

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
UNIDADE ACADÊMICA CENTRO DE TECNOLOGIA
CURSO DE ENGENHARIA QUÍMICA

GUSTAVO HENRIQUE DE VASCONCELOS SILVA

**AVALIAÇÃO E DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE,
ANTIMICROBIANA E ANTIFÚNGICA DO EXTRATO AQUOSO
HIDROALCOÓLICO DE *Syzygium aromaticum*, *Origanum vulgare* e *Rosmarinus
officinalis* COM APLICAÇÃO EM LEITE FERMENTADO COMERCIAL**

Maceió

2024

GUSTAVO HENRIQUE DE VASCONCELOS SILVA

**AVALIAÇÃO E DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE,
ANTIMICROBIANA E ANTIFÚNGICA DO EXTRATO AQUOSO
HIDROALCOÓLICO DE *Syzygium Aromaticum*, *Origanum Vulgare* e *Rosmarinus
officinalis* COM APLICAÇÃO EM LEITE FERMENTADO COMERCIAL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Curso de Engenharia Química da
Universidade Federal de Alagoas, como
requisito parcial à obtenção do título de
Bacharelado em Engenharia Química.

Orientadora: Prof. Dra. Renata Maria Rosas
Garcia Almeida.

Coorientadora: Prof. Dra. Jadriane de
Almeida Xavier.

Maceió
2024

Catlogação na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária: Girlaine da Silva Santos – CRB-4 – 1127

S586a Silva, Gustavo Henrique de Vasconcelos.
Avaliação e determinação da atividade antioxidante, antimicrobiana e antifúngica do extrato aquoso hidroalcoólico de *syzygium aromaticum*, *origanum vulgare* e *rosmarinus officinalis* com aplicação em leite fermentado comercial / Gustavo Henrique de Vasconcelos Silva. – 2024.
[47] f.: il.: color

Orientadora: Renata Maria Rosas Garcia Almeida.
Coorientadora: Jadriane de Almeida Xavier.

Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Engenharia Química: Bacharelado) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de Tecnologia, Maceió, 2024.

Bibliografia: f. [44 – 47].

1. Atividade antioxidante. 2. Atividade antimicrobiana. 3. Antifúngicos. 4. Leite fermentado. 5. Produtos naturais. I. Título.

CDU: 547.9:637.146

GUSTAVO HENRIQUE DE VASCONCELOS SILVA

**AVALIAÇÃO E DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE,
ANTIMICROBIANA E ANTIFÚNGICA DO EXTRATO AQUOSO
HIDROALCOÓLICO DE *Syzygium aromaticum*, *Origanum vulgare* e *Rosmarinus
officinalis* COM APLICAÇÃO EM LEITE FERMENTADO COMERCIAL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao curso de Engenharia Química da
Universidade Federal de Alagoas como
requisito parcial para obtenção do título de
Bacharel em Engenharia Química.

Banca Examinadora:

Documento assinado digitalmente
 **RENATA MARIA ROSAS GARCIA ALMEIDA**
Data: 22/03/2024 11:11:16-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Orientadora: Profa. Dra. Renata Maria Rosas Garcia Almeida
(Universidade Federal de Alagoas)

Documento assinado digitalmente
 **JADRIANE DE ALMEIDA XAVIER**
Data: 22/03/2024 19:15:02-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Coorientadora: Profa. Dra. Jadriane de Almeida Xavier
(Universidade Federal de Alagoas)

Documento assinado digitalmente
 **ALBANISE ENIDE DA SILVA**
Data: 27/03/2024 10:41:39-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Albanise Enide da Silva
(Universidade Federal de Alagoas)

Documento assinado digitalmente
 **JORGE JOSE DE BRITO SILVA**
Data: 27/03/2024 19:29:41-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Jorge José de Brito Silva
(Universidade Federal de Alagoas)

AGRADECIMENTOS

Primeiro de tudo, agradecer à Deus que me permitiu chegar até aqui, por todos os momentos que passei durante a graduação, cada conquista, cada derrota, cada vitória, cada angústia, cada tristeza, por cada lágrima que foi derramada, Deus sabe de tudo e todas as coisas.

Agradecer a minha amada mãe, Jacione Xavier, pelo apoio e força em momentos que tanto precisei.

Agradecer a meus melhores amigos, Gabriel e Ítalo pelo incentivo de sempre, com certeza, sem vocês eu também não teria chegado até aqui, porque mesmo quando ninguém acreditou, vocês acreditaram, toda leveza que vocês me trouxeram em momentos tão conturbados durante a graduação, sem vocês, nada teria sido possível.

Agradecer a meus amigos de curso que iniciaram comigo, Ana, Bruna, Rayanne e Matheus que não só me fortaleceram mais asseguraram que cada momento da nossa trajetória não seria igual. A amigos que também surgiram em meio ao curso, Bia, Cinthya e Itaíza, vocês são pra vida!

Agradecer a amigos que conquistei durante a graduação também, Elison, Amylly, Anne, André, Téo, Tauane, Karla, Paulo, Ari, Mari, Lucas, todos vocês, vou com certeza levar pra vida.

Agradecer também as minhas orientadoras a Prof^ª. Dr^ª. Renata Maria Rosas e Prof^ª. Dr^ª. Jadriane Xavier por toda ajuda, suporte e cuidado na orientação de um trabalho tão novo.

Por fim e não menos importante, agradecer à todos que fazem parte da minha vida, aos professores e colaboradores da empresa em que trabalho, um enorme obrigado!

RESUMO

Os aditivos alimentares se tornaram obrigatórios na alimentação moderna, justamente por sua capacidade de promover qualidade e validade de alimentos industrializados. Muitos alimentos e bebidas que são veiculados pela indústria levam doses desses aditivos que podem comprometer parte da saúde a longo prazo, como resposta a isso, surge o estudo e a demanda em pesquisas sem adição de componentes químicos. Os óleos essenciais são uma alternativa para substituição de aditivos como os conservantes, entretanto, por ser considerado complexo dependendo da erva extraída/obtida, sua estrutura e os compostos bioativos transformam sua atividade antioxidante, antimicrobiana e antifúngica potencializadores quando inseridos em um meio. Este trabalho, visa elaborar um extrato, segundo a legislação, que promova a substituição ou a interação em partes com esses aditivos. Três extratos foram criados e submetidos a uma triagem inicial para avaliação do seu poder antioxidante, com respostas satisfatórias e diluição diferenciadas, o extrato com 60% de água milli-q e 40% álcool etílico respondeu melhor ao ensaio além de mostrar melhor estabilidade. Três grupos de análises foram criados Controle, L+E e EXT. Os ensaios escolhidos para avaliação e determinação da atividade antioxidante foram CTF, FRAP e DPPH[•], todos apresentaram um melhor desempenho da atividade no grupo L+E, exceto o DPPH[•] devido a ação do impedimento estérico. Além disso, um ensaio microbiológico por difusão de ágar trouxe a leitura do potencial antimicrobiano e antifúngico que precisava avaliar, constatando menor crescimento nas placas com o grupo EXT. Ao fim, é possível concluir que o extrato atendeu todas as exigências e desempenhou um papel forte e significativo em todas as atividades, tornando o alimento saudável e agregando aspectos positivos a sua formulação.

Palavras-chave: Antioxidante; Antimicrobiano; Antifúngico; Extrato; Alimentação.

ABSTRACT

Food additives have become mandatory in modern food, precisely because of their ability to promote the quality and validity of processed foods. Many foods and drinks that are distributed by the industry contain doses of these additives that can compromise part of your health in the long term. In response to this, studies and demands for research without the addition of chemical components arise. Essential oils are an alternative to replace certain additives, however, as they are considered complex depending on the herb used, their structure and bioactive compounds transform their antioxidant, antimicrobial and antifungal activity when inserted into a potentiating environment. This work aims to prepare an extract in accordance with legislation that promotes the replacement or interaction in parts with these additives. Three extracts were created and subjected to an initial screening to evaluate their antioxidant power, with guaranteed responses and different dilutions. The extract with 60% milli-q water and 40% ethyl alcohol responded better to the test in addition to showing better stability. Three analysis groups were created Control, L+E and EXT. The assays chosen to evaluate and determine antioxidant activity were CTF, FRAP and DPPH•, all of which showed a better activity performance in the L+E group, except DPPH• due to the action of steric hindrance. Furthermore, a microbiological assay by agar diffusion brought the reading of the antimicrobial and antifungal potential that I evaluated, finding less growth on the plates with the EXT group. In the end, it is possible to conclude that the extract met all criteria and played a strong and significant role in all activities, making the food healthy and adding positive aspects to its formulation.

Keywords: Antioxidant; Antimicrobial; Antifungal; Extract; Food.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura do Eugenol, Acetato de eugenila, Óxido de cariofileno, α -humuleno e β -cariofileno.....	20
Figura 2	Diagrama da representação de uma unidade de hidrodestilação.....	22
Figura 3	Reação entre os compostos fenólicos e os derivados dos ácidos fosfotúngstico e fosfomolibdico em ambiente alcalino, resultando na formação de uma cor azul pelo método de Folin-Ciocalteu (a); Variação de cor observada no ensaio (b).....	24
Figura 4	Estabilização do Radical livre DPPH.....	24
Figura 5	Redução do complexo férrico $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{TPTZ})_2]\text{Cl}_3$ a ferroso $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{TPTZ})_2]\text{Cl}_2$ pela ação de um antioxidante.....	25
Figura 6	Fluxograma da metodologia.....	27
Figura 7	Matérias-primas, da esquerda para a direita: cravo-da-índia (<i>Syzygium aromaticum</i>), orégano (<i>Origanum vulgare</i>) e alecrim (<i>Rosmarinus officinalis</i>). ..	28
Figura 8	Leite Fermentado (Valedourado).....	28
Figura 9	Garrafa de frasco de vidro verde.....	29
Figura 10	Extratos pós-filtrados (A: 70:30, B: 60:40, C:50:50).....	29
Figura 11	Reação do ácido gálico com molibdênio, componente do reagente de Folin-Ciocalteu.....	31
Figura 12	Meio de cultura inserido nas placas de petri.....	33
Figura 13	Grupo Controle.....	39
Figura 14	Grupo L+E.....	40
Figura 15	Grupo EXT.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Proporção vs. Matérias-Primas.....	34
Tabela 2	Resultados da Triagem.....	34
Tabela 3	Avaliação dos resultados de FRAP por concentração e grupo desejado.....	35
Tabela 4	Avaliação dos resultados de CTF por concentração e grupo desejado.....	36
Tabela 5	Avaliação dos resultados de DPPH* por concentração e grupo desejado.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

OE	Óleo Essencial
CEO	Óleo Essencial de Cravo-da-índia
FDA	Food and Drug Administration
GRAS	Geralmente Reconhecido como Seguro
CNAE	Classificação Nacional de Atividades Econômicas
CONCLA	Comissão Nacional de Classificação
REACH	Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals
ECHA	European Chemicals Agency
EUA	Estados Unidos da América
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ISO	International Organization for Standardization
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
OEO	Óleo Essencial de Orégano
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
FRAP	Ferric Reducing Ability Power
TPTZ	2,4,6-tripiridil-1,3,5- triazina
LTBA	Laboratório de Tecnologia de Bebidas e Alimentos
CTEC	Centro de Tecnologia
UFAL	Universidade Federal de Alagoas
LEEO	Laboratório de Eletroquímica e Estresse Oxidativo
IQB	Instituto de Química e Biotecnologia
CTF	Conteúdo Total de compostos Fenólicos
RFC	Reagente de Folin-Ciocalteu
ASR	Capacidade Sequestradora do Radical

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
α	Alfa
β	Beta
$\pm$	Mais ou menos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	16
2.1	Geral	16
2.2	Específico	16
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1	Óleos essenciais e alimentos	17
3.2	Legislação e mercado	18
3.3	Óleos essenciais	19
3.3.1	Cravo	20
3.3.2	Orégano	21
3.3.3	Alecrim	21
3.4	Métodos de obtenção de extratos de óleos essenciais	22
3.4.1	Hidrodestilação	22
3.4.2	Arraste a vapor	22
3.4.3	Solventes orgânicos	23
3.4.4	Prensagem à frio	23
3.4.5	Maceração	23
3.5	Atividade antioxidante	24
3.5.1	Folin-Ciocalteu	24
3.5.2	DPPH	25
3.5.3	FRAP	26
3.6	Métodos para avaliação e determinação da atividade antimicrobiana .	26
3.6.1	Difusão de ágar	27
3.6.2	Diluição em caldo	27
3.7	<i>Aspergillus niger</i>	27
4	METODOLOGIA	29
4.1	Obtenção das matérias-primas e preparo do extrato aquoso	
	Hidroalcólico	29
4.2	Triagem	32
4.3	Teste de aplicação	32
4.4	Análises bioquímicas	33

4.4.1	Avaliação do conteúdo total de compostos fenólicos (CTF)	33
4.4.2	Avaliação da capacidade redutora de ferro (FRAP)	33
4.4.3	Avaliação da capacidade antioxidante frente ao radical DPPH•	34
4.5	Análises Microbiológica	34
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	36
5.1	Triagem dos extratos	36
5.2	Ensaio bioquímicos	36
5.2.1	Avaliação da capacidade redutora de ferro (FRAP)	36
5.2.2	Avaliação do conteúdo total dos compostos fenólicos (CTF)	37
5.2.3	Avaliação da atividade antioxidante frente ao radical DPPH•	38
5.3	Ensaio microbiológico	39
6	CONCLUSÃO	43
	REFERÊNCIAS	44

1 INTRODUÇÃO

A necessidade de preservar as características dos alimentos com o aumento de tempo de prateleira, surge desde a pré-história, como forma de armazenamento de alimentos para os grandes períodos de escassez. Os princípios dos métodos são utilizados até os dias atuais, como a aplicação do calor na defumação, concentração com sal para conservar carnes, fermentação para aumentar a shelf life de produtos de origem vegetal ou animal (CAROCHO et al., 2014; SILVA et al., 2014).

Alguns aditivos na área alimentícia são mais tóxicos do que outros, incluindo conservantes cancerígenos como o nitrato de sódio e nitritos, não havendo necessidade destes se fossem utilizados óleos essenciais para conservação de alimentos. Podendo ser mantida de forma simples e não-tóxica além das propriedades antibacterianas dos óleos mantendo os alimentos saudáveis, e estimulando o sistema de defesa antimicrobiana do corpo. As propriedades antioxidantes de alguns óleos essenciais podem aumentar a vida útil dos alimentos, proporcionando uma vida saudável ao consumidor.

A demanda por produtos sem adição de compostos químicos sintéticos estimula pesquisas sobre a viabilidade de sua produção (RAMOS, 2017). Dessa forma, existem muitas substâncias interessantes para a composição de um possível extrato.

O *Syzygium aromaticum* (cravo-da-índia) é uma flor aromática cultivada em Madagáscar, Sri Lanka, Indonésia e China. Vários relatos sugerem que *S. aromaticum* L. contém aproximadamente 15-20% em peso de óleo essencial (OE). O óleo essencial de cravo (CEO) contém uma alta quantidade de compostos fenólicos com diversas atividades biológicas, incluindo propriedades antibacterianas, antifúngicas, inseticidas e antioxidantes. A FDA (Food and Drug Administration) classifica o CEO como geralmente reconhecido como seguro (GRAS); por isso, é utilizado em perfumes, cosméticos, medicamentos e alimentos.

Origanum vulgare L. (orégano) tem-se mostrado promissor em estudos de bioprospecção, com atividade antimicrobiana *in vitro* e *in vivo* em relação a diversas espécies de fungos e bactérias (CLEFF et al., 2010; MITCHELL et al., 2010; CLEFF et al., 2013). No óleo essencial de orégano, foram descritos em torno de 34 compostos ativos, entre os quais 80% a 98% são fenóis, considerados os responsáveis pela atividade antimicrobiana e antioxidante (KABOUCHE et al., 2005).

Rosmarinus officinalis L., pertencente à família Lamiaceae, também conhecida popularmente como “alecrim”, “alecrim rosmarinho”, “flor-de-olimpio”, “rosmarinho”, é uma planta de aspecto subarbustivo lenhoso, ramificado, que chega até 1,5 m de altura, aromática,

flores azulada-claras, o *Rosmarinus officinalis* é uma planta oriunda da região do Mediterrâneo e cultivada em quase todos os países (LORENZI; MATOS, 2008). As propriedades terapêuticas presentes em seu óleo essencial apresentam atividade antisséptica, antifúngica, inseticida, antioxidante, adstringente, antimicrobiana, anti-inflamatória e antitumoral (WOLFFENBUTTEL, 2010; MATIOLLI, 2014).

O leite fermentado apresenta um elevado potencial no desenvolvimento de novos produtos, principalmente por estar relacionado com a saúde e com a praticidade no consumo. Recentemente, as indústrias de alimentos têm explorado essa matriz devido a suas características, que permite a viabilidade funcional dos ingredientes adicionados, a aceitabilidade dos produtos lácteos, e a relação que os consumidores fazem com o aspecto de saudabilidade. Os alimentos funcionais são todos os alimentos ou bebidas que, consumidos na alimentação diária, podem conferir benefícios fisiológicos específicos, devido à presença de compostos biologicamente ativos (COSTA, 2013).

Dessa forma, o leite fermentado será a principal ferramenta de estudo entre a sinergia das ervas avaliando parâmetros que englobem as atividades antioxidante, antimicrobiana e antifúngica.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a atividade antioxidante, antimicrobiana e antifúngica no extrato aquoso hidroalcolólico composto por cravo (*S. aromaticum*), orégano (*O. vulgare*) e alecrim (*R. officinalis*) em um leite fermentado comercial a fim de investigar alterações em propriedades sensoriais, além de correlacionar a substituição de aditivos que possuem a função de conservantes, sendo traçada uma rota alternativa e saudável para o mesmo fim.

2.2 Específicos

- Avaliar a atividade antioxidante, antimicrobiana e antifúngica durante as análises dos grupos controle, L+E (Leite + Extrato) e EXT (Extrato).
- Classificar a validade e o prolongamento de vida útil do produto.
- Caracterizar um produto de fácil aceitação no mercado e na indústria.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Óleos essenciais e alimentos

Os óleos essenciais (OEs) de plantas são comumente comercializados em função de sua capacidade aromatizante. No entanto, tem despertado grande interesse devido às propriedades funcionais que também se apresentam como antimicrobianos. Coerentemente com a imagem saudável, os conservantes naturais vêm adquirindo expressividade na aplicação em alimentos (BUSATTA et al., 2007). No mercado europeu estão disponíveis conservantes alimentícios compostos por 50% de OEs (alecrim, artimísia e citrus) e 50% de glicerol (MENDONZA-YEPES et al., 1997). Outros produtos são encontrados também nos Estados Unidos a base de OEs dispersos em soluções de citrato de sódio ou cloreto de sódio, reconhecidos como aditivos alimentícios seguros (CUTTER, 2000). Entretanto, é insignificante a quantidade desses conservantes alimentícios contendo OEs está disponível no mercado quando comparada aos demais conservantes usuais.

Visando à aplicação como conservantes alimentícios, estudos têm buscado a verificação da ação antimicrobiana dos OEs aplicados diretamente em alimentos. Mendonça (2004) verificou inibição significativa no crescimento de *Staphylococcus aureus* quando inoculado em ricota com adição de 1% de OE do *Syzygium aromaticum* (cravo-da-índia), com redução de 4,27 ciclos logarítmicos quando comparada ao crescimento de *S. aureus* em ricota sem adição de óleo. Em ricota adicionada de 1% de OE de orégano houve redução de 3,36 e 1,88 ciclos logarítmicos na população de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, respectivamente (ALARCON, 2007). Busatta et al. (2007) obtiveram resultados que demonstraram que a adição de OE de orégano (*Origanum vulgare*) em linguiça pode ser uma via promissora para ação bacteriostática, no entanto, a aceitação sensorial decresce com o aumento da concentração de óleo adicionada. Avaliando o OE de manjerona (*Origanum majorana* L.) Busatta et al. (2008) observaram que esse óleo aplicado em linguiça exerceu um efeito bacteriostático quando adicionado em concentração equivalente à Concentração Inibitória Mínima (CIM) e em concentrações maiores exerceu um efeito bactericida, entretanto, ocorreram alterações no paladar do produto.

Apesar do fato de que Smith-Palmer, Stewart & Fyfe (1998) obtiveram efeito bactericida in vitro com concentrações menores que 0,1% de OEs de diversas plantas, mas Smith-Palmer, Stewart & Fyfe (2001) evidenciaram que concentrações de 0,5 e 1% desses óleos são necessárias para inibir com êxito a contaminação de alimentos. Além disso, o uso de

concentrações insuficientes permitiu o restabelecimento de células injuriadas não letalmente e foi verificado que a composição química, em relação à gordura, da matriz alimentar mostrou ser um importante fator na determinação da eficiência dos OEs. Assim, acredita-se que a necessidade do uso de altas concentrações de OEs em alimentos do que em meios laboratoriais é devido a um ambiente de crescimento mais complexo no alimento, o qual providencia grande proteção às células microbianas contra os agentes antimicrobianos. O uso de OEs, nas concentrações necessárias para serem efetivos como conservantes em alimentos, despertam o interesse de adequação em relação às alterações nas propriedades sensoriais do produto. Smith-Palmer, Stewart; Fyfe (2001) expuseram algumas visões tecnológicas para essa adequação.

3.2 Legislação e Mercado

No Brasil, a CNAE (Classificação Nacional de Atividades Econômicas) é o instrumento de padronização nacional dos códigos de atividade econômica e dos critérios de enquadramento utilizados pelos diversos órgãos da administração tributária do país.

A CNAE foi elaborada pela Comissão Nacional de Classificação (CONCLA), sendo usada pelo IBGE para a coleta e processamento dos dados de produção. Os produtos são organizados segundo uma hierarquia associada ao seu processo de fabricação. Os óleos essenciais são classificados dentro da Seção C, “Indústrias de Transformação”, na divisão 20, “Fabricação de Produtos Químicos”, grupo 20.9, “Fabricação de produtos e preparados químicos diversos”, classe 20.93-2 “Fabricação de aditivos de uso industrial”. Dentro da subclasse, todos os óleos essenciais são agrupados em apenas três categorias: OEs de laranja (2093.2280), OEs de outros cítricos, excluindo os de laranja (2093.2270) e outros OEs (2093.2295). Essa distribuição impossibilita a coleta de informações sobre a produção de óleos específicos, como óleo de eucalipto ou o óleo de uma espécie específica de menta, por exemplo.

Para a União Europeia, toda a legislação do REACH (*Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals*), emitida pela Agência Europeia de Produtos Químicos (*European Chemicals Agency* – ECHA) tem que ser cumprida. “Sem dados, sem mercado” (*No data, no market*) é o moto do REACH. Óleos essenciais são classificados pela ECHA como “substâncias naturais complexas” e precisam ser caracterizados do ponto de vista químico (composição), biológico (toxicológico) e ambiental (biodegradabilidade, bioacumulação). A China e os EUA adotaram uma legislação similar.

No caso dos EUA, é aplicada somente para produtos comercializados em quantidades acima de 1 tonelada. O mercado interno brasileiro, comparativamente, é bem menos regulado.

Registro ou regulamentação não se aplicam ao OE mas em função da sua forma de uso. Em alimentos, os OEs são classificados como aditivos alimentares e, uma vez que constem em documentos internacionais, como o Codex Alimentarius, estão isentos de registro.

Por outro lado, no Brasil, fitoterápicos (óleos essenciais incluídos) são considerados como medicamentos. Portanto, para fins medicinais, OEs devem seguir as avaliações de segurança e eficácia previstas na RDC 26/201442 e em outras normas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Se usados como excipientes, os estudos de segurança e eficácia deverão ser realizados nos produtos finais (medicamento ou cosmético), também seguindo regulamento específico. É importante mencionar que os regulamentos citados estão em processo de revisão pela ANVISA e modificações são esperadas, particularmente com o aumento das exigências para registro e autorização de uso.

3.3 Óleos Essenciais

Os óleos essenciais podem ser definidos segundo a norma 9235 da *International Organization for Standardization* (ISO), como:

[...] produtos obtidos de matérias-primas naturais de origem vegetal, por destilação a vapor, por processos mecânicos a partir do epicarpo de frutos cítricos, ou por destilação a seco, após a separação da fase aquosa – se houver – por processos físicos. (ISO, 2021)

Logo, extratos contendo voláteis obtidos com solventes, ceras e gorduras, fluidos supercríticos, técnicas de *headspace* ou quaisquer outros meios não são óleos essenciais. Na mesma norma técnica são apresentadas as definições e designações para esses outros tipos de produtos aromáticos. Essa definição é seguida internacionalmente pela indústria e associações científicas e regulatórias do setor.

Já pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), os óleos essenciais podem ser definidos como:

“São produtos voláteis de origem vegetal obtidos por processo físico (destilação por arraste com vapor de água, destilação a pressão reduzida ou outro método adequado). Os óleos essenciais podem se apresentar isoladamente ou misturados entre si, retificados, desterpenados ou concentrados. Entende-se por retificados, os produtos que tenham sido submetidos a um processo de destilação fracionada para concentrar determinados componentes; por concentrados, os que tenham sido parcialmente desterpenados; por desterpenados, aqueles dos quais tenha sido

retirada a quase totalidade dos terpenos.” (Brasil, Resolução N°2 de 15 de Janeiro de 2007)

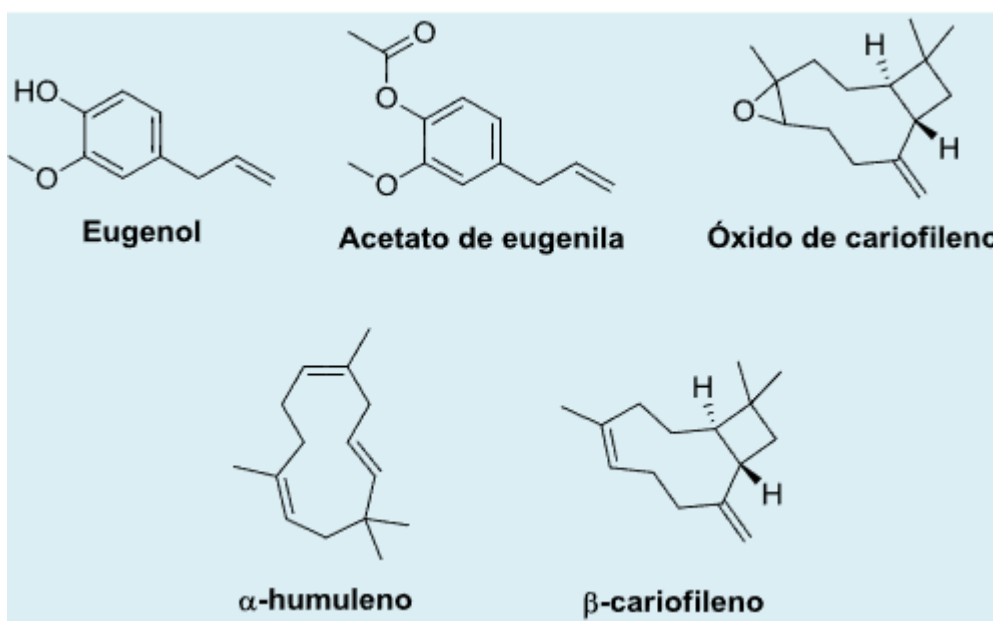
3.3.1 Cravo

Segundo o MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento),

O cravo-da-índia é o botão floral da espécie *Eugenia Caryophyllata*, Thunb, de sabor picante e aroma intenso, colhido antes de desabrochar quando da passagem da coloração verde/amarela clara para róseo/vermelha e que quando desidratado, face a seu preparo, mediante secagem natural e/ou artificial, apresenta a coloração da haste pardo-escura, liso, e as pétalas não desabrochadas de tonalidade mais clara e brilhante.” (Brasil, Portaria 159/1981, MAPA)

Oliveira et al. (2009) relataram a composição química dos compostos voláteis extraídos de *S. aromaticum* (folhas, caules e botões florais). Os resultados mostram que o eugenol (4-alil-2-metóxfenol) e o acetato de eugenila são os principais componentes do extrato, obtidos por hidrodestilação, corroborando os resultados de outros autores (AFFONSO, 2012; CHAIEB, 2007; SANTORO, 2007; et al.). A figura 1 apresenta a estrutura dos principais compostos extraídos de *S. aromaticum*.

Figura 1 – Estruturas do Eugenol, Acetato de eugenila, Óxido de cariofileno, α -humuleno e β -cariofileno.



Fonte: Affonso (2014)

3.3.2 Orégano

O orégano, conhecido cientificamente como *Origanum vulgare* L., pertence à família Lamiaceae (Labiatae) da qual também faz parte, manjerição (*Ocimum basilicul* L.), alfavaca (*Ocimum gratissimum* L.), hortelã (*Mentha arvensis* L.), alfazema (*Lavandula angustifolia* Mill.), alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), sálvia (*Salvia officinalis* L.). O gênero *Origanum*, possui mais de 205 espécies destacando-se *Origanum majorana* L e *Origanum vulgare* como as mais importantes. Essas duas espécies são bastante confundidas principalmente no sul do Brasil, em que o orégano é denominado manjerona. Apesar de pertencerem à mesma família, essas espécies possuem características distintas.

Em relação a esse condimento, são inúmeros os estudos que o utiliza na medicina, para o tratamento de tosse, desordens do trato digestivo e problemas menstruais. Além disso, é apresentado diversas vezes na literatura por possuir inúmeros compostos benéficos a saúde de quem o consome, como o carvacrol e timol que possuem atividades anti-inflamatórias, antibacterianas e antioxidantes, além dos efeitos fungicidas e anticâncer que lhe é presente (HAN, 2017; OLMEDO, 2014; PEZZANI, 2017; et al.).

No entanto, a eficácia da atividade bactericida de óleo essencial de orégano (OEO) pode variar em função dos teores de timol e carvacrol presentes, que dependem de fatores abióticos como tipo de solo, clima, práticas agrícolas, variedade do orégano e processo de extração do óleo essencial (CONSENTINO et al., 1999).

3.3.3 Alecrim

O alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) é amplamente utilizado na medicina popular, apresenta gosto agri-doce, sendo usado em pães, preparações que contenham carne e para adornar saladas. Também é empregado em batatas fritas, caldos verdes, sobremesas, biscoitos, geleias, saladas de frutas, marmeladas e vinhos quentes. Nos Estados Unidos é utilizado em carnes, aves, peixes e linguiças e no Marrocos é adicionado à manteiga e a outros alimentos para aumentar a vida-de-prateleira dos produtos (SCHWAGER et al., 2016).

Rosmarinus officinalis apresenta diferentes antioxidantes, diterpenos e triterpenos, bem como flavonóides (BASTOS, 2011). Na verdade, o alecrim e a sálvia são dois dos condimentos antioxidantes mais potentes, sobretudo, em banha de porco. As propriedades antioxidantes do extrato de alecrim têm recebido considerável atenção nos últimos anos, sendo reconhecidas desde a Antiguidade. Mas recentemente, tentativas têm sido realizadas para determinar a

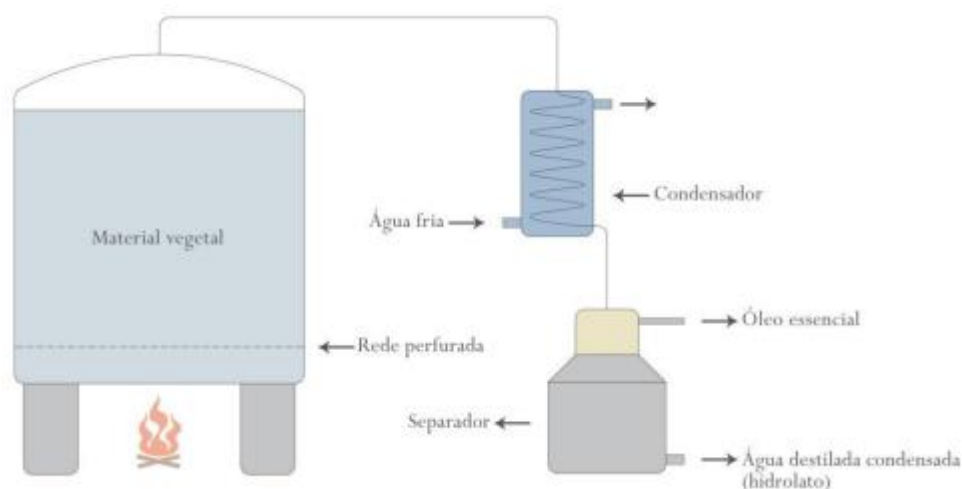
estrutura química dos constituintes ativos do vegetal, sendo que, rosmanol e os diterpenos rosmaridifenol e rosmariquinona já foram identificados (BABOVIC et al., 2010).

3.4 Métodos de obtenção de extratos de Óleos Essenciais

3.4.1 Hidrodestilação

Neste processo o material vegetal é colocado num destilador cilíndrico com água e levado à ebulição (Figura 2). Com o aquecimento, a água evapora, arrastando os componentes voláteis presentes no material vegetal, sendo condensados numa serpentina de condensação. No condensado formam-se duas fases, a serem separadas num decantador e recolhidas num frasco de coleta (denominado vaso florentino): o OE e a água destilada condensada, que consiste na mistura de água com compostos solúveis.

Figura 2 – Diagrama da representação de uma unidade de hidrodestilação.



Fonte: Serrano; Figueiredo (2018).

3.4.2 Arraste à vapor

O processo de extração por arraste à vapor é um processo de custo médio e muito usado em óleos que são usados em alimentos e na cosmetologia, por não ter necessidade um tratamento pós extração. Ele se dá à medida que o fruto, folhas ou flores é submetido a uma corrente de vapor de água que faz com que as substâncias voláteis presentes, que são mais leves

que o vapor de água, sejam levadas até um condensador que resfria os vapores os tornando líquido novamente para que possam ser separados pela diferença de densidade.

3.4.3 Solventes orgânicos

Determinados tipos de óleos são muito instáveis, não suportando aumentos de temperatura. Neste caso, utilizam-se solventes orgânicos para sua extração, tais como hexano, benzeno, metanol, etanol, propanol, acetona, pentano e diversos solventes clorados (FILIPPIS, 2001), sendo que, geralmente tem-se preferência por solventes apolares (FÜLLER, 2008), ressaltando-se que o benzeno é um dos mais utilizados. As principais características que o solvente deve ter são: a seletividade, uma baixa temperatura de ebulição, ser quimicamente inerte e possuir um baixo custo (BIASI & DESCHAMPS, 2009).

3.4.4 Prensagem a frio

É um método de extração comumente utilizados para espécies de Citrus (laranja, bergamota, toranja, limão, etc.) e de algumas sementes para obter os óleos essenciais. Também conhecida como 'prensagem a frio', pois não requer fonte de aquecimento, preservando a qualidade olfativa intacta do produto final. Através da utilização de prensas hidráulicas, ocorre a prensagem (esmagamento) do fruto que produz o suco e o óleo essencial. O óleo essencial é então separado do suco através de jatos d'água, formando uma emulsão que posteriormente é separada através de uma das seguintes operações unitárias: decantação, centrifugação ou destilação fracionada.

3.4.5 Maceração

O processo de maceração é aonde as plantas, devidamente secas, entram em contato com um solvente, podendo ser com álcool, óleos vegetais e até água, onde vai se dissolvendo e liberando seus princípios ativos. As plantas devem estar em pedaços pequenos, para que possa ter um contato maior com o solvente, sendo agitado diariamente o recipiente para ajudar na extração (EVANGELISTA, ARCE, 1997; TREVIZANI, 2019; VILAR, 2019).

3.5 Atividade antioxidante

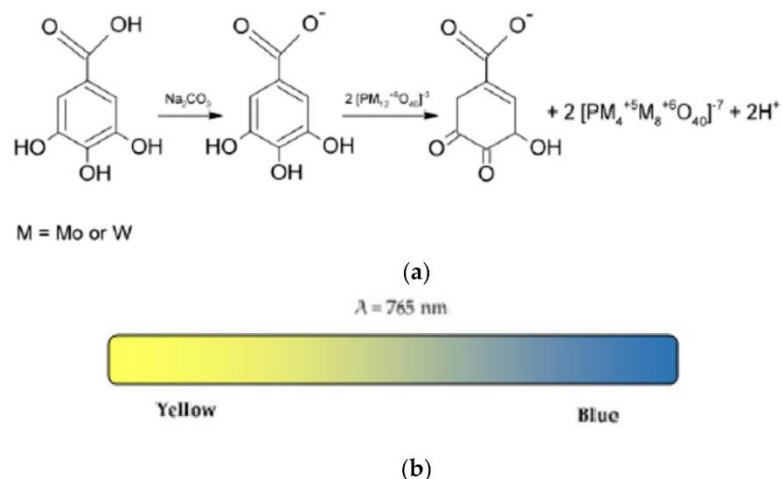
Antioxidantes são substâncias que retardam as reações de degradação oxidativa, ou seja, reduzem a velocidade da oxidação por um ou mais mecanismos, como inibição de radicais livres e complexação de metais. As substâncias antioxidantes podem apresentar diferentes propriedades protetivas e agir em diversas etapas do processo oxidativo, funcionando por diferentes mecanismos e são, portanto, classificadas em duas categorias principais: antioxidantes primários e secundários.

São considerados primários os compostos de ação antioxidante capazes de inibir ou retardar a oxidação por inativação de radicais livres graças à doação de átomos de hidrogênio ou de elétrons, o que transforma os radicais em substâncias estáveis. Os antioxidantes secundários apresentam uma grande variedade de modos de ação: ligação de íons metálicos (alteração de valência); conversão de hidroperóxidos em espécies não-radicais ou absorção de radiação ultravioleta (UV).

3.5.1 Folin-Ciocalteu

O ensaio de Folin-Ciocalteu é frequentemente utilizado para avaliar o teor de fenóis totais de um extrato vegetal, geralmente existe uma correlação positiva entre o teor de fenóis totais e a capacidade antioxidante de um produto natural. Esse ensaio baseia-se na redução do reagente de Folin-Ciocalteu com compostos fenólicos em estado alcalino. O reagente de Folin-Ciocalteu contém um complexo do ácido fosfomolibdico/fosfotúngstico, no qual o molibdênio e o tungstênio estão no estado de oxidação VI (coloração amarela) e que são reduzidos para obter um cromóforo azul com absorção máxima a 765 nm. O íon molibdênio central no complexo é aceito como um sítio redutor, onde o Mo (IV) íon é reduzido a Mo (V) aceitando um elétron doado pelo antioxidante fenólico. A figura 3 apresenta a reação de redução entre os compostos fenólicos e o ácido gálico, um antioxidante bastante conhecido e utilizado como padrão positivo em ensaios antioxidantes.

Figura 3 – Reação entre os compostos fenólicos e os derivados dos ácidos fosfotúngstico e fosfomolibdico em ambiente alcalino, resultando na formação de uma cor azul pelo método de Folin-Ciocalteu (a); Variação de cor observada no ensaio (b).

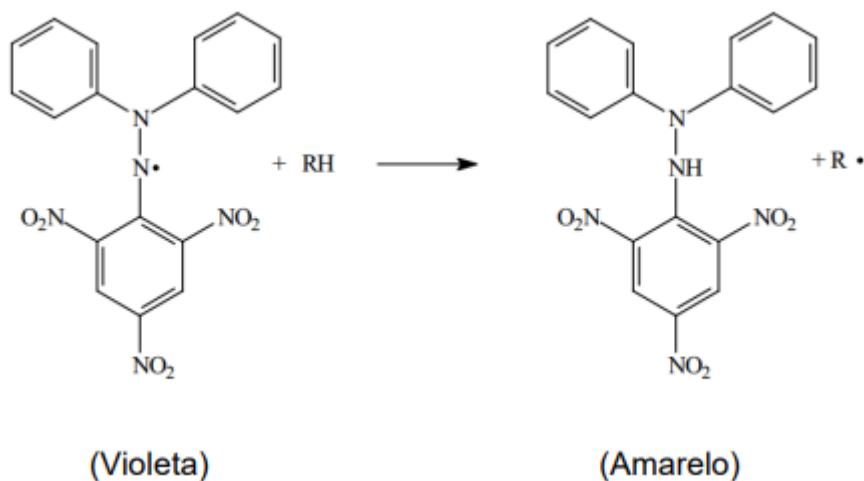


Fonte: Serrano; Figueiredo, 2018.

3.5.2 DPPH

O método DPPH (BRAND-WILLIAMS et al., 1995) é baseado na captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) por antioxidantes, produzindo um decréscimo da absorbância a 515 nm. Esse método foi modificado por SÁNCHEZ-MORENO et al. (1998) para medir os parâmetros cinéticos. O DPPH é um radical livre que pode ser obtido diretamente por dissolução do reagente em meio orgânico (Fig. 4).

Figura 4 – Estabilização do Radical livre DPPH.

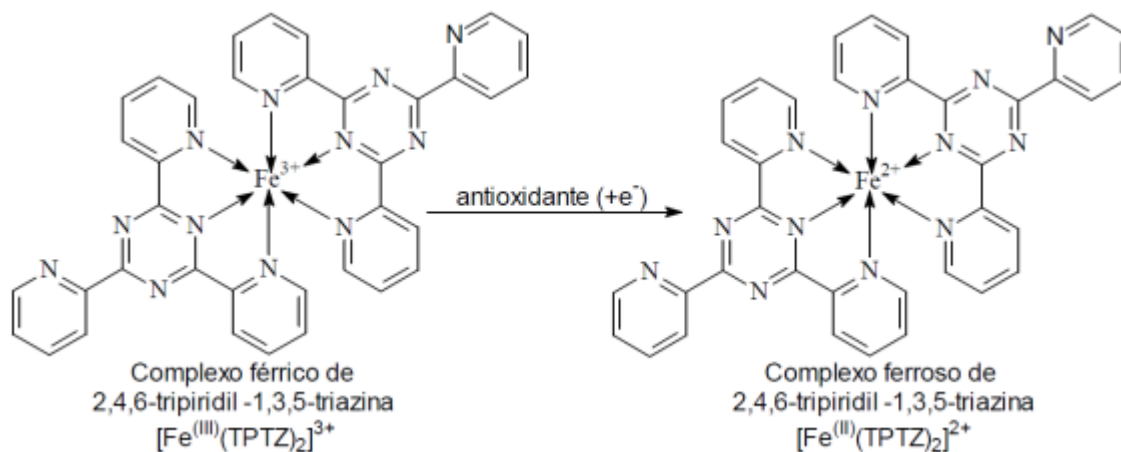


Fonte: RUFINO; ALVES; BRITO et al., 2007)

3.5.3 FRAP

O ensaio FRAP (*Ferric Reducing Ability Power*) determina o poder de redução de antioxidantes utilizando o reagente ferricianeto de potássio ou o hexacianoferrato (III) de potássio. Inicialmente, ocorre a formação do complexo oxidado de Fe^{3+} , o 2,4,6-tripiridil-1,3,5-triazina (TPTZ) após reação com cloreto férrico (BOROSKI et al., 2015). A figura 5 demonstra a redução do complexo de ferro na molécula.

Figura 5 – Redução do complexo férrico $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{TPTZ})_2]\text{Cl}_3$ a ferroso $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{TPTZ})_2]\text{Cl}_2$ pela ação de um antioxidante.



Fonte: PRIOR et al., 2005.

3.6 Métodos para avaliação e determinação da atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana de extratos vegetais é avaliada através da determinação de uma pequena quantidade da substância necessária para inibir o crescimento do microrganismo-teste; esse valor é conhecido como Concentração Mínima Inibitória (CMI). Um aspecto bastante relevante na determinação da CMI de extratos vegetais é a preocupação em relação aos aspectos toxicológicos, microbiológicos e legais pertinentes aos compostos naturais ou suas combinações (PINTO et al., 2003).

O estudo de agentes antimicrobianos tem grande abrangência, sendo ponto crucial em vários setores do campo farmacêutico e cosmético. Outro ponto a ser ressaltado é a utilização desse estudo como primeiro *screening* na descoberta da atividade farmacológica de novos agentes, sendo de extrema importância, principalmente em um país como o Brasil que oferece uma imensa biodiversidade.

3.6.1 Difusão de ágar

O teste de difusão em ágar, também chamado de difusão em placas, é um método físico, no qual um microrganismo enfrenta uma substância biologicamente ativa em meio de cultura sólido e relaciona o tamanho da zona de inibição de crescimento do microrganismo testado, com a concentração da substância ensaiada (PINTO et al., 2003).

A avaliação é comparativa frente a um padrão biológico de referência (controle positivo) e a zona ou o halo de inibição de crescimento é medida partindo-se da circunferência do disco ou poço, até a margem onde há crescimento de microrganismos (BARRY; THORNSBERRY, 1991). Conforme a dimensão do halo os microrganismos podem ser classificados como: sensíveis, quando o diâmetro da zona de inibição é maior ou não mais do que 3 mm menos que o controle positivo; moderadamente sensíveis, halo maior que 2 mm, mas menor que o controle positivo de mais de 3 mm; e resistentes, diâmetro igual ou menor que 2 mm (OSTROSKY et al., 2008).

3.6.2 Diluição em caldo

O método de diluição em caldo considera a relação entre a proporção de crescimento do microrganismo desafiado no meio líquido e a concentração da substância ensaiada. A avaliação é comparada frente a um padrão biológico de referência. Entende-se por proporção a densidade da turbidez provocada pelo crescimento microbiano (PINTO et al., 2003).

O método fornece resultados quantitativos e não é influenciado pela velocidade de crescimento dos microrganismos. Sua desvantagem é a dificuldade na detecção de contaminação no caso de teste de materiais clínicos. Como controle positivo, utiliza-se o caldo com o quimioterápico padrão com a suspensão padronizada de microrganismo em teste, e como controle negativo o meio de cultura com o solvente usado para dissolução da amostra e a suspensão microbiana (SAHM & WASHINGTON II, 1991). Duas metodologias podem ser empregadas: macro e microdiluição.

3.7 Fungo *Aspergillus niger*

O gênero *Aspergillus* é um anamórfico pertencente à família Trichocomaceae, ordem Eurotiales, subclasse Eurotiomycetidae, classe Eurotiomycetes, filo Ascomycota. Sua

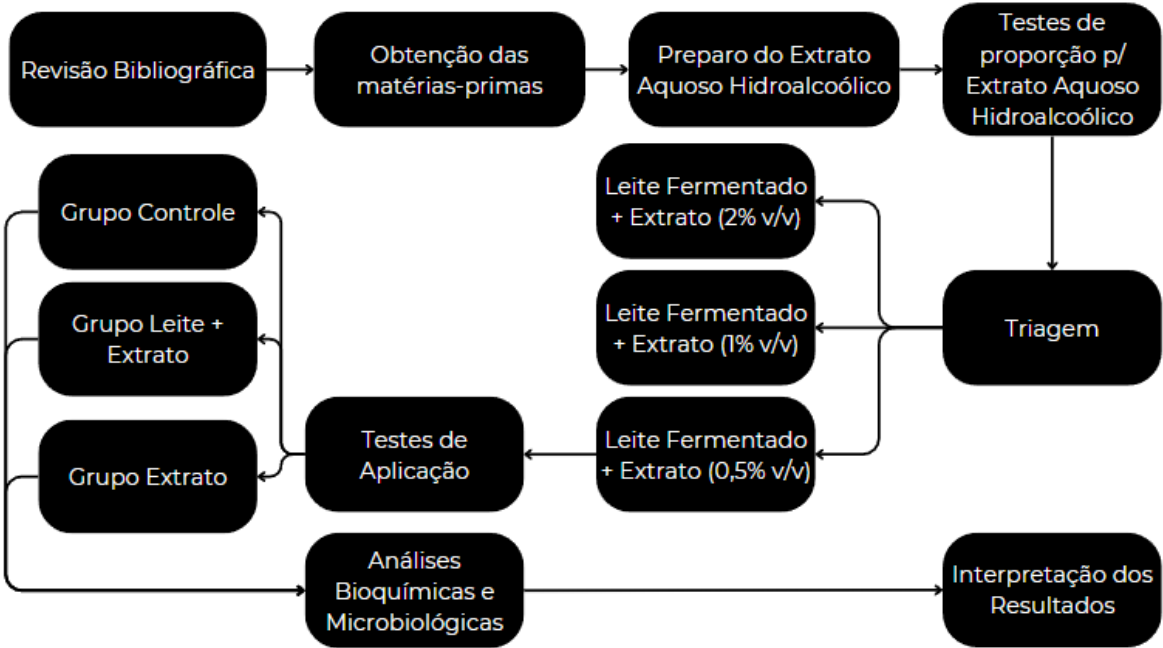
reprodução é assexuada e caracteriza-se pela produção de fiálides e conídios em cadeia. O conidióforo de *Aspergillus* é simples, usualmente aseptado e termina numa vesícula, onde ficam inseridas as fiálides. Algumas espécies podem produzir células Hülle ou esclerócios. Muitas espécies de *Aspergillus* apresentam telemorfos e se reproduzem sexualmente. (KLICH, 2002).

O fungo já foi utilizado para avaliação da atividade antifúngica dos extratos de plantas e óleo de eucalipto quando isolado de pêlo de cães. Este fungo foi escolhido, pois é o sapróbio mais frequente encontrado na microbiota normal dos pêlos dos cães e no ambiente, e em caso de baixa imunidade, este fungo pode causar graves casos de dermatofitose pelo fato de ser oportunista.

4 METODOLOGIA

A presente metodologia foi realizada no Laboratório de Tecnologia de Bebidas e Alimentos (LTBA) do Centro de Tecnologia da UFAL (CTEC-UFAL) e no Laboratório de Eletroquímica e Estresse Oxidativo (LEEO) do Instituto de Química e Biotecnologia da UFAL (IQB-UFAL), seguindo as etapas da figura 6.

Figura 6 – Fluxograma da metodologia.



Fonte: Autor, 2024.

4.1 - Obtenção das Matérias-Primas e Preparo do Extrato Aquoso Hidroalcoólico

As matérias-primas de: cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), orégano (*Origanum vulgare*) e alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e leite fermentado foram comprados com a melhor viabilidade em loja física da erva doce & doce erva e em seguida o acesso aos patrimônios genéticos foram devidamente cadastrados no SISGEN (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado) sob nº A988325. As figuras 7 e 8 demonstram o aspecto das matérias-primas e do leite fermentado utilizado neste trabalho.

Figura 7 – Matérias-primas, da esquerda para a direita: cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), orégano (*Origanum vulgare*) e alecrim (*Rosmarinus officinalis*).



Fonte: Autor, 2024.

Figura 8 – Leite Fermentado (Valedourado).



Fonte: Autor, 2024.

Foram realizadas pesagens de cada matéria-prima com proporções iguais para obtenção do melhor extrato aquoso hidroalcolico, com diferentes proporções de água e álcool para estudo e desenvolvimento de uma triagem conforme a tabela 1 apresentada abaixo.

Tabela 1: Proporção vs. Matérias-Primas

	70%H₂O: 30%EtOH	60%H₂O: 40%EtOH	50%H₂O: 50%EtOH
Cravo	5,0792g	5,0131g	5,0181g
Orégano	3,0826g	3,0145g	3,0021g
Alecrim	1,0777g	1,0132g	1,0022g
Água	70,6721g	60,1434g	50,2317g
Álcool	30,8786g	40,7536g	50,2356g

Fonte: Autor, 2024.

O extrato hidroalcólico foi realizado após a pesagem das matérias-primas e reservado em um frasco de vidro verde, para se ter a menor incidência de contato com a luminosidade criando um sistema próprio de extração por maceração estática em que o solvente sequestra os compostos ativos para si, e por fim, filtrando mais tarde partículas sólidas com papel de filtro. A figura 9 evidencia a garrafa utilizada como meio durante o processo.

Figura 9 – Garrafa de frasco de vidro verde.



Fonte: Autor, 2024.

A extração durou 15 dias para cada extrato na garrafa, gerando 3 extratos diferentes: extrato 70:30 (70% de Água Milli-q e 30% de Álcool Etílico P.A.), extrato 60:40 (60% de Água Milli-q e 40% de Álcool Etílico P.A.) e extrato 50:50 (50% de Água Milli-q e 50% de Álcool Etílico P.A.). A figura 10 revela o aspecto dos extratos abaixo.

Figura 10 – Extratos pós-filtrados (A: 70:30, B: 60:40, C: 50:50)



Fonte: Autor, 2024.

4.2 - Triagem

A triagem surgiu a partir do momento em que os testes de viabilidade com o leite fermentado começaram a ser realizados, pela concentração, muitos testes poderia gerar interferentes já que a leitura de boa parte das análises é realizada por um comprimento de onda em um espectrofotômetro. Dependendo da diluição, já era esperado a mudança de parâmetros como: cor e cheiro, dessa forma, se viu a necessidade de criar a triagem para concluir esta realização.

As diluições adotadas para emulsificação com o leite fermentado foram: 2%, 1%, e 0,5%, estudando seus comportamentos organolépticos e atribuindo a análise de DPPH* como guia de escolha de atividade e estabilidade diante da emulsificação leite-extrato, assim, facilitando a escolha da melhor diluição para interpretação dos resultados.

4.3 - Testes de Aplicação

Com a alíquota mãe escolhida (0,5% v/v), realizamos testes para construção da confiabilidade dos resultados, levando a uma diluição seriada para melhor interpretação em

cada ensaio bioquímico. Um sistema de grupos foi criado para visualizar a ação do extrato, sendo ele: Controle (Apenas leite), L+E (Leite com extrato) e EXT (Somente extrato), dessa forma, nos permitiria alcançar a leitura nos comprimentos de onda segundo a metodologia sem interferências por coloração ou mistura do produto obtido. Cada ensaio teve sua própria diluição seriada e interpretação acerca do resultado.

4.4 - Análises Bioquímicas

4.4.1 - Avaliação do conteúdo total de compostos fenólicos (CTF)

O conteúdo total de compostos fenólicos foi obtido segundo o método de Folin-Ciocalteu (RFC), descrito por Cicco et al (2009) com algumas modificações. Inicialmente, o extrato foi diluído em etanol na concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, em seguida, foram adicionados aos tubos de ensaio, 120 μL da amostra, 180 μL de água, 300 μL do reagente de Folin-Ciocalteu e 2,4 mL de carbonato de sódio a 5% (m/v) totalizando o volume final de 3 mL. Os tubos foram colocados em banho-maria na temperatura de 40°C , no escuro pelo tempo de 20 min. Por fim, as medidas espectrofotométricas foram realizadas no UV-Vis (Agilent 8453) em $\lambda = 760 \text{ nm}$.

O conteúdo total de compostos fenólicos (CTF) foi obtido por meio de uma curva analítica preparada a partir da solução etanólica de ácido gálico ($0,7 - 7,0 \text{ mg L}^{-1}$) e os resultados foram expressos em miligramas equivalentes de ácido gálico por grama do extrato (mg de EAG/g do extrato seco).

4.4.2 - Avaliação da capacidade redutora de ferro (FRAP)

A determinação da capacidade antioxidante por meio da redução de ferro (III) (FRAP) foi obtida segundo o método de Larrauri et al (1997), com algumas alterações. O método consiste na medida da habilidade que os compostos antioxidantes presentes na amostra têm de reduzirem em meio ácido ($\text{pH} = 3,6$) o complexo Fe (III) / TPTZ (2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina) $[\text{Fe(III)(TPTZ)}_2]^{3+}$, para formar o complexo $\text{Fe (II) } [\text{Fe(II)(TPTZ)}_2]^{2+}$ de coloração azul, com absorção em 595 nm.

O reagente FRAP foi preparado a partir da mistura de 25 mL de tampão acetato (300 mM, $\text{pH} = 3,6$), 2,5 mL solução TPTZ (20 mM em HCl 40 mM) e 2,5 mL da solução de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (10 mM), sendo preparado apenas no momento da análise. Em cada tubo de ensaio,

adicionou-se 90 µL da amostra (100 µg mL⁻¹), 270 µL do solvente e por fim adicionou-se 2,7 mL do reagente FRAP. Agitou-se os tubos para a homogeneização da mistura reacional e em seguida foram colocados em banho-maria a 37 °C por 30 min. Após o tempo descrito anteriormente, a medição da absorbância foi realizada em 595 nm por espectrofotometria (UV-Vis modelo Agilent 8453). O reagente FRAP foi utilizado como branco. Utilizou-se como padrão, o Trolox para a construção da curva de analítica (0,15 - 30 µmol L⁻¹) e os resultados foram expressos em µmol de equivalentes trolox (ET)/g do extrato seco.

Este ensaio consiste em avaliar o poder de redução do Fe³⁺ em Fe²⁺ indo da forma férrica a ferrosa em complexos presentes no meio, dessa forma gerando alterações bioquímicas no produto sejam elas benéficas ou maléficas. O ensaio foi realizado em triplicata com concentrações diferentes que permitiram a avaliação no espectro de onda em questão.

4.4.3 - Avaliação da capacidade antioxidante frente ao radical DPPH•

A capacidade antioxidante sequestradora de radicais como o DPPH• foi avaliada segundo Sánchez-Moreno e colaboradores (1999), com algumas modificações. Inicialmente foi preparada uma solução de DPPH• em metanol (40 µg mL⁻¹) e, em seguida, foram adicionados 300 µL da solução do extrato a 2,7 mL da solução de DPPH e por fim deixou-se reagir à temperatura ambiente por 30 min. A capacidade antioxidante foi avaliada observando-se a redução do radical DPPH• (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) de coloração púrpura a DPPH-H (difenil-picril-hidrazina) de coloração amarela por meio da diminuição da absorbância em 516 nm por espectrofotometria (UV-Vis modelo Agilent 8453).

Para o cálculo da capacidade sequestradora do radical (ASR) do extrato utilizou-se a equação 1 no tempo reacional de 30 min:

$$\%ASR = [A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}}] / A_{\text{controle}} \times 100 \quad [\text{Equação 1}]$$

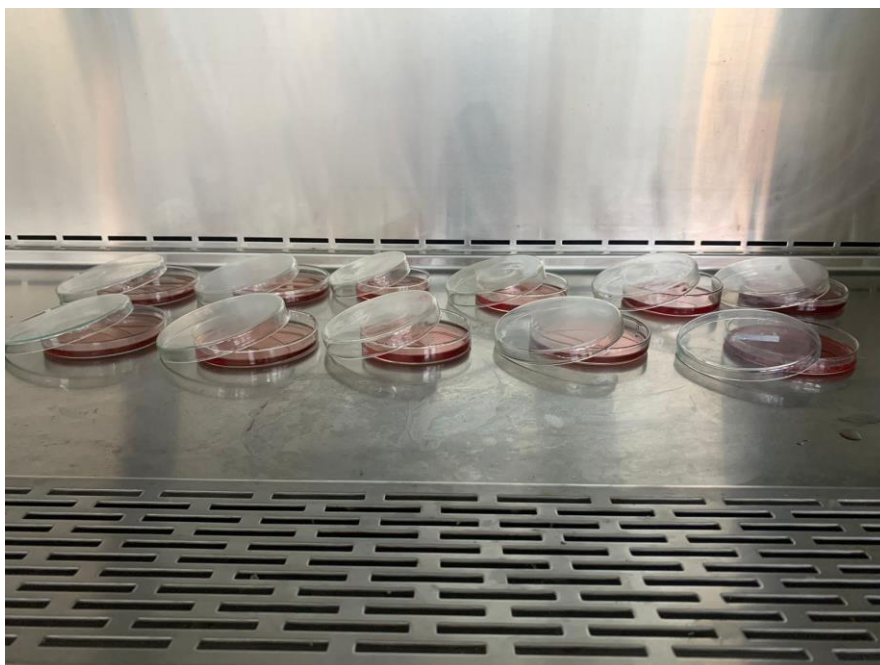
Onde, A_{controle} é a absorbância inicial da solução metanólica de DPPH• e A_{amostra} é a absorbância da mistura reacional (DPPH• + amostra). As reações foram realizadas em triplicata (n=3) e os resultados foram expressos como % ASR média ± desvio padrão.

4.5 - Análise Microbiológica

O meio de cultura MacConkey Ágar foi utilizado nessa análise, sendo preparado seguindo as instruções do fabricante, utilizando 50,0 g do meio de cultura e 1,0 litro de água

destilada. Em seguida, realizou-se a esterilização das placas de petri, meio de cultura e a pinça anatômica sendo envoltos por papel alumínio e inseridos na autoclave. O processo de autoclave consiste na adesão de água até cobrir a resistência já que parte dessa água será evaporada e o atingimento da temperatura interior de 120°C, após alcançar a temperatura foram contabilizados 15 minutos para a realização própria da esterilização e desligou-se em seguida. A válvula de despressurização foi aberta e a autoclave repousada alguns minutos até que a temperatura abaixa-se para retirar os materiais inseridos. Com a utilização de uma capela de exaustão, aos poucos as placas de petri foram distribuídas e o ágar inserido. A figura 11 apresenta os meios devidamente separados nas placas de petri prontos para inoculação.

Figura 11 – Meio de cultura inserido nas placas de petri.



Fonte: Autor, 2024.

Com o meio solidificando, o fungo *Aspergillus niger* foi inoculado no meio de cultura utilizando a pinça anatômica. As amostras dos três grupos: controle (leite), L+E (leite+extrato) e EXT (extrato) foram embebidas em papel de filtro para maior viabilidade. O papel de filtro foi cortado em discos pequenos e irregulares e colocados diretamente nas amostras e em seguida nas placas de petri sendo o procedimento realizado em triplicata. Ao fim, as placas foram revestidas de plástico filme e levadas a uma estufa bacteriológica para incubação de 7 dias.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 – Triagem dos Extratos

Os resultados obtidos durante essa triagem foram realizados por base do ensaio de DPPH•, interpretando esses resultados obtemos a seguinte Tabela 2.

Tabela 2: Resultados da triagem.

Amostra	DPPH•
A (70:30)	43,55 ± 1,7
B (60:40)	57,76 ± 0,7
C (50:50)	55,57 ± 1,66

Fonte: Autor, 2024.

Mediante a tabela acima, podemos ver que o maior valor de sequestro do radical DPPH• foi o do extrato B com uma proporção de 60% de água e 40% de álcool, tendo a maior ação antioxidante, além do menor desvio padrão observado.

5.2 - Ensaio Bioquímicos

Com a escolha do extrato B, outros obstáculos acabaram surgindo, o leite por ser uma mistura, apresenta diferentes substâncias, dessa forma, os ensaios bioquímicos precisaram de algumas diluições para melhor leitura devido ao espectro de onda específico para captação de cada reagente que serão enunciados em cada resultado a seguir.

5.2.1 – Avaliação da capacidade redutora de ferro (FRAP)

A escolha desse ensaio foi determinada devido o solvente. O leite fermentado é um produto com diversos compostos que desencadeiam importantes finalidades desde nutricional a suas mudanças redutoras que podem alterar a composição organoléptica do produto final.

Todos sofreram diluição seriada conforme evidencia a Tabela 3, além disso, os valores obtidos são expressos em capacidade antioxidante Trolox equivalente.

Tabela 3: Avaliação dos resultados de FRAP por concentração e grupo desejado.

AMOSTRA	Concentração (%)	FRAP
		($\mu\text{mol ET/L extrato}$)
EXT	0,016	15,14 $\pm$ 0,08
	0,008	10,61 $\pm$ 0,55
	0,004	5,10 $\pm$ 0,09
Controle	0,016	1,54 $\pm$ 0,16
	0,008	0,54 $\pm$ 0,05
	0,004	1,24 $\pm$ 0,03
L+E	0,016	16,40 $\pm$ 0,85
	0,008	9,10 $\pm$ 0,28
	0,004	7,93 $\pm$ 0,73

Fonte: Autor, 2024.

Os resultados obtidos nos permitem interpretar que o grupo Controle (leite) foi o que menos apresentou atividade antioxidante, isso nos permite levar em consideração que outros compostos estão em maior proporção dentro da mistura como proteínas, carboidratos e outros íons como sódio e cálcio. Já o grupo extrato apresentou uma grande atividade antioxidante em suas diferentes concentrações, além de desvios menores quando analisadas as triplicatas, isso nos permite inferir que o extrato possui uma grande capacidade redutora de ferro e que estão presentes em maiores proporções quando comparadas ao grupo controle.

O grupo L+E (Leite com Extrato) foi o grupo que apresentou maior atividade antioxidante, além de apresentar desvios padrões maiores, isso se deve ao fator de instabilidade do extrato no leite, em caso de estudos assistidos segundo Ramos (2017) por volta do 14º dia em diante uma maior estabilidade do extrato no leite devido a sua emulsificação. Contudo, o atual estudo demonstra que a fusão de ambos torna o produto capaz de inibir e/ou reduzir a oxidação no leite fermentado.

5.2.2 – Avaliação do conteúdo total dos compostos fenólicos (CTF)

Os teores de fenólicos totais dos grupos controle, L+E e EXT estão dispostos na tabela 4, outro experimento que sofreu diluição seriada para melhor visualização dos resultados e leitura do espectro de onda utilizado, além disso, todos apresentam desvios pequenos e o ensaio também foi realizado em triplicata.

Tabela 4: Avaliação dos resultados de CTF por concentração e grupo desejado.

AMOSTRA	Concentração (%)	CTF
		(mg EAG/g extrato)
EXT	0,25	2,63 ± 0,02
	0,13	1,31 ± 0,07
	0,06	0,32 ± 0,05
Controle	0,25	1,91 ± 0,08
	0,13	0,84 ± 0,15
	0,06	0,34 ± 0,03
L+E	0,25	3,76 ± 0,03
	0,13	2,23 ± 0,07
	0,06	1,04 ± 0,04

Fonte: Autor, 2024.

O grupo controle apresentou menor incidência nos teores de fenóis totais, o que já era esperado e o extrato apresentou uma incidência mediana de fenóis, ressaltando o ponto de menor concentração 0,06% o controle se sobressai quando comparado ao extrato, isso ocorre segundo Kabir et al. (2021), devido a quantidade de água que é utilizada na composição do extrato ou podendo apontar um problema na eficiência do extrato em concentrações menores.

Já o grupo L+E foi o que apresentou a maior incidência em todas as concentrações, além do controle já ser potencializado com um teor ameno, a junção só fortaleceu o potencial antioxidante do produto. Para o presente estudo, esse resultado ressalta a sinergia com o ensaio do FRAP e leva a importância de compostos bioativos presentes no extrato a consolidar a mistura.

5.2.3 – Avaliação da atividade antioxidante frente ao radical DPPH•

O ensaio do DPPH• foi realizado em triplicata como os demais, além disso, as concentrações também foram reduzidas, passando por diluições seriadas até encontrar a melhor leitura no comprimento de onda e mais tarde sendo tratado os dados na tabela 5 e expressos em ASR % (Capacidade sequestradora do radical).

Tabela 5: Avaliação dos resultados de DPPH• por concentração e grupo desejado.

AMOSTRA	Concentração (%)	DPPH• (ASR %)
EXT	0,016	43,45 ± 0,74
	0,008	25,86 ± 2,06
	0,004	15,14 ± 1,42
Controle	0,016	0,49 ± 0,58
	0,008	0
	0,004	0
L+E	0,016	21,64 ± 3,36
	0,008	16,37 ± 2,14
	0,004	10,97 ± 0,06

Fonte: Autor, 2024.

Com os resultados tratados, podemos analisar que o grupo Controle não exerceu capacidade antioxidante frente ao radical DPPH•, a não ser pela menor concentração que foi encontrado um valor desprezível quando comparado com os demais grupos, ressaltando a falta de atividade antioxidante nesse grupo. Já o extrato foi o grupo que apresentou a maior capacidade em sequestrar o radical, por ser um extrato munido dos princípios ativos de três ervas que já possuem historicamente estudos envolvendo antioxidantes, só reforça a menção em que o extrato possui alta atividade antioxidante quando colocado em questão.

Já o grupo L+E apresentou uma atividade intermediária, diferente dos demais ensaios para avaliação e determinação da atividade antioxidante, o radical DPPH• possui a limitação de atuação em caso de impedimento estérico, segundo Prior et al., 2005, devido ao seu mecanismo de atuação por transferência de prótons, dessa forma, o leite que possui diversos componentes que favorecem o impedimento estérico como a gordura, sendo então possíveis interferentes para a avaliação do resultado final já que podem interferir na cinética da reação deixando-a mais lenta. Portanto, podemos inferir quando comparamos o grupo controle e o grupo L+E que o extrato agiu de forma a aumentar os valores do sequestro do radical exercendo grande atividade antioxidante, sendo benéfico para o produto a inibição da oxidação.

5.3 – Ensaio Microbiológico

O ensaio microbiológico nos permitiu estudar a eficiência do extrato em meio microbiano.

O método utilizado foi realizado em triplicata com concentração exata (0,5% v/v) e sem diluição, as Figuras 12 a 14 descrevem os grupos e as discussões se prosseguem.

Figura 12 – Grupo Controle.



Fonte: Autor, 2024.

O grupo controle apresentou um grande crescimento do fungo no meio, não diretamente nos discos embebidos. Levando em consideração alguns pontos, como possíveis interferentes, o sorbato de potássio é acrescido em algumas marcas de leite fermentado e não designado no rótulo, o MAPA não adverte seu uso, por não fazer mal ao ser humano, nosso corpo possui a habilidade de absorver esse sal que desempenha um papel significativo na proliferação desses microrganismos. Segundo Neves (2015), a formulação do leite fermentado ainda é pouca estudada e um segredo para muitos leigos, como cada marca ou empresa realiza seu próprio produto e há diversas formas de chegar ao produto final, o MAPA apenas exige os componentes

básicos e informações importantes no rótulo da bebida. Dessa forma, o sorbato inibe a proliferação desses microrganismos por controlar a atividade do meio e o pH.

Figura 13 – Grupo L+E.



Fonte: Autor, 2024.

Já o grupo L+E quando comparado ao grupo controle teve um crescimento moderado, boa parte da cepa do fungo já apresenta inércia em uma das triplicatas, ocorrendo mediante atividade do extrato. Em caso de maior emulsificação do extrato ao leite fermentado, a incidência seria quase nula, tornando o meio não propício ao seu crescimento, além da possibilidade dos interferentes (sorbato de potássio).

Figura 14 – Grupo EXT.



Fonte: Autor, 2024.

Por fim, o grupo EXT quando comparado aos demais grupos foi o que mais conseguiu inibir o crescimento do fungo *Aspergillus niger*, a última triplicata (terceira da esquerda para a direita) praticamente apresentou atividade nula quando comparada a todas as outras do mesmo grupo e dos demais grupos.

6 CONCLUSÃO

A mudança de foco de trabalho assistido a trabalho efetuado tornou a percepção e a visualização de resultados mais confiável para se tratar e apresentar, é interessante levar em consideração algumas inferências acerca da literatura e do trabalho em questão. O extrato hidroalcolico atuou como um potencializador de atividade antioxidante, antimicrobiana e antifúngica, além disso, o mesmo extrato também pode atuar como componente flavorizante já que as ervas que compõem o extrato possuem um certo aroma que podem mascarar sua introdução no produto. O estudo trouxe uma sinergia para o extrato como ponto forte, de fórmula original todos os resultados demonstraram satisfação e se propôs uma alternativa de redução de conservantes que são prejudiciais à saúde em bebidas fermentadas.

Em contraponto, a análise de DPPH^{*} evidenciou o impedimento estérico relativo à presença do leite fermentado, reduzindo assim o potencial do extrato na sua redução. Porém, essa é uma limitação do ensaio e pode ser confrontada com os resultados de Folin e FRAP. Dessa forma, há um acerto em comprovar a potencialização no presente trabalho e abre novas possibilidades, inclusive para o uso do óleo essencial ao invés do extrato bruto. Assim, novos estudos precisam ser realizados para a efetiva comparação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. MALUF, S. Óleos essenciais como conservantes para alimentos. 2016. Página inicial. Disponível em: <http://samiamaluf.blogspot.com/2016/09/oleos-essenciais-como-conservantes-para.html>. Acesso em: 24 jul de 2023.
2. HARO-GONZÁLEZ, José Nabor et al. Clove essential oil (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): Extraction, chemical composition, food applications, and essential bioactivity for human health. *Molecules*, v. 26, n. 21, p. 6387, 2021.
3. OSÓRIO, Luiza da Gama et al. Atividade in vitro do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. em isolados clínicos de *Aspergillus* spp. *Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia*, v. 71, p. 204-210, 2019.
4. DE MELO, Antônia Filha Moreira et al. Alecrim (*rosmarinus officinalis* l.) Atividade anti-inflamatória: uma revisão de literatura. *Revista de Casos e Consultoria*, v. 12, n. 1, p. e24346-e24346, 2021.
5. RAMOS, L. R. R.; SANTOS, J. S.; GRANATO, D.; SILVA, L. P.; SANTANA, A. S. Fenólicos totais, atividade antioxidante e antimicrobiana de extrato aquoso de *Syzygium aromaticum* e *Ilex paraguariensis*: aplicação em leite fermentado. 12° Latin American Symposium of Food Science, Campinas, SP, 04-07 de nov 2017.
6. ALONSO, L. Óleos essenciais como alternativa natural para a conservação de alimentos. 2022. 101 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Uberlândia, Patos de Minas, 2022.
7. BANDONI, A. L. Os recursos vegetais aromáticos no Brasil: seu aproveitamento industrial para a produção de aromas e sabores. Vitória: EDUFES, 2008.
8. BIZZO, H.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. *Quim. Nova*, vol. 32, n. 3, 2009.
9. CASSEL, E.; SERAFINI, L. Produção de óleos essenciais: uma alternativa para a agroindústria nacional. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. (Coord.). *Biotecnologia na agricultura e na agroindústria*. Guaíba: Agropecuária, p. 333-377, 2001.
10. BRASIL. Classificação Nacional de Atividades Econômicas – CNAE. [Brasília]: Ministério da Fazenda, 25 de set.2020. Disponível em: <https://www.gov.br/receitafederal/pt-br/assuntos/orientacao-tributaria/cadastros/cnpj/classificacao-nacional-de-atividades-economicas-2013-cnae/apresentacao>. Acesso em:
11. BIZZO, Humberto R.; REZENDE, Claudia M. O mercado de óleos essenciais no Brasil e no mundo na última década. *Química Nova*, v. 45, p. 949-958, 2022.

12. International Organization for Standardization. ISO 9235:2021. Aromatic natural raw materials – Vocabulary. International Organization for Standardization: Genebra, 2021
13. BRASIL, RDC nº 2, 15 de janeiro de 2007. Regulamento técnico sobre aditivos aromatizantes. Diário oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 15 jan. 2007.
14. BRASIL, Portaria 159/81, 22 de junho de 1981. MAPA. Normas de identidade, qualidade e embalagem do cravo-da-índia. Diário oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 24 jun. 1981.
15. AFFONSO, Raphael S. et al. Quantificação e Caracterização dos Principais Componentes do Extrato Etanólico de Cravo-da-Índia *Syzygium aromaticum* [L] Merr. et Perry. Revista Virtual de Química, v. 6, n. 5, p. 1316-1331, 2014.
16. FERNANDEZ, Ana Sophia Tovar et al. Autenticação de orégano (*Origanum vulgare* L.) Orgânico utilizando espectroscopia NIR e quimiometria. Química Nova, v. 43, p. 1500-1504, 2021.
17. SILVA, Janine Passos Lima et al. Óleo essencial de orégano: interferência da composição química na atividade frente a *Salmonella Enteritidis*. Food Science and Technology, v. 30, p. 136-141, 2010.
18. AMARAL, S. M.; CARVALHO, L. Q. C.; PEREIRA, N. A. C. de S.; SOUSA SOBRINHO, M. de F.; SOUSA SOBRINHO, M. K. de.; SANTOS, L. D. L. dos.; BARBOSA, M. C. N. A.; SILVA, B. L.; RODRIGUES, A. E. F.; LINHARES, B. O.; CARVALHO, F. da S.; CUNHA, A. P. G. da; SOLANO, L. dos S.; SANTOS, D. O.; LOPES, L. A. de S. Alecrim (*rosmarinus officinalis*): principais características. Revista de Casos e Consultoria, [S. l.], v. 12, n. 1, p. e24651, 2021. Disponível em: <https://periodicos.ufrn.br/casoseconsultoria/article/view/24651>. Acesso em: 8 mar. 2024.
19. SERRANO, Carmo; FIGUEIREDO, Ana Cristina. Métodos de obtenção dos óleos essenciais e outros extratos. A Fileira das Plantas Aromáticas e o Desenvolvimento Local, edt. Inocência Seita Coelho e Miguel Pestana (INIAV) p. p. 83-96, 2018.
20. CASTILHO, Giovanna Kawasaki; DA SILVA FELISBINO, Sabrina; RODRIGUES, Natalia Mayume. Estudo sobre os tipos de extração para óleos essenciais e óleos vegetais. RCMOS-Revista Científica Multidisciplinar O Saber, v. 1, n. 10, p. 52-59, 2021.
21. SILVEIRA, Jeniffer Cristina et al. Levantamento e análise de métodos de extração de óleos essenciais. Enciclopédia Biosfera, v. 8, n. 15, 2012.
22. COSTA, Leonardo Duarte da. Revisão bibliográfica sobre comparação de metodologias convencionais de extração de óleos essenciais. 2022.

23. MARCOLINA, Marzy. Óleos essenciais: estudo de extração e atividade antimicrobiana. 2021. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.
24. Munteanu IG, Apetrei C. Métodos analíticos usados na determinação da atividade antioxidante: uma revisão. Int J Mol Sci. 2021 25 de março.
25. RUFINO, M. D. S. M. et al. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. 2007.
26. BOROSKI, M. et al. Antioxidantes- princípios e métodos analíticos. Curitiba: Appris, 2015.
27. OSTROSKY, Elissa A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. Revista brasileira de Farmacognosia, v. 18, p. 301-307, 2008.
28. DA SILVA, Fernanda Chaves et al. Taxonomia polifásica para identificação de *Aspergillus* seção flavi: uma revisão. Revista Eletrônica Sala de Aula em Foco, v. 1, n. 1, p. 18-40, 2015.
29. CARBONERA, Fabiana. Avaliação da composição lipídica e da capacidade antioxidante em filés de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com diferentes fontes de ácidos graxos e antioxidantes. 2014.
30. TORRES NETO, José Ferreira et al. Reaproveitamento de óleo vegetal residual na produção de sabões: avaliação do potencial antifúngico pela adição de óleos essenciais. 2023.
31. DE MORAES, Marina Levorato et al. Caracterização físico-química do leite fermentado por *Lactobacillus helveticus* adicionado de extrato de hibisco durante a estocagem. Research, Society and Development, v. 11, n. 1, p. e18211124475-e18211124475, 2022.
32. DE MOURA FRANÇA, Leandro. Desenvolvimento de Sistema de Análise por Injeção Sequencial para Determinação Espectrofotométrica da Capacidade Antioxidante em Bebidas Empregando o Radical Derivado do N-fenil-1, 4-fenilenodiamino.
33. RAMOS, L. R. R.; SANTOS, J. S.; GRANATO, D.; SILVA, L. P.; SANTANA, A. S. Fenólicos totais, atividade antioxidante e antimicrobiana de extrato aquoso de *Syzygium aromaticum* e *Ilex paraguariensis*: aplicação em leite fermentado. 12º Latin American Symposium of Food Science, Campinas, SP, 04-07 de nov 2017.
34. NEVES, Jéssica Eliane. Leite fermentado acrescido de farinha de casca de uva: desenvolvimento, caracterização e aceitação sensorial. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.
35. GUIMARÃES, C. DESENVOLVIMENTO DE BLENDS ATIVAS DE ACETATO DE CELULOSE E QUITOSANA INCORPORADAS COM ÓLEO ESSENCIAL DE CRAVO DA ÍNDIA (*Eugenia caryophyllus*). Orientador: Prof. Dr. Bruno Carfiofi. 2019. TCC -

Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2019. Disponível em:

<https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/199724/TCC%20Carolina%20Guimarães.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 29 jul de 2023.

36. STEFFENS, Andréia Hoeltz. Estudo da composição química dos óleos essenciais obtidos por destilação por arraste a vapor em escala laboratorial e industrial. Orientador: Prof. Dr. Eduardo Cassel. 2008. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia e Tecnologia dos Materiais, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2008. Disponível em: <https://tede2.pucrs.br/tede2/bitstream/tede/3155/1/423851.pdf>. Acesso em: 29 jul de 2023.
37. SILVA, E. de S. et al. Conservação de alimentos pelo uso de aditivos: uma revisão. Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos, Curitiba, v. 37, n. 2, p. 18-29, 2019.
38. VAZ, A. P. A.; JORGE, MHA. Orégano. 2006.
39. FRIAS, Danila Fernanda Rodrigues; KOZUSNY-ANDREANI, Dora Inês. VERIFICAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFUNGICA DE EXTRATOS DE PLANTAS E ÓLEO DE EUCALIPTO NO CONTROLE in vitro de *Aspergillus niger*. Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia, v. 4, n. 2, p. 12-19, 2009.
40. ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. Química Nova, v. 33, n. 10, 2010.