UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Química

FLORIPES FERREIRA DE OLIVEIRA

**Caracterização físico-química de amostras de
óleo de pinho e estudo da ação de sistemas
tensoativos na atividade antimicrobiana de
ativos fenólicos.**

SÃO PAULO
Data do Depósito na SPG:
07/05/2008

FLORIPES FERREIRA DE OLIVEIRA

**Caracterização físico-química de amostras de
óleo de pinho e estudo da ação de sistemas
tensoativos na atividade antimicrobiana de
ativos fenólicos.**

*Tese apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São
Paulo para obtenção do Título de
Doutor em Química (Química
Analítica)*

Orientador: Prof. Dr. Jivaldo do Rosário Matos

SÃO PAULO

2008

**Aos meus pais,
Hilda e Olegário e a
minha irmã Fátima.**

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Jivaldo do Rosário Matos por orientar, incentivar e valorizar a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Silvia Eguchi pela total disposição em colaborar durante a execução deste trabalho e pela satisfação da amizade criada.

À Maria Inácia e Ana Rodrigues pela satisfação em me receber e passar valiosas informações sobre os conceitos e as práticas de um laboratório de microbiologia e a imensa satisfação de tê-las como amigas.

À Luiza Okubo por todo apoio dado e pelas oportunidades oferecidas para execução deste trabalho.

Ao Senhor Oleg Schevciw e Patricia Busko Di Vitta pelas colaborações dadas.

À Colgate-Palmolive por abrir as portas de seu laboratório e em especial a Lucas Assis, Marcos Amendola, Miriam Maeda, Paulo Kolle e Ricardo Gomes.

À Raquel Silva pela colaboração na execução das análises de CG-MS e à Márcia Longarço pelas revisões feitas.

Às empresas Dierberger, Dow, Lanxess, Mahler, Oxiten, Rhom and Haas e Stepan, pelo fornecimento das matérias primas ou apoio na condução de análises.

Aos colegas do LATIG, pela convivência, amizade e companheirismo.

À Luciana, Renato, Senhor Francisco, funcionários da biblioteca e da seção de Pós-graduação pelo apoio prestado.

Ao meu amigo Ricardo, pela amizade, confiança e apoio que sempre depositou em mim.

Aos meus colegas, amigos e companheiros de viagens Daniela, Decio, Edson, Helena, Márcia, Maritza, Mauricio, Paulo, Virgínia.

Aos meus tios e primos por compreenderem a minha ausência.

E em especial à minha mãe, ao meu pai e à minha irmã pela confiança na realização deste trabalho e compreensão devido à minha ausência em vários momentos.

Gostaria de agradecer a todos os amigos e colegas que eu me esqueci de mencionar, mas que de alguma forma contribuíram e que estiveram presentes durante este momento da minha vida.

"Nunca se deve engatinhar quando se tem o impulso de voar."

Hellen Keller, escritora e educadora

"Nada na vida deve ser temido, somente compreendido. Agora é hora de compreender mais, para temer menos."

Marie Curie, física

"Começai por fazer o que é necessário, depois o que é possível e, de repente, estareis fazendo o impossível."

Francisco de Assis

RESUMO

Oliveira, F. F. **Caracterização físico-química de amostras de óleo de pinho e estudo da ação de sistemas tensoativos na atividade antimicrobiana de ativos fenólicos**. 2008. 191p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Química (Química Analítica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Este trabalho tem como objetivo a caracterização de amostras comerciais de óleo de pinho com o intuito de identificar outros componentes que apresentem ação antimicrobiana, além do α -terpineol. Também, visa avaliar a influência de três tensoativos distintos na ação antimicrobiana do o-fenil fenol, do o-benzil p-clorofenol e do p-cloro m-cresol. Os tensoativos selecionados foram o linear alquilbenzeno sulfonato de sódio (NaLAS), uma mistura de laurato de trietanolamina e de sódio (laurato de Na/Tea) e alfa olefina sulfonada (AOS). Amostras comerciais de óleo de pinho e 61 frações, isoladas por destilação a pressão reduzida de uma amostra de óleo de pinho bruto, foram avaliadas a partir de medidas de índice de refração, curvas TG/DTG, espectroscopia no infravermelho, CG-DIC e CG-EM, características organolépticas e atividade antimicrobiana com a determinação do halo de inibição (contra *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708). Observou-se que as amostras comerciais apresentaram composições distintas, conforme procedência. O perfil das curvas TG/DTG permitiu uma avaliação comparativa do comportamento térmico das frações isoladas na destilação. A composição do óleo de pinho apresenta diversidade de componentes com atividade antimicrobiana inibitória. Todas as amostras de óleo de pinho apresentaram atividade bacteriostática para ambos os microrganismos e as frações, na composição em que foram separadas, apresentaram melhor atividade bacteriostática para *S. aureus*. Foram preparadas 42 formulações considerando teores de biocida de 0, 0,7 e 1,0% (p/p) e de tensoativo a 1,5 e 5% (p/p). As amostras foram acondicionadas em frascos de PET de 30 mL e avaliadas quanto ao pH, cor, odor, aparência nas 2^a, 4^a, 8^a e 12^a semanas do teste de estabilidade, conduzido a 4, 25 e 45°C. O sistema tensoativo empregando o laurato de Na/TEA apresentou melhor estabilidade. Os tensoativos estudados (AOS, NaLAS e laurato de Na/TEA), apresentaram ação antimicrobiana e influenciaram positivamente na atividade dos ativos fenólicos. Pôde-se identificar a influência do teor de tensoativo na estabilização do derivado fenólico em um sistema exposto a alta temperatura (45°C) armazenado em embalagem de PET. Os teores de ativos fenólicos foram determinados por CLAE empregando detector UV.

Palavras-chave: antimicrobiano, fenólicos, óleo de pinho, tensoativos, desinfetantes

ABSTRACT

Oliveira, F. F. **Physical-chemical characterization of pine oil samples and study on surfactants systems action in antimicrobial activity of active phenolic**. 2008. 191p. PhD Thesis – Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

This work aims at characterizing commercial samples of pine oil with a view at identifying other components that present antimicrobial action besides its of α -terpineol. It also aims at evaluating how three different surfactants influence the antimicrobial action of the o-phenyl-phenol, of the o-benzyl-p-chlorophenol and p-chloro-m-cresol. The selected surfactants were the sodium linear alkylbenzene sulphonate (NaLAS), a mixture of triethanolamine and sodium laurate, in addition to sodium alpha-olefins sulfonate (AOS). Pine oil commercial samples and 61 fractions, which were isolated by reduced pressure distillation of a raw pine oil sample, were analyzed based on measures of index of refraction, TG/DTG curves, infrared spectroscopy, GC-FID and GC-MS, odour characterization and antimicrobial activity with the determination of the inhibition disc (against *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 and *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708). It was observed that commercial samples presented marked different compositions according to their origin. TG/DTG curves profile allowed a comparative evaluation of the thermal behavior of those fractions isolated during distillation. Pine oil composition presents a diversity of components with antimicrobial activity. All pine oil samples presented bacteriostatic activity when tested against the two microorganisms mentioned above, and fractions in the composition in which they were inserted presented better bacteriostatic activity against *S. aureus*. Forty two formulations were prepared taking into consideration the content of biocide of 0, 0.7 and 1.0% (w/w) levels and surfactant of 1.5 e 5% (w/w) levels. Samples were stored into PET bottles of 30 mL and evaluated as per the pH, color, odour, appearance during 2nd, 4th, 8th e 12th weeks of the stability test, which was carried out at 4, 25 e 45°C. When using Na/TEA laurate, the surfactant system presented better stability. Studied surfactants - AOS, NaLAS and Na/TEA laurate - presented antimicrobial action and positively influenced in active phenolics activity. It was possible to identify the influence of content of surfactant in stabilizing the phenolic derivative while under a system exposed to high temperature (45°C) inside a PET packaging. Active phenolics content was determined by HPLC using UV detection.

Keywords: antimicrobial, phenolic, pine oil, surfactants, disinfectants.

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1. Esquema do processo de obtenção de óleo de pinho a partir da goma-resina.....	5
Figura 2. Detalhes do processo de resinagem. (a) Corte do "bigode" para fixação do saco plástico coletor; (b) aplicação da pasta ácida; (c) vista de uma área de resinagem; (d) detalhe do tronco de uma árvore de <i>Pinus</i>	9
Figura 3. Esquema das reações envolvidas no processo de hidratação do α -pineno (adaptada de Liu <i>et al.</i> , 2008)	14
Figura 4. Estruturas do (a) 2-benzil-4-clorofenol (OBCP), (b) 4-cloro-3-metilfenol (PCMC) e (c) do 2-hidroxibifenilo (OPP).....	25
Figura 5. Representação esquemática comparando as estruturas de bactérias Gram positivas e Gram negativas.....	40
Figura 6. Sítios de ação dos agentes antimicrobianos	47
Figura 7. Curvas TG/DTG de uma amostra de $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, obtida na termobalança TGA-50, sob atmosfera dinâmica de N_2 e razão de aquecimento de $10^\circ\text{C min}^{-1}$	61
Figura 8. Tipo de cromatografia e relação de FM, FE e mecanismo de separação envolvido	62
Figura 9. Esquema para condução do teste de suspensão.....	89
Figura 10. Esquema do método de controle de contagem	90
Figura 11. Espectro de absorção na região do infravermelho para três amostras de óleo de pinho do fabricante S com 50, 65 e 75% de TATT	94
Figura 12. Espectro de absorção na região do infravermelho para amostra de óleo bruto ..	94
Figura 13. Sobreposição das curvas TG/DTG obtidas a $10^\circ\text{C min}^{-1}$ e sob atmosfera dinâmica de nitrogênio, de amostras de óleo de pinho 50, 65 e 75% de TATT	96
Figura 14. Curva TG e detalhe da curva DTG obtidas a $10^\circ\text{C min}^{-1}$, sob atmosfera dinâmica de ar para amostras de óleos de pinho a 50% provenientes dos fabricantes B, D, S e Y.....	97
Figura 15. Diagrama de Matriz para principais componentes do óleo de pinho.....	99
Figura 16. Cromatogramas de uma amostra de óleo de pinho bruto. a) CG-EM e b) CG-DIC	101
Figura 17. Curva TG e detalhe da curva DTG obtidas a $10^\circ\text{C min}^{-1}$, sob atmosfera dinâmica de ar para a amostra de óleo de pinho bruto, frações F1, F24 e F61 e o resíduo final da destilação	105
Figura 18. Fotos ilustrativas da formação do halo de inibição para alguns óleos e frações do óleo bruto (leituras após 24h de incubação)	113
Figura 19. Gráfico da Percentagem de variação de pH - Teste de estabilidade a 5°C	118

Figura 20. Gráfico da Percentagem de variação de pH - Teste de estabilidade a Temperatura Ambiente	119
Figura 21. Gráfico da Percentagem de variação de pH - Teste de estabilidade a 45°C	119
Figura 22. Cromatograma da fase móvel (acetonitrila/ água 65:35 (v/v); pH 2,6 (H ₃ PO ₄)) .	121
Figura 23. Cromatograma base matriz do sistema com 5% de AOS e 15,4% de etanol	121
Figura 24. Cromatograma base matriz do sistema 5% de NaLAS e 15,4% de EtOH	122
Figura 25. Cromatograma da base matriz do sistema 5% de laurato de Na/TEA e 15,4% de EtOH.....	122
Figura 26. Cromatogramas típicos de (a) PCMC; (b) OPP e (c) OBCP.....	123
Figura 27. Cromatograma de uma solução contendo três derivados fenólicos (PCMC, OPP e OBCP) na concentração de 100 mg mL ⁻¹ , na FM acetonitrila: água (65:35 v/v, pH 2,6 (H ₂ PO ₃)).....	124
Figura 28. Espectro de absorção na região do infravermelho para Fração F1	153
Figura 29. Espectro de absorção na região do infravermelho para Fração F6	154
Figura 30. Espectro de absorção na região do infravermelho para Fração F11	154
Figura 31. Espectro de absorção na região do infravermelho para Fração F13	155
Figura 32. Espectro de absorção na região do infravermelho para Fração F19	155
Figura 33. Espectro de absorção na região do infravermelho para Fração F20	156
Figura 34. Espectro de absorção na região do infravermelho para Fração F22	156
Figura 35. Espectro de absorção na região do infravermelho para Fração F23	157
Figura 36. Espectro de absorção na região do infravermelho para Fração F24	157
Figura 37. Espectro de absorção na região do infravermelho para Fração F27	158
Figura 38. Espectro de absorção na região do infravermelho para Fração F29	158
Figura 39. Espectro de absorção na região do infravermelho para Fração F31	159
Figura 40. Espectro de absorção na região do infravermelho para Fração F34	159
Figura 41. Espectro de absorção na região do infravermelho para Fração F39	160
Figura 42. Espectro de absorção na região do infravermelho para Fração F43	160
Figura 43. Espectro de absorção na região do infravermelho para Fração F47	161
Figura 44. Espectro de absorção na região do infravermelho para Fração F50	161
Figura 45. Espectro de absorção na região do infravermelho para Fração F56	162
Figura 46. Espectro de absorção na região do infravermelho para Fração F61	162
Figura 47. Espectro de absorção na região do infravermelho para o resíduo de destilação de uma amostra retirada após a Fração F19	163
Figura 48. Espectro de absorção na região do infravermelho para o resíduo da destilação amostra retirada após a Fração F28.....	163

Figura 49. Espectro de absorção na região do infravermelho para uma amostra de resíduo final de destilação amostra retirada após a Fração F61	164
Figura 50. Halo de inibição para as frações F1, F234, α -terpineol e óleo do fabricante B (leitura após 24h). a) <i>Salmonella choleraesuis</i> e b) <i>Staphylococcus aureus</i>	165
Figura 51. Halo de inibição para as frações F5, F567, F10 e F11 (leitura após 24h). a) <i>Salmonella choleraesuis</i> e b) <i>Staphylococcus aureus</i>	165
Figura 52. Halo de inibição para as frações F16, F17, F19 e o terpinoleno (leitura após 24h). a) <i>Salmonella choleraesuis</i> e b) <i>Staphylococcus aureus</i>	166
Figura 53. Halo de inibição para as frações F20, F21, F22 e F23 (leitura após 24h). a) <i>Salmonella choleraesuis</i> e b) <i>Staphylococcus aureus</i>	166
Figura 54. Halo de inibição para as frações F28, F29, resíduo F19 e óleo bruto (leitura após 24h). a) <i>Salmonella choleraesuis</i> e b) <i>Staphylococcus aureus</i>	167
Figura 55. Halo de inibição para as frações F31, F32, F33 e resíduo F28 (leitura após 24h). a) <i>Salmonella choleraesuis</i> e b) <i>Staphylococcus aureus</i>	167
Figura 56. Halo de inibição para as frações F39, F40, F42 e F44 (leitura após 24h). a) <i>Salmonella choleraesuis</i> e b) <i>Staphylococcus aureus</i>	168
Figura 57. Halo de inibição para as frações F46, F48, F50 e resíduo F44 (leitura após 24h). a) <i>Salmonella choleraesuis</i> e b) <i>Staphylococcus aureus</i>	168
Figura 58. Halo de inibição para as frações F52, F54, F56 e F58 (leitura após 24h). a) <i>Salmonella choleraesuis</i> e b) <i>Staphylococcus aureus</i>	169
Figura 59. Halo de inibição para as frações F41, F45, F60 e resíduo Final (leitura após 24h). a) <i>Salmonella choleraesuis</i> e b) <i>Staphylococcus aureus</i>	169
Figura 60. Halo de inibição para as frações F45, F51, F57 e F61 (leitura após 24h). a) <i>Salmonella choleraesuis</i> e b) <i>Staphylococcus aureus</i>	170
Figura 61. Halo de inibição para as frações F53, F55, F59 e terpinoleno (leitura após 24h). a) <i>Salmonella choleraesuis</i> e b) <i>Staphylococcus aureus</i>	170
Figura 62. Halo de inibição para as frações F39, F40, F42 e F44 (leitura após 48h). a) <i>Salmonella choleraesuis</i> e b) <i>Staphylococcus aureus</i>	171
Figura 63. Halo de inibição para as frações F45, F57, F58 e F61 (leitura após 48h). a) <i>Salmonella choleraesuis</i> e b) <i>Staphylococcus aureus</i>	171
Figura 64. Resumo ilustrando dados cromatográficos e formação de halo de inibição	172
Figura 65. Fotos do teste de suspensão (a) tubos de repique das cepas, (b) acerto da escala Mc Farland.....	173
Figura 66. Tubos com a amostra-teste, 2 tubos com CN + Tween 80 e 2 tubos com solução tampão	173
Figura 67. Teste de suspensão (a) Transferência de alíquota, (b) agitação do tubo, (c) plaqueamento, (d) adição de Agar, (e) incubação, (f) placa com crescimento .	174

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Área Brasileira com Floresta Plantada - 2006	6
Tabela 2 - Composição típica de algumas resinas e terebintina de três tipos de <i>Pinus</i>	12
Tabela 3 – Classificação dos terpenos.....	18
Tabela 4 – Principais componentes presentes no óleo de pinho e algumas de suas propriedades físico-químicas	19
Tabela 5 – Valores de pKa e log P para dez derivados fenólicos.....	24
Tabela 6 - Concentração inibitória mínima (CIM) de derivados fenólicos em ágar nutriente (mg L ⁻¹).....	26
Tabela 7 - Dados toxicológicos do fenol e alguns de seus derivados.....	29
Tabela 8 - Dados de concentrações letal (CL) e efetiva (CE) do PCMC em diferentes organismos.....	30
Tabela 9 - Dados de concentrações letal (CL) e efetiva (CE) do OBCP em diferentes organismos.....	31
Tabela 10 - Dados de concentração letal (CL) e concentração efetiva (CE) do OPP para diferentes organismos	32
Tabela 11- Linha do tempo dos lançamentos de alguns dos principais tensoativos de uso comercial	35
Tabela 12 - Ações do agente antimicrobiano nas bactérias e suas conseqüências	48
Tabela 13 - Classificação das principais técnicas termoanalíticas e abreviaturas aceitáveis	58
Tabela 14 - Algumas aplicações da CG na análise de óleos essenciais e terpenos.....	66
Tabela 15 - Ordem de eluição e tempo de retenção do α -pineno e seus isômeros nas colunas capilares CP-Wax 52CB e γ -cilclodextrina.....	67
Tabela 16 - Parâmetros utilizados na elaboração das formulações biocidas.....	85
Tabela 17 - Índice de Refração de amostras de óleo de pinho (fabricantes B, D, S e Y) com diferentes TATT*.....	93
Tabela 18 - Caracterização olfativa de algumas frações de óleo de pinho.....	103
Tabela 19 - Percentagem relativa dos componentes de uma amostra de óleo de pinho e de seis frações de destilação. Resultados obtidos por CG-EM.....	107
Tabela 20 - Percentagem relativa dos componentes das frações F1 a F13 obtida por CG-DIC.....	108
Tabela 21 - Percentagem relativa dos componentes das frações F14 a F26 obtida por CG-DIC.....	109
Tabela 22 - Percentagem relativa dos componentes das frações F29 a F40	109

Tabela 23 - Percentagem relativa dos componentes das frações F41 a F49 e do resíduo final da destilação	110
Tabela 24 - Percentagem relativa dos componentes das frações F50 a F60	112
Tabela 25 – Resultado da leitura do halo de inibição (mm) formado na avaliação qualitativa da atividade antimicrobiana de algumas amostras de óleo de pinho e suas frações de destilação	114
Tabela 26 – Faixa de tensão superficial e pH para os três sistemas de tensoativos estudados	118
Tabela 27 - Dados da curva média da calibração para PCMC, OPP e OBCP obtidas em três dias diferentes	125
Tabela 28 - Áreas dos picos referentes a replicatas de injeção de uma amostra com PCMC, OPP e OBCP em um sistema com 5 % de AOS	126
Tabela 29 - Avaliação da robustez do método de dosagem de PCMC quanto variação de FM, vazão e temperatura do forno (Área dos Picos)	127
Tabela 30 - Avaliação da robustez do método de dosagem de OPP quanto variação de FM, vazão e temperatura do forno (Área dos Picos)	127
Tabela 31 - Avaliação da robustez do método de dosagem de OBCP quanto variação de FM, vazão e temperatura do forno (Área dos Picos)	128
Tabela 32 – Resultados das determinações do teor de ativo fenólicos por CLAE das amostras recém-preparadas e após estabilidade e suas variações com relação ao teor inicial	129
Tabela 33 - Resultados testes reducional para avaliação dos sistemas tensoativos (média das leituras)	131
Tabela 34 – Comparativo da composição de quatro óleos de pinho analisados por CG-DIC e CG-EM	151
Tabela 35 - Comparativo da composição de cinco óleos de pinho analisados por CG-DIC e CG-EM	152

SIGLAS E ABREVIATURAS

ABRAF	Associação dos Produtores de Florestas Plantadas
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária e Ambiental
AOS	Alfa Olefina Sulfonada
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATR	<i>Attenuated Total Reflection</i> (reflectância atenuada total)
CE	Concentração Efetiva
CG-DIC	Cromatografia Gasosa com Detector de Chama
CG-EM	Cromatografia Gasosa Acoplada ao Espectrômetro de Massa
CIM	Concentração Inibitória Mínima (MIC <i>Minimum Inhibitory Concentration</i>)
CL	Concentração Letal
CLC	Cromatografia Líquida Clássica
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CMC	Concentração Micelar Crítica
CN	Caldo Nutriente
CRAs	<i>Chlorine-Releasing Agents</i> (agentes liberadores de cloro)
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DC	5,5'-dicloro-2,2'-dihidroxi-difenil metano
DQO	Demanda Química de Oxigênio
DTG	Termogravimetria Derivada
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i>
FBA	Fator de Bioacumulação (<i>Bioaccumulation Factor</i> – BCF)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FIR	<i>Far Infrared</i> (infravermelho afastado)
FM	Fase Móvel
FTIR	<i>Fourier-Transform Infrared</i> (Infravermelho por Transformada de Fourier)
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

IV	Espectroscopia na Região do Infravermelho
LAB	Linear Alquilbenzeno
LAS	Linear Alquilbenzeno Sulfonato
MIR	<i>Middle Infrared</i> (infravermelho médio)
NIR	<i>Near Infrared</i> (infravermelho próximo)
NCCLS	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
OBCP	<i>o</i> -benzil <i>p</i> -clorofenol
OECD	<i>European Organization for Economic Cooperation and Development</i>
OPP	<i>o</i> -fenil fenol
PCMC	<i>p</i> -cloro <i>m</i> -cresol
PCMX	<i>p</i> -cloro <i>m</i> -xilol (4-cloro-3,5-dimetilfenol)
PCP	pentaclofenol
PET	politereftalato de etila
PHMB	polihexametileno Biguanida
PSC	Pomares de Sementes Clonares
QACs	quaternary Ammonium Compounds (compostos quaternários de amônios)
QSAR	<i>quantitative Structure-Activity Relationship</i> (relação quantitativa entre estrutura química e atividade)
SBS	Sociedade Brasileira de Silvicultura
SDS	dodecil sulfato de sódio
TEA	trietanolamina
T_{eb}	Temperatura de Ebulição
TG	Termogravimetria
TGE	<i>Tryptone Glucose Extract Ágar</i>
TSA	Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos (Antibiograma)
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFC mL⁻¹	Unidade Formadora de Colônia por Mililitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	1
2	REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1	Óleo de Pinho	4
2.1.1	O mercado de <i>Pinus</i> no Brasil	5
2.1.2	O mercado de goma-resina e da terebintina	7
2.1.3	Terebintina	11
2.1.4	Produção do óleo de pinho	13
2.1.5	Componentes do óleo de pinho	17
2.2	Derivados fenólicos	22
2.2.1	Toxicidade e ecotoxicidade dos compostos fenólicos	28
2.2.1.1	Ecotoxicidade do PCMC	29
2.2.1.2	Ecotoxicidade do OBCP	30
2.2.1.3	Ecotoxicidade do OPP	32
2.2.2	O mercado dos derivados fenólicos.....	33
2.3	Tensoativos	33
2.3.1	Sabões de ácidos graxos	36
2.3.2	Linear alquilbenzeno sulfonato (LAS)	37
2.3.3	Alfa olefina sulfonada (AOS)	38
2.4	A morfologia das bactérias	38
2.5	Métodos de controle do crescimento de microrganismos	41
2.5.1	Principais agentes antimicrobianos	44
2.5.2	Mecanismo de ação dos agentes antimicrobianos	46
2.5.3	Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana	49
2.5.3.1	Método de eficácia para produtos desinfetantes	50
2.5.3.2	Método para avaliação da atividade bacteriostática	53
2.6	Teste de estabilidade	55
2.7	Análise térmica	57
2.7.1	Termogravimetria (TG)/Termogravimetria derivada (DTG)	58
2.8	Cromatografia	62

2.8.1	Cromatografia Gasosa (CG)	63
2.8.2	Cromatografia Líquida (CLAE)	68
2.9	Espectroscopia na região do infravermelho (IV)	71
2.9.1	Espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	73
2.9.2	Espectroscopia de reflectância total atenuada (ATR)	74
3	MATERIAIS E MÉTODOS	76
3.1	Materiais	76
3.2	Métodos	76
3.2.1	Avaliação organoléptica	76
3.2.2	Índice de refração	79
3.2.3	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV)	79
3.2.4	Termogravimetria (TG) e termogravimetria derivada (DTG)	79
3.2.5	Cromatografia Gasosa (CG)	80
3.2.5.1	Cromatografia Gasosa com detector de chama (CG-DIC)	80
3.2.5.2	Cromatografia Gasosa acoplada ao espectrômetro de massa (CG-EM) .	81
3.2.6	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	82
3.2.7	Destilação a pressão reduzida	83
3.2.8	Preparo das formulações biocidas	84
3.2.9	Determinação da tensão superficial	85
3.2.10	Metodologia do disco de difusão para determinação da atividade bacteriostática	85
3.2.10.1	Preparo do método de disco de difusão	86
3.2.11	Método de suspensão para determinação da atividade bactericida	87
3.2.11.1	Preparo do método de suspensão	87
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	91
4.1	Aspectos gerais das amostras de óleo de pinho	91
4.2	Caracterização organoléptica das amostras de óleo de pinho	91
4.3	Determinação do índice de refração das amostras de óleo de pinho	92
4.4	Determinação dos espectros de absorção na região do infravermelho das amostras de óleo de pinho	93
4.5	Avaliação do comportamento térmico das amostras de óleo de pinho	95
4.6	Determinação da composição de algumas amostras de óleo de pinho	

	por cromatografia a gás.....	97
4.7	Destilação de uma amostra de óleo de pinho bruto e avaliações físico-químicas das frações	101
4.7.1	Avaliação olfativa das frações de destilação.....	102
4.7.2	Determinação dos espectros de absorção na região do infravermelho das frações de destilação	103
4.7.3	Avaliação do comportamento térmico das frações de destilação	104
4.7.4	Determinação da composição de algumas frações de destilação por cromatografia a gás	106
4.8	Avaliação microbiológica de amostras de óleo de pinho e suas frações	112
4.9	Avaliação da estabilidade das formulações biocidas	116
4.10	Determinação de derivados fenólicos por CLAE	120
4.11	Estudo da ação antimicrobiana das formulações	130
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	134
6	PERSPECTIVAS	136
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	137
	GLOSSÁRIO	146
	APÊNDICE	151
	APÊNDICE A - Tabelas comparativas entre análise CG-EM e CG-DIC ..	151
	APÊNDICE B - Espectros de absorção na região do infravermelho para as frações e resíduos obtidos no processo de destilação de uma amostra óleo de pinho bruto	153
	APÊNDICE C - Fotografias das placas do teste de halo de inibição realizado para as frações e algumas amostras de óleo de pinho e terpinoleno. Leitura realizada após 24h. Figura com resumo dos testes..	165
	APÊNDICE D - Detalhes do teste de suspensão.....	173

1 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

Com a evolução da humanidade e à medida que as pessoas passaram a viver em casas, a procura por produtos saneantes para limpeza e higienização dessas vem aumentando de modo que os produtos de limpeza têm participação crescente e cativa na cesta básica dos consumidores. Fatores como o desenvolvimento de melhores hábitos de limpeza pessoal, da casa, de ambientes de trabalho, de áreas de lazer e com a implantação de melhorias progressivas no saneamento básico das cidades, muitas conquistas foram atingidas nas últimas décadas na área da saúde. Conseqüentemente, houve redução de doenças tais como diarreia infantil e viroses, entre outras, causadas por contaminação por microrganismos.

A necessidade de produtos saneantes mais eficientes, de baixo custo e que ofereçam maior segurança ao usuário são objetos de estudos dos pesquisadores nesta área. Produtos saneantes que apresentam atividade antimicrobiana contra microrganismos patogênicos, mas não necessariamente todas as formas microbianas esporuladas em objetos e superfícies inanimadas, são denominados produtos desinfetantes.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é o órgão no Brasil responsável pela regulamentação das condições para notificação e registro dos produtos saneantes. Quando o produto saneante apresenta atividade antimicrobiana devem ser registrados na AVISA seguindo a RDC nº. 14, de 28 de fevereiro de 2007 e a Portaria nº. 15, de 23 de agosto de 1988.

Segundo a RDC nº 14, somente são permitidas como princípios ativos de produtos com ação antimicrobiana aquelas substâncias comprovadamente aceitas pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA), pelo Centro

Regulador de Alimentos e Drogas dos Estados Unidos (FDA) ou pela Comunidade Européia. No caso de substâncias ativas que não atendam a esta condição, deve-se apresentar uma série de testes toxicológicos, tais como mutagênicos, teratogênicos, carcinogênicos, entre outros, requeridos nesta resolução.

No Brasil, os principais biocidas utilizados na composição de produtos desinfetantes de uso doméstico são os quaternários de amônio e os derivados fenólicos. Faz-se uso de fragrâncias com diferentes notas olfativas para se construir uma linha de desinfetantes que atendam às exigências dos consumidores. As fragrâncias de maior aceitação para esta aplicação são aquelas que possuem notas de pinho, limão e lavanda em sua composição.

O óleo de pinho, sintetizado a partir da goma-resina natural do pinheiro, é mundialmente reconhecido por suas propriedades antimicrobianas e características olfativas. Nos produtos saneantes, ele é empregado em formulações com ação biocida como componente ativo principal, co-ativo, como fragrância ou simplesmente no suporte de apelo de marketing. Apresenta em sua composição uma variedade de terpenos, sendo o α -terpineol o seu componente principal de ação biocida.

Por apresentarem ações tensoativa e antimicrobiana, os quaternários de amônio favorecem o desenvolvimento de desinfetantes simples, encontrando-se à venda no mercado produtos compostos apenas por quaternário, corante, fragrância, conservante e água. Porém, no desenvolvimento de formulações mais ricas em número de componentes e de melhor desempenho antimicrobiano, há necessidade de se levar em consideração as interações entre componentes que possam afetar adversamente a eficácia antimicrobiana. Os quaternários de amônio podem ser inativados por tensoativos aniônicos e não iônicos, resíduos aniônicos e proteínas. Algumas formulações são inativadas por água dura (FRAISE, 1999).

O amplo emprego dos derivados fenólicos deve-se às suas ações de caráter bactericida (inclusive tuberculicida), viruscida, fungicida. Em geral, os derivados fenólicos apresentam baixa solubilidade em água e recorre-se ao uso de solventes e tensoativos para melhorar tal propriedade quando do desenvolvimento de uma formulação estável e eficaz. Entretanto, é de grande interesse saber se, e como, os adjuvantes de uma formulação alteram a atividade do agente antimicrobiano.

Por todas estas razões, o presente trabalho tem como objetivo geral avaliar a influência de três tensoativos distintos na ação antimicrobiana do *o*-fenil fenol, do *o*-benzil *p*-clorofenol e do *p*-cloro *m*-cresol. Visa-se também realizar a caracterização de amostras comerciais de óleo de pinho com o intuito de identificar outros componentes que apresentem ação antimicrobiana, além do α -terpineol.

Os tensoativos selecionados foram o linear alquilbenzeno sulfonato de sódio, uma mistura de laurato de trietanolamina e sódio e alfa olefina sulfonada.

Para atender aos objetivos gerais, foram definidos os seguintes objetivos específicos:

- elaboração de formulações desinfetantes constituídas por um sistema com tensoativo e agente antimicrobiano;
- avaliação da estabilidade das formulações desinfetantes;
- identificação do tipo e quantificação do teor de ativo fenólico nas formulações de desinfetantes;
- determinação da atividade antimicrobiana das formulações;
- caracterização físico-química e analítica de amostras de óleo de pinho;
- separação do óleo de pinho em frações e identificação de seus componentes;
- avaliação da atividade antimicrobiana de frações do óleo de pinho.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Óleo de Pinho

Comercialmente, podem ser encontrados dois tipos de óleos de pinho; óleo de pinho essencial e o material chamado simplesmente de óleo de pinho, proveniente da hidratação da terebintina.

O óleo de pinho essencial é o material extraído das agulhas, ramos e brotos do *Pinus* pelo processo de destilação a vapor. Segundo Motiejūnaitė e Pečiulytė (2004) o óleo pode ser destilado a partir de diferentes espécies de *Pinus* dependendo do país e da região onde este processo é feito. Na Escandinávia, utiliza-se o *P. sylvestris*; na França o *P. palustris*; nos Alpes, Sibéria e Montes Cápato o óleo é destilado do *P. cabrea*, *P. lambertiana*, *P. palustris*, *P. taeda*, *P. ponderosa* ou *P. sabiniana*.

Na aromaterapia, o óleo de pinho essencial é utilizado por suas propriedades anti-séptica, tônica, expectorante peitoral, diurética, estimulante, depurativa, restauradora, refrescante, desodorante, descongestionante e sudorífera, além de ser também um estimulante da glândula adrenal. Popularmente, ele é usado no tratamento de doenças como a asma, bronquite, laringite, gripe, infecção urinária, hipotensão, fadiga mental, cistite, problemas da próstata, reumatismo, gota, artrite e dores musculares.

O tipo de óleo de pinho de maior consumo é o material produzido a partir da terebintina, retirada da goma-resina do *Pinus*, cujo processo de obtenção está ilustrado na **Figura 1** e será abordado mais detalhadamente em outra seção.

O óleo de pinho apresenta-se como um líquido transparente, com cor variando de incolor a amarelo e com odor pináceo característico. Entre as diversas aplicações pode-se citar a utilização na produção de desinfetante à base de pinho, o uso para mascarar odor na indústria de tintas imobiliárias, como agente de flotação na extração de minérios, veículo em produtos agro-veterinários, como umectante na indústria têxtil, como componente em formulação de fragrâncias, entre outras.

Figura 1. Esquema do processo de obtenção de óleo de pinho a partir da goma-resina

2.1.1 O mercado de *Pinus* no Brasil

Segundo a Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas (ABRAF, 2006), os *Pinus*, originários principalmente do sudeste dos Estados Unidos e de alguns países tropicais, foram introduzidos no Brasil em meados do século XX pelo filósofo alemão Hermann Bruno Otto Blumenau. Em 1959, no Estado de São Paulo, foram plantadas mais de 800 mil mudas dando, assim, início a um plano de produção e exploração racional de madeira de florestas plantadas. Com a introdução de incentivos fiscais, a partir da década de 60 surgiram os primeiros pomares de

sementes clonais (PSC) que visavam atender à demanda crescente por semente melhorada, tanto quantitativa como qualitativamente.

Nos anos 70, no contexto da concessão de incentivos fiscais às florestas plantadas, chegou-se à conclusão de que pelo clima, solo e condições atmosféricas do país, o plantio de espécies produtivas como o *Pinus elliottii* e o *Pinus taeda* seriam a melhor opção para obtenção de resultados econômicos rentáveis.

Segundo a Sociedade Brasileira de Silvicultura (SBS, 2008), a área total com florestas plantadas em 2006 no Brasil totalizou 5,74 milhões ha, sendo: 3,55 milhões de ha com eucalipto; 1,82 milhões de ha com *Pinus*; e 370,5 mil ha de outras espécies (**Tabela 1**), apresentando um crescimento de pouco mais de 175 mil ha em relação ao ano de 2005 (5,56 milhões ha).

Tabela 1 - Área Brasileira com Floresta Plantada - 2006

ESTADO	EUCALIPTO	PINUS	TOTAL (ha)
Minas Gerais	1.083.744	152.000	1.235.744
São Paulo	816.880	146.474	963.354
Paraná	121.908	686.453	808.361
Santa Catarina	70.341	530.992	601.333
Bahia	540.172	54.820	594.992
Rio Grande do Sul	184.245	181.378	365.623
Espirito Santo	207.800	4.408	212.208
Mato Grosso do Sul	119.319	28.500	147.819
Pará	115.806	149	115.955
Maranhão	93.285	0	93.285
Amapá	58.473	20.490	78.963
Goiás	49.637	14.408	64.045
Mato Grosso	46.146	7	46.153
Outros	41.392	4.190	45.582
Total	3.549.148	1.824.269	5.373.417
Outras espécies			370.519
TOTAL			5.743.936

Fonte: Abraf, 2007

Minas Gerais apresenta a maior área de floresta plantada do país (1,23 milhões ha), seguido por São Paulo (963,3 mil ha), o que corresponde a 21,5% e 16,8%, respectivamente, do total.

A madeira de *Pinus* constitui importante fonte de matéria-prima na fabricação de painéis reconstituídos, compensados, serrados, celulose e papel e goma-resina, entre outras aplicações.

2.1.2 O mercado de goma-resina e da terebintina

A resinagem no Brasil teve início na década de 70, e evolui de tal forma que, em 1989, o País passou da condição de importador para exportador deste produto e de seus derivados. Atualmente, o Brasil é o terceiro maior produtor mundial de goma-resina, tendo produzido mais de 106,4 mil t na safra 2006/2007, dos quais aproximadamente 38,5 mil t são de resina proveniente do *Pinus* tropical e 67,9 mil ton do *Pinus elliottii*.

Segundo a SBS (2008), a implantação e o manejo de florestas de *Pinus* para a produção de resina constituem-se em uma alternativa social e econômica para a fixação do homem no campo, seja pela capacidade em antecipar receitas, seja pela criação de empregos diretos e indiretos durante o processo de extração, processamento e beneficiamento industrial.

No estudo da avaliação econômica da resinagem em florestas tropicais de *Pinus elliottii* realizado por Figueiredo Filho *et al.* (1992), os autores argumentam que se a produção média de goma-resina for de 1,5 kg/árvore/ano, não é vantajoso resinar e, caso a produção seja de 2,0 kg/árvore/ano, a resinagem torna-se vantajosa a partir do 6º ano e ainda, considerando-se custos de produção de no

máximo 0,50 US\$/árvore/ano, só é vantajoso resinar a partir do 8º ano. Quando se têm médias de produção superiores a 3,0 kg/árvore/ano, o emprego da resinagem passa a ser vantajoso no manejo, chegando a ter-se uma receita líquida por árvore superior a US\$ 8,00, dado que o custo de produção é baixo.

Segundo a Associação de Resinadores do Brasil – ARESB, a produção nacional de goma-resina de *Pinus* em 2006 foi de aproximadamente 106,4 mil toneladas, sendo o estado de São Paulo responsável por 42,3% desse total e Minas Gerais, por 22,4%. O restante da produção distribui-se respectivamente por RS 18,4%; MS 8,4%; PR 4,6%; BA 2,1% e TO 0,9%. As exportações brasileiras de resina, breu e terebintina totalizaram US\$ 48,2 milhões em 2006 e os principais destinos das exportações dessas matérias-primas foram, respectivamente:

- a) resina: Argentina (82%), Espanha (8%), Rússia (7%);
- b) breu: Países Baixos (20%), EUA (19%), Portugal (13%);
- c) terebintina: França (48%), México (32%), EUA (6%).

Segundo Garrido *et al.* (2006) e Kronka, Bertolani e Ponce (2005), a resinagem empregada nos últimos anos no Brasil consiste na remoção periódica de parte da casca da árvore, sob forma de faixas ou estrias com 2 a 3 cm de altura, dependendo do diâmetro da árvore, em intervalos de 14-15 dias. A resina encontra-se no lenho dos pinheiros, dentro de canais resiníferos verticais e horizontais, sendo necessária a aplicação de uma solução ácida para destruir as paredes celulósicas destes canais, permitindo assim a livre exsudação da resina. A solução ácida empregada pode ser o ácido sulfúrico (25%) ou uma “pasta ácida” (mistura de ácido sulfúrico com casca de amendoim ou farelo de arroz). A safra de coleta da goma-resina vai de setembro a abril/maio e neste período são executadas

aproximadamente de 18-20 estrias na árvore, resultando um painel de 50 cm por safra. A **Figura 2** ilustra o procedimento de resinagem.

Figura 2. Detalhes do processo de resinagem. (a) Corte do "bigode" para fixação do saco plástico coletor; (b) aplicação da pasta ácida; (c) vista de uma área de resinagem; (d) detalhe do tronco de uma árvore de *Pinus*.

A goma-resina obtida a partir de florestas plantadas de *Pinus* oferece, por destilação, uma fração volátil denominada terebintina e uma fração fixa, o breu.

Kolicheshi (2006) descreve uma metodologia de tratamento da goma-resina para obtenção de terebintina e breu onde o aquecimento da goma-resina é seguido pela adição de ácido oxálico e terra diatomácea. Esta mistura é fundida entre 180 e 200°C e diluída com terebintina reciclada da goma-resina processada anteriormente. O material fluido é então filtrado, lavado e deixado em decantação a 80°C por um período de 4 a 8 horas. Uma nova filtração é realizada e as frações obtidas da goma-resina são separadas por destilação, que pode ser à pressão atmosférica ou à pressão reduzida. Os produtos obtidos após a destilação são:

a) 60 – 85% de breu, também chamado de “*gum-resin*” ou breu vivo. O breu é um material resinoso, não volátil, composto de ácidos monocarboxílicos derivados do ácido abiético;

b) 15 – 30% de terebintina, também chamada de “*turpetine*” ou óleo essencial de terebintina, que é predominantemente uma mistura de hidrocarbonetos monoterpênicos bicíclicos $C_{10}H_{16}$, onde os constituintes principais, na maioria das vezes, são o α -pineno e o β -pineno.

As variações dos tipos e da concentração de terebintina dependem da origem e do tratamento durante a refinação. Estes fatores incluem: a idade de corte da árvore, a localização geográfica, o tipo de fragmentos coletados no processo e as técnicas usadas na refinação.

A fim de avaliar algumas destas influências, Brito, Barrichello e Trevisan (1978) estudaram a correlação entre a temperatura, a precipitação pluviométrica e a produção de goma-resina de pinos tropicais (*Pinus caribaea* var. *bahamensis*, *Pinus oocarpa* e *Pinus kesiya*) com idade de 10 anos, plantados na região de Piracicaba no Estado de São Paulo, Brasil. Relataram que o *P. caribaea* var. *bahamensis* apresentou maior rendimento de goma-resina que os *P. oocarpa* e *P. kesiya*, com rendimento similares. Os autores também sugeriram que a prática de resinagem pode ser realizada nos pinheiros tropicais estudados durante todo o ano, sob condições de temperaturas médias quinzenais distribuídas entre 16 e 25°C e precipitação pluviométrica com intensidades entre zero e 17 mm hora⁻¹, conforme condições utilizadas no experimento e sem prejuízo da produção média de resina.

A terebintina é utilizada como matéria-prima de indústrias químicas e farmacêuticas, principalmente como solvente em certas tintas especiais e na fabricação de óleo de pinho.

Já o breu é aplicado na fabricação de tintas, vernizes, plásticos, lubrificantes, adesivos, inseticidas, germicidas e bactericidas. Seu principal emprego, todavia, está na fabricação de cola de breu, de uso generalizado na indústria de papel.

2.1.3 Terebintina

Terebintina é o termo genérico usado para designar o óleo volátil presente nas árvores, principalmente nas coníferas e o método de isolamento da terebintina irá fornecer a sua denominação. A seguir são citadas algumas das denominações utilizadas:

- a) terebintina de goma ou de resina ou cola de terebintina** (Latim: "*oleum terebinthinae*", Fr: "*essence de térébinthine*", Al: "*Balsamterpentinoel*", Ing.: "*gum turpentine*") – esta designação refere-se ao tipo de terebintina obtida pela destilação por arraste a vapor d'água da goma-resina presente nas árvores vivas.
- b) terebintina destilada por vapor ou terebintina destilada de madeira** (Fr.: "*essence de bois distillée à la vapeur*", Al.: "*Wasserdampfdestilliertes Wurzelterpentinöl*", Ing.: "*Steam distilled wood turpentine or wood turpentine*") – esta designação refere-se ao tipo de terebintina obtida pelo processo de destilação a vapor d'água ou por extração por solventes de tocos ou de árvores velhas abatidas.
- c) terebintina destilada destrutivamente** (carbonização) – refere-se ao tipo de terebintina preparada a partir do destilado obtido na carbonização da madeira.
- d) terebintina sulfato ou terebintina Kraft ou terebintina sulfatada bruta** (Fr.: "*essence de papeterie de sulfate brute*", Al.: "*Rohsulfatterpentinöl*", Ing.:

“*Crude sulfate turpentine*”) – é um subproduto recuperado dos condensados dos digestores de cozimento da polpa de papel pelo processo de sulfato alcalino conhecido como processo Kraft. É uma mistura de materiais terpênicos e compostos orgânicos de enxofre (cerca de 12%) conferem mau odor.

e) terebintina sulfatada refinada - é obtida a partir da terebintina crua sulfatada após refino para a retirada dos compostos orgânicos de enxofre.

f) terebintina sulfito (Ing. “*sulfite turpentine*”) - esta designação refere-se ao subproduto no processo de polpação de *Pinus* por sulfito na produção de papel.

Como foi mencionando na **seção 2.1.2** a composição química da goma-resina sofre influência das condições que envolvem a resinagem, tais como o tipo de *Pinus*, região de plantio, idade de corte, época de coleta e condições climáticas. Conseqüentemente seus produtos, terebintina e breu, sofrem as modificações em suas composições conforme exemplificado na **Tabela 2**.

Tabela 2 - Composição típica de algumas resinas e terebintina de três tipos de *Pinus*

<u>Composição da resina</u>	Teores (%)		
	Pee	Pcb	Po
Colofônia (Breu)	68,45	75,94	75,52
Água + Casca	11,75	8,61	10,22
Terebintina	19,40	15,44	14,25
<u>Composição da terebintina</u>			
Alfa pineno	63,5	52,3	52,8
Beta Pineno	16,6	1,6	3,9
Beta Felandreno	8,7	17,4	13,9
Longifoleno	5,3	2,8	5,6
Limoneno	-	18,0	-
Terpinoleno	1,2	3,2	20,3
Outros	4,7	4,7	3,5

Pee: *P. elliottii* var. *elliottii*; Pcb: *P. caribaea* var. *bahamensis*; Po: *P. oocarpa*
 Fonte: Brito; Barrichelo; Gutierrez, 1980; Ramos, Garcia, 2007.

2.1.4 Produção do óleo de pinho

O óleo de pinho é uma mistura de alcoóis terpênicos e hidrocarbonetos. Na literatura são encontrados estudos realizados para a investigação da hidratação de terpenos sob catálise ácida, utilizando como material de partida a terebintina de goma, terebintina sulfatada (PAKDEL; SARRON; ROY, 2001, SANTOS, 2005) e o α -pineno isolado (CASTANHEIRO; RAMOS; VITAL, 2003, MOSHIDA *et al.*, 2007, LIU *et al.*, 2008). Muitos dos estudos buscam não só alternativas de catalisadores como também definições das condições de processo, visando aumentar o rendimento da reação e a seletividade do processo de transformação do α -pineno em α -terpineol, utilizando a quantificação deste componente como controle de rendimento e seletividade do processo.

A **Figura 3** ilustra o processo de hidratação do α -pineno e algumas reações secundárias envolvidas. Quando em meio ácido, dá-se a transferência de próton para a dupla ligação do alceno (1), forma-se um carbocátion intermediário (2) que sofre um rearranjo e reage com a água do meio para formar o álcool protonado que, na seqüência, perde H^+ formando o produto neutro (3) e regenerando o catalisador. O α -terpineol formado pode sofrer ataque eletrofílico na dupla ligação pelos íons H^+ do catalisador, formando um cátion que se desprotona, gerando 1,8 terpene. Todavia, a reação pode seguir por outras rotas, como o acoplamento do H^+ com o grupo hidroxila do α -terpineol formando um carbocátion intermediário (4), precursor de diversos produtos secundários (ex.: limoneno, terpinoleno, α -terpineno). Entretanto, deve-se considerar que a síntese do óleo de pinho a partir da terebintina envolve outras reações secundárias devido à complexidade de sua composição.

Figura 3. Esquema das reações envolvidas no processo de hidratação do α -pineno (adaptada de Liu *et al.*, 2008)

Existe uma variedade de catalisadores ácidos que podem ser utilizados neste processo, tais como os ácidos minerais (ROMÁN-AGUIRRE *et al.* 2005), heteropoliácidos (GUSEVKAYA, 2001; ROBLES-DUTENHEFNER, 2001), resinas trocadoras de cátions e zeolitas (CASTANHEIRO; RAMOS; VITAL, 2003; MOCHIDA *et al.*, 2007; VITAL *et al.*, 2000). Alguns dos trabalhos encontrados na literatura sobre a hidratação do α -terpineol estão comentados a seguir.

Em 1947, Mosher realizou a hidratação do α -pineno com ácido 1-cloro-4-naftaleno sulfônico durante um processo de 6 horas. Obteve um rendimento de 30% em teores de terpenos monociclos, identificou as presenças de dipenteno, terpinoleno, α -terpeno e p-cimeno e sugeriu a presença de p-mentano e γ -terpinene.

Williams e Whittaker (1971) pesquisaram o rearranjo que ocorria na hidratação sob catálise ácida do α -pineno e do β -pineno, empregando ácido sulfúrico (em ácido acético aquoso 10% ou ácido acético anidro) e com ácido perclórico (em

ácido acético aquoso 10%). Observaram que o rendimento máximo é alcançado após 6 horas de reação, em ambos os casos. Entretanto, o rendimento foi de 55% para o ácido perclórico e 34% com o ácido sulfúrico. Inferiram que, com o ácido sulfúrico em ácido acético 10%, a taxa de conversão para o β -pineno é menor que para o α -pineno. Propuseram que a mudança de ácido acético anidro para o ácido acético aquoso 10% reduz a distribuição de produto, aumentando assim as seletividades.

Vital *et al.* (2000) compararam a seletividade e a atividade da hidratação do α -pineno usando zeólita USY, zeólita beta ou carbono ativado de superfície modificada, com o desempenho da membrana de polidimetilsiloxane (PDMS) preenchida com estes catalisadores. A reação foi realizada a 50°C, usando acetona aquosa (na relação acetona/água, 1:1 v/v) como solvente. Para a zeólita USY, a seletividade máxima foi de 30% para o catalisador livre e 55% para a membrana composta. Já no caso da zeólita beta ocorreu o efeito contrário, quando a seletividade máxima de 70% com o catalisador livre caiu para 58% na presença da membrana. Para o carbono ativado, a membrana causou um ligeiro aumento na seletividade. Em todos os casos a quantidade de catalisador na membrana não teve efeito na seletividade.

Pakdell, Sarron e Roy (2001) investigaram a hidratação do α -pineno e da terebintina crua sulfatada sob diversas condições. Neste estudo, as condições ótimas de reação de hidratação foram obtidas utilizando uma solução 15% de ácido sulfúrico com adição de excesso de acetona em um banho aquecido a 80-85°C por um período de 4 horas. Nestas condições, o rendimento para formação de α -terpineol foi de 67% a partir do α -pineno e 77% com relação ao teor inicial de α -pineno contido na terebintina crua. Observaram que o tempo prolongado favorece as

reações secundárias da hidratação, principalmente a formação progressiva de 1,8-terpine, após 4 horas de processo.

Castanheiro *et al.* (2003) estudaram a hidratação do α -pineno a α -terpineol utilizando uma membrana polimérica catalítica, consistindo de HPMo (ácido dodecamolibdofosfórico) imobilizado em polivinilálcool (PVA), com ligações cruzadas com 10, 20 e 30% de ácido succínico e HPMo imobilizado em zeólita USY dispersa em uma matriz de PDMS. A atividade da membrana HPMo/PVA aumenta com as ligações cruzadas de polímero devido ao aumento na hidrofobicidade da membrana. Todavia, este aumento é limitado pelo avanço das restrições de mobilidade da molécula. A membrana HPMo-USY/PDMS mostrou alta seletividade para a hidratação do pineno, maior que aquela observada com HPMo presa apenas em USY. Entretanto, a seletividade para o α -terpineol (65% a uma conversão de 80%) é pouco maior que a observada com HPMo/PVA com 20 a 30% de ácido succínico (70 a 75% para conversão de 90%). Para ambas as membranas catalíticas, a estabilidade da membrana é razoavelmente boa e a atividade catalítica da membrana aumenta com usos subseqüentes, provavelmente devido à interação entre o α -terpineol retido e a matriz polimérica.

Román-Aguirre *et al.* (2005) estudaram o uso do ácido cloroacético como agente catalisador da hidratação do α -pineno, utilizando água como doador de hidroxila. A maior seletividade atingida foi de 95,5% com taxa de conversão de 10%. Por outro lado, a maior conversão foi de 99% com seletividade de 70% após 4 horas de reação.

A procura do mercado consumidor por produtos naturais vem impulsionando nos últimos tempos o desenvolvimento de processos biotecnológicos na produção de aromas naturais, também chamados de “bioaromas”. Maróscatica Júnior e

Pastore (2007) apresentaram uma seleção de trabalhos envolvendo a biotransformação de limoneno em treze substâncias distintas, entre elas o *R*-(+)- α -terpineol. Os autores pontuam como pioneiro o estudo feito por Kraidman *et al.*¹, em 1969, no qual a transformação do limoneno a α -terpineol foi catalisada por uma linhagem de *Cladosporium* sp. Os autores citam que, desde 1985, vários trabalhos têm abordado o relevante potencial de linhagens de *Penicillium* sp ao converter *R*-(+)-limoneno em *R*-(+)- α -terpineol, mencionando especificamente o trabalho de Tan *et al.*², no qual a linhagem utilizada demonstrou enantiosseletividade e enantioespecificidade ao converter a mistura racêmica de limoneno a *R*-(+)- α -terpineol. A atividade aumentou mais de 12 vezes após indução por meio da adição seqüencial do substrato, o que proporcionou um rendimento de 3,2 g L⁻¹ de α -terpineol após 96 h de reação em escala laboratorial.

2.1.5 Componentes do óleo de pinho

Os compostos terpênicos que constituem o óleo de pinho são encontrados na natureza como componentes dos óleos essenciais de muitas plantas. Os terpenos podem ser hidrocarbonetos ou compostos com oxigênio, tais como álcoois, aldeídos ou cetonas que são chamados de terpenóides. Antigamente eles eram considerados como derivados do isopreno ($\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}=\text{CH}_2$), mas em seguida descobriu-se que seu precursor é o ácido mevalônico, o qual provém da acetil coenzima A. A partir da utilização da regra do isopreno (Wallach 1887) que considera a divisão da estrutura dos terpenos em unidades de isopreno (C_5H_8)_n, pode-se atualmente, estudá-los, conforme classificação apresentada na **Tabela 3**.

¹ Kraidman, G.; Mukherjee, B. B.; Hill, I. D.; *Bacteriol. Proc.* **1969**, 69, 63.

² Tan, Q.; Day, D. F.; Cadwallader, K. R.; *Process Biochem.* **1998**, 33, 29.

Tabela 3 – Classificação dos terpenos

Unidade de Isoprenos	Número de carbonos	Classificação	Exemplo
1	5	Hemiterpeno	
2	10	Monoterpeno	Pineno, limoneno, citral, nerol, mentol
3	15	Sesquiterpeno	Nerolidol, farnesol, cedrol
4	20	Diterpeno	Vitamina A, estevioside, isofitol
5	25	Sesterpeno	
6	30	Triterpeno	Esqualeno, lanosterol
8	40	Tetraterpeno	Caroteno
>8	>40	Politerpeno	Clorofila

Fonte: KIRK-OTHMER Encyclopedia of chemical technology, 1983

Na **Tabela 4** são apresentados os principais componentes presentes no óleo de pinho, terpenos e terpenóides, e algumas de suas propriedades físico-químicas.

Tabela 4 – Principais componentes presentes no óleo de pinho e algumas de suas propriedades físico-químicas

Terpeno	CAS Reg. No.	Fórmula Molecular	Massa Molar	Estrutura	T _{eb760} °C	logP ACD/LoD	CLog P	Solubilidade
α-pineno	80-56-8	C ₁₀ H ₁₆	136,23		156,2	4,37	4,741	i H ₂ O(18 mg L ⁻¹); msc EtOH, eth, chl
canfeno, (+)	(+)1422321 (-)1422353	C ₁₀ H ₁₆	136,23		161,0	4,37	4,182	vs eth
β-pineno	127-91-3	C ₁₀ H ₁₆	136,23		166,0	4,37		i H ₂ O(23 mg L ⁻¹); s bz, EtOH, eth, chl
α-felandreno	99-83-2	C ₁₀ H ₁₆	136,23		171,0	4,43	4,412	i H ₂ O; msc eth
1,4 - cineol	470-67-7	C ₁₀ H ₁₈ O	154,25		172,0	2,58	2,736	i H ₂ O (153 mg L ⁻¹); s EtOH
Careno-2	554-61-0	C ₁₀ H ₁₆	136,23		167,5	4,20		
(+)-R- limoneno	5989-27-5	C ₁₀ H ₁₆	136,23		175,0	4,45	4,352	i H ₂ O (14 mg L ⁻¹), pg; s querosene, EtOH, óleo de parafina, óleo fixo

continua

[illegible]

Terpeno	CAS Reg. No.	Fórmula Molecular	Massa Molar	Estrutura	T _{eb} 760 °C	logP ACD/LoD	CLog P	Solubilidade
borneol, (±)	6627-72-1	C ₁₀ H ₁₈ O	154,25		Sub	2,71	2,720	i H ₂ O; vs EtOH, eth, bz
4 – terpinenol	562-74-3	C ₁₀ H ₁₈ O	154,25		209,0	2,99	2,749	2,94 mg L ⁻¹ em H ₂ O
α-terpineol	196838	C ₁₀ H ₁₈ O	154,25		220,0	2,79	2,629	sl H ₂ O;vs ace,bz,eth, EtOH
γ-terpineol	586-81-2	C ₁₀ H ₁₈ O	154,25		218,0	3,14	2,749	
hidrato de terpin	2451-01-6	C ₁₀ H ₂₀ O ₂ ·H ₂ O	190,28		265,0	1,07		
terpin	80-53-5	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	172,27		258	1,60		1g dissolve em 250mL H ₂ O, 77 mL bz, 140 mL eth

i= insolúvel; sl= solúvel; vs= muito solúvel; msc= miscível; ace= acetona; bz= benzeno; EtOH= etanol; eth= éter; chl= clorofórmio; teb= temperatura de ebulição

Fonte: Chemspider; CRC Handbook of Chemistry and Physics; NIST Livro de Química na Web.

2.2 Derivados fenólicos

A maior importância do uso do fenol (ácido carbólico) deve-se ao fato de Joseph Lister tê-lo utilizado em seu trabalho pioneiro sobre anti-sepsia cirúrgica, publicado em 1867 na revista inglesa *Lancet* sob o título “*On the antiseptic principle in the practice of surgery*”, dando assim início à história dos germicidas. Lister tomou conhecimento dos estudos de Pasteur sobre a teoria microbiana das doenças e a partir deste conhecimento encontrou uma forma de combater as infecções. Uma extraordinária redução na incidência de infecções pós-operatória foi alcançada ao se utilizar um *spray* com solução de fenol na desinfecção de salas cirúrgicas e ao se adotar a prática de cobrir as feridas com ataduras embebidas em solução diluída de fenol. O fenol, por outro lado, é também utilizado como composto padrão para comparar a atividade antimicrobiana de um desinfetante, como será descrito posteriormente neste trabalho. Ele apresenta ação bactericida (inclusive tuberculicida), viruscida e fungicida comprovadas, tendo sido usado amplamente como agente desinfetante por muitos anos. Porém, mais recentemente, devido à sua toxicidade e ao seu característico odor desagradável, o fenol propriamente dito não é muito utilizado como desinfetante ou anti-séptico e, para muitas aplicações, tem sido substituído por vários derivados químicos ou compostos químicos relacionados que são menos tóxicos para o tecido, menos irritante para a pele e mais ativos contra os microrganismos.

Por muitos anos, o principal processo de obtenção do fenol e de seus derivados foi por meio da destilação destrutiva do carvão de hulha, sendo possível se obter, a partir deste processo, mais de 50 substâncias fenólicas que são separadas por apresentarem diferentes pontos de ebulição. A primeira substância a

ser separada é o fenol ($T_{eb} = 182^{\circ}\text{C}$), seguida dos cresóis ($T_{eb} = 189\text{-}205^{\circ}\text{C}$), xilenóis ($T_{eb} = 210\text{-}230^{\circ}\text{C}$) e, por fim, uma mistura de ácidos pesados ($T_{eb} = 230\text{-}310^{\circ}\text{C}$) que compreende propilfenol, tetrametilfenol, dietilfenol, naftol entre outros (GODDARD; McCUE, 2000).

Nos dias atuais, os compostos fenólicos são produzidos em larga escala por meio de processos industriais eficientes e que geram produtos com alto teor de pureza.

Os processos mais empregados para a síntese de fenol são: Processo Dow-Bayer; Processo Dow Califórnia Research; Processo Scientific Design e Processo Hock. Este último foi desenvolvido em 1944 por Hock e Lang e é o mais usado atualmente. Consiste na alquilação do benzeno a iso-propil benzeno (cumeno) o qual é oxidado a hidroperóxido de cumeno que, posteriormente, sofre clivagem em meio ácido para produzir fenol e acetona (PASSONI, 1998).

O processo de síntese mais importante para a produção de 2-fenil-fenol inicia-se com o ciclohexano que é condensado a 2-ciclohexenil-cicloexanona que em seguida, por meio de desidratação catalítica, proporciona o 2-fenil-fenol com ótima pureza e alto rendimento de reação. Com o aquecimento de cloreto de benzilo em excesso de fenol é possível obter as formas 2- e 4- benzil-fenol. Estes produtos podem formar os correspondentes cloro-benzil-fenóis pela adição de SO_2Cl_2 , sendo o 2-benzil-4-clorofenol a mais importante forma dentro deste grupo. Os clorofenóis, por sua vez, são materiais de partida para produção de diclorofenóis e hexaclorofenóis que são formados durante a reação irreversível do formaldeído com 4-clorofenol ou 2,4,5-triclorofenol (PAULUS, 2005).

O fenol e seus derivados atacam a parede celular provocando danos generalizados nesta e induz uma progressiva perda de constituintes intracelulares.

Em altas concentrações ocorre coagulação intracelular. Em baixas concentrações, por outro lado, a adsorção do fenólico na membrana citoplasmática da célula e os danos relacionados a esta adsorção são reversíveis, o que confere caráter bacteriostático. Pelo exposto, dependendo da concentração utilizada, a ação dos derivados fenólicos pode ser bacteriostática ou bactericida (PAULUS, 2005; RUSSEL, 2003).

A capacidade de penetração de um fenólico na célula depende da sua hidrofobicidade, que é quantificada pelo coeficiente de partição octanol/água ($\log POW$; $\log P$ ou $\log POA$). A melhor ação antimicrobiana de um dado derivado fenólico é obtida quando este está na sua forma não dissociada, isto é, em meio ácido ou neutro. Por outro lado, os fenolatos apresentam maior solubilidade em água. Desta maneira, é de relevante importância o conhecimento dos valores de pK_a e $\log P$ para seleção do ativo fenólico adequado. A **Tabela 5** apresenta estes valores para alguns derivados fenólicos.

Tabela 5 – Valores de pK_a e $\log P$ para dez derivados fenólicos

Derivado Fenólico	pK_a	$\log P$
2-fenilfenol (OPP)	11,6	3,090
benzilfenol	11,6	3,40 ^a
3-metil-6-isopropilfenol	10,6	3,28 ^a
2-benzil-4-clorofenol (OBCP)	9,7	4,40 ^b
4-cloro-3,5-dimetilfenol (PCMX)	9,7	3,483
4-cloro-3-metilfenol (PCMC)	9,6	2,985
5,5'-dicloro-2,2'-dihidroxi-difenilmetano	8,7/12,6	-
2,4,6-triclorofenol	8,5	2,326
Metil-4-hidroxibenzoato	8,5	1,985
Ácido salicílico	3,0	2,183

Fonte: Paulus, 2005; ^aChemspider, 2008; ^bLanxess, 2008

A introdução no anel fenólico de grupos com efeito indutivo atraentes de elétrons, como halogênios e em especial o Cl, confere um caráter mais ácido ao anel

e conseqüentemente maior ação antimicrobiana. Quando a substituição do halogênio ocorre na posição 4 (*p*-) a eficiência antimicrobiana é maior que na posição 2 (*m*-).

Os alquil fenóis são menos solúveis e menos ácidos que o fenol, porém apresentam maior capacidade para reduzir a tensão superficial, melhorando assim a ação antimicrobiana da substância. Quanto maior a cadeia linear, maior será a ação antimicrobiana, atingindo um máximo para cadeia linear C₆ na posição *p*-. Cadeias ramificadas com o mesmo número de carbono de uma cadeia linear apresentam menor ação antimicrobiana. A **Figura 4** ilustra a estrutura do 2-benzil-4-clorofenol (o-benzil-p-clorofenol) que apresenta substituição de grupo benzil na posição 2 e Cl na posição 4, a do 4-cloro-3-metilfenol e do 2-hidroxibifenilo.

Figura 4. Estruturas do (a) 2-benzil-4-clorofenol (OBPC), (b) 4-cloro-3-metilfenol (PCMC) e (c) do 2-hidroxibifenilo (OPP)

A **Tabela 6** apresenta um pequeno painel das diferenças de concentração inibitória mínima para diferentes derivados fenólicos.

Um recurso para melhorar a solubilidade dos compostos fenólicos, e conseqüentemente aumentar a sua atividade antimicrobiana no sistema, é o uso de tensoativos.

Tabela 6 - Concentração inibitória mínima (CIM) de derivados fenólicos em ágar nutriente (mg L⁻¹)

	OPP	BP	OBCP	PCMC	PCMX	DC	PCP
<u>Bactérias</u>							
<i>Escherichia coli</i>	200	500	3500	250	200	100	500
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1500	5000	5000	800	1000	>5000	500
<i>Staphylococcus aureus</i>	100	100	20	200	100	5	10
Bactérias resistentes ao formaldeído	750	4000	>5000	250	300	300	250
<u>Leveduras</u>							
<i>Candida albicans</i>	100	100	50	200	75	50	35
<i>Torula rubra</i>	100	100	50	50	100	50	100
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	200	50	50	200			
<u>Fungos</u>							
<i>Aspergillus niger</i>	75	100	100	100	100	100	50
<i>Penicillium citrinum</i>	35	100	75	100	50	50	50
<i>Rhizopus nigricans</i>	50	100	50	100	100	35	15
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>			5-10	50-100			
<i>Trichophyton pedis</i>	20	20	10	100	50	10	10

OPP=2-fenilfenol; BP=benzilfenol; OBCP=α-benzil-*p*-clorofenol; PCMC=*p*-cloro-*m*-cresol; PCMX=*p*-cloro-*m*-xilol; DC=5,5'-dicloro-2,2'-dihidroxi-difenil metano; PCP=pentaclofenol.

Fonte: Paulus, 2005; Lanxess, 2007a, 2007b

Segundo Paulus (1993), em concentrações baixas de tensoativo, nas quais não há formação de micelas, a disponibilidade do derivado fenólico é maior. Porém, em concentrações altas de tensoativos (em especial tensoativos não-iônicos, mas em menor grau também para os aniônicos), deve-se aumentar a concentração de derivados fenólicos para manter-se a ação biocida. Isto se deve ao fato de ocorrer a inclusão do biocida nas micelas formadas quando o tensoativo apresenta concentrações acima da sua concentração micelar crítica (cmc), reduzindo a adsorção do biocida às bactérias.

Já Bean e Berry (1951) estudaram a atividade antimicrobiana do OBCP em uma solução de laurato de potássio e concluíram que tanto a concentração de sabão e a de biocida, quanto a relação destas, influenciam na atividade antimicrobiana do

OBCP, apresentando relações favoráveis e desfavoráveis para atividade antimicrobiana. E ainda, que a atividade antimicrobiana está diretamente relacionada com a concentração de OBCP na micela e independe da concentração na solução.

Os tensoativo não-iônicos como, por exemplo, o Tween 80, são utilizados como inibidores da atividade antimicrobiana, quando da execução de ensaios microbiológicos como será apresentado na **seção 3.2.11.1**.

O 4-cloro-3-metil-fenol (*p*-cloro *m*-cresol, PCMC) apresenta um amplo e equalizado espectro de ação antimicrobiana, que abrange bactérias, leveduras e fungos, sendo eficaz também contra os vírus da hepatite B, herpes e HIV, mesmo na presença de contaminação de matérias orgânicas como proteínas. Em geral, altas concentrações são necessárias para atingir eficiência contra micobactérias (1500-5000 ppm para *Mycobacterium tuberculosis* ATCC 25618). Sua eficiência é maior entre pH 4 e 8 e apresenta grande solubilidade em água (580 g L⁻¹ a 20°C) (PAULUS, 2005). Por todos estes atributos, o PCMC e o seu sal sódico são utilizados como conservante em tintas, adesivos, pigmentos, aditivos para concreto, nos produtos têxteis e artefatos de couro, como também em uma variada gama de formulações de desinfetantes hospitalares, podendo estar associado a uma pequena quantidade de glutaraldeído, a fim de atingir maior eficiência viruscida (PAULUS, 2005, LANXESS, 2007a).

Outro importante representante deste grupo é o 2-benzil-4-cloro-fenol (*o*-benzil -*p*-clorofenol, OBCP). O espectro de atividade do OBCP é amplo para fungos e leveduras, mas apresenta falhas para bactérias, como *Pseudomonas*. Em formulações de desinfetantes, pode ser usado em combinação com outros ativos fenólicos, melhorando o espectro de ação antimicrobiana do produto e podendo-se também diminuir a concentração de OBCP, o que minimiza o risco de aparecimento

de irritação da pele. O OBCP atua melhor em pH entre 4 e 8, porém é estável em toda faixa de pH entre 1 e 14. Devido à sua baixa solubilidade em água ($0,5 \text{ g L}^{-1}$ a 20°C) em muitas formulações, está associado aos tensoativos uma vez que é compatível com tensoativos aniônicos, sabões e, em certas condições, com não iônicos, porém não é compatível com catiônicos. Apresenta aplicações em formulações desinfetantes para uso hospitalar, doméstico, industrial e veterinário (PAULUS, 2005; LANXESS, 2008).

O 2-fenil-fenol (*o*-fenil-fenol, OPP) apresenta um amplo espectro de atividade antimicrobiana, valores favoráveis de toxicidade e é completa e rapidamente biodegradado. Sua solubilidade em água é baixa ($0,5\text{-}0,6 \text{ g L}^{-1}$ a 20°C), mas é facilmente solúvel em etanol (5900 g L^{-1} a 20°C). É empregado em formulações desinfetantes para uso hospitalar, doméstico, veterinário, ambientes públicos, indústria de madeira, papel, couro, têxtil, colas e adesivos e preservação de frutas entre outras aplicações, podendo ser associado a outros derivados fenólicos como o OBCP e o PCMC (PAULUS, 2005; LANXESS, 2007b).

2.2.1 Toxicidade e ecotoxicidade dos compostos fenólicos

O conhecimento da toxicidade e da ecotoxicidade dos fenólicos é de grande importância e deve ser levado em consideração quando da seleção e decisão de uso destes como agentes biocidas ou bacteriostáticos.

Apesar de alguns derivados fenólicos apresentarem alta toxicidade e baixa biodegradabilidade e, por isso, apresentarem alto índice de rejeição quanto ao seu uso, há um vasto número de derivados fenólicos que apresentam características toxicológicas e ecotoxicológicas que permitem seu uso de forma segura.

A **Tabela 7** apresenta valores de toxicidade de alguns dos fenólicos mais consumidos mundialmente. Pode-se observar que apesar do fenol propriamente dito apresentar baixo valor de DL_{50} (317 mg kg^{-1}), os derivados fenólicos aludidos na tabela possuem altos valores de DL_{50} com exceção do pentaclorofenol (150 mg kg^{-1}).

Tabela 7 - Dados toxicológicos do fenol e alguns de seus derivados

Fenólicos	DL_{50} oral, rato (mg kg^{-1})	Irritação		Toxicidade Percutânea
		Pele	Mucosa	
Fenol	317	++	++	++
OPP	2.700	+	++	-
BP	3.360	++	++	-
PCMC	1.830	++	++	-
OBCP	>5.000	++	++	-
PCMX	3.830	+	+	-
DC	3.310	-	+	-
PCP	150	++	++	++ ^b
Triclosan	4.530->5.000	-	-	

-, sem efeito; +, moderado; ++, forte; OPP, *o*-fenilfenol; BP, benzilfenol; PCMC, *p*-cloro-*m*-cresol; OBCP, *o*-benzil-*p*-clorofenol; PCMX, *p*-cloro-*m*-xilol; DC, 5,5'-dicloro-2,2'-dihidroxi-difenil metano; PCP, pentaclorofenol; ^a DL_{50} = 325 mg/kg, rato

Fonte: GODDARD, P.A., McCUE, K.A. (2000), PAULUS, W. (2005)

2.2.1.1 Ecotoxicidade do PCMC

A biodegradabilidade do PCMC foi avaliada por meio da metodologia OECD (*European Organization for Economic Cooperation and Development*) *Guideline* 301C e os resultados obtidos conferiram uma classificação de material facilmente biodegradável (>90%), formando quantidade estequiométrica de íons cloretos e sugerindo uma completa mineralização do material (PAULUS, 2005).

Lanxess (2003) apresenta dados da literatura que indicam a total mineralização do PCMC, em concentrações até 100 mg L^{-1} , pelas bactérias naturais do Rio Reno em um período de 7-14 dias, quando a substância era oferecida como única fonte de carbono. Neste estudo, a biodegradabilidade foi também avaliada por

meio do monitoramento do teor de cloreto formado. A **Tabela 8** apresenta dados de concentração letal (CL) e concentração efetiva (CE), determinados por estudos de ecotoxicidade aguda.

Tabela 8 - Dados de concentrações letal (CL) e efetiva (CE) do PCMC em diferentes organismos

Concentração	Valor (mg L ⁻¹). h
CE ₅₀ para lodo ativado	60
CE ₅₀ para algas (<i>Scenedesmus subs.</i>)	>10 (96h)
CE ₅₀ para microcrustáceo (<i>Daphnia magna</i>)	2,29 (48h)
CL ₅₀ para microcrustáceo (<i>Daphnia magna</i>)	3,90 (48h)
CL ₅₀ para peixes (<i>Leuciscus idus</i>)	1,20 (48h)
CL ₅₀ para truta arco-íris (<i>Onchorhynchus mykiss</i>)	0,92 (96h)
CL ₅₀ para peixes (<i>Pimephales promelas</i>)	7,60 (96h)

Fonte: Paulus (2005) e Lanxess (2003)

A bioacumulação do PCMC foi investigada de acordo com o *Guideline* OECD 305 C, durante um período de teste de seis semanas, utilizando-se o peixe *Oryzae latipes*, como organismo teste. O fator de bioacumulação (FBA) obtido foi 10 (LANXESS, 2003).

2.2.1.2 Ecotoxicidade do OBCP

No estudo de toxicidade e ecotoxicidade do OBCP apresentado por Lanxess (2006a), a biodegradabilidade deste material foi testada seguindo diferentes metodologias:

- a) Empregando-se a OECD 301 D (frasco fechado): relativa a uma demanda química de oxigênio (DQO) de 2170 mg g⁻¹ obteve-se, uma demanda

bioquímica de oxigênio (DBO) de 30-40% (5 dias), 40-50% (10 dias) e 45-55% (20 dias) determinados após adaptação da bactéria;

b) Em condições não climatizadas em água de rios, 0,1 mg L⁻¹ de OBCP foi degradado em 6 dias. Em esgoto 0,5 e 1,0 mg L⁻¹ degradou em 1 dia;

c) Na presença de lodo ativado em sistema climatizado, 1 mg L⁻¹ de OBCP atingiu grau de degradação de 80% em 1 hora e 100% em 24 horas.

A **Tabela 9** apresenta os dados de CL e CE determinados por estudos de ecotoxicidade aguda.

Tabela 9 - Dados de concentrações letal (CL) e efetiva (CE) do OBCP em diferentes organismos

Concentração	Valor (mg L ⁻¹). h
CE ₅₀ para lodo ativado	9,60
CE ₅₀ para algas (<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>)	0,13 (72h)
CE ₅₀ para microcrustáceo (<i>Daphnia magna</i>)	1,50 (24h)
CL ₁₀₀ para peixes (<i>Leuciscus idus</i>)	1,20 (48h)
CL ₅₀ para <i>peixe em método estático</i>	1,00 (96h)

Fonte: Paulus (2005) e Lanxess (2006a)

A bioacumulação do OBCP foi determinada por meio de estudo conduzido para amostras de OBCP intactas e radioativadas por um período de 8 dias, utilizando-se o peixe *Lepomis macrochirus* como organismo teste. Determinou-se FBA de 75 para o material intacto e 460 para o material radioativado. (LANXESS, 2006a).

Estudos de fotólise do OBCP foram realizados de acordo com a ASTM Draft N° 6, “*Proposed Standard Practice for Conducting Aqueous Photolysis Test* (1980)”, obtendo-se meia vida (t_{1/2}) de 5 dias quando utilizado água milli-Q e 16,8 h com água natural (LANXESS, 2006a).

2.2.1.3 Ecotoxicidade do OPP

Lanxess (2006b) apresenta um resumo da literatura dos resultados de biodegradabilidade do OPP obtidos a partir do emprego de diferentes metodologias:

- a) empregando-se a OECD 301 D (frasco fechado): trabalhando-se em condições adaptadas, obteve-se DBO de 50-60% (5 dias), 60-70% (10 dias) e 70-80% (20 dias);
- b) nas águas do Rio Reno, sem a inoculação, a biodegradabilidade atingiu 89% depois de 3 dias e 100% depois de 6 dias;
- c) na presença de lodo ativado, o OPP é totalmente degradado após um período de 10-14 dias.

A **Tabela 10** apresenta os dados de CL e CE do OPP determinados por estudos de ecotoxicidade aguda.

Tabela 10 - Dados de concentração letal (CL) e concentração efetiva (CE) do OPP para diferentes organismos

Concentração	Valor (mg L ⁻¹). H
CE ₅₀ para lodo ativado	62,20
CE ₅₀ para algas (<i>Scenedesmus subspicatus</i>)	0,85 (72h)
CE ₀ para microcrustáceo (<i>Daphnia magna</i>)	0,75 (24h); 0,38 (48h)
CE ₅₀ para microcrustáceo (<i>Daphnia magna</i>)	2,1(24h);1,50 (48h)
CL ₀ para peixes (<i>Leuciscus idus</i>)	20,00(96h)
CL ₀ para truta arco-íris (<i>Salmo gairdneri</i>)	5,00 (48h)
CL ₁₀₀ para peixes (<i>Salmo gairdneri</i>)	10,00 (48h)

Fonte: Paulus (2005) e Lanxess (2006b)

LANXESS (2006b) cita que o fator de bioacumulação encontra-se numa faixa de 70 a 100, calculado por meio da metodologia QSAR. Considera que, devido à metabolização da substância (por exemplo, sulfatação) o valor real do FBA deve

estar abaixo desta faixa e, desta forma, o OPP não apresentando risco de bioacumulação.

2.2.2 O mercado dos derivados fenólicos

De acordo com um estudo realizado por Kline & Company (2006) sobre o mercado americano de biocidas fenólicos, estima-se crescimento médio de consumo de derivados fenólicos de 1,7% entre 2004-2009, com uma previsão de atingir um consumo total de 14,2 Mil t em 2009.

O mercado de preservação de madeira é o maior consumidor de PCP, o que classifica o PCP como líder no mercado de fenólicos com uma participação 85% em volume e 61% em valor. Considerando o mercado brasileiro de produtos saneantes, o maior consumo é do OBCP.

2.3 Tensoativos

Tensoativos são substâncias capazes de reduzir a tensão superficial do meio no qual estão dissolvidas, podendo também reduzir ou não a tensão interfacial entre o meio no qual estão dissolvidas e outro meio condensado.

Outras denominações para tensoativos são detergentes ou surfatantes (do termo em inglês *surfactant – surface active agent*).

Uma singularidade presente nas moléculas tensoativas é a presença de duas porções estruturais distintas: uma cauda hidrofóbica e uma cabeça hidrofílica, mostrando tendências opostas de solubilidade.

Na região denominada “cabeça”, há um grupamento polar que possui afinidade por água ou por outros compostos polares e é denominado grupo hidrofílico. Como exemplo, pode-se citar os grupos carboxilato, sulfato, sulfonato, amônio quaternário, betaínicos ou cadeias polioxietilênicas, como no caso dos tensoativos não-iônicos etoxilados. Na mesma molécula, na região denominada “cauda”, há o chamado grupo hidrofóbico que, por sua natureza apolar, não possui afinidade por água, mas a possui por substâncias apolares, sendo chamado muitas vezes de grupamento lipofílico. É, normalmente, constituída por cadeias de hidrocarbonetos alifáticos ou de aromáticos, ou de ambos (FALBE, 1987).

Os primeiros tensoativos sobre os quais se têm relatos são os sabões de ácidos graxos. Acredita-se que o sabão tem sido usado há mais de 2.300 anos e que os primeiros produtores usavam gordura animal e cinzas. À medida que se fervia a mistura (composta de gordura, cinzas e água), ocorria a saponificação e neutralização, originando assim o sabão.

Os primeiros tensoativos sintéticos surgiram da necessidade de se suprir a falta de matérias-primas naturais (óleos e gorduras animais e vegetais) existente durante a Primeira Guerra Mundial. A **Tabela 11** apresenta cronologicamente o aparecimento dos diversos tensoativos usualmente comercializados para aplicações na área de higiene e limpeza.

Tabela 11- Linha do tempo dos lançamentos de alguns dos principais tensoativos de uso comercial

Data de lançamento	Tensoativo introduzido
0 a.C.	Sabões de ácidos graxos
Anos 20	Alquil sulfatos Dodecilbenzeno sulfonatos
Anos 30	Alquifenóis etoxilados Amidas Quaternários
Anos 40	Óxidos de aminas Linear alquilbenzeno sulfonatos Alcoóis etoxiladosCopolímeros EO/PO
Anos 50	Alquil éter sulfatos Alcano sulfonatos Alfa olefina sulfonadas Poliaminas
Anos 60	Betaínas
Anos 70	Alquil poliglicosídeos Ésteres metílicos sulfonados
Anos 80	Glucamidas
anos 90	Ésteres metílicos etoxilados
>2000	Monoglicerídeos sulfatados Tensoativos geminados

Fonte: Pedro, 2008

Outra classificação empregada para os tensoativos é feita segundo a natureza da cabeça polar, ou seja, grupo hidrofílico:

- a) Aniônicos:** tensoativos que em solução aquosa apresentam carga negativa em seu grupo polar. Os principais representantes desta classe são os sabões de ácidos graxos, os alquil sulfatos, os alquil éter sulfatos e os alquil sulfossuccinatos;
- b) Catiônicos:** tensoativos que em solução aquosa apresentam carga positiva em seu grupo polar. São exemplos os sais de aminas primárias, secundárias e terciárias, sais quaternários de amônio.

- c) Não iônicos: são assim caracterizados por possuírem grupos hidrofílicos sem cargas ligados à cadeia graxa. Sua solubilidade em água é devida à hidratação dos grupos hidrófilos, via ponte de hidrogênio. Como exemplos podem ser citados os alquilaril e alcoóis etoxilados e etoxilados-propoxilados, ésteres de alcoóis poli-hídricos, amidas e aminas etoxiladas.
- d) Anfóteros: são caracterizados por apresentarem, na mesma molécula, grupamentos positivo e negativo. O grupamento positivo é, normalmente, representado por um grupo de nitrogênio quaternário, enquanto que o negativo por um grupo carboxilato ou sulfonato. O grupo polar positivo é mais pronunciado em pH menor que 7 ao passo que o grupo polar negativo é mais pronunciado em pH maior que 7.

2.3.1 Sabões de ácidos graxos

Os ácidos graxos são ácidos carboxílicos de cadeia longa, variando de 10 a 30 carbonos (os mais usuais são de 12 a 18). Em moléculas com tamanho de cadeia graxa pequena, o grupo funcional ácido é dominante, o que confere um caráter polar à molécula. Por outro lado, em ácidos graxos de cadeia longa, esta atribui um caráter apolar à molécula.

O sabão é produzido pela saponificação ou reação de hidrólise alcalina de gorduras e óleos. De forma geral, são utilizados hidróxido de sódio ou carbonato de sódio para converter o ácido graxo em seu sal.

A reação de hidrólise pode ser representada como:

As cadeias graxas mais usadas na produção de sabão são: C12 (láurico) ácido saturado, C14 (mirístico) ácido saturado, C18 (esteárico) ácido saturado e C18 (oléico) ácido monoinsaturado. Sabões com cadeia menores que C8 são totalmente solúveis em água enquanto que, entre C8-C18, são parcialmente solúveis e acima de C20 são insolúveis em água (GALVAÑ, 1996).

A solubilidade do sal de sabão também é regida pelo neutralizante empregado. Os sabões de sal de potássio são mais solúveis que aqueles à base de sódio. As etanolaminas (monoetanolamina, dietanolamina e trietanolamina) apresentam sais mais solúveis e com melhores propriedades espumantes.

2.3.2 Linear alquilbenzeno sulfonato (LAS)

O tensoativo mais utilizado em formulações detergentes no mundo é o LAS, comumente chamado de ácido sulfônico. Sua alta aplicação se deve tanto ao baixo custo de produção como à sua excelência como detergente, promotor de espuma e poder de molhabilidade, apresentando uma elevada capacidade de remoção da gordura de constituição das mãos.

O LAS é produzido a partir da sulfonação do linear alquilbenzeno C₁₀-C₁₃ (LAB) com trióxido de enxofre ou com oleum (ácido sulfúrico fumegante), resultando no ácido dodecilbenzeno sulfônico, que pode ser neutralizado com hidróxido de sódio e trietanolamina, entre outros (FALBE, 1997).

Segundo Almeida *et al.* (1994), as propriedades físico-químicas do LAS dependem essencialmente da estrutura do LAB (comprimento e grau de ramificação da cadeia carbônica e posição do grupo fenil), do teor de subprodutos da reação de obtenção do LAB e dos agentes de neutralização empregados.

2.3.3 Alfa olefina sulfonada (AOS)

As AOS's foram comercialmente difundidas nos Estados Unidos após 1965. No Japão, entre 1980-81, o uso da AOS em produtos domissanitários ultrapassou aquele do LAS. As AOS's são freqüentemente escolhidas como substitutas ao linear alquilbenzeno sulfonato devido às suas propriedades de biodegradação, espuma, detergência, resistência a dureza da água e suavidade. Estas diferenças de eficácia se devem ao fato das cadeias carbônicas das alfa-olefinas variarem de C12 a C18.

Segundo boletim técnico da *Stepan Company* (2001), a biodegradação primária das AOS's comercializadas por esta empresa pode chegar a 100% em 3 a 5 dias, sob condições de laboratório. O material BIO-TERGE AS40 apresenta os seguintes dados toxicológicos e ecotoxicológicos (STEPAN, 2006):

- Não listado como carcinogênico de acordo com IARC, NTP ou OSHA.
- Toxicidade oral DL_{50} (ratos) = >500 - 5000 mg/kg
- Toxicidade dérmica DL_{50} (coelhos) = >400 < ou igual a 2000 mg/kg
- Ecotoxicidade aquática CL_{50} = >1.0-10 mg/L

2.4 A morfologia das bactérias

O conhecimento da morfologia dos microrganismos é uma ferramenta de auxílio para compreensão da interação entre estes com um dado agente atimicrobiano, levando à compreensão do mecanismo de ação desta interação e da seletividade microbiana.

Neste trabalho, os microrganismos alvo de estudo foram as bactérias. A seguir são apresentadas algumas considerações sobre a morfologia destas.

Entre as principais características das células bacterianas estão suas dimensões, forma, estrutura e arranjo. Estes elementos constituem a morforfologia da célula, no entanto, são consideradas características morfológicas grosseiras das bactérias. Com o refinamento das técnicas de microscopia eletrônica se faz possível o maior conhecimento sobre a célula bacteriana e sua anatomia intracelular típica. Além do conhecimento das estruturas intracelulares, deve-se ter ciência de suas propriedades estruturais e funcionais na célula bacteriana.

a) Estruturas externas: é constituída de glicocálice, cápsula, flagelos, filamentos axiais (endoflagelos), fíbricas e/ou pili, endosporo (esporos) e parede celular.

- **Parede celular**: estrutura complexa, semi-rígida, cuja principal função é dar forma e rigidez à célula. De acordo com a estrutura e a organização da parede celular, as bactérias podem ser divididas em dois grupos: Gram positivas e Gram negativas.

Os constituintes básicos da parede celular de bactérias Gram positivas e Gram negativas estão ilustrados na **Figura 5** e as diferenças na sua composição estão descritas a seguir:

- ✓ **Bactérias Gram positivas**: apresentam uma parede celular relativamente simples, sendo constituída por uma membrana citoplasmática, uma camada espessa de peptidoglicano (ou mureína) e uma camada externa, que pode ou não estar presente, denominada cápsula. Contém ainda os ácidos teicóicos que quando ligados ao peptidoglicano ou a lipídeos da membrana citoplasmática são denominados ácidos lipoteicóicos. Entre 40 a 90 % do seu peso são formados de peptidoglicano, sendo que esta constituição não proporciona um grande obstáculo para a penetração de

pequenas moléculas como, por exemplo, um agente antimicrobiano (SCHMITT, 1986).

Fonte: MORETTI, 2008; E-ESCOLA: UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA, 2008

Figura 5. Representação esquemática comparando as estruturas de bactérias Gram positivas e Gram negativas

- ✓ **Bactérias Gram negativas:** sua parede celular apresenta uma estrutura mais complexa constituída de uma membrana citoplasmática (também chamada de membrana interna) circundada por uma fina camada de peptidoglicano (a quantidade de peptidoglicano não excede a 10% do seu peso seco). Presa à camada de peptidoglicano está a membrana externa, que é formada por uma dupla camada lipoprotéica constituída de proteínas, lipoproteínas, lipopolissacarídeos, porina e fosfolipídios. A complexidade da membrana externa oferece um maior impedimento de ação dos agentes antimicrobianos (SCHMITT, 1986).

- b) Estruturas internas: São as membranas internas (ou citoplasmáticas), citoplasma, nucleóide (ou região nuclear), ribossomos, glânulos (ou corpúsculos de inclusão) e vacúolos gasosos.

2.5 Tipos de tratamento para o controle de crescimento de microrganismos

Os microrganismos são as formas de vida mais difundida na natureza. Sua presença tem efeitos positivos e negativos na vida do homem e, portanto, seu controle é fundamental para evitar que estes produzam conseqüências indesejáveis para a saúde, ao meio ambiente e aos bens que compõem a qualidade de vida do ser humano.

Os tratamentos para o controle de crescimento de microrganismos podem ser realizados por meio físico ou químico, os quais devem ser específicos para a ação desejada e não devem produzir efeitos colaterais indesejáveis.

Entre os agentes físicos mais utilizados podemos citar o calor seco (estufa, incineração, aquecimento ao rubro, flambagem), a pressão, calor úmido (autoclave, água em ebulição, pasteurização), a radiação (radiação gama, raios X e ultravioleta), os filtros e dessecação (liofilização).

Quando do emprego de controle químico, faz-se uso de agentes antimicrobianos, os quais podem ser divididos, entre os que matam os microrganismos, que são os microbicidas, e aqueles que inibem seu crescimento, os chamados microbiostáticos. Algumas substâncias químicas antimicrobianas são bactericidas em uma determinada concentração e bacteriostática em concentrações menores (PELCZAR JUNIOR *et al.*, 1996).

O agente antimicrobiano “ideal” deve possuir características que lhe proporcionem eficiência sob todas as condições de uso. A seguir estão listadas as

propriedades principais que o agente antimicrobiano deve possuir. Essa lista pode ser usada como um guia na seleção do melhor agente para a aplicação à que se destina (PELCKZAR JUNIOR *et al.*, 1996):

- a)** atividade antimicrobiana de amplo espectro - esta é sempre a primeira exigência e deve ser atendida com o uso de baixa concentração do material e ter ação eficaz sobre uma grande variedade de microrganismos;
- b)** solubilidade - a substância deve ser solúvel em água ou outros solventes (álcool) em quantidades necessárias ao seu uso efetivo;
- c)** compatibilidade com outros componentes da formulação - deve ser compatível com sabões, detergentes e outros produtos químicos presentes na fórmula a fim de manter sua atividade, como também ser ainda minimamente afetado a fim de garantir ação antimicrobiana;
- d)** estabilidade - o armazenamento da substância durante um período razoável (*shelf life*/prazo de validade ou tempo de prateleira), sob variações climáticas, não deve resultar em uma perda significativa de ação antimicrobiana; a estabilidade também deve ser mantida quando diluído;
- e)** ausência de toxicidade - não deve prejudicar o homem nem os animais;
- f)** homogeneidade - as preparações devem ser uniformes em sua composição;
- g)** inativação mínima por material estranho - alguns compostos químicos antimicrobianos são facilmente combináveis com proteínas, diminuindo assim a quantidade de substância química disponível na ação contra os microrganismos;

- h)** atividade em temperatura ambiente - não deve ser necessário aumentar a temperatura, além daquela normal encontrada no ambiente, onde os compostos químicos são utilizados;
- i)** poder de penetração - a ação antimicrobiana é limitada ao local de aplicação. Entretanto, a ação na superfície faz-se algumas vezes necessária;
- j)** ausência de poderes corrosivos e tintoriais - os componentes não devem corroer ou desfigurar metais, corar ou danificar os tecidos ou causar deterioração de borrachas, plásticos e outros materiais;
- k)** poder desodorizante – o produto deve ser inodoro ou apresentar um odor agradável.
- l)** capacidade detergente - um agente antimicrobiano que tem propriedades detergentes tem a vantagem de ser capaz de remover mecanicamente os microrganismos da superfície que está sendo tratada;
- m)** disponibilidade a baixo custo - o produto deve ser facilmente encontrado e de baixo custo;
- n)** biodegradabilidade – quando disposto ao meio ambiente, o produto deve ser biodegradável e não acumulativo;
- o)** atendimento à legislação vigente – o agente antimicrobiano deve ter seu uso aprovado para a aplicação à que se destina pela legislação vigente.

A utilização de um único agente antimicrobiano em determinados desenvolvimentos de formulações de desinfetantes não se mostra suficiente e utiliza-se a combinação de dois ou mais agentes para aumentar o espectro de atuação e as condições de uso.

Alguns elementos-chave que devem ser compreendidos no estudo da seleção e combinações de agentes antimicrobianos são:

- a) o mecanismo de ação do agente antimicrobiano;
- b) os fatores que influenciam este mecanismo;
- c) a adição no produto;
- d) as condições de uso do produto como: diluição de uso, materiais que podem inativar o agente antimicrobiano, materiais orgânicos, etc.

2.5.1 Principais agentes antimicrobianos

A aplicação do óleo de pinho, do fenol e seus derivados como agentes antimicrobianos já foi abordada previamente. Entretanto, outros compostos merecem destaque em virtude de sua ampla aplicação no controle de microrganismos:

- Alcoóis. No Brasil o mais utilizado é o álcool etílico (etanol), mas pode-se citar também o álcool isopropílico (isopropanol) e o n-propanol (as propriedades bactericidas aumentam com o aumento do tamanho da cadeia). Os alcoóis apresentam rápido e amplo espectro de ação contra bactérias vegetativas (inclusive micobactérias), vírus e fungos, não sendo, porém, esporicidas. Todavia, são conhecidos por inibir a esporulação e a germinação de esporos, mas este efeito é reversível. Bactérias Gram negativas são mais sensíveis aos alcoóis que as bactérias Gram positivas. São largamente aplicados como anti-sépticos de pele, e desinfetantes de superfícies, em baixas concentrações podem ser usados como conservantes e para potencializar outros biocidas. A atividade antimicrobiana dos alcoóis é significativamente baixa em concentrações menores que 50%, tornando-se ótima na faixa de 60 a 90% (FRAISE, 1999; PELCKZAR JUNIOR *et al.*, 1996, PENNA; MAZZOLA; MARTINS, 2001).

• Cloro e agentes liberadores de cloro. O cloro, quando na forma gasosa (Cl_2) é de difícil manipulação e requer equipamentos especializados e, por isso, seu uso é limitado a aplicações de larga escala como, por exemplo, no tratamento de água. Os liberadores de cloro como o hipoclorito de sódio são mais empregados por apresentarem maior facilidade no manuseio. Apresentam ação rápida como bactericida (inclusive tuberculicida), viruscida. São corrosivos e, por isso, sua aplicação em superfícies metálicas deve ser evitada. Sua ação pode ser reduzida quando na presença de matéria orgânica e são incompatíveis com detergentes catiônicos (FRAISE, 1999; PELCKZAR JUNIOR *et al.*, 1996).

• Peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio é um forte agente oxidante, apresenta ação bactericida, viruscida, tuberculicida, esporocida e fungicida. Na concentração de 3 a 6%, apresenta ótimo desempenho e em concentrações mais elevadas, entre 6 e 25%, tem propriedades esterilizantes. É facilmente decomposto em água e oxigênio, tornando seu uso ambientalmente correto. (McDONNELL; RUSSELL, 1999, PENNA; MAZZOLA; MARTINS, 2001).

• Quaternários de Amônio (QAC's). O maior exemplo deste tipo de compostos para esta aplicação é o cloreto de benzalcônio. De uma maneira geral, os QAC's são muito efetivos contra bactérias Gram positivas e efetivos em menor grau para as Gram negativas, sendo a do Gênero *Pseudomonas* especialmente mais resistente. São ativos contra alguns fungos e contra vírus com envoltório lipídico. Não apresentam ação letal contra esporos bacterianos, vírus sem envoltório e micobactérias. Os QAC's são fortemente inativados pelas proteínas por meio de processo de adsorção, como também por uma variedade de materiais naturais e sintéticos e por detergentes não-iônicos, sabões. São influenciados negativamente pela presença de íons cálcio e magnésio presentes na água dura. Podem danificar

borrachas sintéticas e alumínio. A faixa de pH entre 9 e 10 mostra-se ideal, enquanto que, valores abaixo de 7,0 são desfavoráveis (FRAISE, 1999; McDONNELL; RUSSELL, 1999; MERIANOS, 2000; PELCZAR JUNIOR *et al.*, 1996; PENNA; MAZZOLA; MARTINS, 2001).

- Clorhexidina: É um biocida amplamente utilizado em produtos anti-sépticos (em particular para mãos e bocas) como ingrediente ativo ou conservante, fato este que se deve ao seu largo espectro de ação antimicrobiana e por provocar baixa irritação na pele. Sua atividade depende do pH do meio e é fortemente reduzida na presença de material orgânico (McDONNELL; RUSSELL, 1999).

- Biguanidas poliméricas: As biguanidas poliméricas vêm sendo aplicadas como agente desinfetante na indústria de alimentos e bebidas e na desinfecção de piscinas. A PHMB (polihexametileno biguanida) é ativa contra bactérias Gram positivas e Gram negativas, vírus, não sendo esporicida. Apresenta boa estabilidade térmica, baixa corrosividade e alta solubilidade em água. Por apresentar alta atividade antimicrobiana contra *Pseudomonas aureginosa*, é utilizada em formulações desinfetantes associada a compostos quaternários de amônio e derivados fenólicos (McDONNELL; RUSSELL, 1999).

2.5.2 Mecanismo de ação dos agentes antimicrobianos

Os agentes antimicrobianos atuam de várias maneiras para inibir ou matar os microrganismos e considerável progresso tem sido obtido na compreensão dos seus mecanismos de ação (CLOETE, 2003; DENYER, 1995; DENYER; RUSSELL, 2003; MCDONNELL; RUSSELL, 1999; STEWART, 1998; SCHMITT, 1986). A partir deste conhecimento é possível predeterminar-se as condições sob as quais o biocida

atuará mais efetivamente e revelar quais microrganismos serão mais susceptíveis ao seu ataque.

A **Figura 6** ilustra as regiões de ataque do biocida na bactéria e a **Tabela 12** apresenta informação adicional sobre o dano provocado ao sítio atacado e suas consequências para o microrganismo.

Figura 6. Sítios de ação dos agentes antimicrobianos

Fonte: Cloete, 2003; IFH, 2000

Tabela 12 - Ações do agente antimicrobiano nas bactérias e suas conseqüências

Sítio de Ação	Dano Provocado	Conseqüência	Agente Antimicrobiano
Parede Celular	Mudança estrutural e funcional; liberação de componentes da parede celular; iniciação de autólise.	Anomalias na morfologia e construção, aumento da não especificidade na permeabilidade celular, ruptura.	Fenol e seus derivados, óleo de pinho, hipoclorito de sódio, formaldeído, liberadores de formaldeído, mercuriais, CTAB, alcoóis alifáticos, 2-feniletanol, EDTA, SDS, ácido benzóico.
Membrana Citoplasmática	Perda da organização estrutural e integridade.	Progressiva liberação de material intracelular (ex.: íons de potássio, fosfatos inorgânicos, aminoácidos, pentoses, nucleotídeo, proteína); iniciação de autólise.	QAC's, fenol e seus derivados, fenticloro, etanol, clorhexidina, biguanida polimérica, 2-feniletanol, n-dodecildietanolamina, polietoxialquilfenol, SDS.
Membrana Citoplasmática	Aumento seletivo da permeabilidade a prótons e outros íons.	Dissipação da força próton motora; desacoplamento da fosforilação oxidativa; inibição do transporte ativo; perda das substâncias intracelulares vitais.	Ácidos fracos lipofílicos (ex.: acético, propiónico, sórbico, benzóico), parabenos, alquilfenóis, clorocresol, 2-fenoxietanol, fenticloro, 1-dodecilmiperidina n-óxido, tetraclorosalicilanilida.
Membrana Citoplasmática	Inibição da ligação membrana enzima	Inibição da respiração e transferência de energia; inibição de síntese de ATP; inibição substrato de oxidação; inibição do processo de transporte	Clorhexidina, 2-fenoxietanol; azida, bronopol, CTAB, isotiazolinona (ex.: 5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-ona; 1,2-benzisotiazolin-3-ona), acetato de iodo, organomercuriais, sais de metais pesados (ex.: prata, cobre e mercúrio)
Citoplasma	Inibição de enzimas citoplasmáticas; interação com biomoléculas funcionais (ex.: DNA, RNA)	Inibição de processo catabólico e anabólico	Formaldeído e liberadores de formaldeído, agentes oxidantes (ex.: peróxido de hidrogênio, ácido peracético), parabenos, cloroacetamida,
Citoplasma	Coagulação e precipitação de constituintes citoplasmáticos (usualmente sob alta concentração de biocida)	Desnaturação de enzimas; destruição de biomoléculas	Clorhexidina e outras biguanidas, QACs, alguns fenólicos e alguns metais pesados

Fonte: Denyer, 1995

2.5.3 Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana

O estudo para o desenvolvimento de métodos possíveis de serem empregados na avaliação da ação antimicrobiana de uma substância teve início logo após a descoberta de que as bactérias eram causadoras de infecções e deteriorações. Em 1881, Robert Koch publica um artigo descrevendo um teste precursor do atual teste carreador. Em 1890, Geppert aprimora o método de Koch ao introduzir o conceito de neutralização do antimicrobiano após o tempo de exposição. Ridell e Walker, em 1903, descrevem a primeira metodologia aplicada na determinação do coeficiente fenólico (REYBROUCK, 1998). Muitos outros trabalhos têm sido desenvolvidos, aprimorados e padronizados, todos objetivando a avaliação da atividade bacteriostática ou bactericida, inclusive com simulação de condições de uso ou testes desafios da robustez do antimicrobiano em um produto. Entre estes métodos, seis são amplamente aplicados e recomendados pela legislação vigente quando da avaliação de agentes antimicrobianos em aplicações específicas:

- a)** Concentração Inibitória Mínima (CIM ou MIC);
- b)** Coeficiente Fenólico;
- c)** Teste de Suspensão (*Time Kill*);
- d)** Halo de inibição (poços ou discos);
- e)** Teste de Cilindros Carreadores;
- f)** Teste de Desafio (*Challenge Test*).

2.5.3.1 Método de eficácia para produtos desinfetantes

Segundo a RDC nº14 (BRASIL, 2007), produtos com ação antimicrobiana deverão ter sua eficácia comprovada mediante a aplicação de metodologia da AOAC - Association of Official Analytical Chemists ou métodos adotados pelo CEN - Comitê Europeu de Normatização. Caso não haja métodos disponíveis e recomendados pelas instituições acima citadas, a Autoridade Sanitária competente analisará caso a caso os métodos apresentados.

Segundo VAN KLINGEREN *et al.* (1998), um produto desinfetante deve ter sua eficácia testada em três fases distintas:

- Fase 1: Testes preliminares para confirmar que o produto possui ação desinfetante. Emprega-se o teste de suspensão;
- Fase 2: Testes para avaliar a ação antimicrobiana sob diversidade de uso, como o teste de suspensão que é realizado sob diferentes substratos e em diferentes concentrações de uso;
- Fase 3: Teste “*in loco*”, no qual as medidas de desempenho são feitas sob condições reais de uso.

Normalmente, os produtos são avaliados durante as etapas de desenvolvimento (amostras recém-preparadas e envelhecidas no teste de estabilidade sob condição de temperatura elevada) e ainda em controles periódicos, que são realizados em amostras de prateleiras até o final de seu prazo de validade.

O método de suspensão pode ser qualitativo (coeficiente fenólico) ou quantitativo (teste em suspensão). Em ambos, um volume apropriado de uma suspensão de bactéria (o inóculo) é adicionado em um volume de desinfetante na

concentração a ser testada. Depois de um tempo de exposição, uma alíquota é retirada a fim de verificar-se o número de microrganismos sobreviventes. No teste do coeficiente fenólico (método qualitativo), uma alçada da suspensão bacteriana é adicionada ao antimicrobiano e, depois do tempo de contato, uma nova alçada é transferida para um tubo contendo meio de cultura e então incubada. O resultado é expresso como crescimento positivo (+) ou crescimento negativo (-). Nos métodos quantitativos, os volumes da suspensão bacteriana e da solução biocida teste são definidos. Após o tempo de contato e de incubação é feita uma contagem do número de microrganismos sobreviventes e a redução decimal é avaliada quando comparada com a contagem inicial do inóculo. Subtraindo-se o logaritmo da contagem inicial da população do logaritmo da contagem final obtém-se a redução logarítmica decimal, ou efeito microbida (EM ou ME), expresso na Equação 1.

$$\log (P_i) - \log (P_f) = EM \quad \text{(Equação 1)}$$

$$[(P_i - P_f) / P_i] \times 100 = \% \text{ de Morte ou de redução} \quad \text{(Equação 2)}$$

Onde: P_i = população inicial; P_f = população final; EM= efeito microbida.

Um EM de 1 significa que 90% da população inicial foi morta (ver Equação 2), para um EM de 2 por sua vez, significa que ocorreu morte de 99%. Em geral, se trabalha com EM 3, isto é morte de 99,9% da população inicial e, em casos ideais, pode se trabalhar com valores de EM acima de 5. Ou seja, eliminação maior que 99,999% da contagem microbiana inicial (REYBROUCK, 1998; AOAC, 1998a).

No presente trabalho utilizou-se como referência o método da AOAC 960.09 (AOAC, 1998a), empregado para avaliação de desinfetantes. Esta metodologia é aplicada na comprovação de apelos de *marketing* onde se lê “mata 99,9% dos germes e bactérias testados”.

No teste carreador, ou diluição de uso, a peça carreadora (cilindro de aço inoxidável são empregados para o teste de produtos saneantes) é contaminada pela imersão em uma cultura líquida do microrganismo teste e, quando seca, é introduzida em um tubo contendo o desinfetante teste na diluição de uso. Após o tempo de exposição, o carreador é transferido para um tubo de subcultura (o objetivo desta transferência é remover o excesso do desinfetante carreado) e em seguida é feita outra transferência para um novo tubo de subcultura quando, só então, pode ser incubado e realizada a avaliação final. O não crescimento de microrganismo indica a eficiência do agente antimicrobiano. No Brasil, a metodologia utilizada é a da AOAC última edição, utilizando-se 60 tubos de aço inoxidável de dimensões padronizadas, como carreadores. A aprovação só ocorre quando da ausência de crescimento microbiano em, pelo menos, 59 tubos testados.

São encontradas na literatura algumas aplicações destas metodologias na avaliação de produtos desinfetantes. Timenetsky e Alterthum (1989) determinaram o coeficiente fenólico de 24 desinfetantes comercializados em São Paulo. Seis destes produtos eram de uso hospitalar e os demais de uso doméstico. Os compostos ativos eram formados à base de fenóis, quaternário de amônio, formaldeído, etanol e cloro, sendo que alguns estavam associados. Os microrganismos utilizados foram o *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 e a *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708. Os valores dos coeficientes fenólicos variaram de 58,3 a 0,1. Os desinfetantes hospitalares apresentaram valores

superiores aos de uso doméstico, mas os autores não atribuíram estas diferenças a uma melhor qualidade dos produtos. A metodologia adotada neste estudo mostrou que alguns produtos de uso doméstico, aparentemente, possuíam atividade antibacteriana baixa ou inexistente uma vez que o coeficiente fenólico não pôde ser obtido a partir das diluições utilizadas na avaliação.

Timenetsky, Yanaguita e Silva (1992) avaliaram a eficácia de 19 produtos desinfetantes contra o *Vibrio cholerae* por meio do método de diluição de uso com 10 carreadores. Os compostos ativos dos produtos incluíam formaldeído, fenóis, cresóis, quaternário de amônio, cloro e etanol, sendo que sete destes produtos eram de composição associada. Outros sete produtos mostraram-se ineficazes mesmo quando aplicados puros. Dos 12 que foram eficazes puros, 8 tornaram-se ineficazes na diluição 1:2. A água sanitária (2,8% de cloro ativo) apresentou eficácia até na diluição 1:200.

Holah *et al.* (1998) fizeram uma revisão das metodologias de avaliação de eficácia antimicrobiana que poderiam ser aplicadas para produtos usados na indústria de alimentos, sendo que algumas avaliações puderam ser feitas *in situ*.

2.5.3.2 Método para avaliação da atividade bacteriostática

O método de disco-difusão foi idealizado por Bauer e colaboradores em 1966 e, desde então, é amplamente empregado para verificar se uma substância teste tem alguma ação inibitória sobre um determinado microrganismo. Também foi possível determinar a menor concentração da substância teste que é capaz de inibir o crescimento, ou seja, a concentração inibitória mínima (CIM). Neste método a substância pesquisada é colocada em um reservatório, podendo este ser um disco

de papel ou uma cavidade no meio de cultura ou ainda um cilindro sobre a superfície, em contato com meio de cultura sólido previamente inoculado com o microrganismo teste. A leitura, que é qualitativa, é realizada após o período de incubação, medindo-se o diâmetro do halo de inibição de crescimento microbiano formado. O diâmetro é inversamente proporcional à concentração inibitória mínima (CIM). Esse método permite classificar a amostra bacteriana em suscetível (S), intermediária (I) ou resistente (R) ao antimicrobiano.

O teste de disco-difusão é um método prático, de fácil execução e idealizado para bactérias de crescimento rápido. Os reagentes são relativamente econômicos e não há necessidade de equipamentos especiais, além de apresentar grande flexibilidade na escolha do número e tipo de antimicrobiano a ser testado.

Outra metodologia utilizada para a determinação da CIM é o método de diluição. Uma quantidade de amostra é dissolvida homogeneamente em um meio e são feitas diluições sucessivas da amostra original, inoculando-se no microorganismo teste. A leitura é realizada após o período de incubação considerando-se a primeira diluição em que não se observa turvação.

Aplicando o método de ágar em placa com orifício modificado, Paker e Luz (2007) avaliaram os seguintes óleos: copaíba, alecrim, melaleuca, alho, andiroba; própolis, e dois ingredientes de origem natural (um extraído de folhas de oliva e o farnesol). As cepas selecionadas foram *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) e *Candida albicans* (ATCC 10231). Os autores comprovaram que dentre as amostras analisadas, os melhores resultados foram obtidos com os óleos de melaleuca e alecrim por apresentarem atividade bacteriostática e fungistática para as quatro cepas em questão.

Sabulal *et al.* (2006), avaliaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial da fruta da *Amomum cannicarpum*, empregando o método de disco de difusão. Os microrganismos testes foram bactérias Gram positivas e Gram negativas e alguns fungos. O óleo apresentou atividade bacteriostática contra *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Proteus vulgaris* e ótima ação fungistática para *Candida albicans* e *Candida glabrata*.

Já Yu *et al.* (2004) empregaram o método de disco de difusão para determinar a atividade antimicrobiana do óleo essencial *Scutellaria barbata*. Primeiramente, a suspensão teste de microrganismo (2×10^8 UFC mL⁻¹) foi espalhada sobre o meio sólido em placas de Petri. Discos de papel de filtro (6 mm de diâmetro) foram individualmente impregnados com 15 µL do óleo diluído (180 mg mL⁻¹), e, então, colocados sobre o inóculo. As bactérias Gram positivas, inclusive o *Staphylococcus aureus*, se mostraram mais sensíveis ao óleo do que as Gram negativas e as leveduras.

2.6 Teste de estabilidade

A estabilidade de um produto depende de fatores ambientais tais como temperatura, umidade, luz e de outros fatores inerentes ao produto, tais como propriedades físicas e químicas de substâncias ativas e dos demais componentes da formulação, forma de apresentação, tipo e propriedades dos materiais de embalagem.

Pode-se chamar de teste de estabilidade o conjunto de testes projetados para obter informações sobre a estabilidade de produtos quanto aos limites previamente especificados, visando estabelecer seu prazo de validade e período de utilização em

embalagem e condições de estocagem determinadas. Existem dois tipos de estudos de estabilidade aplicados aos produtos saneantes (ANVISA, 2008c):

- Estabilidade acelerada - estudos projetados para acelerar a degradação química ou mudanças físicas de um produto em condições de estocagem forçadas. Os dados assim obtidos, combinados com aqueles dos estudos de longa duração, podem ser usados na avaliação não só das alterações que ocorrem em longo prazo quando em condições não aceleradas, como também do impacto de curtas exposições às condições fora daquelas estabelecidas em rotulagem.
- Estabilidade de longa duração - estudos projetados para verificação das características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas de um produto durante o prazo de validade preconizado, sendo usado para estabelecer ou confirmar o prazo de validade projetado, além de estabelecer as recomendações para as condições de estocagem.

Os estudos de estabilidade devem ser executados com o produto em sua embalagem primária original, ou em outra com a mesma composição química e em escala.

A ANVISA (2008c) elaborou um guia de estabilidade para produtos saneantes e, segundo este, as condições para realização dos testes são:

- o estudo de estabilidade acelerada deve ser realizado a $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Todos os testes descritos na monografia analítica de cada produto deverão ser cumpridos no início (mês 0) e depois em 3 meses e em 6 meses. Quando a temperatura do teste for de $50 \pm 2^{\circ}\text{C}$, todos os testes descritos na monografia analítica de cada produto deverão ser cumpridos em avaliações conduzidas no início (mês 0) e depois em 3 meses;

- no estudo de estabilidade de longa duração, a amostra é armazenada à temperatura ambiente. Todos os testes descritos na monografia analítica de cada produto deverão ser realizados no início (mês 0), em 6 meses e em 12 meses e anualmente, após o primeiro ano até o prazo de validade declarado no registro;

- para produtos que requeiram preparação para uso, todos os testes descritos na monografia analítica deverão ser realizados após a preparação, no mínimo no início e no fim do prazo de validade preconizado pela empresa.

2.7 Análise térmica

A análise térmica é um conjunto de técnicas que permitem medir as mudanças de uma propriedade física de uma substância (e /ou de seus produtos de reação) em função da temperatura e/ou tempo, enquanto a substância é submetida a uma programação controlada de temperatura (GIOLITO & IONASHIRO, 1988). Entre estas técnicas a termogravimetria/termogravimetria derivada (TG/DTG), a análise térmica diferencial (DTA) e a calorimetria exploratória diferencial (DSC) são as mais amplamente difundidas e utilizadas. No entanto, outras técnicas para medida de outras propriedades físicas podem ser empregadas.

Segundo a definição, para que uma técnica térmica seja considerada termoanalítica é necessário, que esta inclua a medição de uma propriedade física, expressa direta ou indiretamente em função da temperatura e executada sob um programa controlado desta variável (WENDLANDT, 1986; MACHADO; MATOS, 2004). A classificação dos métodos termoanalíticos em relação a uma propriedade física medida em função da temperatura e as abreviaturas empregadas nas técnicas termoanalíticas estão apresentadas na **Tabela 13**.

Tabela 13 - Classificação das principais técnicas termoanalíticas e abreviaturas aceitáveis

Propriedade	Principais Técnicas	Abreviatura Aceitável
Massa	Termogravimetria	TG
	Deteção de gás desprendido	EGD
	Análise de gás desprendido	EGA
	Análise térmica por emanção	ETA
Temperatura	Determinação da curva de aquecimento ^(*)	
	Análise térmica diferencial	DTA
Entalpia	Calorimetria exploratória diferencial ^(**)	DSC
Dimensões	Termodilatometria	TD
Características mecânicas	Análise termomecânica	TMA
	Análise termomecânica dinâmica	DMA
Características acústicas	Termossonimetria	TS
	Termoacustimetria	
Características ópticas	Termoptometria	TO
Emissão de luz	Termoluminescência	TL
Características elétricas	Termoeletrometria	TE
Características magnéticas	Termomagnetometria	TM

(*) Quando o programa de temperatura for pelo modo resfriamento, torna-se: determinação da curva de resfriamento.

(**) Ocorre confusão sobre este termo, sendo conveniente a sua separação em duas modalidades: DSC com compensação de potência e DSC com fluxo de calor.

Fonte: GIOLITO, IONASHIRO (1988); MACHADO, L.D.B.; MATOS, J.R. (2004)

2.7.1 Termogravimetria (TG)/termogravimetria derivada (DTG)

A termogravimetria é uma técnica termoanalítica na qual a variação (perda ou ganho) de massa (m) da amostra (sólida ou líquida) é determinada em função da temperatura (T) e/ou do tempo (t), enquanto a amostra é submetida a uma programação controlada de temperatura (Equação 3).

$$m = f(T \text{ ou } t)$$

(Equação 3)

A termogravimetria pode ser classificada em isotérmica, quase-isotérmica e dinâmica. Na TG isotérmica, a massa da amostra é registrada como uma função do tempo à temperatura constante. Na TG quasi-isotérmica, a amostra é aquecida a uma razão de aquecimento linear enquanto não ocorrer variação de massa. A partir do momento em que a balança detecta a variação de massa, o aquecimento é mantido isotérmico. E, finalmente, na TG dinâmica há um acompanhamento das variações de massa sofridas pela amostra quando esta é submetida a um resfriamento ou aquecimento linear.

De modo geral a TG é usada para:

- a) avaliar a estabilidade térmica de materiais diversos;
- b) obter parâmetros cinéticos das reações de decomposição térmica;
- c) controlar e conhecer o estado de hidratação dos sais;
- d) isolar fases intermediárias que possam surgir durante a decomposição térmica da amostra;
- e) elucidar fenômenos de dessolvatação, desidratação e eflorescência;
- f) determinar pureza de reagentes padrões em química analítica;
- g) identificar de forma funcional os compostos orgânicos, etc.

Como em qualquer técnica instrumental, existe na termogravimetria um grande número de fatores que afetam a natureza, precisão e exatidão dos resultados experimentais. Estes fatores podem ser divididos em duas categorias:

- a) fatores instrumentais:
 - razão de aquecimento;
 - atmosfera do forno;

- geometria do cadinho e da amostra;
- sensibilidade do mecanismo de registro;
- material do cadinho.

b) características da amostra:

- massa da amostra;
- solubilidade dos gases libertados;
- tamanho das partículas;
- compactação da amostra;
- calor da reação;
- natureza da amostra;
- condutividade térmica.

A termogravimetria derivada (DTG) é o registro da curva TG, na qual se deriva a massa em relação ao tempo (dm/dt), em função da temperatura (T) ou do tempo (t), ou seja:

$$dm/dt = f(T \text{ ou } t) \quad (\text{Equação 4})$$

A curva DTG apresenta informações de uma forma que é mais acessível visualmente (maior resolução): a área do pico apresenta relação direta à variação de massa (Δm); com base na altura do pico, a qualquer temperatura, se obtém a variação de massa e ainda, permite a pronta determinação da temperatura de pico máximo ($T_{\text{máx.}}$) na qual Δm ocorre mais rapidamente.

A **Figura 7** ilustra as curvas TG/DTG do processo de decomposição térmica do oxalato de cálcio monoidratado ($\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), que é uma substância padrão utilizada na verificação das condições da instrumentação. A curva TG apresenta “degraus” atribuídos a cada etapa de decomposição térmica do material. Estes

degraus são substituídos por picos na curva DTG. A partir da altura dos picos da curva DTG é possível:

- obter a razão de Δm (variação de massa) na temperatura selecionada;
- obter as temperaturas correspondentes ao início e final da decomposição com maior exatidão;
- e, para outros materiais onde ocorrem sobreposições de reações é possível calcular a Δm .

Em caso de reações de decomposição térmica que ocorrem lenta e gradativamente, a curva DTG não mostrará um pico, mas se aproximará de um patamar dificultando a avaliação dos eventos térmicos, uma vez que a derivada de uma constante é nula.

Figura 7. Curvas TG/DTG de uma amostra de $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, obtida na termobalança TGA-50, sob atmosfera dinâmica de N_2 e razão de aquecimento de $10^\circ\text{C min}^{-1}$

A partir das curvas TG/DTG, observa-se que os percentuais de variação de massa correspondente à cada etapa de decomposição térmica são concordantes com os valores obtidos pelo cálculo teóricos, isto é, na 1ª etapa o teor de H_2O é de

12,33%, na 2ª etapa a percentagem de CO é de 19,1 e na 3ª etapa a percentagem de CO₂ é de 30,12.

2.8 Cromatografia

A cromatografia pode ser definida como um método físico-químico de separação, no qual os constituintes da amostra a serem separados são particionados entre duas fases, uma estacionária e de grande área superficial, e a outra um fluido que percola na primeira. Portanto, trata-se de um método que se baseia na partição da amostra entre uma fase móvel (FM) líquida ou gasosa e uma fase estacionária (FE) - líquida ou sólida.

Existem quatro tipos principais de cromatografia: cromatografia em papel (CP), cromatografia de camada delgada (TLC), cromatografia gasosa ou a gás (CG) e cromatografia líquida (CL), como é ilustrado na **Figura 8**.

Figura 8. Tipo de cromatografia e relação de FM, FE e mecanismo de separação envolvido

A seleção do tipo de cromatografia depende do material que será isolado, podendo recorrer-se ao uso de diversos métodos cromatográficos aplicados seqüencialmente para obter-se um composto na forma pura.

2.8.1 Cromatografia a gás (CG)

A cromatografia a gás é um método de separação no qual os componentes de uma mistura são separados em fases: a fase estacionária (líquida ou sólida), que possui uma superfície de exposição muito grande e uma segunda, a fase móvel, que é um gás que circula em contato com a fase estacionária. A amostra deve ser suficientemente volátil a fim de que possa atravessar a coluna na forma de vapor e ser estável termicamente para não se decompor nas condições de separação. A vaporização da amostra ocorre em um sistema de injeção e em seguida esta é transportada pela fase móvel gasosa (gás de arraste) ao longo da coluna. A separação dos componentes da mistura e suas partições com a fase estacionária, baseiam-se não só nas diferenças de solubilidades e pressão de vapor relativa, mas também na afinidade de cada componente com a fase estacionária. Este tipo de processo cromatográfico é chamado de eluição, no qual o material eluído passa por um detector onde será analisado. Apresenta-se a seguir quatros tipos de detectores utilizados na CG (PERES, 2002, SMITH, 1988, SKOOG; WEST; HOLLER, 1996):

- a)** Detector por condutividade térmica (DCT ou TCD) - possuem dois ou quatro filamentos de platina (Pt), tungstênio (W), níquel (Ni) ou Pt - W, os quais são aquecidos por corrente elétrica. Conforme o gás passa pelos filamentos há transferência de calor e o tempo da passagem do gás, juntamente com a condutividade térmica são registrados. Dá-se assim, a análise. Esta análise é feita comparando-se o gás de arraste

puro (que passa por um conjunto de filamentos) com o gás de arraste misturado à amostra (que passa por outro conjunto de filamentos). Este tipo de detector não destrói a amostra e seu maior emprego ocorre em análises de compostos orgânicos, inorgânicos, derivados de petróleo etc.

- b)** Detector por ionização de chama (DIC ou FID) - consiste de um campo elétrico (200 - 300 v) e uma chama (H_2 + ar) onde a amostra é queimada. A combustão resulta em radicais livres que são ionizados pelo campo elétrico, aumentando a corrente nos eletrodos. É utilizado apenas para compostos orgânicos e apresentam baixa sensibilidade ao formaldeído e ácido fórmico.
- c)** Detector por captura de elétrons (DCE ou ECD) - Neste detector há uma fonte de radiação beta em corrente constante. Quando o gás de arraste (N_2 ultra puro) misturado à uma amostra passa pelo detector, acontece a substituição de um elétron por um íon negativo, provocando uma supressão da corrente elétrica. O gás de arraste misturado com a amostra é comparado ao gás de arraste puro (corrente de fundo), e quanto maior seu valor maior é a sensibilidade do detector. A diminuição do valor da corrente de fundo indica a presença de impureza, vazamento da fonte, sujeira ou coluna mal condicionada. É usado, principalmente, na separação de compostos halogenados de amostras de pesticidas e drogas.
- d)** Detector fotométrico de chama (DFC) – ocorre uma combustão na região do campo elétrico com emissão de luz de diversos comprimentos de ondas. Há um sistema de filtros que elimina as

radiações desnecessárias, selecionando as de interesse, em especial as que contenham enxofre (S) e fósforo (P). O gás de arraste é o N_2 e o da chama é o H_2 . A pureza dos reagentes deve ser da ordem de partes por trilhão. Apresenta ainda alta estabilidade para compostos sulfurados e fosforados.

A cromatografia a gás é muitas vezes acoplada a técnicas seletivas espectroscópicas e eletroquímicas, originando métodos extremamente úteis na identificação de componentes de misturas complexas. As interfaces mais utilizadas são:

- a) Cromatografia gasosa acoplada e espectrometria de massa (CG-MS ou CG-EM).
- b) Cromatografia gasosa acoplada e espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (CG-FTIR).

São encontrados na literatura vários trabalhos relativos ao emprego da CG na elucidação da composição de óleos essenciais e do controle de processo de transformações de terpenos. A **Tabela 14** apresenta alguns exemplos destas aplicações, discriminando o tipo de equipamento, tipo de coluna e programação de aquecimento que são usados no experimento. Na seqüência outros exemplos são comentados.

Robles-Dutenhefner *et al.* (2001) estudaram a aplicação de heteropoliácido $H_3PW_{12}O_{40}$ suportada em sílica como catalisador na hidratação e acetoxilação de limoneno, β -pineno e α -pineno. Neste trabalho, o desenvolvimento da reação foi monitorado por cromatografia gasosa (Cromatógrafo Shimadzu 14 B, coluna Carbowax 20 M e detector DIC), utilizando acetato de bornila como padrão interno. A identificação e caracterização do produto final da reação foi realizada por meio da

análise por espectrometria de massas acoplada à cromatografia gasosa utilizando equipamento Hewlett-Packard MSD 5890/série II operado a 70 eV.

Tabela 14 - Algumas aplicações da CG na análise de óleos essenciais e terpenos

Trabalho	Aplicação	Equip./detector	Coluna	Aquecimento
Liu <i>et al.</i> , 2008	(1)	HP6890 CG/DIC	HP-5 30mX0,32mmX0,25µm	
Pakdel; Sarron; Roy, 2001	(1)	HP5890 CG HP 5970 MS	HP-5MS 30mX0,25mmX0,25µm	50/2/5/200/30/29 0/10
Román-Aguirre <i>et al.</i> , 2005	(1)	ThermoFinnigan GC 8000/Voyager MS	All tech AT-5 30mx0,25mm	60/3/5/150/1/ 10/250/1
Román-Aguirre <i>et al.</i> , 2005	(1)	Perkin-Elmer Auto system XL/ DIC	PE-1 60mX0,25mm	80/1/10/150/1/15 /250/15
Velasco-Negueruela <i>et al.</i> , 2005	(2)	Varian GC 3300/ DIC	DB1 50mX0,25mmX0,25µm	90/4/240
Velasco-Negueruela <i>et al.</i> , 2005	(2)	HP 5890/ Não informado	DB1 50mX0,25mmX0,33µm	70/4/250
Yu <i>et al.</i> , 2004	(3)	HP5890 CG HP 5972 MS	HP-5MS 30mX0,25mmX0,25µm	40/5/4/200/20
Yu <i>et al.</i> , 2004	(3)	Younglin 680D DIC e sniffing porta	DB-5 MS ou DB-Wax 30mX0,25mmX0,25µm	40/5/10/200/24

(1) Controle do processo de hidratação do α -terpineol; (2) caracterização do óleo essencial extraído de duas espécies de *Pimpinella*; (3) determinação de compostos voláteis das agulhas do *Pinus densiflora*;

Davies (1990) elaborou uma revisão da literatura quanto aos valores de índices Kováts determinados por meio de CG-EM, utilizando-se as colunas de metil silicone (dimetil polisiloxano) e/ou Carbowax 20M para 400 monoterpenos e sesquiterpenos encontrados em óleos essenciais naturais ou produtos sintéticos. Neste trabalho, listou-se em torno de 900 valores de índices Kováts.

Díaz *et al.*, investigaram variações no tempo de retenção de seis terpenos (α -pineno, β -pineno, canfeno, limoneno, α -felandreno e p-cimeno) empregando seis tipos de fases líquidas com ampla faixa de diferenças de polaridades entre elas. As análises foram conduzidas no aparelho HP Agilent PaloAlto com detector DCT. Os

autores concluíram que a afinidade do solvente com o terpeno está relacionada com a presença de estruturas elétron-aceptoras (melhoram a afinidade) e a linearidade da molécula (diminui a afinidade). Estes fatores também determinam a seletividade, obtendo-se melhores resultados quando do emprego de fases líquidas não lineares com grupos elétron-aceptores.

Allahverdiev, Irandoust e Andersson (1999), usaram uma coluna capilar de γ -ciclodextrina (Octakis(6-O-metil-2,3-di-O-pentil)- γ ciclodextrina com OV 1701, 60:40) para separar os enantiômeros do α -pineno e do limoneno, comparando as ordens de eluição e tempo de retenção com a coluna capilar CP-Wax 52 CB. A ordem de eluição e o tempo de retenção obtidos para os isômeros de terpenos estudados são apresentados na **Tabela 15**. A aplicação da γ -ciclodextrina demonstrou ser uma ótima ferramenta no controle da formação de enantiômeros durante o processo de isomerização.

Tabela 15 - Ordem de eluição e tempo de retenção do α -pineno e seus isômeros nas colunas capilares CP-Wax 52CB e γ -ciclodextrina

Ordem	Componente	Ponto de Ebulição, °C	Tempo de retenção	
			Coluna CP-Wax 52 CB	γ -ciclodextrina
1	tricileno	153	8,125	8,075
2	($\pm$) α -pineno	156	8,730	
2a	(+) α -pineno	154-156		9,350
2b	(-) α -pineno	156-158		9,570
3	fencheno	139-148	-	-
4	($\pm$) canfeno	159-160	10,906	10,422
5	α -terpineno	175	18,503	14,755
6	($\pm$) α -limoneno	176	19,333	
6a	(+) α -limoneno	176-177		15,159
6b	(-) α -limoneno	176-177		15,353
7	<i>p</i> -cimeno	176-178	21,042	15,462
8	γ -terpineno	182	21,797	15,849
9	terpinoleno	184	22,167	15,968

Fonte: Allahverdiev, Irandoust e Andersson (1999)

Quanto à aplicação da CG na determinação de componentes fenólicos pode ser citado o trabalho de Coelhan *et al.* (2006) no qual foi feita a determinação do teor de OPP em 61 amostras de cerveja enlatada providas de 27 países. Primeiramente, as amostras sofreram um pré tratamento por meio de uma extração líquido-líquido (com dietil éter e acetonitrila, 20:25 v/v) e em seguida, determinou-se o teor de OPP por CG-EM. O método apresentou limite de detecção na ordem de $0,1 \times 10^{-6} \text{ mg mL}^{-1}$ e faixa de linearidade entre 0,4 e $40 \times 10^{-6} \text{ mg mL}^{-1}$ quando utilizados 50 mL de amostra para análises.

2.8.2 Cromatografia líquida

A Cromatografia líquida em coluna se divide em cromatografia líquida clássica (CLC) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou HPLC). Na CLC são utilizadas colunas de vidro sob pressão atmosférica e a vazão da fase móvel ocorre devido à força da gravidade, por outro lado na CLAE a vazão ocorre pela aplicação de uma alta pressão. As separações na cromatografia líquida são alcançadas por partição, adsorção, troca iônica, exclusão por tamanho ou interações estereoquímicas (gel permeação e gel filtração), dependendo do tipo da fase estacionária utilizada. A CLAE é um método de separação de ampla aplicação.

Sistemas que consistem de fases estacionárias polares e fases móveis apolares são definidos como cromatografia em fase normal. Quando a fase estacionária é apolar e a fase móvel é polar os sistemas são denominados como cromatografia em fase reversa. A afinidade de uma substância pela fase estacionária e conseqüentemente seu tempo de retenção na coluna e sua ordem de eluição são controlados pela polaridade da fase móvel.

A fase móvel deve dissolver a amostra sem qualquer interação química entre ambas. Esta fase deve apresentar alto grau de pureza ou ser de fácil purificação, para que se possam fazer análises de alta sensibilidade, uma vez que as impurezas podem interferir na detecção do analito. Deve ser compatível com o detector empregado e possuir polaridade adequada para permitir uma separação conveniente dos componentes da amostra.

A cromatografia de fase reversa é a mais empregada e embora existam vários solventes que possam ser utilizados, a água, metanol e acetonitrila são os mais usados.

Os detectores usados na CLAE são (PERES, 2002, SMITH, 1988, SKOOG; WEST; HOLLER, 1996):

- a)** Detector por absorção no ultra-violeta e no visível – neste detector a amostra recebe uma radiação eletromagnética, normalmente no ultravioleta ou até no infravermelho e a absorção da luz por parte da amostra é medida em um dado comprimento de onda. Existem dois tipos de detectores de luz ultravioleta: o de comprimento de fixo (fotômetro) e o de comprimento de onda variável (espectrofotômetro UV-VIS). Em condições ótimas, pode-se atingir sensibilidades de até 0,001 unidades de absorvância e, se o composto absorve intensamente na faixa de UV, é possível detectar quantidades de amostras da ordem de nanogramas (10^{-9} g).
- b)** Detectores por índice de refração – estes detectores acompanham continuamente a diferença no índice de refração entre a fase móvel pura e o efluente que sai da coluna contendo os componentes da amostra. Pode ser usado para amostras que não absorvem no

ultravioleta. A resposta deste detector é moderada, geralmente de ordem micrograma (10^{-6} g).

- c)** Detectores de fluorescência - utilizados como método de detecção específica, são sensíveis para substâncias que fluorescem ou que podem ser convertidas em derivados fluorescentes, por transformação química ou adicionando reagentes fluorescentes a grupos funcionais específicos. Este tipo de detector pode detectar quantidades de ordem picograma (10^{-12} g).
- d)** Outros detectores - detectores no infravermelho, eletroquímicos, baseados em outras propriedades do soluto (como constante dielétrica, densidade, pressão de vapor, viscosidade, etc.) e acoplamento com espectrômetros de massa têm sido apresentados para serem usados na CLAE.

Thompson (2001) determinou por CLAE o teor de ativo fenólico de 19 produtos desinfetantes. As amostras continham de 1 a 4 tipos de derivados fenólicos. A metodologia aplicada empregou bomba modelo 510, controlador modelo 680, detector UV modelo 590E a 280 nm, injetor modelo 7125 ajustado com volume de alça de 20 μ L, coluna Zorbax SB-C18 (250 mm x 4,6 mm x 5 μ m), fase móvel com acetonitrila/água (55:45 v/v), pH 3 (0,05 M de KH_2PO_4) e vazão de 1,0 mL min^{-1} . Este método demonstrou ser um eficiente meio de isolamento e quantificação dos 6 tipos de fenólicos investigados (fenol, 2-fenilfenol, 4-t-amilfenol, 4-cloro-3,5-dimetilfenol, 2-benzil-4-clorofenol e triclosan) com faixas de limite de quantificação variando entre $5,58 \times 10^{-5}$ e $2,5 \times 10^{-4}$ mg mL^{-1} e limite de detecção entre $1,76 \times 10^{-5}$ e $0,67 \times 10^{-4}$ mg mL^{-1} .

Yang *et al.* (2004) empregou a μ HPLC-ECD para determinar OPP presente em casca de limão. Nesta metodologia foram usados: degaseificador LC26; bomba LC-100; injetor 7125 ajustado com volume de alça de 5 μ L; coluna CAPCELL PAK C-18 UG 120 microbore ODS (150 mm x 1,0 mm x 3 μ m); fase móvel com 17 mM de tampão (pH 4,0) de ácido acético e acetato de sódio em acetonitrila (60:40 v/v); vazão de 15 μ L min⁻¹ e aplicação de um potencial de +0,9V vs. Ag/AgCl. Este método apresentou alta sensibilidade e seletividade na determinação de OPP, sendo necessária apenas uma amostra de 2,5 mg de casca de laranja para análise. O limite de detecção atingiu valores de $6,8 \times 10^{-7}$ mg mL⁻¹.

2.9 Espectroscopia na região do infravermelho (IV)

A espectroscopia estuda a interação da radiação eletromagnética com a matéria. Dependendo da energia de radiação incidente, um ou mais dos seguintes processos podem ocorrer: absorção, reflexão, fluorescência/fosforescência, espalhamento ou reação fotoquímica.

O movimento dos átomos que constituem as moléculas resulta em rotações e vibrações moleculares. Portanto, além das transições entre níveis eletrônicos, deve-se também levar em consideração as transições devidas às rotações e vibrações. No entanto, apenas as vibrações são geralmente consideradas, pois as energias envolvidas nas diferentes formas de rotação são muito semelhantes (a diferença entre dois níveis rotacionais é tipicamente algo em torno de 5×10^{-5} eV) e, portanto, negligenciadas. Em relação às vibrações moleculares, é importante lembrar que todos os átomos da molécula se movem periodicamente e em fase, que o centro de

massa da molécula permanece inalterado e que a molécula não muda de orientação ou posição com a vibração.

Cada ligação química possui uma frequência natural e para que ocorra uma absorção na região do infravermelho a radiação incidente deve estar nesta mesma frequência. Outro fator para que ocorra a absorção é a ocorrência de variação do momento de dipolo elétrico da molécula como consequência de seu movimento vibracional ou rotacional (o momento de dipolo é determinado pela magnitude da diferença de carga e a distância entre dois centros de carga). E somente nessas circunstâncias que o campo elétrico alternante da radiação incidente interage com a molécula, originando os espectros.

A região do infravermelho pode ser dividida em três partes:

- Infravermelho próximo (NIR): 13300 a 3000 cm^{-1} (750 a 3300 nm)
- Infravermelho médio (MIR): 4000 a 400 cm^{-1} (2,5 μm a 25 μm)
- Infravermelho distante (FIR): abaixo de 400 cm^{-1}

O espectro vibracional característico de moléculas, na maior parte das substâncias orgânicas, situa-se na região do MIR. A radiação nesta faixa (2,5 a 25 μm) é responsável pelas transições vibracionais do estado fundamental para o primeiro estado excitado, enquanto no NIR são transições do estado fundamental para o segundo e terceiro estados excitados.

O espectro no infravermelho de um composto químico é considerado uma de suas propriedades físico-químicas mais características, podendo ser considerado sua “impressão digital”, o que leva a espectroscopia na região do infravermelho ter extensa aplicação na identificação dos compostos e na análise quantitativa de misturas de compostos. Como a intensidade de uma banda de absorção é proporcional à concentração do componente que causou esta banda, a quantidade

de um composto presente em uma amostra pode ser determinada por meio de uma curva de calibração (intensidade da banda *versus* concentração) construída a partir de amostras com concentrações conhecidas do composto em questão. No entanto, quanto mais complexa é a amostra ou quanto maior o número de interferentes presentes, mais difícil se torna a construção de uma calibração univariada confiável, sendo necessário lançar mão de cálculos estatísticos mais trabalhosos, que permitam a utilização de vários comprimentos de onda para determinação de uma única propriedade, obtendo-se, assim, uma calibração multivariada.

2.9.1 Espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A técnica de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) utiliza uma configuração diferenciada na construção do equipamento, conhecida como Interferômetro de Michelson. O interferograma é formado pela soma de todas as ondas de diferentes amplitudes e das frequências que chegam ao interferômetro e possui todas as informações espectrais da amostra, sob um dado conjunto de condições. Porém, a forma com que essa informação se apresenta não é muito útil para o analista e usa-se do tratamento matemático por transformada de Fourier para converter esta informação em espectro, relacionando-se as intensidades com as respectivas frequências.

As principais vantagens da espectroscopia FTIR são:

- a)** Melhores precisão e exatidão em termos de comprimento de onda;
- b)** Todos os sinais da fonte alcançam o detector simultaneamente. Essa característica torna possível a obtenção de todo o espectro de uma só

vez (2 a 3 s) e com essa economia de tempo é possível aumentar o número de varreduras (“scans”) para aumentar a razão sinal/ruído (a melhora na relação sinal-ruído é proporcional a raiz quadrada do número de *scans*);

- c) O instrumento apresenta poucos elementos ópticos e não necessita de fenda. A potência da radiação que chega ao detector é maior do que nos instrumentos dispersivos e maiores relações sinal/ruído são observadas;
- d) Equipamento sempre acoplado a um computador, facilitando a visualização, tratamento dos dados e comparação de espectros.

2.9.2 Espectroscopia de reflectância total atenuada (ATR)

A espectroscopia de reflectância total atenuada (ATR) é uma técnica que requer nenhuma ou uma mínima e rápida preparação da amostra viabilizando a obtenção de espectros no infravermelho de amostras que são relativamente espessas e fortemente absorventes para serem analisadas por espectroscopia de transmitância. Pode ser aplicada na obtenção de informações sobre as propriedades da superfície de um material, incluindo identificação, modificação e adsorção em superfícies. Atualmente tem sido aplicada com vantagens para qualquer amostra sólida ou líquida e também em análise quantitativa.

A ATR baseia-se no fato de que quando um feixe de radiação passa de um meio mais denso (cristal da janela do dispositivo de ATR, geralmente ZnSe ou Ge) para um meio menos denso (amostra), ocorrem eventos de refração e/ou reflexão. A fração do feixe de luz incidente que é refletida aumenta conforme o ângulo de

incidência, e quando excede um determinado ângulo crítico a reflexão é completa. No ponto de reflexão, o feixe atua como se penetrasse a uma pequena distância dentro da amostra, de forma que esta componente da radiação (designada de onda evanescente) pode ser absorvida pela amostra em contato com a superfície da janela (neste caso, refere-se à radiação como “atenuada”). É possível fazer com que a radiação sofra diversas reflexões internas e conseqüentes atenuações, aumentando a sensibilidade da técnica que, de qualquer forma, não é grande, dado o curto “caminho ótico” proporcionado pelas ondas evanescentes.

Como desvantagens podem ser citadas a redução do sinal que atinge o detector para 15-20% do valor original quando do uso da transmitância, mas que pode ser compensada pelo aumento do número de reflexões, e o custo elevado para aquisição do acessório ATR.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

As amostras de óleo de pinho foram adquiridas de quatro empresas fabricantes, neste trabalho, denominadas como empresas **B**, **D**, **S** e **Y**.

Uma amostra de óleo bruto (óleo que foi coletado antes do processo de destilação industrial) foi doada pela empresa Dierberger.

Padrões analíticos de α -pineno, β -pineno foram adquiridos da marca Fluka e de terpinoleno, α -terpineol, β -terpineol, γ -terpineol da marca Merck, foram utilizados nas análises de CG-DIC.

Os derivados fenólicos utilizados neste trabalho foram o *o*-benzil *p*-clorofenol (OBCP), *o*-fenil fenol (OPP) e o *p*-cloro *m*-cresol (PCMC), todos doados pela empresa Lanxess.

Para elaboração do sistema tensoativo, a solução de laurato de trietanolamina e sódio foi preparada a partir da neutralização do ácido láurico 99% (Cognis) com hidróxido de sódio a 50% e trietanolamina (Oxiten). Uma amostra de ácido linear alquilbenzeno sulfônico a 96%, adquirida da empresa Stepan, foi neutralizada com hidróxido de sódio a 50%. A alfa olefina sulfonada foi doada pela empresa Stepan com o nome comercial de Bioterge AS40, contendo 39% de ingrediente ativo. Todas as percentagens indicadas foram p/p.

3.2 Métodos

3.2.1 Avaliação olfativa

Na avaliação de caracterização olfativa dos óleos de pinho e das frações de destilação, foram utilizadas fitas olfativas, que tiveram uma de suas pontas impregnada com a amostra-teste. Duas analistas previamente treinadas nesta metodologia realizaram a análise sensorial das fitas, imediatamente após a impregnação, para a avaliação das notas de saída, e após 5 minutos, para que as notas mais pesadas pudessem ser sentidas olfativamente.

A classificação das notas olfativas foi atribuída segundo classificação consagrada pela literatura (DALLIMORE, 1992, ASCHAR, 2001) e utilizada pelos fabricantes de essências. A seguir é apresentado um pequeno glossário das descrições de odores e suas notas olfativas (DALLIMORE, 1992).

- Aldeídico: característico de aldeídos com cadeia alifática entre C8 e C12.
- Ambarado: doce, quente levemente animálico, baunilha.
- Amendoado: doce, oleoso, odor natural de amêndoa.
- Animálico: impregnação de odor animal inclui *civet*, *musk*, *ambergris* e *castoreum*.
- Balsâmico: quente, doce e resinoso com fraco aspecto medicinal, polvorosa;
- Canforado: reminiscência de cânfora e eucalipto.
- Cítrico: fresco, volátil, difusivo, *sparkling*. Odor da lima, limão, bergamota, laranja, mandarina, grapefruit, tangerina capim cidreira.
- Couro: fenólico, quente, animálico.
- Doce: pesado, típico da baunilha e notas de açúcar.
- Flora: característico do odor de flores como a do jasmim, rosa, tuberosa, *ylang-ylang*, flor de laranjeira e violeta.

- Fresh: termo usado subjetivamente dependendo da sensação e experiência individual para as notas cítricas, florais, verdes e frutais;
- Frutal: quente, doce, frutal. Odor característico de uva (antranilato de metila), framboesa (oxifenilon ou frambinone, *p*-hidroxibenzil acetona, CAS 5471-51-2), pêra (verdural extra, *cis*-3-hexenyl acetate, CAS 3681-71-8), abacaxi (ciclohexil propionato de alila, CAS 7493-74-5) melão (helional, α -metil-1,3-benzodioxol-5-propanal, CAS 1205-17-0).
- Herbal: odor de planta fresca, odor característico da erva doce, sálvia, alecrim, eucalipto glóbulos, pinho, agulhas de pinho, menta.
- Leve: descrição usada para os odores (notas) florais, verdes, cítricos ou combinações destes.
- Madeira (amadeirado): notas naturais de madeira como sândalo, cedro, *vetiver*, *patchouly*, *cashmeran* (CAS 33704-61-9) e o musgo de carvalho.
- Medicinal: fenólico, canforado, herbal, freqüentemente pungente.
- Musgoso: odor de terra, madeira, fenólico, verde.
- Picante ou especiarias: pungente, quente e culinário. Odor característico do cominho, gengibre, canela, pimenta, cardamomo, salsão, cravo e noz moscada.
- Pinho: redolente da madeira, agulhas e resina do pinho.
- Polvoroso: leve, confortável, frequentemente balsâmico e *musk*.
- Quente: tipicamente ambarado, animático, balsâmico e doce.
- Químico: duro, agressivo e de odor “básico”, exemplificada pelo odor do álcool amílico, acetofenona e difenil óxido.
- Resinoso: quente, doce, balsâmico, agudo nas notas de topo (saída).
- Verde: leve intensidade, redolente, folheado, gramíneo. Odor do gálbano, folhas de violeta, lírio do vale, mimosa, cassis.

3.2.2 Índice de refração

Medidas de índice de refração foram realizadas no aparelho da marca Quimes modelo WYA-15 ABBE Refractometer. Um banho térmico com circulação de água foi utilizado para controle da temperatura das medidas realizadas a 20 e 25°C.

3.2.3 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV)

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos no equipamento *Spectrum Bx*, FTIR *System* da Perkin Elmer utilizando-se cela ATR (*DuraSamplIR*) de nove reflexões, no intervalo de 4000 a 700 cm^{-1} , utilizando 16 *scans* e resolução de 2 cm^{-1} .

Antes da obtenção de cada espectro das amostras foi realizado um ensaio de branco (cela limpa, sem amostra) visando diminuir a interferência da atmosfera sobre o espectro das amostras. As amostras foram aplicadas diretamente sobre o elemento de diamante. O software utilizado para aquisição dos dados foi o *Spectrum* v.2.0 (Perkin Elmer).

3.2.4 Termogravimetria (TG) e termogravimetria derivada (DTG)

As curvas TG/DTG para caracterização de amostras de óleo de pinho foram obtidas utilizando termobalança, modelo TGA 50 (Shimadzu), sob atmosferas dinâmicas de nitrogênio ou ar sintético (50 mL min^{-1}) taxa de aquecimento (β) de 10°C min^{-1} e cadinho de Pt contendo massa de amostra entre 38 e 42 mg.

3.2.5 Cromatografia Gasosa (CG)

A cromatografia gasosa foi empregada neste trabalho na caracterização das amostras de óleo de pinho e das frações obtidas na destilação a pressão reduzida.

3.2.5.1 Cromatografia Gasosa com detector de chama (CG-DIC)

Para avaliações CG-DIC, devido à indisponibilidade de equipamentos, foram utilizados dois equipamentos em etapas diferentes do projeto. Os primeiros estudos foram realizados com a metodologia que foi denominada como “Programação 1 da CG-DIC”, utilizado cromatógrafo modelo 5890 HP, munido de uma coluna de sílica DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m; 5% fenil metilsiloxano/95% polidimetilsiloxano). A temperatura inicial no forno era de 60°C, com um incremento de temperatura de 2°C min⁻¹, até atingir-se 70°C. Após atingir-se esta temperatura, foi utilizado um segundo incremento de 5°C min⁻¹, até 170°C. As temperaturas do injetor e detector foram mantidas a 220°C. O gás de arraste utilizado foi H₂, no detector os gases foram H₂ e ar sintético e como “*make up*” o N₂. Pressão: 33,1 kPa; Vazão: 1 mL min⁻¹. As análises foram realizadas com uma solução de óleo de pinho a 1% (p/p) em etanol.

Na “Programação 2 da CG-DIC”, foi utilizado cromatógrafo da marca Agilent modelo 7890A, munido de uma coluna de sílica DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m; 5% fenil metilsiloxano/95% polidimetilsiloxano). A temperatura inicial no forno era de 60°C, ficando nesta temperatura por 2 min. Aplicou-se uma rampa de temperatura com um incremento de 2°C min⁻¹, até atingir-se 140°C, após a qual, foi utilizado um segundo incremento de 5°C min⁻¹, até 180°C e permanência nesta temperatura por 2 minutos. As temperaturas do injetor e detector foram mantidas a 220°C. O gás de

arraste utilizado foi H₂, pressão na coluna: 46,2 kPa, Vazão: 0.25 mL min⁻¹; relação de split 1:100. No detetor, o N₂ foi utilizado como “make up” (26 ml min⁻¹), H₂ (35 ml min⁻¹) e ar sintético (350 ml min⁻¹). Foram analisadas soluções de óleo de pinho e suas frações diluídas a 10% (p/p) em etanol.

A identificação dos principais componentes das amostras de óleo de pinho foi realizada por meio da técnica de adição de padrão, também conhecida como *Spiking*. Para isso, foram utilizados padrões analíticos Merck e Fluka de alguns terpenos comuns em óleos voláteis como α -pineno, β -pineno, β -terpineol, terpinoleno, γ -terpineno e γ -terpineol.

Utilizou-se como matriz de referência uma amostra de óleo de pinho do fabricante B. Obteve-se o cromatograma típico desta matriz de referência e dos terpenos padrões. Pequenas amostras da matriz foram aditivadas com os padrões analíticos dos terpenos em estudo e, para cada padrão adicionado, observou-se no cromatograma o tempo de retenção onde havia aumento do sinal analítico. Confrontando todos os resultados, determinou-se o tempo de retenção nas condições de análise empregada para os terpenos em estudo.

Os ensaios cromatográficos foram feitos com correção de linha base, não se empregando a técnica de padrão interno, uma vez que o foco deste trabalho não foi a quantificação dos componentes.

3.2.5.2 Cromatografia Gasosa acoplada ao espectrômetro de massa (CG-EM)

Para avaliações CG-EM, foi utilizado cromatógrafo marca HP modelo 5890 com espectrômetro de massa da HP modelo 5973, munido de coluna HP5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m), temperatura inicial do forno de 80°C mantida por 3 minutos,

com incremento de temperatura de 10°C até atingir 300°C, mantendo-se esta temperatura por 7 minutos. Temperatura do injetor 250°C e da interface de 300°C. *Split* 1:100 e injeção de 0,3 µL da amostra tal qual. Para identificação dos componentes, utilizou-se uma biblioteca NIST MS *Search* 2.0.

3.2.6 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

O teor de derivados fenólicos (OPP, OBCP e PCMC) contido nas amostras de desinfetante formuladas foi determinado por meio de ensaios de cromatografia líquida de alta eficiência. O equipamento utilizado nestes ensaios foi um cromatógrafo líquido, marca Shimadzu modelo LC-10AD com sistema de injeção automático modelo SIL 20A detector de UV-VIS modelo SPD 10A, coluna Zorbax SB-C 18,5 µm (4,6 x 250 mm). O comprimento de onda selecionado foi 280 nm. Os ensaios foram realizados em condições constantes onde a fase móvel foi composta de acetonitrila, água acidificada com ácido fosfórico (0,3 mL por litro de FM, para pH 2,6) na proporção 65:35 (v/v). Volume de injeção de 20 µL e vazão de 1 mL min⁻¹.

Para obtenção das curvas de calibração foram utilizadas amostras de OPP, OBCP e PCMC de purezas conhecidas e apresentadas em laudo de análise do fabricante. As soluções foram preparadas nas concentrações de 20, 30, 50, 80 e 100 mg L⁻¹, usando a fase móvel como diluente.

As determinações do teor de derivado fenólico, nas formulações biocidas, foram feitas em amostras recém-preparadas e em amostras envelhecidas após exposição a 45°C por doze semanas na realização do ensaio de estabilidade. Foram preparadas soluções com concentrações de aproximadamente 60 mg L⁻¹, usando a fase móvel como diluente.

As amostras foram filtradas antes das análises em membrana com 0,22 μm de poro (Durapore, Millipore®).

O processo de validação do método analítico foi iniciado com a realização da verificação da linearidade, intervalo, precisão instrumental e robustez, seguindo os critérios propostos pela resolução da ANVISA RE nº 899, de 29/05/2003 (ANVISA, 2003).

3.2.7 Destilação a pressão reduzida

A destilação de uma amostra de óleo de pinho bruto foi conduzida em sistema a pressão reduzida, variando a pressão de 20 a 1 mmHg em diversas etapas.

Iniciou-se a destilação utilizando-se balão de fundo redondo com três bocas e com capacidade de 2 L e 500 mL, conforme quantidade de material a ser destilado. Na boca central do balão acoplou-se uma coluna de destilação recheada com espiras de vidros - esta coluna tem 1 metro de altura e 0,5 cm de diâmetro interno, com altura de recheio de 90 cm. Em outra boca do balão foi colocado um termômetro para medida da temperatura do meio e na terceira boca acoplou-se uma tampa para colocação e retirada de material sem a necessidade da desmontagem da coluna. Na parte superior da coluna foi conectado um condensador total, no qual existia um dedo frio e uma torneira para a regulação da vazão de condensado, retirado como destilado, e o restante retornando como refluxo para a coluna. Neste condensador estava inserido um termômetro para a verificação da temperatura do vapor no topo da coluna.

Na saída do destilador foi conectado um tubo graduado com torneira para a verificação da vazão e retenção de destilado e na saída deste um balão de 50 mL para a coleta do destilado.

Uma bomba de vácuo foi conectada por um sistema ao tubo graduado, evitando o arraste de gotas e vapor. O aquecimento foi controlado por manta de aquecimento.

Após os experimentos as amostras de destilado foram armazenadas em vidros âmbar com vedante e tampa e mantidas sob refrigeração, a fim de evitar-se degradação pela luz e eventual perda de componentes por volatilização.

3.2.8 Preparo das formulações biocidas

Foram preparadas 42 formulações considerando níveis de teor de biocida de 0, 0,7 e 1,0% (p/p) e níveis de tensoativo de 1,5 e 5% (p/p). Foram previamente preparadas solução do linear alquilbenzeno sulfonato de sódio 10% e uma solução 20% da mistura de laurato de trietanolamina e sódio (1:1 p/p). A alfa olefina sulfonada foi usada tal qual. Para melhorar a solubilidade do derivado fenólico no sistema formulado, foram adicionados 15,4% (p/p) de etanol. Todas as amostras tiveram o pH ajustado entre 7 e 8 com solução de hidróxido de sódio. A **Tabela 16** apresenta os tipos de biocidas, tensoativos, solventes e as concentrações utilizadas na elaboração das formulações.

As amostras foram acondicionadas em frascos de PET de 30 mL, identificadas e submetidas a teste de estabilidade a 4, 25 e 45°C por doze semanas. Foram feitas avaliações de pH, cor, odor, aparência nas 2^a, 4^a, 8^a e 12^a semanas. Os ensaios de atividade antimicrobiana para as amostras recém-preparadas foram

realizados no início e para as amostras expostas a 45°C no final do ensaio de estabilidade (12 semanas de exposição).

Tabela 16 - Parâmetros utilizados na elaboração das formulações biocidas

Parâmetro	Variações
Tipos de biocidas	OPP, OBCP, PCMC
Teor de biocida	0%; 0,7% e 1,0% (p/p)
Tipo de tensoativo	Laurato de sódio e trietanolamina (Laurato de Na/TEA) Linear alquilbenzeno sulfonato de sódio (NaLAS) Alfa olefina sulfonada de sódio (AOS)
Teor de tensoativo	1,5 e 5% (p/p)
Teor de etanol	15,4% (p/p)
Teor de água	q.s.p. 100% (p/p)
pH (T _{ambiente})	7-8

3.2.9 Determinação da tensão superficial

A determinação da tensão superficial foi realizada nas amostras recém-preparadas dos desinfetantes formulados. A determinação foi feita pelo método da gota pendente utilizando aparelho OCAH 200 *High Speed Contact Angle*, com agulha de diâmetro interno de 1,37 mm e externo de 1,65 mm, tamanho 38,1 mm.

3.2.10 Metodologia do disco de difusão para determinação da atividade bacteriostática

Este ensaio foi realizado para avaliação da atividade bacteriostática das amostras de óleo de pinho e das frações de destilação. O princípio deste método baseia-se na formação de um halo de inibição frente ao microrganismo teste previamente inoculado no meio de cultura onde são colocados discos de papéis

impregnados com uma solução das amostras das quais se deseja investigar a atividade antimicrobiana. As substâncias impregnadas nos discos de papel difundem-se no meio de cultura e, caso a amostra em questão apresente atividade inibitória sobre o microrganismo testado, formar-se-á um halo de inibição (ausência de crescimento microbiano) ao redor do disco impregnado. Após o período de incubação, respeitadas as condições específicas para o microrganismo, é medido o diâmetro da zona de inibição em volta de cada disco. A metodologia recomendada pela ANVISA é baseada na metodologia M2-A8 do NCCLS (ANVISA, 2003) e o método No 65.3210.006 do INCQS (2007) da placa de ágar.

3.2.10.1 Preparo do método de disco de difusão

Os testes foram feitos com as cepas padrões *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708. A partir da cultura estoque foram feitos três repiques consecutivos a cada 24 horas e incubados a uma temperatura entre 35 e 37°C, onde em cada repique uma alçada do meio foi transferida para 10 mL de caldo nutriente, e o terceiro repique de 24 horas foi utilizado para o teste.

O meio de cultura utilizado para o teste de atividade bacteriostática foi o Ágar Mueller-Hinton (MERCK®) - preparado a partir do meio desidratado de acordo com a recomendação do fabricante. Para cada 100 mL de meio fundido e a uma temperatura entre 45 e 48°C foi adicionado 1 mL de inóculo. Esta mistura foi transferida para uma placa de Petri e deixou-se solidificar. Em cada placa de Petri distribuiu-se 5 discos de papel de filtro Whatman 41 com 5 mm de diâmetro, umedecidos com 3 µL da amostra teste.

As placas foram incubadas a uma temperatura entre 35 e 37°C, durante 24 horas para primeira leitura e mais 24 horas para a segunda leitura. Em cada leitura as placas foram inspecionadas quanto à presença de halo de inibição (medidos em mm). Todos os ensaios foram realizados em triplicata e tiveram como controle negativo água estéril.

O aparecimento de zona clara de inibição ao redor do disco de papel indica que a amostra teste possui propriedades inibitórias, porém a dimensão do diâmetro formado sofre influência da permeabilidade da amostra-teste no ágar.

3.2.11 Método de suspensão para determinação da atividade bactericida

Método de suspensão também conhecido como reducional ou *Time Kill Test* é o teste destinado a determinar a atividade bactericida de um produto e foi empregado nas avaliações das formulações biocidas. O microrganismo teste é exposto ao produto, sendo analisado quantitativamente a intervalos de tempo definidos, para a contagem dos microrganismos sobreviventes. Este ensaio permite estabelecer importantes parâmetros de sanificação, tais como dosagem do antimicrobiano, tempo de contato e eficácia sobre o microrganismo-alvo. A metodologia usada foi baseada na metodologia Nº 960.9 da *Association of Official Analytical Chemists*.

3.2.11.1 Preparo do método de suspensão

Os testes foram feitos com as cepas padrões *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708. O meio de cultura utilizado para

cultivo, subcultivo e manutenção das bactérias foi o caldo nutriente (DIFCO®). Foram feitos 3 repiques consecutivos a cada 24 horas, incubados a uma temperatura entre 35 e 37°C. A padronização da suspensão foi feita em solução tampão de fosfato, utilizando-se a escala McFarland nº 3.

Este ensaio foi realizado nas amostras desinfetantes recém-preparadas e em amostras envelhecidas após exposição a 45°C por doze semanas na realização do ensaio de estabilidade.

As amostras de produtos testes foram distribuídas, em duplicata, em tubo estéril - 9,9 mL de produto. Em cada tubo adicionou-se 0,1 mL da suspensão de microrganismo, e após intervalos de 5 e 10 minutos foram transferidas alíquotas de 1 mL para tubos contendo 9 mL de caldo nutriente com 0,5% de *Tween* 80. Destes tubos foram transferidas alíquotas de 0,1 mL para tubos contendo 9,9 mL de solução tampão diluída. Após esta diluição alíquotas de 1 mL e 0,1 mL foram transferidas, em duplicata, para placas de Petri estéreis nas quais foi adicionado meio ágar extrato de *triptone glucose* (TGE). Após resfriamento e solidificação do ágar as placas foram invertidas e incubadas a uma temperatura entre 35 e 37°C por 48 horas. A avaliação de crescimento de colônias foi realizada com auxílio de um equipamento com lente de aumento. O esquema para condução do método de suspensão para a amostra teste está representado na **Figura 9** e no **APENDICE D** são apresentadas algumas fotos que ilustram o procedimento.

Figura 9. Esquema para condução do teste de suspensão

Para controle da contagem da suspensão de microrganismo, uma alíquota de 0,1 mL da suspensão foi adicionada a um tubo estéril com 9,9 mL da solução tampão e foram realizadas outras duas diluições consecutivas seguindo estas condições. Alíquotas de 0,1 mL e 1 mL foram transferidas, em duplicata, para placas de Petri estéreis nas quais foi adicionado meio TGE. Após resfriamento e solidificação do ágar as placas foram invertidas e incubadas a uma temperatura entre 35 e 37°C por 48 horas. A avaliação de crescimento de colônias foi realizada com auxílio de lente de aumento. A **Figura 10** ilustra este método.

Figura 10. Esquema do método de controle de contagem

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Aspectos gerais das amostras de óleo de pinho

Neste estudo as amostras de óleo de pinho foram recebidas em embalagem plástica de PE opaca, acompanhadas de laudo de análise e ficha de segurança. Cerca de 50 g de amostra foi transferida para frasco de vidro âmbar e armazenada sob refrigeração.

Para um maior conhecimento das amostras selecionadas para o estudo, procedeu-se a caracterização organoléptica, determinações do índice de refração, caracterização por espectroscopia na região do infravermelho, avaliação do comportamento térmico por TG/DTG e análises por cromatografia gasosa, utilizando detector de ionização de chama (CG-DIC) e acoplada ao espectrômetro de massa (CG-EM).

4.2 Caracterização física e organoléptica das amostras de óleo de pinho

Inicialmente, foram avaliadas as propriedades físicas e organolépticas das amostras de óleo de pinho a 50% de alcoóis terpênicos total, obtidas de 4 fabricantes (**B**, **D**, **S**, **Y**) e ainda a amostra de óleo de pinho bruto.

O óleo do fabricante **B** apresentou-se líquido, cor amarela clara e odor característico de pinho com notas olfativas verdes e secas, levemente canforadas.

Para os óleos do fabricante **D**, a amostra a 50% apresentou-se líquida, incolor, com odor característico com notas olfativas de pinho, verdes secas e canforadas.

As notas canforadas foram mais intensas para os óleos do fabricante **S**, que também apresentou notas de pinho, verdes e secas, aparência líquida e de cor amarela.

A amostra procedente do fabricante **Y** apresentou-se líquida, incolor com odor característico de pinho com notas de saída levemente frutais e notas de corpo verdes e secas.

E por último, a amostra de óleo bruto apresentou-se líquida, com cor amarela, odor característico de pinho com notas frutais de saída e um corpo verde seco e canforado.

4.3 Determinação do índice de refração das amostras de óleo de pinho

A determinação do índice de refração não apresentou uma boa correlação com o teor de alcoóis terpênicos totais, conforme dados apresentados na **Tabela 17**. Como o óleo de pinho é uma mistura de hidrocarbonetos e alcoóis terpênicos, a sua denominação comercial de teor é referente ao teor de alcoóis terpênicos total. Existe um grande número de combinações possíveis entre seus componentes que possa atender a uma mesma especificação. Ainda, devem ser consideradas as variações entre os teores de hidrocarbonetos que, usualmente não são especificados.

Pode-se observar na **Tabela 17** que a especificação do fabricante S para o óleo de pinho a 65 e 75% é a mesma, o que confirma a consideração dada acima.

Tabela 17 - Índice de Refração de amostras de óleo de pinho (fabricantes **B**, **D**, **S** e **Y**) com diferentes TATT*

Fabricante	TATT(%)	n ₂₀	n ₂₅	Especificação Fabricante n ₂₀
B	50	1,4778	1,4759	ne
B	50	1,4780	1,4757	ne
D	50	1,4769	1,4745	ni
D	65	1,4777	1,4757	1,477-1,482
D	80	1,4795	1,4773	1,481**
S	50	1,4760	1,4742	1,476-1,480
S	65	1,4795	1,4774	1,479-1,483
S	65	1,4807	1,4781	1,479-1,483
S	65	1,4814	1,4792	1,479-1,483
S	75	1,4825	1,4807	1,479-1,483
S	75	1,4792	1,4777	1,479-1,483
Y	50	1,4751	1,4726	1,4775**
Y	50	1,4785	1,4768	ni
Y	50	1,4776	1,4754	1,4777**
Y	65	1,4764	1,4756	1,4797**
Y	65	1,4784	1,4762	1,4803**
Y	75	1,4791	1,4764	1,4799**

*TATT = Teor de alcoóis terpênicos total; **resultado obtido pelo fabricante, dado de laudo; n₂₀ = índice de refração a 20°C; n₂₅ = índice de refração a 25°C; ni = não informado; ne = não especificado

4.4 Determinação dos espectros de absorção na região do infravermelho das amostras de óleo de pinho

Na avaliação por espectroscopia de absorção na região do infravermelho as variações dos TATT foram evidenciadas pelas diferenças das intensidades das bandas de absorção ou transmitância principalmente a partir da banda de estiramento -OH em torno de 3370 cm⁻¹. A **Figura 11** exemplifica estas variações para amostras de óleo de pinho do fabricante S com 50, 65 e 75% de TATT. O espectro de absorção na região do infravermelho para a amostra de óleo bruto

utilizada para fracionamento pelo processo de destilação a pressão reduzida está ilustrado na **Figura 12**.

Figura 11. Espectro de absorção na região do infravermelho para três amostras de óleo de pinho do fabricante S com 50, 65 e 75% de TATT

Figura 12. Espectro de absorção na região do infravermelho para amostra de óleo bruto

Apesar do óleo de pinho ser uma matriz complexa contendo vários componentes, são sugeridas as seguintes atribuições vibracionais para as bandas principais:

- Entre 700 e 1600 cm^{-1} são evidenciadas diversas bandas de deformação angular C-C e C-H alifático;
- Bandas com dois ápices em 1157 e 1128 cm^{-1} referentes do estiramento **C-OH** de álcool secundário;
- Banda com dois ápices em 1376 e 1365 cm^{-1} , caracterizam metilas geminais;
- Banda em 1438 cm^{-1} pode ser atribuída a metila, deslocada para este comprimento possivelmente por estar ligada a um anel e próxima à dupla ligação (considerando que absorção normal de metilas e metilenos nesta região é em torno de 1450-1460 cm^{-1});
- Bandas em 1644 e 1677 cm^{-1} referente à deformação axial C=C;
- Bandas na região entre 2970 e 2850 cm^{-1} , C-H de carbono alifático saturado sp^3 , com intensidade alta característica do esqueleto terpênico;
- Banda em 3376 cm^{-1} estiramento -OH.

4.5 Avaliação do comportamento térmico das amostras de óleo de pinho

Para a avaliação do comportamento térmico de amostras de óleo de pinho foram selecionadas aquelas de procedência do fabricante **S** com teores de alcoóis terpênicos total de 50, 65 e 75%.

A **Figura 13** ilustra as curvas TG/DTG das amostras com diferentes TATT. Essas curvas evidenciam que a perda de massa inicia-se à temperatura ambiente,

chegando à perda praticamente total a 165, 170 e 176°C, respectivamente, para as amostras com 50, 65 e 75% de alcoóis terpênicos totais.

Entre as amostras de diferentes concentrações observou-se que a temperatura de decomposição térmica e/ou volatilização eleva-se com o aumento do teor de alcoóis terpênicos totais e não sofre influência da atmosfera utilizada.

Figura 13. Sobreposição das curvas TG/DTG obtidas a $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ e sob atmosfera dinâmica de nitrogênio, de amostras de óleo de pinho 50, 65 e 75% de TATT

Os resultados estão coerentes, pois os óleos com teores mais altos de alcoóis terpênicos apresentam maiores teores de componentes com ponto de ebulição e/ou volatilização mais altos.

A **Figura 14** ilustra as curvas TG/DTG das amostras com os mesmos TATT's, porém de diferentes fabricantes. Observa-se que existem diferenças no perfil das curvas TG/DTG para os óleos de pinho de diferentes fabricantes por estes

apresentarem diferenças na composição, tal como evidenciado pelo estudo de análise cromatográfica.

Figura 14. Curva TG e detalhe da curva DTG obtidas a $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$, sob atmosfera dinâmica de ar para amostras de óleos de pinho a 50% provenientes dos fabricantes **B**, **D**, **S** e **Y**

4.6 Determinação da composição de algumas amostras de óleo de pinho por cromatografia a gás

Amostras de óleo de pinho produzidas nos anos de 2004 e 2005 por 3 fabricantes (**B**, **D** e **Y**) contendo aproximadamente 50% de alcoóis terpênicos totais, foram analisadas por CG-DIC utilizando a “programação 1 da CG-DIC” e comparadas de acordo com o percentual relativo da área integrada para cada pico. Foram assinalados 20 componentes principais do óleo de pinho, presentes na maioria das amostras testadas. Para cada componente, foram calculados os tempos de retenção médios e as concentrações típicas, de acordo com o fabricante. A

identificação dos componentes utilizando a CG-DIC foi realizada segundo a técnica de adição de padrão, possibilitando a identificação de β -pineno, α -pineno, terpinoleno, α -terpineol, β -terpineol e γ -terpineol.

As concentrações médias para cada componente foram relacionadas entre si por meio de um gráfico de matriz, ilustrado na **Figura 15**, possibilitando identificar visualmente os componentes que melhor permitem a separação e classificação das amostras do óleo de acordo com a origem.

As amostras de óleo de pinho do fornecedor **B** foram diferenciadas das amostras das demais procedências pelo teor do componente eluído no tempo de retenção de 8,13 min, nenhum dos padrões utilizados apresentou eluição neste tempo de retenção, não sendo possível nesta fase fazer a identificação deste. Estas amostras apresentaram teores deste componente na faixa de 3,0 a 3,3%, em área de pico, enquanto as amostras de outras procedências apresentaram teores variando de 1,9 a 2,5%.

Para as amostras manufaturadas pela empresa **S** os teores entre 15,1 e 15,7% de terpinoleno (tr 11,11 min) permitiram diferenciar este material das demais procedências que apresentam menores teores de terpinoleno (9,7 a 11,3%).

Os teores de α -pineno (tr 4,47 min) variando de 15,0 a 17,0% nas amostras manufaturadas pela empresa **D** possibilitaram diferenciar esse material em relação as amostras das empresas **S** e **B** que apresentaram teores entre 8,5 a 9,5%. Apenas uma amostra da empresa **S** apresentou teor de 15,8% de α -pineno.

(*) identificado por adição de padrão, (**) atribuição comparativa pela ordem de eluição e percentagem dos dados obtidos por CG-DIC e CG-EM

Figura 15. Diagrama de Matriz para principais componentes do óleo de pinho

Tais conclusões referenciam um painel de produção de óleo de pinho de aproximadamente um ano. Deve-se contemplar que alterações nestes valores podem ocorrer caso ocorra negociações das empresas fabricantes de óleo de pinho com novos fornecedores de goma-resina, o que acarretaria mudanças da composição do material de partida. A introdução de alterações nas rotas de reações ou nos processos de destilação também pode alterar a especificação dos produtos. Porém, deve-se considerar que uma empresa fornecedora de um insumo deve

previamente comunicar e acordar com seus clientes a introdução de qualquer mudança de especificação dos insumos negociados entre elas.

Objetivando a identificação de um maior número de componentes existentes na composição do óleo de pinho, foi empregada a CG-EM e o uso de uma biblioteca eletrônica, que possibilitou a identificação de 22 componentes. Neste estudo foram avaliadas amostras de óleo de pinho com teores totais de alcoóis terpênicos variando de 50 a 80% adquiridas das empresas **D** (amostras com 50, 65 e 80%), **S** (amostras com 50, 65 e 75%) e **Y** (amostras com 50, 65 e 75%). Foi conduzida, ao mesmo tempo, a análise por CG-DIC utilizando a “programação 2 da CG-DIC” e os resultados foram comparados de acordo com o percentual relativo da área integrada para cada pico, considerando a ordem de eluição dos componentes. No **APÊNDICE A**, estão apresentadas as **Tabelas 34 e 35** com os resultados obtidos pelas duas técnicas. Os compostos terpênicos estão distribuídos conforme as suas respectivas ordens de eluição. Observa-se que as técnicas utilizadas apresentaram, em alguns casos, diferenças nos teores determinados de algum componente específico, porém as injeções não foram feitas em replicatas, o que poderia minimizar estas diferenças.

A **Figura 16** ilustra os cromatogramas obtidos pelo emprego por CG-EM e CG-DIC (programação 2 da CG-DIC) para a amostra de óleo de pinho bruto que foi utilizada como material de partida para a destilação a pressão reduzida.

Figura 16. Cromatogramas de uma amostra de óleo de pinho bruto. a) CG-EM e b) CG-DIC

4.7 Destilação de uma amostra de óleo de pinho bruto e avaliações físico-químicas das frações

A massa de aproximadamente 1,2 kg da amostra de óleo de pinho bruto foi submetida ao processo de destilação, que permitiu coletar 61 amostras de destilados, as quais foram denominadas frações de destilação. Durante o processo,

em intervalos de tempo distintos, também foram coletadas quatro amostras do balão de destilação, que foram denominadas resíduos de destilação.

A caracterização físico-química dessas amostras foi realizada por CG-DIC, CG-EM, espectroscopia no infravermelho, TG/DTG e avaliação do caráter olfativo.

Algumas frações coletadas seqüencialmente apresentaram semelhanças qualitativas e em alguns casos quantitativas. Isto se deve ao fato de que as coletas foram realizadas não apenas quando se observava uma alteração na temperatura de ebulição do destilado como também quando da ocorrência de alguma perturbação da pressão do sistema, interrupção do processo ou quando o volume do destilado atingia 20 mL.

4.7.1 Avaliação olfativa

Como o óleo de pinho é muitas vezes utilizado como fragrância ou faz parte da composição de uma fragrância, foi realizada a caracterização olfativa das frações de destilação.

A avaliação olfativa das frações evidenciou que há diferenças qualitativas entre elas. A mudança de caráter olfativo foi, sensorialmente, percebida entre as frações coletadas no decorrer da destilação, como é apresentado na **Tabela 18**.

As notas canforadas (devido à presença de canfeno) foram, sensorialmente, observadas com alta intensidade para as frações mais leves, as notas mais oleosas e resinosas foram características das frações intermediárias e as notas de pinho e herbais ficaram mais pronunciadas nas frações mais pesadas.

Tabela 18 - Caracterização olfativa de algumas frações de óleo de pinho

Fração	Caracterização olfativa
F1	Madeira, verde seca, oleosa (resinosa)
F9, F10	Madeira, verde, canforada fresca
F13, F14, F15, F18	Madeira, adocicada, canforada
F16, F17	Madeira, canforada, resinosa
F22	Resinosa, sintética (solvente)
F24	Resinosa, seca, picante leve ranço
F32, F33 e F34	Mentolada, levemente resinosa, seca, sintética (solvente)
F35, F36, F37	Aromática, verde, seca, resinosa
F38, F39, F40, F41	Saída cítrica, verde. Corpo resinoso, verde picante
F42	Madeira, verde, levemente mentolado, suave
F43, F44, F45	Madeira, verde, pinho
F46	Verde, pinho, rançosa, sintética (solvente)
F47, F48, F49	Saída aromática, anis. Corpo verde e fresco
F50, F51	Herbal, pinho, canforada
F53,	Saída floral (pétalas de rosas), corpo verde herbal (capim), pinho
F61	Verde floral, herbal, pinho
Resíduo final da destilação	Tabaco, madeira queimada

4.7.2 Determinação dos espectros de absorção na região do infravermelho das frações de destilação

Os espectros de absorção na região do infravermelho, para as frações estão apresentados no **APÊNDICE B**.

As bandas características das frações são as mesmas que estão presentes nas amostras de óleo de pinho e foram discutidas na **seção 4.4** . Ressaltando que em alguns espectros algumas frações apresentaram banda em torno de 3080 cm^{-1} referente ao estiramento =C-H olefínico, não evidenciado nas amostras de óleo.

4.7.3 Avaliação do comportamento térmico das frações de destilação

A avaliação do comportamento térmico das frações obtidas na destilação do óleo de pinho bruto foi realizada por meio da técnica de termogravimetria.

A **Figura 17** ilustra as curvas TG/DTG para o óleo de pinho bruto, as frações de destilação F1, F24 e F61 e o resíduo final de destilação.

As curvas TG/DTG do óleo de pinho bruto apresentam duas etapas de perdas de massa, a primeira ocorrendo entre a temperatura ambiente e 165°C, com uma variação de massa de 73,5% ($T_{\text{pico DTG}} = 142^{\circ}\text{C}$) e a segunda que apresenta uma variação de massa de 26% ($T_{\text{pico DTG}} = 175^{\circ}\text{C}$), atingindo perda de massa praticamente total até 250°C.

No caso da fração mais leve F1, as curvas TG/DTG evidenciam perda de massa em uma única etapa desde 25°C. A velocidade de perda de massa é máxima na temperatura de 141°C ($T_{\text{pico DTG}}$) a 160°C, praticamente ocorre volatilização total da amostra.

As curvas TG/DTG evidenciam que a fração F24 apresenta, inicialmente, um comportamento térmico muito similar ao da amostra do óleo de pinho bruto. A velocidade máxima de perda de massa ocorre a 152°C ($T_{\text{pico DTG}}$) e na temperatura de 300°C, praticamente não deixa resíduo.

Para a fração F61 as curvas TG/DTG evidenciam que a amostra é termicamente estável até cerca de 60°C. A perda de massa ocorre em apenas uma etapa entre 60 e 230°C ($T_{\text{pico DTG}} = 201^{\circ}\text{C}$) e atinge perda de massa, praticamente, total a 250°C.

As curvas TG/DTG evidenciam claramente que o resíduo final de destilação apresenta componentes mais pesados, visto que o processo de decomposição

térmica e/ou volatilização se inicia próximo a 80°C, ocorre em pelo menos três etapas e finaliza acima de 560°C.

Esses resultados sugerem que a termogravimetria pode ser empregada para monitorar o processo de destilação, visto que permite avaliar, comparativamente, o comportamento térmico das diferentes frações coletadas. O comportamento térmico evidenciado para o óleo de pinho bruto indica que é possível obter curvas TG/DTG com multi-etapas de perdas de massa empregando baixas razões de aquecimento ou em equipamentos que permitam ajustar a razão de aquecimento com a perda de massa (termogravimetria de alta resolução). Possivelmente, em cada etapa de perda de massa pode-se associar uma determinada fração ou grupo de fração de destilação.

Figura 17. Curva TG e detalhe da curva DTG obtidas a $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$, sob atmosfera dinâmica de ar para a amostra de óleo de pinho bruto, frações F1, F24 e F61 e o resíduo final da destilação

4.7.4 Determinação da composição de algumas frações de óleo de pinho bruto por cromatografia a gás

Na **Tabela 19** estão listados os resultados obtidos por CG-EM com a identificação de alguns componentes para amostra de óleo de pinho bruto e as frações F1, F19, F24, F31, F39 e F58. Observa-se que a fração F1 é constituída predominantemente de α -pineno (86,4%) e canfeno (10,8%), pois estes possuem menor temperatura de ebulição ($T_{eb} = 156,2$ e 161°C , respectivamente), sendo os primeiros componentes a serem destilados. A fração F19 ainda apresenta teores de α -pineno (17,6%) e canfeno (12,2%), porém, apresenta também componentes mais pesados como β -pineno ($T_{eb} = 166^{\circ}\text{C}$), α -felandreno ($T_{eb} = 171^{\circ}\text{C}$), 1,4-cineol ($T_{eb} = 172^{\circ}\text{C}$) e limoneno e eucaliptol, os quais não foram detectados separadamente ($T_{eb} = 175\text{-}176$ e $176,3^{\circ}\text{C}$). As frações F24, F31 e F39 apresentaram maiores teores de eucaliptol+limoneno (41, 55,5 e 58%). A fração F58, por ser a fração mais pesada entre estas, apresentou 79,3% de α -terpineol ($T_{eb} = 220^{\circ}\text{C}$) e 11,0% de γ -terpineol ($T_{eb} = 218^{\circ}\text{C}$).

A análise de CG-DIC conduzida para as frações de destilação foi realizada em diferentes dias e pequenas variações no tempo de retenção foram obtidas, por esse motivo são apresentados da **Tabela 20** até **Tabela 24** valores de $tr_{\text{médio}}$ para cada componente das frações analisadas.

A **Tabela 20** apresenta os dados obtidos por CG-DIC para as frações F1 a F13. A fração F1 apresentou dois picos, com $tr_{\text{médio}} = 3,65$ e $4,04$ min que não foram detectados nas análises do óleo bruto e pelo método CG-EM utilizado, possivelmente por estarem presentes no óleo bruto a uma concentração baixa não sendo detectado pela metodologia utilizada. Comparando os resultados de CG-DIC

com a CG-EM para os outros picos desta fração, pode-se dizer que o pico em $tr_{\text{médio}} = 4,16$ é referente ao α -pineno e o $tr_{\text{médio}} = 4,48$ min é referente ao canfeno. Entre as frações F1 e a Fração F14 (esta última apresentada na **Tabela 21**) o teor do componente com $tr_{\text{médio}} = 4,16$ min apresentou gradativa redução de 91 a 84%, por outro lado, o pico $tr_{\text{médio}} = 4,48$ min teve sua percentagem de área crescente de 7,5 a 12,7%. As frações F5 e F11 apresentaram picos com $tr_{\text{médio}}$ até 6,85 min, porém somando percentagem total de área menor que 2%. Possivelmente, durante o processo de destilação deve ter ocorrido pequena perturbação na temperatura ou pressão do sistema durante a coleta destas frações.

Tabela 19 - Percentagem relativa dos componentes de uma amostra de óleo de pinho bruto e de seis frações de destilação. Resultados obtidos por CG-EM

Componentes	tr (min)	Óleo Bruto	F1	F19	F24	F31	F39	F58
α -pineno	4,38	14,0	86,4	17,6	0,6	0,1	1,0	nd
canfeno	4,56	2,4	10,8	12,2	0,1	nd	0,2	nd
beta pineno	5,08	0,6	0,1	7,3	4,1	0,8	0,1	nd
α -felandreno	5,34	1,8	nd	9,9	9,0	3,5	nd	nd
1,4 – cineol	5,46	2,1	nd	25,2	22,0	16,6	0,6	nd
careno-2	5,54	2,1	nd	nd	9,4	4,6	nd	nd
<i>p</i> -cimeno	5,58	1,2	nd	nd	8,3	14,7	29,7	nd
eucaliptol + limoneno	5,76	9,9	nd	21,1	41,0	55,5	58,0	nd
α -terpineno	6,18	1,2	nd	0,1	0,1	0,6	0,4	nd
terpinoleno	6,70	8,6	nd	nd	nd	nd	1,1	nd
fenchol	7,01	1,0	nd	nd	nd	nd	nd	nd
1-terpinenol	7,32	2,3	nd	nd	nd	nd	nd	1,1
β -terpinol	7,46	2,1	nd	nd	nd	nd	nd	1,9
borneol	7,84	0,8	nd	nd	nd	nd	nd	nd
4 – terpinenol	8,03	1,3	nd	nd	nd	nd	nd	1,6
α -terpineol	8,32	37,8	nd	0,4	nd	nd	nd	79,3
γ -terpineol	8,39	6,6	nd	nd	nd	nd	nd	11,0
hidrato de Terpin	9,78	0,9	nd	nd	nd	nd	nd	nd
terpin	10,08	0,8	nd	nd	nd	nd	nd	nd
outros	-	2,5	2,7	6,2	5,4	3,6	8,9	5,1

nd = não determinado

Tabela 20 - Percentagem relativa dos componentes das frações F1 a F13 obtida por CG-DIC

tr médio (min)	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12	F13
3,65	0,32												
4,04	1,29	1,08	1,08	1,05	0,60	0,63	0,71	0,63	0,61	0,52	0,42	0,44	0,56
4,16	90,92	91,05	91,05	90,93	87,4	88,99	89,35	88,97	89,2	88,73	85,72	87,23	89,40
4,48	7,47	7,88	7,88	8,02	10,97	10,39	9,94	10,39	10,19	10,75	12,19	12,01	10,04
4,53											0,27		
6,02					0,26						0,35		
6,42					0,4						0,57	0,31	
6,85					0,36						0,49		

A percentagem relativa das áreas dos picos detectados para as frações de F14 a F26 estão apresentados na **Tabela 21**. Pode-se observar que para estas frações os teores de componentes mais voláteis, que apresentaram $tr_{médio}$ em 4,16 e 4,48 min foram diminuindo significativamente durante as coletas das frações e deixaram de ser detectados a partir da F26. Entre $tr_{médio}$ 4,53 e 4,99 min foram detectados picos somente até a F23. As maiores percentagens destas frações foram para os componentes com $tr_{médio} = 5,21$ min (variando aproximadamente entre 4 a 9%); 6,02 min (≈ 5 a 17%); 6,42 min (≈ 6 a 37%) e 6,85 min (≈ 6 a 41%). Comparando estes resultados obtidos para as frações F19 e F24 com aqueles obtidos por CG-EM para estas frações e para as amostras de óleo comercial, pode-se sugerir que os picos com $tr_{médio} = 5,21$; 6,02; 6,42 min são referentes ao β -pineno, α -felandreno e 1,4-cineol, respectivamente. Na avaliação destas frações por CG-EM não foi possível fazer a separação do limoneno e do eucaliptol. No entanto, nos ensaios realizados para as amostras de óleo de pinho, foi possível separá-los e identificá-los (**Tabela 34** e **Tabela 35**). Os $tr_{médio}$ foram 6,85 e 6,91 min, respectivamente.

Tabela 21 - Percentagem relativa dos componentes das frações F14 a F26 obtida por CG-DIC

tr médio (min)	F14	F15	F16	F17	F18	F19	F20	F21	F22	F23	F24	F26
4,04	0,35											
4,16	84,04	37,18	77,8	49,74	37,19	20,44	4,55	2,27			0,57	
4,48	12,66	17,79	20,36	19,96	17,78	12,18	4,03	2,55	0,35	0,54		
4,53	0,30	3,14	0,78	2,6	3,14	3,43	2,13	2,00	0,95			
4,74				0,52	0,71	0,97	0,87	0,98	0,91	0,78		
4,99	0,30	0,71	0,28	3,26								
5,21		4,95			4,95	7,37	7,12	8,32	8,63	8,94	4,54	4,46
5,64		0,46		0,32	0,46	0,72	0,84	0,91	1,08	1,11	0,62	0,62
6,02	0,50	7,40	0,30	5,00	7,43	10,50	11,67	15,31	17,23	17,54	10,18	12,69
6,17						0,24			0,38	0,39		
6,42	0,86	13,40	0,47	8,83	13,4	20,18	26,23	30,33	35,31	37,40	29,14	34,87
6,69		1,82		1,22	1,80	3,33	6,51	4,47	4,22	4,21	8,86	6,51
6,85	0,99	9,90		6,31	9,89	14,49	35,62	32,87	22,36	19,98	34,35	40,86
6,91		3,25		2,24	3,24	5,02			8,59	8,78	9,86	

A **Tabela 22** apresenta os resultados obtidos pela CG-DIC da fração F29 até a fração F40. Observa-se que estas frações apresentam três componentes principais nos $tr_{médio}$ em 6,02; 6,69 e 6,85 min. A fração F36 apresentou teor de aproximadamente 74% do componente no $tr_{médio}$ 6,86 min (limoneno). A partir da F37 os componentes nos $tr_{médio}$ entre 6,91 e 9,19 min já são detectados.

Tabela 22 - Percentagem relativa dos componentes das frações F29 a F40

tr médio (min)	F29	F31	F32	F33	F34	F35	F36	F37	F39	F40
4,99	0,29									
5,21	1,79	0,45								
5,64	0,29									
6,02	6,97	2,74	2,23	1,85	1,20	0,39				
6,42	30,64	21,26	16,48	16,89	12,12	6,14	2,97	1,42	0,46	0,24
6,69	9,85	14,5	15,33	15,90	17,63	19,80	21,93	22,04	21,16	15,92
6,85	50,17	60,78	64,83	63,22	68,81	72,70	73,77	73,05	66,71	32,32
6,91								0,21	0,41	0,59
7,96								1,62	4,77	12,58
9,19								1,67	6,49	37,64
outros		0,26	0,67			0,43	0,73			0,72

As frações entre F41 e F49 apresentaram maior diversidade de componentes. Foi possível detectar mais de 30 picos nos cromatogramas, como pode ser observado na **Tabela 23**, que apresenta a porcentagem relativa das áreas destes picos. O pico em $tr_{\text{médio}} = 9,19$ min apresenta maior porcentagem em área para as frações F1 (63%), F42 (89%), F43 (85%), F44 (90%) e F45 (49%), a partir da qual o pico no $tr_{\text{médio}} = 10,49$ min representando aproximadamente 33% na F46 e 29% nas frações F48 e F49 e o pico no $tr_{\text{médio}} = 11,4$ min com 20% para F46 e 17% para F48 e F49.

Considerando as atribuições dadas na CG-EM estas frações apresentam desde o componente que elui no $tr_{\text{médio}} = 6,69$ min, atribuído como sendo careno-2 ($T_{\text{eb}} = 167,5^{\circ}\text{C}$), até o eluido no $tr_{\text{médio}} = 20,25$ min, considerado como hidrato de terpin ($T_{\text{eb}} = 265^{\circ}\text{C}$). Desta forma, pode-se inferir que não se conseguiu controlar adequadamente as condições de temperatura e pressão durante a destilação destas frações, a fim de promover a melhor separação dos componentes.

Algumas observações e considerações durante o processo de destilação destas frações podem ser destacadas:

- Entre as frações F38 e F40 a pressão de trabalho aplicada na coluna de destilação foi de 3 mmHg, a temperatura do banho variou de 97 a 103°C e no bulbo o vapor chegava a uma temperatura variando de 45 a 49°C;
- Para não elevar a temperatura do banho acima de 110°C, a partir da coleta da fração F40, a pressão na coluna foi reduzida a 1 mmHg e nesta condição foi difícil controlar a destilação, ocorrendo algumas vezes refluxo de líquido no topo da coluna;
- As frações de F41 a F47 (esta última não foi analisada por CG-DIC) foram coletadas após o controle do refluxo da coluna;

- A partir da fração F48 a pressão de trabalho foi de 2 mmHg, o que favoreceu uma melhor separação, como pode ser visto na **Tabela 24**.

Tabela 23 - Percentagem relativa dos componentes das frações F41 a F49 e do resíduo final da destilação

tr médio (min)	F41	F42	F43	F44	F45	F46	F48	F49	Resíduo Final
6,69	0,81	0,95	1,47	0,84	0,89	0,41	0,33		
6,85	1,18	0,55		0,68	0,41				
vários picos				0,25	2,36				
7,96	4,61	5,71	1,54		0,34				
vários picos			0,45		3,27				
9,19	63,49	88,95	85,01	90,20	48,8	12,77	0,56	0,77	
9,52	0,25	0,27	0,23	0,23	0,27				
9,55					1,14	0,44			
9,74			0,26	0,31	1,48	0,78			
10,21	2,58		0,53	0,67	0,69	0,40			
10,28					1,63	0,87	0,32	0,28	
10,32					0,41				
10,39		0,94	1,40	3,08	4,93	0,26			
10,44					9,88				
10,49			0,22	0,94	19,85	32,67	29,40	29,27	
10,55		0,39	0,29		0,6	0,51	0,29		
10,62					1,15	0,56	0,79	0,80	0,47
10,80	3,05	0,45	2,04	1,60		0,31		0,28	
11,06						0,38	0,31	0,28	
11,17						3,04			
11,26	2,31				0,35	2,52	12,79	16,40	
11,39						1,33	0,38	0,28	
11,58	0,82					2,23	2,28	1,88	
11,74	0,86				0,26	20,18	17,32	17,39	
12,00						0,27	1,03	1,11	
12,20						0,49	0,58	0,43	
12,70	1,36				0,23		0,83	0,79	1,70
13,33	0,35		0,34				6,56	7,56	
13,70	15,36		2,16	0,39			0,50	0,35	
14,00									3,83
14,27	2,77	1,25					9,46	7,51	63,99
14,53		0,22					13,54	13,00	8,85
15,85									0,61
16,68			0,85	0,23			0,37	0,44	
17,89			0,85						1,64
18,20			0,42						
18,71									1,33
19,17									1,45
19,56			0,73	0,36					0,67
20,25			0,69	0,22					0,75
20,39									7,22
20,70									4,72
outros	0,20	0,32	0,52		1,06			0,41	3,02

As frações F50 a F60 apresentaram teores do componente com eluição no $tr_{\text{médio}}$ igual a 14,27 min variando de 61 a 81%, pela CG-EM este componente foi determinado como sendo o α -terpineol.

O processo de destilação foi interrompido após a coleta da fração F61 porque o resíduo da destilação apresentava uma alta viscosidade e volume muito reduzido, tornando difícil a agitação.

Tabela 24 - Percentagem relativa dos componentes das frações F50 a F60

$tr_{\text{médio}}$ (min)	F50	F52	F53	F54	F56	F57	F58	F60
10,49	3,04	0,44	0,36	0,52	0,44	0,25		
10,62	0,26							
11,26	8,79	3,63	2,82	3,98	3,60	2,42	1,31	1,00
11,74	7,99	4,52	3,75	4,98	4,72	3,45	2,18	1,74
12,00	0,63	0,37	0,30	0,42	0,37	0,26		
12,70	3,21	3,41	3,22	3,38	3,57	3,62	3,00	2,87
13,05	0,34	0,36	0,29	0,33	0,33		0,26	0,23
13,33	4,50	2,76	2,23	3,22	2,93	2,05	1,24	1,01
13,70		0,40	0,46	0,45	0,38	0,54		0,61
14,27	61,49	73,83	76,29	72,63	73,54	77,06	81,29	81,54
14,53	9,73	10,27	10,26	10,09	10,14	10,33	10,72	10,81
19,56								0,21

4.8 Avaliação microbiológica de amostras de óleo de pinho e suas frações

Obtidas as frações de destilação, os testes microbiológicos foram conduzidos objetivando a seleção de possíveis frações que possuíam atividade antimicrobiana e que, em trabalhos futuros, possam ser estudadas em associação aos fenólicos como componente de um sistema antimicrobiano de uma formulação de desinfetante mais eficiente.

O teste de disco de difusão foi realizado em amostras de óleo de pinho dos fabricantes (**B**, **S** e **Y**), uma amostra de óleo de pinho bruto, suas frações e o resíduo final, ambos, obtidos pelo processo de destilação a pressão reduzida. Todas as

amostras de óleos dos fabricantes **B**, **S** e **Y** apresentaram ação inibitória para *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708, como é ilustrado na **Figura 18**. Estes dados comprovam a reconhecida ação antimicrobiana do óleo de pinho. Com a comprovação da ação bacteriostática da amostra de óleo de pinho bruto foi possível conduzir o estudo com esta amostra, a fim de caracterizar a ação antimicrobiana de suas frações isoladas pelo processo de destilação.

Figura 18. Fotos ilustrativas da formação do halo de inibição para alguns óleos e frações do óleo bruto (leituras após 24h de incubação)

A **Tabela 25** apresenta os resultados das leituras dos halos de inibição formados e no **APÊNDICE C**, estão ilustradas algumas fotos deste teste. As frações mais leves foram divididas em três grupos. O primeiro grupo compreendendo as frações de F1 a F4 que não apresentaram ação inibitória para os microrganismos testados. O segundo grupo com as frações entre F5 e F14 que apresentaram ação inibitória com formação de halo de inibição bem definido para *S. aureus* e halos não

definidos, que foram denominados halos difusos, para *S. choleraesuis*. Entre estes dois grupos observou-se um aumento do teor de canfeno, sendo que as frações que continham teor superior a 9,9% deste composto apresentaram ação inibitória, sugerindo que o canfeno possua uma atividade antimicrobiana nas condições testadas. E o terceiro grupo, das frações entre F15 e F26, foi observada a inibição para os dois microrganismos testados. Estas frações apresentaram diversidade na composição e ampla variação na concentração destes compostos, não sendo possível atribuir a atividade antimicrobiana a um ou mais componentes específicos.

Tabela 25 – Resultado da leitura do halo de inibição (mm) formado na avaliação qualitativa da atividade antimicrobiana de algumas amostras de óleo de pinho e suas frações de destilação

Fração	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538		<i>Salmonella choleraesuis</i> ATCC 10708		Fração	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538		<i>Salmonella choleraesuis</i> ATCC 10708	
	24h	48h	24h	48h		24h	48h	24h	48h
Óleo de B	8	9	9	9	F36	0	(8)	0	0
Óleo de S	11	11	9	9	F37	(8)	(8)	0	0
Óleo de Y	8	9	9	9	F39	0	0	0	0
Óleo Bruto	10	10	9	9	F40	0	0	0	0
F1	0	0	0	0	F41	8	(8)	9	9
F 2, 3 e 4	0	0	0	0	F42	(8)	(8)	0	0
F5	7	8	(18)	(19)	F43	8(13)	8(15)	8(12)	8(17)
F 6, 7 e 8	8	8	(24)	(27)	F44	11	8(15)	8(12)	8(15)
F 9 e 10	7	8	(20)	(25)	F45	14	(13)	8(14)	15
F11	7	8	(24)	(27)	F46	10	(14)	8(12)	8(10)
F12	7	7	0	(26)	F48	9	9	10	10
F13	7	7	(25)	(26)	F50	11	10	12	13
F14	8	7	(20)	(26)	F51	9	10	10	14
F15 e 18	8	8	(8)	(27)	F52	11	10	11	12
F16	6	6	0	(21)	F53	11	11	10	12(30)
F17	8	8	0	(22)	F54	11	11	12	13
F19	0	0	0	0	F55	11	11	10	13
F20	14	11(17)	14	15	F56	11	11	10	10
F21	8	8	(9)	(9)	F57	10	10	11	16
F22	8	9	0	0	F58	11	11	11	11(36)
F23	11	12	10	10	F59	11	11	11	15(40)
F24 e 26	11	12	9	14	F60	10	10	12	13
F29	8	8	0	0	F61	10	10	11	12
F31	(8)	(9)	0	0	Resíduo F19	8	8	10	9
F32	(8)	0	0	0	Resíduo F28	9	9	9	9
F33	(9)	(9)	0	0	Resíduo F44	9	10	11	12
F34	(8)	(8)	0	0	Resíduo final	9	9	9	9
F35	0	(8)	0	0	Terpinoleno	11	12	10	10

Os resultados representam a média dos diâmetros dos halos de inibição em milímetros (mm).

(θ) os valores entre parênteses indicam o diâmetro em mm de um halo difuso.

Resíduo Fn = resíduo retirado após a coleta da fração Fn

As frações intermediárias de F29 a F40, onde as concentrações relevantes são para os compostos 1-4 cineol, careno-2 e limoneno, apresentaram ação inibitória para a bactéria Gram positiva *S. aureus*, mas não para a Gram negativa testada.

A seqüência que abrange as frações de F41 a F48, apresentou boa ação inibitória para ambos os microrganismos, devido à grande dispersão da composição entre estas frações, não sendo possível indicar quais compostos seriam os mais relevantes ou ainda se há uma combinação destes que favoreça a atividade antimicrobiana.

O último grupo representado pelas frações F50 a F60 apresentaram halos bem definidos para ambos os microrganismos testados e nestas frações os teores e tipos de alcoóis terpênicos (1-terpineol, β -terpineol, borneol, 4-terpineol, α -terpineol e γ -terpineol) são os compostos que mais se destacam.

O resíduo obtido no final da destilação também foi avaliado e apresentou atividade antimicrobiana para as bactérias testadas. Este resíduo tem em sua composição uma alta concentração de α -terpineol.

Embora a maioria das frações estudadas demonstrasse uma linearidade no perfil de atividade bacteriostática na seqüência em que se apresentava se observou que algumas delas, apesar de apresentar uma composição próxima às de suas imediatamente antecedentes e posteriores, divergiram quanto as suas atividades antimicrobianas, como exemplo pode-se citar as frações F12, F19, F22, F26, F39, F40 e F42. No **APENDICE C** a **Figura 64** ilustra o comparativo entre os dados cromatográficos e a formação de halos de inibição para algumas frações.

Para se obter uma melhor compreensão do perfil da atividade antimicrobiana, sugere-se a identificação dos compostos que apresentaram $tr_{médio}$ em 10,49 e 13,70

min. Para as frações que apresentaram halo difuso um estudo de cada componente relevante poderia ser realizado a fim de se comprovar sua ação bacteriostática. Para os componentes que tenham esta ação comprovada, sugere-se a determinação da CIM.

4.9 Avaliação da estabilidade das formulações biocidas

Objetivando o estudo da ação de sistema tensoativos na atividade antimicrobiana, foram preparadas as formulações de desinfetante conforme apresentado na **seção 3.2.8**. Considerando que uma formulação deve ter atividade antimicrobiana não apenas logo após o seu preparo como também deve manter esta propriedade e suas propriedades organoléticas e de aparência até o fim do prazo de validade, realizou-se o estudo de estabilidade das formulações.

Após o preparo das formulações, foram realizadas medidas de pH, tensão superficial, teor de ativo fenólico e avaliações organolépticas (cor, odor, aparência)

Na avaliação olfativa evidenciou-se a predominância do odor característico do componente fenólico empregado envolvido com notas alcoólicas do etanol. Ao final do teste de estabilidade foi evidenciada uma leve perda de intensidade do odor do produto, porém sem alteração de caráter olfativo.

Para as amostras preparadas com NaLAS observou-se durante o teste de estabilidade alteração da cor da base de incolor para castanha, atingindo maior intensidade quando do uso do PCMC. As formulações expostas a 5°C contendo este tensoativo combinado com o emprego do OBCP apresentaram-se turvas na avaliação realizada na 12ª semana, e tornando-se límpida na temperatura ambiente.

Os sistemas com AOS e laurato de Na/TEA, apresentaram boa estabilidade não apresentando separação de fases ou alteração de cor e odor. As amostras expostas a 5°C apresentaram-se turvas, porém quando as amostras atingiram a temperatura ambiente, em torno de 25°C, tornaram-se límpidas.

Com relação à interação das formulações com a embalagem (frascos de PET), em alguns casos, as embalagens expostas a 45°C ficaram com as paredes foscas, evidenciando um ataque da formulação. Não foi possível fazer uma associação entre os tipos de tensoativos, mas sim com a concentração destes. Uma maior concentração favorece uma maior solubilização micelar do ativo fenólico, não o deixando livre, por exemplo, para interagir com a embalagem. Quando se tem um aumento da temperatura de uma solução tensoativa aniônica há uma maior solubilização dos monômeros que passam a agregar em maiores valores de cmc, o que equivale dizer que em relação a uma temperatura mais baixa, a solubilização micelar é reduzida, já que uma maior fração de moléculas tensoativa estará presente na forma monomérica.

Os ativos fenólicos possuem solubilização por pontes de hidrogênio. Ao aumentar-se a temperatura da solução, a solubilidade do fenólico em água fica reduzida e este tende a migrar para a micela. Porém, conforme explanado anteriormente, o aumento da temperatura favorece a forma monomérica em detrimento à fórmula micelar, sendo que o resultado líquido destes fenômenos é a redução de solubilidade dos ativos fenólicos no sistema aquoso com conseqüente migração destes para a superfície da embalagem.

As medidas de tensão superficial e as faixas de pH das formulações avaliadas variaram conforme valores demonstrados na **Tabela 26**. Não foram observadas influências na tensão superficial referentes ao tipo e/ou teor de derivado fenólico

utilizado. Como as concentrações empregadas estavam acima da cmc dos tensoativos somente o tipo de tensoativo influenciou nas variações das medidas.

Tabela 26 – Faixa de tensão superficial e pH para as formulações biocidas agrupadas pelo tipo de tensoativo utilizado

Sistema Tensoativo	Faixa de Tensão Superficial (dyna cm ⁻²)	Faixa de pH
Laurato de Na/TEA	28 - 30	7,34 - 7,8
NaLAS	30 - 32	7,33 - 7,54
AOS	32 - 34	7,36 - 7,49

O acompanhamento das variações de pH foi realizado em todas as avaliações programadas, e as percentagens de variações de pH com referência ao pH inicial da amostra estão ilustradas na **Figura 19** para amostras expostas a 5°C, na **Figura 20** para amostra mantida à temperatura ambiente e na **Figura 21** para amostras que foram submetidas a aquecimento em estufa a 45°C.

Figura 19. Gráfico da Percentagem de variação de pH - Teste de estabilidade a 5°C

Figura 20. Gráfico da Percentagem de variação de pH - Teste de estabilidade a Temperatura Ambiente

Figura 21. Gráfico da Percentagem de variação de pH - Teste de estabilidade a 45°C

Entre as amostras expostas a 5°C e a temperatura ambiente, o perfil de variação de pH apresentou semelhanças, sendo que as percentagens de variações dessa medida ficaram: entre 0,1-6,6% para AOS; 0,8-8,5% para Laurato de Na/TEA e 6,1-17% para NaLAS.

Observa-se na **Figura 21** uma variação progressiva do pH entre a segunda semana e a décima segunda semana do teste de estabilidade. A maior variação de pH foi para as amostras com 1,5% de AOS e PCMC, atingindo valores de 24,5% quando o PCMC estava presente a 0,7% e 45% quando do uso de 1% deste fenólico. Porém, os sistemas com NaLAS apresentaram maior instabilidade de pH, observando-se influência do tipo de fenólico empregado: variações entre 11,0-19,2% para OPP, 16,6-25,1% para OBCP e 32,4-47,6% para PCMC.

O sistema tensoativo com Laurato de Na/TEA apresentou maior estabilidade no pH com variações entre 0,1-6,6% para as amostras expostas a 45°C por doze semanas.

Nas formulações com NaLAS e sem adição de fenólico a variação de pH foi de 12,1 e 14,1% para amostra com 1,5 e 5% de ativo aniônico, respectivamente.

4.10 Determinação de derivados fenólicos por CLAE

A determinação do teor de um componente considerado como ativo de uma formulação com ação antimicrobiana deve ser realizada logo após o preparo da formulação, durante os testes de estabilidade, no final do prazo de validade do produto e sempre que se achar necessário a fim de se ter o controle do ativo antimicrobiano e conseqüentemente a garantia de sua atividade.

A seguir são apresentados os resultados obtidos nas etapas de desenvolvimento para uma metodologia de determinação do teor de PCMC, OPP e OBCP via CLAE.

Para verificação do sinal-ruído da fase móvel a mesma foi injetada nas condições de análise das amostras-teste. O sinal-ruído variou de -0,040 a +0,025 mV como pode ser observado na **Figura 22**.

Figura 22. Cromatograma da fase móvel (acetonitrila/ água 65:35 (v/v); pH 2,6 (H_3PO_4))

As matrizes (bases sem derivados fenólicos) foram injetadas e os cromatogramas obtidos estão apresentados na **Figura 23** para o sistema com AOS, na **Figura 24** para o sistema com NaLAS e o sistema com laurato de Na/TEA está representado na **Figura 25**.

Figura 23. Cromatograma base matriz do sistema com 5% de AOS e 15,4% de etanol

Figura 24. Cromatograma base matriz do sistema 5% de NaLAS e 15,4% de EtOH

Figura 25. Cromatograma da base matriz do sistema 5% de laurato de Na/TEA e 15,4% de EtOH

O sinal-ruído entre 3,8 e 7,5 minutos (período onde ocorre a eluição dos derivados fenólicos) para os sistemas com AOS e laurato de Na/TEA apresentou valores abaixo de 0,10 mV e para o sistema com NaLAS abaixo de 0,30 mV.

Figura 26. Cromatogramas típicos de (a) PCMC; (b) OPP e (c) OBCP

Observando as diferenças dos tempos de retenção dos derivados fenólicos, representados nos cromatogramas da **Figura 26**, optou-se por fazer a curva de calibração com os três fenólicos em uma mesma solução otimizando o tempo de

obtenção desta. A **Figura 27** representa o cromatograma da amostra padrão (empregadas no levantamento da curva de calibração) contendo 100 mg mL^{-1} de cada um dos ativos fenólicos.

Figura 27. Cromatograma de uma solução contendo três derivados fenólicos (PCMC, OPP e OBCP) na concentração de 100 mg mL^{-1} , na FM acetonitrila: água (65:35 v/v, pH 2,6 (H_2PO_3))

As análises para construção das curvas de calibração foram repetidas em três dias, no dia 1 e no dia 2 foi utilizada a mesma fase móvel e para as análises do dia 3 foi preparada uma nova fase móvel. Foram feitas triplicatas das injeções para cada concentração analisada.

A utilização da fase móvel preparada no terceiro dia provocou aumento nos tempos de retenção principalmente para o OBCP (**Tabela 27**). Isto pode ter ocorrido devido a uma pequena redução no teor de acetonitrila durante o preparo. Thompson (2001) relatou que a alteração na fase móvel na relação acetonitrila/água de 55:45 para 65:35 (v/v), conduziu a uma redução no tempo de retenção (24 para 12 min) do triclosan. A **Tabela 27** apresenta os valores do coeficiente de correlação (r), inclinação e intercepto para a curva média e o tempo de retenção de cada padrão. Considerando que segundo a ANVISA (2003), o critério mínimo aceitável do

coeficiente de correlação (r) de ser igual a 0,99 para que uma metodologia analítica atenda o requisito linearidade da validação de métodos analíticos, a metodologia proposta está de acordo com este critério para determinações de PCMC, OPP e OBCP em concentrações entre 20 e 100 mg L⁻¹. Entende-se por linearidade a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado.

Tabela 27 - Dados da curva média da calibração para PCMC, OPP e OBCP obtidas em três dias diferentes

	PCMC			OPP			OBCP		
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 1	Dia 2	Dia 3
t_r (min)	4,08	4,08	4,18	4,90	4,92	5,10	6,99	7,07	7,45
Coef. de correlação (r)	0,9994	0,9986	0,9951	0,9993	0,9985	0,9950	0,9996	0,9985	0,9952
inclinação	$7,558 \times 10^{-11}$	$7,715 \times 10^{-11}$	$7,626 \times 10^{-11}$	$3,607 \times 10^{-11}$	$3,702 \times 10^{-11}$	$3,662 \times 10^{-11}$	$8,145 \times 10^{-11}$	$8,113 \times 10^{-11}$	$8,045 \times 10^{-11}$
intercepto	$-1,101 \times 10^{-6}$	$-2,254 \times 10^{-6}$	$-3,582 \times 10^{-6}$	$-1,299 \times 10^{-6}$	$-2,572 \times 10^{-6}$	$-4,188 \times 10^{-6}$	$-1,358 \times 10^{-6}$	$-1,619 \times 10^{-6}$	$-3,377 \times 10^{-6}$

Na avaliação da precisão instrumental foram realizadas seis injeções de uma amostra constituída de uma mistura dos três fenólicos em um sistema tensoativo com 5% de AOS. A **Tabela 28** apresenta a área dos picos obtidos para cada injeção, a sua média, o desvio padrão e o coeficiente de variação (CV%) que apresentou para as determinações da área e percentagem de ativo, valores em torno de 1%, atendendo o critério de aprovação da ANVISA (2003) que é no máximo de 5%.

Tabela 28 - Áreas dos picos referentes a replicatas de injeção de uma amostra com PCMC, OPP e OBCP em um sistema com 5 % de AOS

Injeção e resultados	PCMC		OPP		OBCP	
	Área	Conc. (%)	Área	Conc. (%)	Área	Conc. (%)
1	1088381	0,967	2401630	1,022	1049538	0,999
2	1089750	0,969	2408940	1,025	1053892	0,993
3	1089339	0,968	2409750	1,025	1054785	0,994
4	1088840	0,968	2406171	1,024	1053431	0,992
5	1107742	0,986	2449882	1,044	1072800	1,012
6	1107612	0,986	2449260	1,044	1073775	1,013
Média	1095277	0,974	2420939	1,031	1059704	0,999
Desvio Padrão	9616	0,009	22360	0,010	10679	0,011
C.V. (%)	0,878	0,944	0,924	0,996	1,008	1,056

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal. Visando o reconhecimento da suscetibilidade do método às variações nas condições analíticas foram realizadas injeções em condições diferentes de vazão da fase móvel (0,9 e 1,1 mL min⁻¹), temperatura do forno (38 e 42°C) e fase móvel preparada por analistas diferentes, porém com a mesma composição.

Nas **Tabelas 29, 30 e 31** são indicados, respectivamente para PCMC, OPP e OBCP, os desvios padrão e os coeficientes de variações das áreas obtidas nas injeções para cada condição avaliada. Em uma mesma condição, as variações entre injeções não são significativamente diferentes ao nível de 95% de confiança. Porém, na análise comparativa entre as condições proposta e variações na vazão da fase móvel os valores das áreas obtidas apresentaram significativa diferença. Assim sendo, a vazão da fase móvel deve ser um parâmetro de controle constante durante a execução deste método.

Tabela 29 - Avaliação da robustez do método de dosagem de PCMC quanto a variação de FM, vazão e temperatura do forno (Área dos Picos)

	Dados Atuais	FM nova	Vazão 0,9 mL min ⁻¹	Vazão 1,1 mL min ⁻¹	Temp. Forno 38°C	Temp. Forno 42°C
1	1088381	1084060	1202483	984834	1079074	1072602
2	1089750	1082074	1194911	987576	1021858	1070696
3	1089339	1081059	1195708	985911	1071794	1069224
4	1088840	1084498			1083207	1065865
Média	1089078	1082923	1197701	986107	1063983	1069597
Desvio Padrão	595	1630	4161	1381	28477	2846
C.V. (%)	0,055	0,150	0,347	0,140	2,676	0,266
<u>Interações entre colunas</u>						
Média		1086000	1135630	1044947	1076530	1079337
Desvio Padrão		3480	58113	55047	22970	10585
C.V. (%)		0,320	5,117	5,268	2,134	0,981
t _r (min)	4,083	4,18	4,639	3,819	4,229	4,149

Tabela 30 - Avaliação da robustez do método de dosagem de OPP quanto variação de FM, vazão e temperatura do forno (Área dos Picos)

	Dados Atuais	FM nova	Vazão 0,9 mL min ⁻¹	Vazão 1,1 mL min ⁻¹	Temp. Forno 38°C	Temp. Forno 42°C
1	2401630	2395667	2662768	2176090	2385401	2372694
2	2408940	2391449	2640856	2182111	2261639	2366180
3	2409750	2389955	2642283	2179186	2371538	2363745
4	2406171	2396260			2392270	2354213
Média	2406623	2393333	2648636	2179129	2352712	2364208
Desvio Padrão	3664	3108	12260	3011	61325	7660
C.V. (%)	0,152	0,130	0,463	0,138	2,607	0,324
<u>Interações entre colunas</u>						
Média		2399978	2510343	2309125	2379667	2385415
Desvio Padrão		7769	129581	121641	49476	23343
C.V. (%)		0,324	5,162	5,268	2,079	0,979
t _r (min)	4,923	5,091	5,649	4,653	5,169	5,043

Tabela 31 - Avaliação da robustez do método de dosagem de OBCP quanto variação de FM, vazão e temperatura do forno (Área dos Picos)

	Dados Atuais	FM nova	Vazão 0,9 mL min ⁻¹	Vazão 1,1 mL min ⁻¹	Temp. Forno 38°C	Temp. Forno 42°C
1	1049538	1055954	1162686	953383	1044836	1039885
2	1053892	1047957	1161883	959614	993336	1043091
3	1054785	1050628	1162836	*	1042156	1042612
4	1053431	1052248			1045480	1038210
Média	1052912	1051697	1162468	956499	1031452	1040950
Desvio Padrão	2318	3344	512	4406	25451	2309
C.V. (%)	0,220	0,318	0,044	0,461	2,468	0,222
<u>Interações entre colunas</u>						
Média		1052304	1099864	1020774	1042182	1046931
Desvio Padrão		2742	58584	49859	20285	6743
C.V. (%)		0,261	5,326	4,884	1,946	0,644
t _r (min)	7,070	7,474	8,246	6,802	7,516	7,336

* valor não integrado pelo software do equipamento

As amostras recém-preparadas foram avaliadas com base na curva de calibração individual de cada ativo e após o período de estabilidade, por meio da curva de calibração contendo os três fenólicos. A escolha de se fazer as determinações do teor de ativo nas amostras expostas a 45°C, foi realizada em consideração ao fato desta ser, entre as condições avaliadas, a mais agressiva para promoção de alguma instabilidade do sistema.

A **Tabela 32** apresenta os teores de ativo fenólico determinado pelo cálculo das massas pesadas dos componentes da formulação e considerando a teor de ativo do componente fenólico conforme o laudo do fabricante. São também apresentados os teores determinados por CLAE nas determinações realizadas nas amostras recém-preparadas e após a estabilidade a 45°C. São expressas as variações entre o teor da amostra e o teor determinado na análise via CLAE bem

como a variação do teor de ativo entre as amostras recém-preparadas e após o teste de estabilidade.

Tabela 32 – Resultados das determinações do teor de ativo fenólicos por CLAE das amostras recém-preparadas e após estabilidade e suas variações com relação ao teor inicial

Tensoativo		Ativo Fenólico		Teor _{inicial} CLAE _{inicial}	Variação Teor _{inicial} vs CLAE _{inicial}	Teor CLAE _{final}	Variação Teor _{inicial} vs CLAE _{final}	Variação CLAE _{inicial} vs CLAE _{final}
Tipo	Teor (%)	Tipo	Teor (%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
NaLAS	5,0	OPP	0,987	0,998	1,04	0,930	-5,80	-6,78
Laurato	5,0	OPP	0,696	0,691	-0,71	0,712	2,36	3,09
AOS	5,0	OPP	0,996	1,001	0,45	0,956	-4,02	-4,45
NaLAS	5,0	OBCP	0,976	0,949	-2,80	0,929	-4,81	-2,14
Laurato	5,0	OBCP	0,683	0,695	1,70	0,652	-4,63	-6,25
AOS	5,0	OBCP	0,683	0,663	-3,02	0,655	-4,08	-1,19
NaLAS	5,0	PCMC	0,999	1,008	0,93	1,007	0,83	-0,11
Laurato	5,0	PCMC	0,699	0,711	1,59	0,708	1,28	-0,33
AOS	5,0	PCMC	0,998	0,997	-0,12	0,978	-2,02	-1,90
NaLAS	5,0	OBCP	0,684	0,659	-3,80	0,661	-3,28	0,40
Laurato	5,0	OBCP	0,975	0,949	-2,82	0,952	-2,39	0,35
AOS	5,0	OBCP	0,992	0,972	-2,03	0,901	-9,15	-7,31
<u>Amostras que apresentaram alto decaimento do teor de ativo fenólico</u>								
NaLAS	1,5	OPP	0,698	0,641	-8,79	0,489	-29,86	-23,69
NaLAS	1,5	OPP	0,996	0,830	-19,98	0,591	-40,61	-28,75
AOS	1,5	OPP	0,697	0,603	-15,63	0,548	-21,44	-9,16
AOS	1,5	OPP	0,993	0,812	-22,31	0,549	-44,74	-32,41
Laurato	1,5	OPP	0,697	0,665	-4,83	0,488	-30,07	-26,70
Laurato	1,5	OPP	0,995	0,854	-16,52	0,513	-48,50	-40,00
NaLAS	1,5	OBCP	0,678	0,583	-16,31	0,475	-29,99	-18,58
Laurato	1,5	OBCP	0,683	0,619	-10,45	0,389	-43,11	-37,17
NaLAS	1,5	OBCP	0,976	0,779	-25,28	0,508	-47,95	-34,79
AOS	1,5	OBCP	0,976	0,663	-47,17	0,390	-59,99	-41,12
AOS	1,5	PCMC	0,999	0,957	-4,43	0,797	-20,23	-16,70
Laurato	1,5	PCMC	0,699	0,686	-2,01	0,621	-11,25	-9,46
NaLAS	1,5	PCMC	0,701	0,667	-5,21	0,620	-11,65	-7,05

Do total de vinte e cinco amostras avaliadas, doze apresentaram variação menor de 4% entre o teor de ativo e o determinado via CLAE. Observou-se que todas essas amostras apresentaram teor de ativo aniônico de 5%. Dez amostras, das que tinham teor de ativo aniônico de 1,5%, apresentaram variações entre o teor de ativo fenólico e o determinado via CLAE maior que 5%, e foi evidenciado que

estas variações aumentaram nas determinações após o teste de estabilidade, atingindo percentagens de 40%.

Estas variações no teor de ativo endossam a explanação dada anteriormente de que uma maior temperatura (estabilidade a 45°C) causa uma maior insolubilização dos ativos com a conseqüente e referida migração para a superfície interna da embalagem.

4.11 Estudo da ação antimicrobiana das formulações

Na avaliação da ação antimicrobiana pelo método de suspensão, todas as 36 amostras avaliadas que continham os agentes fenólicos (OBCP, PCMC ou OPP) apresentaram efeito microbicida (EM) maior que 3, isto é uma redução superior a 99,9% da contagem microbiana inicial. Desta forma, pode-se considerar que nas concentrações estudadas de tensoativo (1,5 e 5%) e de fenólicos (0,7 e 1,0%) qualquer interação que exista entre estes, não apresenta impacto negativo quando se avalia uma redução logarítmica de 3 ordens de magnitude na contagem do inóculo, pelo contrário evidencia uma atividade antimicrobiana complementar. Considerando os resultados obtidos na determinação do teor dos fenólicos via CLAE, pode-se observar que algumas amostras apresentaram no fim do teste de estabilidade teores de ativo na ordem de 0,4% e EM maior que 3 nos testes microbiológicos. Este resultado sugere uma continuidade do estudo na investigação de sistema com menores teores de derivado fenólico.

Objetivando a avaliação da eficácia da base alcoólica de tensoativo contra as bactérias *Salmonella* e *Staphylococcus*, na ausência de componentes fenólicos, o teste reducional foi realizado em uma base contendo somente tensoativo, álcool e

água nas concentrações apresentadas previamente na **Tabela 16**. Também, foram avaliadas as amostras nas formas frescas e envelhecidas (após exposição a 45°C por 12 semanas) e os resultados estão apresentados na **Tabela 33**.

Tabela 33 - Resultados dos testes reducionais para avaliação dos sistemas tensoativos (média das leituras)

	t_c	<i>Salmonella choleraesuis</i> ATCC 10708				<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538			
		Inicial		Envelhecida		Inicial		Envelhecida	
		EM	%Red.	EM	%Red.	EM	%Red.	EM	%Red.
AOS 1,5%	5	-0,08	16,29	-0,26	45,54	-2,70	98,68	-1,90	98,75
	10	-0,28	47,71	-0,55	71,86	-3,83	99,99	-2,32	99,52
AOS 5,0%	5	-3,32	99,95	-4,01	99,99	-2,86	99,86	-3,81	99,98
	10	-3,32	99,95	-4,01	99,99	-2,86	99,86	-3,81	99,98
NaLAS 1,5%	5	0,61	<u>-311,43</u>	N.A.	N.A.	-2,86	99,86	N.A.	N.A.
	10	0,60	<u>-295,24</u>	N.A.	N.A.	-2,86	99,86	N.A.	N.A.
NaLAS 5,0%	5	-0,15	28,59	-0,44	63,63	-2,38	98,66	-3,81	99,98
	10	-0,38	56,06	-1,28	88,98	-2,51	99,69	-3,81	99,98
Laurato 1,5%	5	-3,32	99,95	-4,01	99,99	-2,86	99,86	-3,81	99,98
	10	-3,32	99,95	-4,01	99,99	-2,86	99,86	-3,81	99,98
Laurato 5,0%	5	-3,93	99,98	-4,01	99,99	-3,83	99,98	-3,81	99,98
	10	-3,93	99,98	-4,01	99,99	-3,83	99,98	-3,81	99,98

t_c = tempo de contato; N.A. = não avaliada; %Red.= percentagem de redução; EM= efeito microbicida

A base alcoólica com 1,5% de AOS, não apresentou efeito antimicrobiano satisfatório contra a bactéria Gram negativa testada (*Salmonella choleraesuis*). Porém quando a concentração de tensoativo foi elevada a 5% o efeito microbicida (EM) foi superior a 3, isto é, redução superior a 99,9%. Para a bactéria Gram positiva (*Staphylococcus aureus*) a base alcoólica com 1,5% de AOS apresentou EM de 3 na amostra fresca e 2 para amostras envelhecidas, quando avaliadas em um tempo de contato de 10 minutos.

Na contagem realizada para as placas com *Salmonella choleraesuis*, após o teste com base alcoólica com 1,5% de NaLAS a leitura final ($8,64 \times 10^6$ e $8,30 \times 10^6$

UFC mL⁻¹, para tempo de contato de 5 e 10 minutos, respectivamente) foi maior que a leitura inicial ($2,10 \times 10^6$ UFC mL⁻¹), porém na mesma potência, podendo assim considerar que não houve aumento da população microbiana e o sistema testado apresentou efeito antimicrobiano nulo para *Salmonella*. Por outro lado, apresentou atividade contra *Staphylococcus aureus* com EM de 2. No teste de estabilidade, este sistema apresentou-se instável, turvo e com separação de fase, por esses motivos não foram conduzidos testes microbiológico na amostra envelhecida para este sistema.

Estes resultados estão de acordo com a literatura (COZZOLI, 1996, GLOXHUBER e KÄSTNER, 1980), apresentando aos ativos aniônicos estudados uma fraca atividade antimicrobiana para as bactérias Gram negativas e relevante atividade antimicrobiana para as bactérias Gram positivas.

A base alcoólica com laurato apresentou redução de pelo menos 99,9% para ambos os microrganismos testados mesmo depois de envelhecida.

Estes resultados podem ser explicados pelo fato que tensoativos mais hidrofóbicos (menor cmc) possam ter atuação antimicrobiana secundária, mais efetiva em relação aos tensoativos mais solúveis.

Praticamente todas as variações de soluções tensoativas quanto aos tipos e concentrações de tensoativos testados, tiveram atuação antimicrobiana significativa frente à bactéria Gram negativa avaliada, devido às características da parede hidrofóbica desta apresentar grande afinidade pelos tensoativos, isto é, pouca seletividade.

Para as bactérias Gram positivas a espessura da camada hidrofóbica da parede celular, por ser menor, torna o microrganismo menos sensível (mais seletivo) aos tensoativos em relação ao tipo e a concentração deste.

Comparando os resultados dos teores de ativos fenólicos no final da estabilidade e os ensaios de eficácia antimicrobiana, observa-se que apesar da redução do teor de ativo fenólico em algumas amostras ter atingido a níveis de perda de aproximadamente 40%, estas amostras apresentaram redução microbiana maior que 99,9%, independente do ativo empregado.

Estes resultados ilustram a importância da realização do estudo de estabilidade de um produto conduzido na embalagem final na qual este será comercializado e, também, reforçam a necessidade do desenvolvimento de formulações robustas capazes de resistirem às interações no sistema e que possam ocorrer durante o seu prazo de validade e, ainda, manterem sua eficácia antimicrobiana.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir do estudo de caracterização físico-química, organoléptica e microbiológica de amostras de óleo de pinho e suas frações isoladas por destilação foi possível concluir que:

A composição do óleo de pinho apresenta diversidade de componentes com atividade antimicrobiana inibitória. Diferenças das concentrações destes componentes na composição de uma amostra de óleo de pinho podem ser provenientes do tipo de goma-resina empregada, condições de reação de hidratação dos monoterpenos e do processo de destilação do produto de reação.

Frações mais leves do óleo de pinho contendo acima de 9,9% de canfeno apresentaram ação antimicrobiana. Individualmente as frações, na composição em que foram separadas, apresentaram melhor atividade bacteriostática para a bactéria Gram positiva testada, porém a associação destas na composição do óleo de pinho proporcionou ação bacteriostática para ambas as bactérias testadas.

A continuidade do estudo, por meio da determinação da CIM das frações que apresentaram ação inibitória, poderá dar indicação da melhor composição de um óleo de pinho considerando o parâmetro ação antimicrobiana.

Mudanças nas concentrações dos teores de monoterpenos presentes no óleo de pinho alteram diretamente o caráter olfativo deste.

A termogravimetria pode ser empregada, tanto em escala piloto como industrialmente como ferramenta de controle no processo de destilação.

No que diz respeito ao estudo da ação de sistemas tensoativos na atividade antimicrobiana de ativos fenólicos foi possível concluir que:

Os tensoativos estudados (AOS, NaLAS e laurato de Na/TEA), apresentam ação antimicrobiana e influenciam na atividade dos ativos fenólicos.

A interação físico-química dos componentes de uma formulação e desta com a embalagem, na qual será armazenada, deve ser avaliada por meio do estudo de estabilidade.

O sistema tensoativo empregando o laurato de Na/TEA como tensoativo apresentou melhor estabilidade e indicou ter influência positiva na atividade antimicrobiana da formulação.

O grau de influência dos tensoativos na ação antimicrobiana dos fenólicos pode ser mais bem evidenciado empregando menor concentração de biocida. Por outro lado, pôde-se identificar a influência do teor de tensoativo na estabilização do derivado fenólico em um sistema exposto na temperatura de 45°C e armazenado em embalagem de PET.

A CLAE apresentou-se como um método promissor na determinação de derivados fenólicos em produtos acabados.

6 PERSPECTIVAS

- Determinar as CIM para as frações de óleo de pinho que apresentaram ação inibitória.

- Empregar as frações de óleo de pinho que apresentam melhor atividade antimicrobiana associada a outros tipos de biocidas em uma formulação de desinfetante.

- Identificar os componentes das frações com atividade antimicrobiana que não foram identificados neste trabalho.

- Identificar óleos essenciais que apresentam teores consideráveis dos componentes do óleo de pinho com atividade antimicrobiana e que também poderiam ser empregados em associação com outros biocidas.

- Avaliar a estabilidade dos derivados fenólicos frente a uma maior variação de concentração de tensoativo e em diferentes tipos de embalagem (vidro, PEAD, PEBD, PP).

- Validar a metodologia de determinação dos derivados fenólicos via CLAE e empregá-la na avaliação de amostras comerciais de desinfetantes de uso doméstico e institucionais.

- Caracterizar o óleo de pinho e suas frações utilizando a termogravimetria de alta resolução.

- Utilizar a técnica DSC para determinação da temperatura de fusão e de ebulição das frações de destilação, proporcionando melhor caracterização destas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS³

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Legislação. VisaLegis. **Portaria n.15, de 23 de agosto de 1988**. Determina que o registro de produtos saneantes domissanitários com finalidade antimicrobiana seja procedido de acordo com as normas regulamentares. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/15_88.htm. Acesso em: 18 mar. 2008a.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Legislação. VisaLegis. **Resolução RDC n.14, de 28 de fevereiro de 2007**. Aprova o Regulamento Técnico para Produtos Saneantes com Ação Antimicrobiana harmonizado no âmbito do Mercosul através da Resolução GMC nº 50/06, que consta em anexo à presente Resolução. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=25959&word>. Acesso em: 18 mar. 2008b.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia para realização de estudos de estabilidade de produtos saneantes**. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/divulga/public/saneantes/guia_estabilidade.pdf. Acesso em: 18 mar. 2008c.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Legislação. VisaLegis. **Resolução RE n.899, de 29 de maio de 2003**. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova guia para validação de métodos analíticos. *Diário Oficial da União*, Brasília, 2003b. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 18 abr. 2008.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Rede Brasileira de Laboratórios. Publicações. **Padronização dos testes de sensibilidade a antimicrobianos por disco-difusão**: norma aprovada. 8.ed. M2-A8, v.23, n.1, 2003. 58p. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/reblas/reblas_public_disco_difusao.pdf. Acesso em: 18 mar. 2008

ALLAHVERDIEV, A.I.; IRANDOUST, S.; ANDERSSON, M. Chromatographic separation of α -pinene isomerization products. **Journal of Chromatography, A**, v.848, n.1/2, p.297-303, 1999.

³ As referências bibliográficas estão de acordo com a norma NBR6023/2000 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), e as abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI) 2002

ALMEIDA, J.L.G.; DUFAUX, M.; BEN, T.Y.; NACCACHE, C. Linear alkylbenzene. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, v.71, n.7, p.675-694, 1994.

ASHCAR R. **Brasileiridade: a cultura do perfume**. São Paulo: Nova Cultura, 2001. p.70-81.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS DE LIMPEZA E AFINS. **Anuário ABIPLA**. São Paulo: Public Projetos Editoriais, 2007. p.71-79

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS. **Anuário estatístico da ABRAF**: ano base 2006. Brasília: ABRAF, 2007. p.16. Disponível em: <http://www.abraflor.org.br/estatisticas/anuario-ABRAF-2007.pdf>. Acesso em: 18 mar 2008

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Disinfectants. In: _____. **Official methods of analysis of the Association Of Official Analytical Chemists**. 16.ed. Arlington: AOAC, 1998a. v.1, cap.6, p.9-11. [AOAC Official Method 960.09].

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Disinfectants. In: _____. **Official methods of analysis of the Association Of Official Analytical Chemists**. 16.ed. Arlington: AOAC, 1998b. v.1, cap.6. [AOAC Official Method 955.14].

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Disinfectants. In: _____. **Official methods of analysis of the Association Of Official Analytical Chemists**. 16.ed. Arlington: AOAC, 1998c. v.1, cap.6. [AOAC Official Method 955.15].

BEAN, H.S., BERRY, H. The bactericidal activity of phenols in aqueous solutions soap. Part II. The bactericidal activity of benzylchlorophenol in aqueous solutions of potassium laurate. *J. Pharm. Pharmacol*, v.3, p.639-655. 1951.

BRITO, J.O.; BARRICHELLO, L.E.G.; TREVISAN, J.F. Condições climáticas e suas influências sobre a produção de resinas de pinheiros tropicais. **IPEF**, n.16, p.37-45, 1978.

BRITO, J.O.; BARRICHELLO, L.E.G.; GUTIERREZ, L.E. Qualidade do breu e de terebintina de pinheiros tropicais. **IPEF**, n.21, p.55-63, 1980.

CASTANHEIRO, J.E.; RAMOS, A.M.; FONSECA, I.; VITAL, J. The acid catalysed reaction of α -pinene over molybdophosphoric acid immobilised in dense polymeric membranes. **Catalysis Today**, v.82, p.187-193, 2003.

CHEMSPIDER BUILDING A STRUCTURE CENTRIC COMUNIT FOR CHEMISTS. Disponível em: < <http://www.chemspider.com/> >. Acesso 20 abr. 2008.

CLOETE, T.E. Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.51, p.272-282, 2003.

COELHAN, M.; BROMIG, K.-H.; GLAS, K.; ROBERTS, A.L. Determination and levels of the biocide ortho-phenylphenol in canned beers from different countries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n.54, p.5731-5735, 2006.

COZZOLI, O. The role of surfactants in self-preserving cosmetic formulas. In: KABARA, J.J., ORTH, D. S. **Preservative-free and self preserving cosmetics and drugs. Principles and practice**. New York; Marcel Dekker, 1997. p.75-118

CRC HANDBOOK OF CHEMISTRY AND PHYSICS. 8th. ed. 2007-2008. Disponível em: < <http://www.hbcpnetbase.com/>> Acesso em: 20 nov. 2007.

DALLIMORE, A. Perfumery. In WILLIAMS, D.F., SCHMITT, W.H. **Chemistry and technology of the cosmetic and toiletries industry**. London: Chapman & Hall, 1992. p.258-274.

DAVIS, N.W. Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpene on methyl silicone and Carbowax 20M phases: review. **Journal of Chromatography**, v.503, p.1-24, 1990.

DENYER, S.P. Mechanism of action of antibacterial biocides. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.36, n.3/4, p.227-245, 1995.

DENYER, S.P.; STEWART, G.S.A.B. Mechanism of action of disinfectants. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.41, p.261-268, 1998.

DÍAZ, E.; CORTINAS, J.; ORDONEZ, S.; VEGA, A.; COCA, J. Selectivity of several liquid phases for separation of pine terpenes by gas chromatography. **Chromatographia**, v.60, n.9/10, p.573-578, 2004.

E-ESCOLA: UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA. Ciências. Biologia. Palavras-chave. **Observação Microscópica de Bactéria - Coloração gram-básico**. Disponível em: <http://www.e-escola.pt/site/topico.asp?topico=306&ordem=0&canal=5>. Acesso em: 02 abr. 2008.

FALBE, J., ed. **Surfactants in consumer products**: theory, technology and application. Berlin, New York: Springer-Verlag, 1987. p.24-122.

FIGUEIREDO FILHO, A., *et al.* Avaliação econômica da resinagem em florestas de *Pinus elliottii* Engelm. *Var. elliottii*. **IPEF**, n.4, p.48-63, 1992.

FRAISE, A.P. Choosing disinfectants. **Journal of Hospital Infection**, v.43, p.255-264, 1999.

GALVAÑ, P.J.V. **Contribución al estudio sobre el comportamiento ambiental y degradación de jabones**. Alicante, 1996. 282p. Tese de Doutorado - Departamento de Ingeniería Química - Universidad de Alicante.

GARRIDO, M.A.O.; POZ, R.D.; FREITAS, J.A.; ROCHA, F.T.; GARRIDO, L.M.A. Metodologia da extração de resina. In: ARESB. **Extração**. Disponível em: <http://www.aresb.com.br/extracao/index.htm>. Acesso em: 12 fev. 2006.

GIOLITO, I.; IONASHIRO, M. A nomenclatura em análise térmica. **Cerâmica**, v.34, p.163-164, 1988.

GLOXHUBER, C., KÄSTNER, W. Pharmacological properties. In: GLOXHUBER, C. **Anionic surfactants. Biochemistry, toxicology, dermatology**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1980. p.411-420.

GODDARDS, P.A.; McCUE, K.A. Phenolic compound. In: BLOCK, S.S., ed. **Disinfection, sterilization and preservation**. 5.ed. Philadelphia: Lippincott Williams &Wilkins, 2000. p.255-281.

GUSEVKAYA, E.V.; ROBLES-DUTENHEFNER, P.A.; SILVA, K.A.; SIDDIQUI, M.R.H.; KOZHEVNIKOV, I.V. Hydration and acetoxylation of monoterpenes catalysed by heteropoly acid. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v.175, n.1/2, p.33-42, 2001.

HOLAH, J.T., LAVAUD, A.; PETERS, W.; DYE, K.A. Future techniques for disinfectant efficacy testing. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.41, n.3, p.273-279, 1998.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. **Manual da qualidade**: método da diluição de uso. Local: Rio de Janeiro. Fundação Oswaldo Cruz, INCQS, No 65.3210.007, revisão 06, 12 set. 2003.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. Manual da qualidade: método para avaliação das atividades bacteriostática e fungistática de saneantes e substâncias preservativas. Local: Rio de Janeiro Fundação Oswaldo Cruz, INCQS, N.65.3210.006, revisão 05, 11 set. 2007.

INTERNATIONAL SCIENTIFIC FORUM ON HOME HYGIENE. **Microbial resistance and biocides**: a review by International Scientific Forum on Home Hygiene (IFH). 2000. Disponível em: <http://www.ifh-homehygiene.org/2003/2public/antresFINAL.pdf>. Acesso em: 03 abr. 2008.

JANZANTTI, Natália S.; FRANCO, Maria Regina B.; WOSIACKI, Gilvan. Effect of processing on the volatile composition of the clarified Fuji apple juice. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 23, n. 3, 2003. Disponível em:

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612003000300037&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 23 Abr 2008. doi: 10.1590/S0101-2061200300030003

KABARA, J.J. Fatty acids and esters as multifunctional components. In: KABARA, J.J., ORTH, D. S. **Preservative-free and self preserving cosmetics and drugs. Principles and practice**. New York; Marcel Dekker, 1997. p.119-137.

KIRK-OTTMER Encyclopedia of Chemical Technology. 3.ed. New York: John Wiley, 1983. p.709-756.

KLINE & COMPANY. **Specialty Biocides 2004-2005**: v.2: United States. Little Falls: Kline & Company, 2008. p.3F1-3F8.

KOLISCHESKI, M.B. **Síntese do mirceno a partir da isomerização térmica do b-pineno**. Curitiba, 2006. 120p. Tese de Doutorado - Engenharia de Processos Térmicos e Químicos – Setor de Tecnologia – Universidade Federal do Paraná.

KRONKA, F.J.N.; BERTOLANI, F.; PONCE, R.H. **A cultura do pinus no Brasil**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Silvicultura, 2005. p.11-43, 70-82.

LANXESS. **Preventol® CMK**: summary of toxicity and ecotoxicity. Leverkusen: Lanxess Deutschland GmbH, 2003. 8p. [Folheto]

LANXESS. **Preventol® O extra**: summary of toxicity and ecotoxicity. Leverkusen: Lanxess Deutschland GmbH, 2006a. 8p. [Folheto]

LANXESS. **Preventol® BP: Preventol® BP75**: summary of toxicity and ecotoxicity. Leverkusen: Lanxess Deutschland GmbH, 2006b. 8p. [Folheto]

LANXESS. **Product Information: Preventol® CMK, CMK-Na**. Leverkusen: Lanxess Deutschland GmbH, 2007a. 9p. [Folheto]

LANXESS. **Product Information: Preventol® Oextra /ON Extra**. Leverkusen: Lanxess Deutschland GmbH, 2007b. 9p. [Folheto]

LANXESS. **Product Information: Preventol® BP**. Leverkusen: Lanxess Deutschland GmbH, 2008. 11p. [Folheto]

LIU, S.W.; YU, S.T.; LIU, F.S.; XIE, C.X.; LI, L.; JI, K.H. Reactions of α -pinene using acidic ionic liquid as catalysts. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v.279, N.2, p.171-181, 2008.

MACHADO, L.D.B.; MATOS, J.R. Análise térmica diferencial e calorimetria exploratória diferencial. In: CANEVAROLO Jr., S.V., coord. **Técnicas de caracterização de polímeros**. São Paulo: Artliber, 2004. p.229-261.

MCDONNELL, G.; RUSSELL, D. Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, n.1, p.147-179, 1999.

MERIANOS, J.J. Surface-active agents. In: BLOCK, S.S. **Disinfection sterilization and preservation**. Philadelphia: Lippincott Williams &Wilkins, 2000. p.283-316.

MONTIEJŪNAITĖ, O.; PEČIULYTĖ, D. Fungicidal properties of *Pinus sylvestris* L. for improvement of air quality. **Medicina (Kaunas)**, v.40, n.8, p.787-795, 2004.

MORETTI, E. **Microbiologia**: fundamentos & aplicações - bacteriologia - estrutura celular. [Envelope Bacteriano]. Disponível em: http://www.fam.br/microrganismos/bacteriologia_envelope.htm. Acesso em: 02 abr. 2008.

MOSHER, W.A. The acid catalyzed isomerization of α -pinene. **Journal of the American Chemical Society**, v.9, n.69, p.2139-2141, 1947.

NIST Mass Spec Data Center, S.E. Stein, director, "Infrared Spectra" in NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database Number 69, Eds. P.J. Linstrom and W.G. Mallard, June 2005, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg MD, 20899. Disponível em: <<http://webbook.nist.gov>>. Acesso em: 20 nov. 2007.

PACKER, J.F.; LUZ, M.M.S. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.1, p.102-107, 2007.

PAKDELL, H.; SARRON, S.; ROY, C. α -Terpineol from hydration of crude sulfate Turpentine oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p.4337-4341, 2001.

PASSONI, L.C. **Oxidação catalítica de benzeno a fenol utilizando paládio e heteropoliácido**. Campinas, 1998. 83p. Tese de Doutorado - Instituto de Química - Universidade Estadual de Campinas.

PAULUS, W. **Microbiocides for protection of material**: a handbook. New York: Chapman & Hall, 1993. p.7-20.

PAULUS, W., ed. **Directory of microbicides for the protection of material**: a handbook. Dordrecht: Kluwer, 2005. p.534-574.

PEDRO, R. Tensoativos: considerações gerais e breve histórico. In: HOUSEHOLD & COSMÉTICOS. **Artigos Técnicos**. Disponível em: http://www.freedom.inf.br/artigos_tecnicos/31012007/tensoativos.asp. Acesso em: 18 mar. 2008.

PELCZAR Jr., J.M.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R.; EDWARDS, D.D. **Microbiologia**: conceitos e aplicações. 2.ed. São Paulo: Makron Books, 1996. p.210-223.

PENNA, T.C.V.; MAZZOLA, P.G.; MARTINS, A.M.S. The efficacy of chemical agents in cleaning and disinfection programs. **BMC Infectious Diseases**, v.1, n.16, 2001. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/picrender.fcgi?artid=57744&blobtype=pdf>. Acesso em: 26 jan. 2008.

PERES, T.B. Noções básicas de cromatografia. **Biológico**, v.64, n.2, p.277-229, 2002.

RAMOS, L.P.; GARCIA, J.N. Qualidade produtiva em resinas de Pinus: parte 1. **Informativo ARESB**, edição 94, dez. 2007. Disponível em: <http://www.aresb.com.br/informativoaresb/jornal/index.htm>. Acesso em: 12 nov. 2007

RIBANI, M. *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

REYBROUCK, G. The testing of disinfectants. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.41, n.3, p.269-272, 1998.

ROBLES-DUTENHEFNER, P.A.; SILVA, K.A.; SIDDIQUI, M.R.H.; KOZHEVNIKOV, I.V.; GUSEVSKAYA, E.V. Hydration and acetoxylation of monoterpenes catalyzed by heteropoly acid. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v.175, n.1/2, p.33-42, 2001.

ROMÁN-AGUIRRE, M.; TORRE-SAENZ, L.; FLORES, W.A.; ROBAU-SANCHEZ, A.; ELQUEZABAL, A.A. Synthesis of terpineol from α -pinene by homogeneous acid catalysis. **Catalysis Today**, v.107/108, p.310-314, 2005.

RUSSELL, A.D. Similarities and differences in the responses of microorganisms to biocides. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.52, p.750-763, 2003.

SABULAL, B.; DAN, M.; PRADEEP, N.S.; VALSAMMA, R.K.; GEORGE, V. Composition and antimicrobial activity of essential oil from the fruits of *Amomum Caninarpum*. **Acta Pharmaceutica**, v.56, n.4, p.473-480, 2006.

SANTOS, M.G. **Refino da terebintina sulfatada desodorizada por destilação e sua utilização na síntese de α -terpineol**. Florianópolis, 2005. 101p. Dissertação de Mestrado - Engenharia Química - Departamento de Engenharia Química e de Alimentos - Universidade Federal de Santa Catarina.

SCHMITT, H.G. The action of antimicrobial substance. In: DEUTSCHE GESELLSCHAFT DER KOSMETIK-CHEMIKER, 1986, Bad Kreuznach. **Resumo**. Bad Kreuznach: German Society for Cosmetic Chemists, 1986. 7p.

SKOOG, D.A.; WEST, D.M.; HOLLER, F.J. **Fundamentals of analytical chemistry**. New York: Saunders College Publishing, 1996. p.660-724.

SMITH, R.M. **Gas and liquid chromatography in analytical chemistry**. New York: John Wiley, 1988. p.62-144, 170, 179-191, 209-310.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE SILVICULTURA. **Fatos e números do Brasil florestal**. São Paulo: SBS, 2008. 109p.

STEPAN COMPANY. **Biodegradation of alpha olefin sulfonates**: technical information. Northfield: Stepan Company, 2001. 2p. [Folheto]

STEPAN COMPANY. **Material safety data sheet**: Bio-Terge AS40. Northfield: Stepan Company, 2006. 5p. [Folheto]

TIMENETSKY, J.; ALTERTHUM, F. Coeficiente fenólico na avaliação microbiológica de desinfetantes de uso hospitalar e doméstico. **Revista de Saúde Pública**, v.23, p.170-174, 1989.

TIMENETSKY, J.; YANAGUITA, R.M.; SILVA, L.A. Avaliação de desinfetantes químicos de uso doméstico contra *Vibrio cholerae* EL TOR (amostra ao toxigênica). **Revista de Saúde Pública**, v.26, p.328-331, 1992.

THOMPSON, R.D. Determination of phenolic disinfectant agents in commercial formulations by liquid chromatography. **Journal of AOAC International**, v.84, n.3, p.815-822, 2001.

VAN KLINGEREN, B.; KOLLER, W.; BLOOMFIELD, S.F.; BOHM, R.; CREMIEUX, A.; HOLAH, J.; REYBROUCK, G.; RODGER, H.-J. Assessment of the efficacy of disinfectants on surfaces. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.41, n.3, p.289-296, 1998.

VELASCO-NEGUERUELA, A.; PÉREZ-ALONSO, M.J.; PÉREZ DE PAZ, P.L.; PALÁ-PAUL, J.; SANZ, J. Analysis by gás chromatography-mass spectrometry of the essential oils from aerial parts of *Pimpinella anagodendron* Bolle and *Pimpinella rupicola* svent., two endemic species to the Canary Islands, Spain. **Journal of Chromatography, A**, v.1095, p.180-184, 2005.

VITAL, J.; RAMOS, A.M.; SILVA, I.F.; VALENTE, H.; CASTANHEIRO, J.E. Hydration of α -pinene over zeolites and activated carbons dispersed in polymeric membranes. **Catalysis Today**, v.56, p.167-172, 2000.

WENDLANDT, W.W. **Thermal analysis**. 3.ed. New York: Wiley, 1986. 814p. (Chemical analysis, v.19).

YANG, L.; KOTANI, A.; HAKAMATA, H.; KUSU, F. Determination of ortho-phenylphenol residues in lemon rind by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection using a microbore column. **Analytical Sciences**, v.20, n.1, p.199-203, 2004.

YU, E.J. Aroma-active compounds of *Pinus densiflora* (red pine) needles. **Flavour and Fragrance Journal**, v.19, p.532-537, 2004.

YU, J.; LEI, J.; YU, H.; CAI, X.; ZOU, G. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Scutellaria barbata*. **Phytochemistry**, v.65, n.7, p.881-884, 2004.

GLOSSÁRIO

Alcatrão de hulha	É um líquido escuro e viscoso constituído essencialmente de hidrocarbonetos aromáticos, tais como benzeno, fenóis, naftaleno, cresóis, antraceno e piche. Trata-se da mais importante fonte natural de compostos aromáticos de grande importância para a indústria (mais de duzentos compostos podem ser obtidos).
Alfa olefina	Olefinas com a dupla no início da cadeia de carbonos.
Autólise	Autofagia. Autodestruição de célula e de organelas citoplasmáticas pelas suas próprias enzimas hidrolisantes; autodigestão.
Bioacumulação	É o nome genérico do processo de captação e retenção de uma substância (contaminante) por um organismo a partir de qualquer fonte (água, sedimento, outro organismo), via qualquer rota (dieta, pele), e se constitui em efeito nocivo quando induz resposta biológica adversa. O termo bioacumulação tem sido aplicado quando organismos vivos estão envolvidos, e biosorção é o termo mais adotado para o uso de organismos mortos.
Cápsula	Camada limosa ou polissacarídeo extracelular.
Citoplasma	Duas áreas distintas são visualizadas através de microscopia eletrônica: uma matriz amorfa (contém ribossomos, grânulos, metabólitos, enzimas, etc.) e o nucleóide, uma região estruturada pela presença do DNA bacteriano.
CLAE-gel filtração	É o tipo de cromatografia líquida por exclusão de tamanho na qual o enchimento é hidrofílico. É usada para separação de substâncias polares.
CLAE-gel permeação	É o tipo de cromatografia líquida por exclusão de tamanho na qual o enchimento é hidrofóbico. É usada para separação de substâncias não polares.
Coefficiente de variação	<p>É uma medida adimensional, útil para comparar resultados das amostras cujas unidades podem ser diferentes. Uma desvantagem do coeficiente de variação é que ele deixa de ser útil quando a média é próxima de zero, pois</p> $CV = 100 \frac{s}{\bar{X}}$ <p>onde s é o desvio padrão para a amostra.</p>
Desinfetante	É um produto que mata todos os microrganismos patogênicos, mas não necessariamente todas as formas microbianas esporuladas em objetos e superfícies inanimadas.
Desodorizante	Produto que tem em sua composição substância com atividade antimicrobiana capaz de controlar odores desagradáveis.
Desvio Padrão	O desvio padrão é uma medida do grau de dispersão dos valores em relação ao valor médio (a média). Indica os limites prováveis dentro dos quais se situam certas proporções das observações.

68% das observações estão distantes da média em 1 desvio padrão, 95% em 2 e 99,7 em 3 desvios padrões.

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{X})^2}{n}}, \quad s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{X})^2}{n-1}}$$

onde σ significa o desvio padrão da população e s significa o desvio padrão da amostra.

Endósporos
(esporos)

Estruturas celulares altamente desidratadas.

Escala Mc Farland

A escala nefelométrica de Mc Farland é o padrão de turvação mais freqüentemente utilizado nos laboratórios de microbiologia para determinar a intensidade da multiplicação bacteriana em meios líquidos de cultivo. Essa multiplicação é evidenciada pela turvação ou opacidade do meio de cultura e quanto maior o número de bactérias, maior será a opacidade do meio de cultura. Consiste em uma série de 11 tubos numerados de 0,5 a 10, com diferentes quantidades de cloreto de bário e ácido sulfúrico, para se obter diferentes concentrações de sulfato de bário, que correspondem a diferentes contagens bacterianas. A equivalência dessas contagens será expressa na seguinte tabela:

Tubo Nº	0.5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Nº aprox.	1.5	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
Bact(x10 ⁸)											

Assim o tubo Nº 0,5 corresponde a 150 milhões de bactérias por ml de meio e o tubo Nº 10 corresponde a 3 bilhões de bactérias por ml de meio.

PROCEDIMENTO:

Comparar a olho nu os tubos do NEFELOBAC com o tubo de cultura bacteriana. Antes, agitar vigorosamente os tubos do NEFELOBAC, pois em repouso o sulfato de bário tende a precipitar. Também homogeneizar o tubo com a cultura bacteriana, para ter uma suspensão (turvação) uniforme. Recomendamos fazer a leitura comparativa dos tubos, colocando-os contra um texto impresso, de forma que a maior ou menor claridade das letras vistas através dos tubos indique maior ou menor turvação.

Fator
bioacumulação
(FBA)

de Relação entre a concentração de uma substância nos tecidos versus a sua concentração na água, em condições nas quais os organismos na cadeia alimentar se encontram expostos.

Filamentos axiais
(endoflagelos)

Presentes exclusivamente nas espiroquetas são os responsáveis pela promoção dos seus típicos movimentos em espiral.

Fímbrias e/ou Pili

São apêndices superficiais rígidos. As fímbrias desempenham papel de aderência bacteriana, e as fímbrias sexuais são responsáveis pela ligação das células doadoras e receptoras na conjugação bacteriana. São receptores específicos de certas partículas virais.

Flagelos

São apêndices responsáveis pela motilidade de bactérias. De acordo com o seu número e posição, são classificados em monotríquias, lofotríquias, anfotríquias ou peritríquias.

Fungicida	É um produto letal para todas as formas de fungos.
Germicida	É um produto de ação letal sobre os microrganismos, especialmente os patogênicos (germes).
Glicocálice	Polímero viscoso e gelatinoso produzido por algumas bactérias. Situa-se externamente à parede celular.
Gram negativas	As bactérias Gram negativas não são coradas pelo corante cristal violeta, mas são coradas com o corante safranina e aparecem coradas de vermelho.
Gram positivas	Bactérias cujas paredes celulares são tipicamente compostas por cerca de 20 camadas de peptidoglicanos (polímeros de polissacarídeos ligados a proteínas), que retêm o corante cristal violeta e aparecem coradas em violeta-escuro.
Grânulos Corpúsculos Inclusão:	ou de Partículas revestidas ou não de membrana lipídica, contêm reservas nutricionais (glicogênio, lipídios, fosfato, ferro, dependendo do organismo).
Homeostase	Propriedade auto-reguladora de um sistema ou organismo que permite manter o estado de equilíbrio de suas variáveis essenciais ou de seu meio ambiente.
Hulha	É um carvão mineral. O carvão mineral é formado por troncos, raízes, galhos e folhas de árvores gigantes que cresceram há 250 milhões de anos em pântanos rasos. Essas partes vegetais, após morrerem, depositaram-se no fundo lodoso e ficaram encobertas. O tempo e a pressão da terra que foi se acumulando sobre o material transformaram-no em uma massa negra homogênea – as jazidas de carvão-, um enriquecimento no teor de carbono.
Índice Kováts	É um índice de retenção que descreve o comportamento de retenção do composto comparativamente ao de uma mistura de alcanos de diferentes números de átomos de carbono. Este índice de retenção fornece informação sobre a sequência de eluição do composto e varia em função da fase estacionária e da temperatura, sendo independente das condições experimentais (JAZANTTI, 2003).
Longifoleno	Quím. Sesquiterpeno tricíclico, com estrutura em ponte e uma ligação dupla, que ocorre nas resinas de certos pinheiros. CAS 475-20-7; C ₁₅ H ₂₄ ; decahidro-4,8,8-trimetil-9-metileno.
Membrana Interna, Plasmática ou Citoplasmática	Estrutura dinâmica, flexível, formada por uma bicamada de fosfolipídios e proteínas. Está envolvida em vários processos celulares, como: na biossíntese da parede celular, no transporte de nutrientes, na respiração e na divisão celular. Esta membrana é a barreira mais importante existente entre o microrganismo e o meio ambiente.
Micobactéria	1.Gênero de bactérias da família <i>Mycobacteriaceae</i> (v. <i>micobacteriáceas</i>), que se apresentam como bastões gram-

	<p>positivos retos, ou ligeiramente encurvados, aeróbicos, acidorresistentes, sendo a maioria delas de crescimento lento.</p> <p>2.Qualquer espécie desse gênero, como, p. ex., a <i>Mycobacterium tuberculosis</i>, o agente causador da tuberculose, e a <i>M. leprae</i>, o agente causador da lepra.</p> <p>3.Qualquer espécime desse gênero.</p>
Motilidade	<p>1.Faculdade de mover(-se).</p> <p>2.Força motriz.</p> <p>3.Fisiol. Capacidade de mover-se espontaneamente.</p>
Notas olfativas	<p>As notas são percepções olfativas dos perfumes. No processo de evaporação, seja na pele, na fita olfativa ou no próprio frasco, a fragrância sofre progressivamente uma série de mudanças sutis e harmoniosas. Para descrever esses momentos, é usados em perfumaria o termo Notas Olfativas, e estas classificam-se em três tipos:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Notas de saída ou de cabeça: são voláteis e são a primeira impressão da fragrância (duram de 0 a 10 min). São exemplo destas, as notas características da bergamota, laranja, tangerina, lavanda, estragão, louro e manjerição. - Notas de corpo: são liberadas em seguida (duram até 4 horas) e denotam a personalidade de quem usa, são produzidas por elementos denominados de modificadores, que é onde se encontram estas essências. Exemplos: essência de rosa, gerânio e neroli. - Notas de fundo: dão peso e nos indicam o tempo de duração na pele (podem durar acima de 4 horas). Como exemplo, temos essência de jasmim, sândalo, patchuli, vetiver, musgo de carvalho, civette, almíscar, âmbar e baunilha. São as últimas percepções olfativas de um perfume.
Nucleóide ou Região Nuclear:	Área de concentração do DNA cromossômico (membrana nuclear ausente). DNA geralmente circular, dupla-fita, associado a proteínas básicas.
Olefina	Hidrocarbonetos insaturados, possuem uma ligação dupla na cadeia ($-C=C-$).
Organoléptico	Fisiol. Diz-se de propriedade demonstrada por um corpo, ou por uma substância, e que impressiona um ou mais sentidos
Preservativo	Bacter. Substância(s) que se adiciona(m) a um produto e que visa(m) a nele destruir ou impedir a proliferação de microrganismos.
Produto de uso institucional	Produto destinado à venda e utilização sob responsabilidade de pessoa jurídica, não sendo necessária a aplicação por pessoa/entidade especializada.
Produto de uso profissional	Produto que por seu risco ou uso específico deve ser aplicado/manipulado exclusivamente por pessoa especializada.
QSAR	Sigla do inglês <i>Quantitative Structure-Activity Relationship</i> (relação quantitativa entre estrutura química e atividade) correlacionam, entre séries congêneres de compostos, afinidades de ligantes a

seus sítios de ligação, seja proteína ou receptor de membrana, constantes de velocidade e outras atividades biológicas; com certas características estruturais (análise de Free Wilson) ou com propriedades moleculares, de grupo ou atômicas, tais como lipofilicidade, polarizabilidade, propriedades eletrônicas e estéricas (análise de Hansch).

Ribossomos	Muito parecidos com os ribossomos dos eucariotos. As duas subunidades compostas por proteínas e RNA são menores.
Sanificação	Ato de sanificar.
Sanificar	Tornar são ou salubre; desinfetar, sanear.
Sanitizante	É um agente/produto que reduz o número de bactérias a níveis seguros de acordo com as normas de saúde.
Sanitização	Hig. Conjunto de procedimentos usados na indústria de produtos alimentares e que visam à manutenção das condições de higiene indispensáveis à obtenção de materiais de primeira qualidade.
Tween 80	Nome comercial para Oleato de Sorbitan Etoxilado 20 EO.
Vacúolos Gasosos	Membranas rígidas, impermeável a água, são compostas de unidades repetidas de proteína, e incluem gases em procariotos que flutuam em lagos ou mares.

APÊNDICE

APÊNDICE A

Tabelas comparativas entre análise CG-EM e CG-DIC

Tabela 34 – Comparativo da composição de quatro óleos de pinho analisados por CG-DIC e CG-EM

Componente*	Y50				Y75		D80		D65	
	t _r DIC	t _r MS	% DIC	% MS	% DIC	% MS	% DIC	% MS	% DIC	% MS
α-pineno	4,16	4,43	19,86	16,00	4,51	4,10	2,67	2,50	7,68	6,80
canfeno	4,48	4,65	1,62	1,60	0,31	1,70	0,44	0,40	1,23	1,20
β- pineno	5,21	5,08	5,99	5,20	1,56	1,40	nd	0,10	0,34	0,30
β-mirceno	5,64	5,19	0,44	0,50	nd	0,10	nd	0,10	nd	0,20
α- felandreno	6,02	5,49	0,75	0,90	nd	0,30	0,42	0,50	0,90	1,00
1,4 cineol	6,42	5,67	2,15	0,00	0,63	0,30	1,25	0,60	2,43	2,60
careno 2	6,69	5,7	0,68	1,50	0,44	0,40	0,81	0,70	1,24	nd
limoneno	6,85	5,94	4,87	5,50	3,23	3,30	3,61	3,90	6,48	7,10
eucaliptol	6,91	5,99	0,80	nd	0,32	nd	0,59	nd	1,00	nd
α-terpineno	7,96	6,39	0,62	0,70	0,65	0,70	0,88	0,90	1,26	1,40
terpinoleno	9,19	6,97	6,47	7,10	8,44	8,80	6,73	6,70	8,53	8,80
fenchol	10,21	7,38	1,09	1,10	1,77	1,70	1,63	1,60	1,50	1,50
1-terpineol	11,26	7,71	1,49	1,50	1,25	1,20	2,78	2,80	2,46	2,50
β-terpineol	11,74	7,89	2,24	2,20	3,11	2,90	3,47	3,40	3,00	2,90
boneol	12,70	8,27	1,86	2,10	2,72	2,90	2,60	2,90	2,17	2,40
4 terpineol	13,33	8,43	1,13	1,20	1,52	1,60	2,01	2,00	1,72	1,80
α-terpineol	14,27	8,8	37,67	39,00	58,51	56,40	60,88	61,50	50,38	51,30
γ-terpineol	14,53	8,86	5,70	4,60	6,52	3,80	8,82	6,70	7,33	5,20
p-ment-1 em-8 ol	17,89	9,62	2,42	2,80	3,33	3,70	nd	0,20	nd	nd
n.i	19,56	nd	nd	nd	nd	nd	0,42	nd	0,34	nd
Terpin	20,25	10,37	0,60	0,60	nd	0,20	nd	0,20	nd	0,20
Acetato de terpinila	21,50	10,97	nd	1,20	nd	0,90	nd	nd	nd	nd
Etoxi-citronelal	23,03	11,17	0,90	0,80	0,69	0,60	nd	nd	nd	nd
n.i	24,20	-	0,66	nd	0,48	nd	nd	nd	nd	nd
outros			nd	3,50	nd	2,70	nd	2,30	nd	2,80

* sequência da ordem de eluição; t_r DIC= tempo de retenção na CG-DIC; %DIC = percentagem relativa pela CGDIC; t_rMS = tempo de na CG-MS; %MS= percentagem relativa pela CG-MS; nd= não determinado; n.i.= não identificado; Y50 = óleo de pinho 50%, fabricante Y; Y75= óleo de pinho 75%, fabricante Y; D80= óleo de pinho 80%, fabricante D; D65= óleo de pinho 65%, fabricante D

Tabela 35 - Comparativo da composição de cinco óleos de pinho analisados por CG-DIC e CG-EM

	S50				Y65		D50		S75		S65	
Componente*	t _r DIC	t _r MS	% DIC	% MS	% DIC	% MS	% DIC	% MS	% DIC	% MS	% DIC	% MS
α-pineno	4,16	4,43	10,13	8,40	6,41	5,30	9,57	8,20	2,35	2,20	2,44	2,30
canfeno	4,48	4,65	2,12	1,90	0,52	0,50	2,09	1,90	0,63	0,60	0,55	0,50
β- pineno	5,21	5,08	1,32	1,20	2,32	2,00	0,38	0,40	nd	nd	nd	nd
β-mirceno	5,64	5,19	0,34	0,40	nd	0,20	0,43	0,50	nd	nd	nd	nd
α- felandreno	6,02	5,49	0,84	0,90	0,51	nd	1,54	1,80	nd	0,10	0,70	0,70
1,4 cineol	6,42	5,67	4,45	2,50	1,98	0,60	4,65	nd	1,24	1,30	2,93	1,50
careno 2	6,69	5,7	1,19	2,00	0,55	0,90	2,33	5,00	0,38	nd	0,58	1,40
limoneno	6,85	5,94	8,38	7,70	4,70	1,10	13,36	12,90	2,21	2,00	5,34	4,60
eucaliptol	6,91	5,99	2,23	2,40	0,89	5,10	nd	nd	0,99	1,00	1,64	1,80
α-terpineno	7,96	6,39	1,37	1,40	0,93	1,00	1,92	2,10	0,60	0,70	0,96	1,00
terpinoleno	9,19	6,97	14,89	15,00	9,58	9,50	10,94	11,70	10,60	11,20	12,25	12,10
fenchol	10,21	7,38	2,04	1,90	1,50	1,50	1,46	1,40	2,77	2,70	2,57	2,50
1-terpineol	11,26	7,71	4,04	3,90	3,54	3,40	3,09	3,00	5,80	5,70	5,74	5,50
β-terpineol	11,74	7,89	2,99	2,70	2,88	2,80	2,83	2,60	3,96	3,70	3,75	3,60
n.i	12,26	nd	0,61	nd	0,32	nd	nd	nd	1,00	nd	0,72	nd
boneol	12,70	8,27	2,00	1,50	2,46	2,70	1,64	1,80	3,02	3,20	2,80	3,00
4 terpineol	13,33	8,43	1,60	1,60	1,59	1,60	1,68	1,60	2,30	2,30	2,14	2,10
α-terpineol	14,27	8,8	31,75	32,90	44,87	46,10	36,41	36,70	51,07	51,10	43,86	44,90
γ-terpineol	14,53	8,86	6,14	5,50	8,55	5,80	5,69	4,70	8,75	6,30	8,48	6,10
n.i	16,68	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,34	nd	nd	nd
p-ment-1 em-8 ol	17,89	9,62	nd	nd	3,95	4,40	nd	nd	nd	nd	nd	nd
n.i	18,20	-	nd	nd	0,29	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
n.i	19,56	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Terpin	20,25	10,37	0,62	0,80	0,34	0,40	nd	0,10	0,49	0,50	0,98	1,10
Acetato de terpinila	21,50	10,97	nd	1,10	nd	1,10	nd	nd	nd	1,80	nd	1,40
Etoxi-citronelal	23,03	11,17	0,96	nd	0,84	0,60	nd	nd	nd	nd	nd	nd
n.i	23,43	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1,52	nd	1,22	nd
n.i	24,20	-	nd	nd	0,50	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
n.i	26,04	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,35	nd
n.i	33,15	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
outros			nd	2,90	nd	3,40	nd	3,60	nd	3,60	nd	3,90

* sequência da ordem de eluição; t_r DIC= tempo de retenção na CG-DIC; %DIC = percentagem relativa pela CGDIC; t_rMS = tempo de na CG-MS; %MS= percentagem relativa pela CG-MS; nd= não determinado; n.i.= não identificado; S50 = óleo de pinho 50%, fabricante S; Y65= óleo de pinho 65%, fabricante Y; D50= óleo de pinho 50%, fabricante D; S75= óleo de pinho 75%, fabricante S; S65= óleo de pinho 65%, fabricante S

APÊNDICE B

Espectros de absorção na região do infravermelho para as frações e resíduos obtidos no processo de destilação de uma amostra óleo de pinho bruto.

Figura 28. Espectro de absorção na região do infravermelho para Fração F1

Figura 29. Espectro de absorção na região do infravermelho para Fração F6

Figura 30. Espectro de absorção na região do infravermelho para Fração F11

Figura 31. Espectro de absorção na região do infravermelho para Fração F13

Figura 32. Espectro de absorção na região do infravermelho para Fração F19

Figura 33. Espectro de absorção na região do infravermelho para Fração F20

Figura 34. Espectro de absorção na região do infravermelho para Fração F22

Figura 35. Espectro de absorção na região do infravermelho para Fração F23

Figura 36. Espectro de absorção na região do infravermelho para Fração F24

Figura 37. Espectro de absorção na região do infravermelho para Fração F27

Figura 38. Espectro de absorção na região do infravermelho para Fração F29

Figura 39. Espectro de absorção na região do infravermelho para Fração F31

Figura 40. Espectro de absorção na região do infravermelho para Fração F34

Figura 41. Espectro de absorção na região do infravermelho para Fração F39

Figura 42. Espectro de absorção na região do infravermelho para Fração F43

Figura 43. Espectro de absorção na região do infravermelho para Fração F47

Figura 44. Espectro de absorção na região do infravermelho para Fração F50

Figura 45. Espectro de absorção na região do infravermelho para Fração F56

Figura 46. Espectro de absorção na região do infravermelho para Fração F61

Figura 47. Espectro de absorção na região do infravermelho para o resíduo de destilação de uma amostra retirada após a Fração F19

Figura 48. Espectro de absorção na região do infravermelho para o resíduo da destilação amostra retirada após a Fração F28

Figura 49. Espectro de absorção na região do infravermelho para uma amostra de resíduo final de destilação amostra retirada após a Fração F61

APÊNDICE C

Fotografias das placas do teste de halo de inibição realizado para as frações e algumas amostras de óleo de pinho e terpinoleno. Leitura realizada após 24h.

Figura 50. Halo de inibição para as frações F1, F234, α-terpineol e óleo do fabricante B (leitura após 24h). a) *Salmonella choleraesuis* e b) *Staphylococcus aureus*

Figura 51. Halo de inibição para as frações F5, F567, F10 e F11 (leitura após 24h). a) *Salmonella choleraesuis* e b) *Staphylococcus aureus*

Figura 52. Halo de inibição para as frações F16, F17, F19 e o terpinoleno (leitura após 24h). a) *Salmonella choleraesuis* e b) *Staphylococcus aureus*

Figura 53. Halo de inibição para as frações F20, F21, F22 e F23 (leitura após 24h). a) *Salmonella choleraesuis* e b) *Staphylococcus aureus*

Figura 54. Halo de inibição para as frações F28, F29, resíduo F19 e óleo bruto (leitura após 24h). a) *Salmonella choleraesuis* e b) *Staphylococcus aureus*

Figura 55. Halo de inibição para as frações F31, F32, F33 e resíduo F28 (leitura após 24h). a) *Salmonella choleraesuis* e b) *Staphylococcus aureus*

Figura 56. Halo de inibição para as frações F39, F40, F42 e F44 (leitura após 24h). a) *Salmonella choleraesuis* e b) *Staphylococcus aureus*

Figura 57. Halo de inibição para as frações F46, F48, F50 e resíduo F44 (leitura após 24h). a) *Salmonella choleraesuis* e b) *Staphylococcus aureus*

Figura 58. Halo de inibição para as frações F52, F54, F56 e F58 (leitura após 24h). a) *Salmonella choleraesuis* e b) *Staphylococcus aureus*

Figura 59. Halo de inibição para as frações F41, F45, F60 e resíduo Final (leitura após 24h). a) *Salmonella choleraesuis* e b) *Staphylococcus aureus*

Figura 60. Halo de inibição para as frações F45, F51, F57 e F61 (leitura após 24h). a) *Salmonella choleraesuis* e b) *Staphylococcus aureus*

Figura 61. Halo de inibição para as frações F53, F55, F59 e terpinoleno (leitura após 24h). a) *Salmonella choleraesuis* e b) *Staphylococcus aureus*

Figura 62. Halo de inibição para as frações F39, F40, F42 e F44 (leitura após 48h). a) *Salmonella choleraesuis* e b) *Staphylococcus aureus*

Figura 63. Halo de inibição para as frações F45, F57, F58 e F61 (leitura após 48h). a) *Salmonella choleraesuis* e b) *Staphylococcus aureus*

Figura 64. Resumo ilustrando dados cromatográficos e formação de halo de inibição

APÊNDICE D

Detalhes do teste de suspensão

Figura 65. Fotos do teste de suspensão (a) tubos de repique das cepas, (b) acerto da escala Mc Farland

Figura 66. Tubos com a amostra-teste, 2 tubos com CN + Tween 80 e 2 tubos com solução tampão

a)

b)

c)

d)

e)

f)

Figura 67. Teste de suspensão (a) Transferência de alíquota, (b) agitação do tubo, (c) plaqueamento, (d) adição de Agar, (e) incubação, (f) placa com crescimento

ANEXO

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Nome: FLORIPES FERREIRA DE OLIVEIRA

Local e data de nascimento: São Paulo, 31 de janeiro de 1970

EDUCAÇÃO

E.S.PS.G. Antonio Raposo Tavares, Osasco, 1985

Faculdade de Tecnologia de São Paulo, São Paulo, 1990

Tecnologia em Construção Civil – Modalidade: Edifícios

Faculdade de Tecnologia de São Paulo, São Paulo, 1991

Licenciada na Parte de Formação Especial do Currículo do Ensino de 2º Grau

Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995

Bacharel em Química com Especialização Industrial

Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998

Curso de Extensão em Administração Industrial

Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003

Mestrado em Química (Química Analítica)

Instituto Racine, São Paulo, 2008

Cursando Pós- Graduação em Gestão Tecnologia Cosmética-Engenharia Cosmética

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

• Nanomateriais e Nanotecnologia	USP	32 Horas	(2008)
• Desenv. de Liderança	JBS	12 Horas	(2006)
• Desenv. de Saneantes	Freedom	16 horas	(2006)
• Coaching and Feedback	Colgate-Palmolive	14 Horas	(2004)
• Audit Skill	Colgate-Palmolive	20 Horas	(2003)
• Valuing People	Colgate-Palmolive	16 Horas	(2003)
• On-Shelf Quality	Colgate-Palmolive	24 Horas	(2001)
• TG/DSC	Vários treinamentos	40 Horas	(1998-2003)
• Management Develop.	Colgate-Palmolive	54 Horas	(1999)
• Segurança em Lab.	Vários treinamentos	26 Horas	(1997-2004)
• Detergentes	ABQ	15 Horas	(1995)
• CG-HPLC	Vários treinamentos	51 Horas	(1991-2000)

OCUPAÇÃO

Consultora na área de pesquisa e desenvolvimento e controle de qualidade para produtos saneantes e cosméticos. 2007 – atual.

PUBLICAÇÕES

OLIVEIRA, F.O.; PAOLA, M.V.R.V., MATOS, J.R. Estudos Exploratórios do Comportamento Térmico de Diferentes amostras Comerciais de Batons. In:

PAN AMERICAN,¹ BRAZILIAN CONGRESS ON THERMAL ANALYSIS AND CALORIMETRY,² Poços de Caldas, 20002. P.168.

OLIVEIRA, F.O.; PAOLA, M.V.R.V., MATOS, J.R. Análise térmica de diferentes amostras comerciais de batons. In: CONGRESO LATINO AMERICANO E IBERICO DE QUÍMICOS COSMÉTICOS, 15, Buenos Aires, 2001

RODRIGUES, P.R.; OLIVEIRA, F.O., AGOSTINHO, S.M.L., Efeito do dodecil sulfato de sódio (SDS) no comportamento eletroquímico do aço inoxidável 304 em meio de H₂SO₄ 2M. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 17, SIMPÓSIO NACIONAL DE QUÍMICA INORGÂNICA, 7, Caxambu, 1994. EQ-12.

MICHELI, L.D.; OLIVEIRA, F.O., AGOSTINHO, S.M.L., Estudo de inibidores orgânicos na corrosão por pites no aço inoxidável 304 em meio de cloreto de sódio. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 17, SIMPÓSIO NACIONAL DE QUÍMICA INORGÂNICA, 7, Caxambu, 1994.EQ.14.

OLIVEIRA, F.O., MACIEL, J.M.; AGOSTINHO, S.M.L., Obtenção de cobre eletrolítico e sulfato de zinco a partir de sucata de latão. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 17, SIMPÓSIO NACIONAL DE QUÍMICA INORGÂNICA, 7, Caxambu, 1994. EQ-03.

OLIVEIRA, F.O., SALINAS, R.K.; FELICISSIMO, A.M.P., Síntese, purificação e caracterização de materiais estratégicos com aplicação em catálise. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 17, SIMPÓSIO NACIONAL DE QUÍMICA INORGÂNICA, 7, Caxambu, 1994. QI-92