

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

**OZONIZAÇÃO DE GRÃOS DE PIMENTA-PRETA: DESCONTAMINAÇÃO DE
Salmonella, EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL E CARACTERÍSTICAS DE
QUALIDADE**

Handina da Graça Lurdes Langa
Massango
Doctor Scientiae

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2024**

HANDINA DA GRAÇA LURDES LANGA MASSANGO

**OZONIZAÇÃO DE GRÃOS DE PIMENTA-PRETA: DESCONTAMINAÇÃO DE
Salmonella, EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL E CARACTERÍSTICAS DE
QUALIDADE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientadora: Leda Rita Dantonino Faroni

Coorientadores: Ernandes R. de Alencar
Maria C. Dantas Vanetti
Alessandra A. Z. R.
Teixeira

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2024**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

M414o
2024

Massango, Handina da Graça Lurdes Langa, 1985-
Ozonização de grãos de pimenta-preta: descontaminação de
Salmonella, extração do óleo essencial e características de
qualidade / Handina da Graça Lurdes Langa Massango. –
Viçosa, MG, 2024.

1 tese eletrônica (84 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Lêda Rita D'Antonino Faroni.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Engenharia Agrícola, 2024.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2024.836>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Pimenta-do-reino - Doenças e pragas - Controle.
2. Ozônio. 3. Essências e óleos essenciais. I. Faroni, Lêda Rita
D'Antonino, 1953-. II. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Engenharia Agrícola. Programa de
Pós-Graduação em Engenharia Agrícola. III. Título.

CDD 22. ed. 633.84

HANDINA DA GRAÇA LURDES LANGA MASSANGO

OZONIZAÇÃO DE GRÃOS DE PIMENTA-PRETA: DESCONTAMINAÇÃO DE Salmonella, EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL E CARACTERÍSTICAS DE QUALIDADE

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 27 de agosto de 2024.

Assentimento:

Handina da Graça Lurdes Langa Massango
Autora

Leda Rita Dantonino Faroni
Orientadora

Essa tese foi assinada digitalmente pela autora em 14/01/2025 às 18:50:47 e pela orientadora em 15/01/2025 às 17:30:36. As assinaturas têm validade legal, conforme o disposto na Medida Provisória 2.200-2/2001 e na Resolução nº 37/2012 do CONARQ. Para conferir a autenticidade, acesse <https://siadoc.ufv.br/validar-documento>. No campo 'Código de registro', informe o código **QEJA.H7PV.J3CC** e clique no botão 'Validar documento'.

Ao meu marido David Massango in memória,
às minhas filhas Kayla, Kyara e Célia,
à minha avó Nelcia Cuna.
Dedico

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Agradeço a Deus, pelo dom da vida, saúde, sabedoria, disposição e alegria. Por me ter concedido mais uma conquista na vida.

À minha mãe Lurdes Mutemucuio in memória, pela educação, carinho e amor.

Ao meu marido David Massango in memória, meu maior incentivador e força motriz. Deus quis que cedo partisses e que te tornasses o nosso anjo da guarda. Eu sei que daí de onde estás continuas na torcida por mais uma conquista nossa. Te amarei eternamente meu amor.

Às minhas filhas Kayla, Kyara e Célia Massango, pelo apoio incondicional, amor e pela paciência que tiveram para suportar os meus lamentos e força que tiveram de ficar sem a minha companhia durante o tempo em que lhes faltei – Obrigada meus amores.

À minha sogra Carla Santos pelo apoio incondicional e pelo carinho que sempre me dedicou.

Ao meu grande amigo Sérgio, pela amizade, apoio incondicional e por estar sempre pronto a ajudar-me e ouvir as minhas lamúrias.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Departamento de Engenharia Agrícola (DEA), pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

À Professora Lêda Rita D'Antonino Faroni pela orientação, confiança, conselhos, carinho, ensinamentos e oportunidades concedidas durante a minha formação.

À Professora Maria Cristina Dantas Vanetti pela orientação durante a realização dos experimentos em seu laboratório, amizade e ensinamentos passados.

Ao Professor Ernandes Rodrigues de Alencar pela coorientação, valiosos ensinamentos passados durante a minha formação e pelas contribuições dadas no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Professor Marcus Vinícius pelos ensinamentos passados, pela disponibilidade em ajudar e pelas valiosas contribuições.

À Alessandra Aparecida Zinato pelos ensinamentos e pelas valiosas contribuições no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Professor Paulo Roberto Cecon por sempre estar disposto a me ajudar com a estatística.

À Professora Maira Christina Marques, por disponibilizar o seu laboratório para a extração de óleos essenciais.

À Professora Maria Eliana Ribeiro Queiroz, por disponibilizar o seu

laboratório para as análises cromatográficas dos óleos essenciais.

Aos amigos do laboratório: Carollayne, Daniele, Filipe, Francisco e Eugénio, muito obrigada pelo apoio prestado e por terem estado presente em todos os momentos.

Ao funcionário do Setor de Armazenamento do Departamento de Engenharia Agrícola da UFV pelo apoio, incentivo e disponibilidade em ajudar: José Geraldo.

A todos que de um modo geral, direta ou indiretamente, contribuíram para realização deste trabalho e para minha formação acadêmica, Muito Obrigada!

RESUMO

MASSANGO, Handina da Graça Lurdes Langa, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2024. **OZONIZAÇÃO DE GRÃOS DE PIMENTA-PRETA: DESCONTAMINAÇÃO DE *Salmonella*, EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL E CARACTERÍSTICAS DE QUALIDADE.** Orientadora: Leda Rita Dantonino Faroni. Coorientadores: Ernandes Rodrigues de Alencar, Maria Cristina Dantas Vanetti e Alessandra Aparecida Zinato Rodrigues Teixeira.

Os objetivos desse estudo foram: (i) avaliar a eficiência do gás ozônio, aplicado em fluxo e a baixas pressões, na descontaminação de *Salmonella* nos grãos de pimenta-preta; (ii) avaliar o efeito do pré-tratamento ultrassônico associado à hidrodestilação como uma alternativa promissora para a extração do óleo essencial e sua aplicação em amostras de pimenta-preta ozonizadas. Amostras de pimenta-preta contaminadas com um coquetel de *Salmonella* foram expostas ao gás ozônio em fluxo e a baixas pressões nas concentrações de 16 e 60 mg L⁻¹, nas vazões volumétricas de 0,5 e 1,0 L min⁻¹, respectivamente. Para os experimentos com aplicação de ozônio em fluxo foram utilizadas amostras de 1,5 kg e para os experimentos com aplicação de ozônio a baixas pressões foram utilizadas amostras de 3,5 kg de pimenta-preta. Nos experimentos com aplicação de ozônio em fluxo o gás ozônio foi reumedecido passando por uma solução de cloreto de sódio 40 % m/v. As análises microbiológicas e físico-químicas dos grãos foram realizadas depois de 2, 4 e 8 h de exposição ao ozônio em fluxo e de 10, 15 e 20 injeções, respectivamente, para a ozonização a baixa pressão. Na segunda etapa otimizou-se o processo de extração do óleo essencial de pimenta-preta em amostras expostas ao gás ozônio não reumedecido e ao gás ozônio que passou pelo processo de reumedecido por 24, 48, 72 e 96 h de aplicação em fluxo. O método de extração foi otimizado em função do tempo de sonicação, com uma frequência operacional de 40 kHz (20 min) e da massa da amostra (60 g). A qualidade, os compostos bioativos dos grãos e os compostos majoritários do óleo essencial foram determinados. Constatou-se a ausência de *Salmonella* em 25 g da amostra de pimenta-preta ozonizada por 8 h com reumedecimento do gás em solução de cloreto de sódio. Por sua vez, as amostras ozonizadas a baixa pressão registraram uma redução de *Salmonella* de 10³ UFC g⁻¹. Foram identificados os compostos majoritários β-pineno e limoneno e observou-se que a sua composição química não foi alterada pela exposição dos grãos ao ozônio. Foi verificado um aumento do rendimento de extração do óleo essencial nas amostras expostas ao ozônio associado ao processo de reumedecimento do gás e os pontos de mínimo foram atingidos após 69 e 67 h de exposição ao ozônio

para o pH e acidez titulável, respectivamente. Por outro lado, amostras expostas ao gás ozônio não reumedecido, não registraram alterações no seu rendimento de extração e na concentração dos compostos majoritários. Mas, foi verificado o ponto de mínimo após 1 h e 12 min de ozonização para o teor de fenólicos totais.

Palavras-chave: ozônio. ; *piper nigrum*. ; desinfecção microbiológica. ; -pineno e limoneno.

ABSTRACT

MASSANGO, Handina da Graça Lurdes Langa, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2024. **OZONATION OF BLACK PEPPER GRAINS: DECONTAMINATION OF *Salmonella*, EXTRACTION OF ESSENTIAL OIL AND QUALITY CHARACTERISTICS.** Adviser: Leda Rita Dantonino Faroni. Co-advisers: Ernandes Rodrigues de Alencar, Maria Cristina Dantas Vanetti and Alessandra Aparecida Zinato Rodrigues Teixeira.

The objectives of this study were: (i) to evaluate the efficiency of ozone gas, applied in flow and at low pressures, in the decontamination of *Salmonella* in black pepper grains; (ii) to evaluate the effect of ultrasonic pretreatment associated with hydrodistillation as a promising alternative for the extraction of essential oil and its application in ozonated black pepper samples. Black pepper samples contaminated with a *Salmonella* cocktail were exposed to ozone gas in flow and at low pressures at concentrations of 16 and 60 mg L⁻¹, at volumetric flow rates of 0.5 and 1.0 L min⁻¹, respectively. For the experiments with ozone application in flow, 1.5 kg samples were used, and for the experiments with ozone application at low pressure, 3.5 kg samples of black pepper were used. In the experiments with ozone application in flow, the ozone gas was rehumidified by passing through a 40% m/v sodium chloride solution. Microbiological and physicochemical analyses of the grains were performed after 2, 4 and 8 h of exposure to ozone in flow and after 10, 15 and 20 injections, respectively, for ozonation at low pressure. In the second stage, the extraction process of black pepper essential oil was optimized in samples exposed to non-rehumidified ozone gas and to ozone gas that underwent the rehumidification process for 24, 48, 72 and 96 h of in-flow application. The extraction method was optimized according to the sonication time, with an operating frequency of 40 kHz (20 min) and the sample mass (60 g). The quality, bioactive compounds of the grains and the major compounds of the essential oil were determined. The absence of *Salmonella* was verified in 25 g of the black pepper sample ozonated for 8 h with gas rehumidification in sodium chloride solution. In turn, the samples ozonated at low pressure recorded a reduction of *Salmonella* of 10³ CFU g⁻¹. The major compounds β-pinene and limonene were identified and it was observed that their chemical composition was not altered by the exposure of the grains to ozone. An increase in the extraction yield of the essential oil was observed in the samples exposed to ozone associated with the gas rewetting process and the minimum points were reached after 69 and 67 h of exposure to ozone for pH and titratable acidity, respectively. On the other hand, samples exposed to non-rewetted ozone gas did not record changes in their extraction yield and in the

concentration of the major compounds. However, the minimum point was observed after 1 h and 12 min of ozonation for the total phenolic content.

Keywords: ozone.; *piper nigrum*.; microbiological disinfection.; -pinene and limonene

SUMÁRIO

ABSTRACT.....	8
1. INTRODUÇÃO GERAL	13
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	16
Capítulo I	19
RESUMO	20
1. INTRODUÇÃO	21
2. MATERIAL E MÉTODOS	23
2.1. Obtenção e caracterização inicial da matéria-prima	23
2.2. Preparo das amostras de pimenta-preta contaminadas	23
2.2.1. Culturas microbianas e condições de cultivo	23
2.2.2. Preparação do coquetel do inóculo e inoculação da pimenta-preta.....	23
2.3. Aplicação do gás ozônio em fluxo	24
2.4. Aplicação do gás ozônio no sistema fechado a baixas pressões	25
2.5. Análises microbiológicas.....	26
2.5.1. Teste quantitativo para análise de <i>Salmonella</i> e contagem de bactérias mesófilas	26
2.5.2. Teste qualitativo (presença/ausência em 25 g da amostra) para análise de <i>Salmonella</i>	27
2.6. Análise dos compostos bioativos e de qualidade da pimenta-preta	27
2.6.2. Compostos fenólicos totais	28
2.6.3. Atividade antioxidante (DPPH*).....	28
2.8. Acidez total titulável (%).....	29
2.9. Cor	30
2.10. Teor de água	30
2.11. Extração do óleo essencial de pimenta-preta.....	30
2.12. Análises estatísticas	32
3. RESULTADOS	33
3.1. Ozonização em fluxo	33
3.1.1. Desinfecção microbiológica	33
3.2. Aplicação de ozônio em sistema fechado a baixas pressões	35
3.2.1. Desinfecção microbiológica	35
4. DISCUSSÃO	40
4.2. Aplicação de ozônio em sistema fechado a baixas pressões	43
4.2.1. Desinfecção microbiológica	43

4.2.2. Teor de fenólicos totais, capacidade antioxidante pelo método de eliminação do radical DPPH* e análises de qualidade	44
4.3. Rendimento de extração e composição dos constituintes do óleo essencial de pimenta-preta ozonizada em fluxo e em baixa pressão	45
5. CONCLUSÕES	46
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
Capítulo II	52
RESUMO	53
1. INTRODUÇÃO	54
2. MATERIAL E MÉTODOS	56
2.1. Amostragem	56
2.2. Reagentes	56
2.3. Planejamento experimental	56
2.4. Identificação dos componentes químicos (perfil do óleo essencial)	58
2.5. Quantificação dos componentes majoritários	59
2.6. Validação do método para a quantificação dos componentes majoritários	59
2.7. Aplicação do método validado em amostras de pimenta-preta ozonizadas	60
2.8. Análise dos compostos bioativos dos grãos de pimenta-preta	61
2.8.1. Preparo dos extratos de pimenta-preta	61
2.8.2. Determinação do conteúdo fenólico total	61
2.8.3. Determinação da atividade antioxidante (DPPH*)	62
2.9. Acidez titulável e potencial hidrogeniônico	62
2.10. Teor de água	62
2.11. Parâmetros de cor	63
2.12. Análises estatísticas	63
3.2. Rendimento de extração do óleo essencial de pimenta-preta	67
3.3. Identificação dos compostos majoritários	67
3.4. Validação do método analítico	68
3.4.1. Seletividade	68
3.5. Limites de detecção e quantificação do método e linearidade	70
3.6. Precisão do método	71
3.7. Comparação de métodos de detecção	71

3.8. Avaliação da qualidade dos óleos extraídos de amostras ozonizadas (aplicação do método)	72
3.9. Compostos bioativos e análises de qualidade da pimenta-preta	72
4.1. Identificação dos componentes majoritários	76
4.2. Seletividade e linearidade	76
4.3. Comparação de métodos de detecção	77
4.4. Rendimento de extração do óleo essencial de pimenta-preta	77
4.5. Compostos bioativos e análises de qualidades da pimenta-preta	78
5. CONCLUSÕES	80
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

1. INTRODUÇÃO GERAL

A pimenta-preta (*Piper nigrum* L.) é uma das especiarias mais consumidas no mundo, sendo popularmente usada como condimento alimentar (ZHANG, CHI *et al.*, 2021). A sua aceitação está relacionada à sua capacidade de realçar o sabor dos alimentos e seus potenciais benefícios à saúde (UMAPATHY *et al.*, 2024; WEI *et al.*, 2019). As especiarias geralmente têm um baixo teor de água, o que reduz o crescimento microbiano. Contudo, sua contaminação pode ocorrer de forma deliberada, acidental ou natural, contribuindo expressivamente para infecções e surtos alimentares (GURTLER; KELLER, 2019). Os casos de detecção de *Salmonella* na pimenta-preta aumentaram tanto a varejo quanto a granel, o que levou a uma rejeição massiva das exportações (ZHANG, GUODONG *et al.*, 2017).

O gênero *Salmonella* é pertencente ao grupo das bactérias Gram-negativas, não formadoras de esporos, em forma de bastonete e pertencentes à família *Enterobacteriaceae* (VENCIA *et al.*, 2015). Duas espécies são identificadas: *S. enterica*, classificada em seis subespécies e *S. bongori*. *Salmonella enterica* subespécie *enterica* é um patógeno que compreende mais de 2.500 sorovares (GRIMONT e WEILL, 2007; BAKER e DOUGAN, 2007). Pesquisas indicam que alguns sorovares de *Salmonella*, como *S. enterica* sorovar Enteritidis e *S. enterica* sorovar Typhimurium, são causadores de manifestações clínicas em humanos (VENCIA *et al.*, 2015). As bactérias do gênero *Salmonella* são responsáveis por aproximadamente 1 milhão de infecções transmitidas por alimentos (SCALLAN *et al.*, 2011; HOFFMANN *et al.*, 2015). Por esse motivo, há uma necessidade de aprimoramento de técnicas de descontaminação da *Salmonella* nos condimentos, para garantir a segurança alimentar e preservar a qualidade dos alimentos.

A ozonização é uma tecnologia verde em ascensão que utiliza o gás ozônio. O ozônio é uma forma alotrópica do oxigênio e se apresenta na forma gasosa, sendo altamente reativo com um grande poder oxidativo e desinfetante (PANDISELVAM *et al.*, 2020). Ele reage instantaneamente e de forma eficiente em diferentes microrganismos (SIVARANJANI *et al.*, 2021). Devido à sua capacidade oxidante, o gás ozônio é utilizado no setor alimentício para diversas aplicações incluindo a preservação de especiarias (PANDISELVAM *et al.*, 2019). Muitos alimentos como as especiarias são ricos em diferentes classes de compostos bioativos, como polifenóis (KAUR *et al.*, 2022) e óleos essenciais. O consumo de alimentos ricos em compostos bioativos alivia o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares, câncer, diabetes e anormalidades funcionais (SIRIWARDHANA *et al.*, 2013). Por esse motivo, as

aplicações de ingredientes bioativos abrangem os setores farmacêutico e nutracêutico, não se limitando apenas à indústria alimentícia (EHARIYA *et al.*, 2021; ALLAQABAND *et al.*, 2022; M).

Estudos realizados indicam que a influência do ozônio nos compostos fenólicos envolve duas teorias diferentes. Primeiro tem-se a “Teoria do Estresse Oxidativo”, onde ocorre a produção dos compostos fenólicos pelas moléculas de ozônio, devido à desintegração parcial da estrutura celular. Modificações essas que podem aumentar a eficiência de extração e auxiliar na liberação de alguns compostos fenólicos que são limitados no tecido vegetal (ALOTHMAN *et al.*, 2010; SACHADYN-KROL *et al.*, 2016). Enquanto, a segunda teoria sugere que o ozônio induz à variação nas atividades enzimáticas levando às mudanças nos compostos fenólicos (RODONI *et al.*, 2010). Por conseguinte, a concentração final dos compostos fenólicos nos alimentos tratados com ozônio é determinada pelo equilíbrio entre os dois mecanismos (LV; TAHIR; OLSSON, 2019).

Os óleos essenciais, como todos os compostos orgânicos, são constituídos de uma mistura complexa de terpenos, terpenoides, fenilpropanoides e vários compostos de baixo peso molecular (WIŃSKA *et al.*, 2019; NIKKHAH e HASHEMI, 2020; WANI *et al.*, 2021). Óleos essenciais são compostos aromáticos voláteis oleosos e hidrofóbicos altamente concentrados extraídos das raízes, caules, folhas, flores, cascas e sementes de matérias vegetais (PALAZZOLO *et al.*, 2013; HAN *et al.*, 2017; AATI *et al.*, 2022). Os óleos essenciais e seus componentes não só possuem aplicações farmacológicas, como também na indústria de cosméticos, alimentícia e no controle de insetos-pragas e microrganismos (MASSANGO *et al.*, 2017; MOURA *et al.*, 2019; BOLOURI *et al.*, 2022). O odor forte é uma das características evidentes dos óleos essenciais. A qualidade dos óleos essenciais está relacionada com a sua composição química, portanto, o método empregado para a extração não deve influenciar na qualidade (NORA e BORGES, 2017).

Apesar dos recentes estudos sobre a ação antimicrobiana do gás ozônio sobre a pimenta-preta, seu efeito sobre a qualidade dos grãos, uso da hidrodestilação assistida pelo ultrassom para a extração dos óleos essenciais, análise de seus compostos majoritários β -pineno e limoneno, e informações sobre a eficiência do ozônio na eliminação da *Salmonella* são escassas. Deste modo, objetivou-se com essa pesquisa (i) avaliar a eficiência do gás ozônio, aplicado em fluxo e a baixas pressões, na descontaminação de *Salmonella* nos grãos de pimenta-preta; (ii)

avaliar o efeito do pré-tratamento ultrassônico associado à hidrodestilação como uma alternativa promissora para a extração do óleo essencial e sua aplicação em amostras de pimenta-preta ozonizadas.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AATI, H. *et al.* Headspace solid-phase microextraction method for extracting volatile constituents from the different parts of Saudi *Anethum graveolens* L. and their antimicrobial activity. **Heliyon** v. 8, n. 3, p. e09051, 2022.

ALLAQABAND, S. *et al.* Utilization of Fruit Seed-Based Bioactive Compounds for Formulating the Nutraceuticals and Functional Food: A Review. **Frontiers in Nutrition** v. 9, n. May, p. 1–13, 2022.

ALOTHMAN, M. *et al.* Ozone-induced changes of antioxidant capacity of fresh-cut tropical fruits. **Innovative Food Science and Emerging Technologies** v. 11, n. 4, p. 666–671, 2010.

BAKER, S.; DOUGAN, G. The genome of *Salmonella enterica* serovar *typhi*. **Clinical Infectious Diseases** v. 45, n. SUPPL. 1, p. 29–33, 2007.

BOLOURI, P. *et al.* Applications of Essential Oils and Plant Extracts in Different Industries. **Molecules** v. 27, n. 24, p. 1–17, 2022.

DALLA NORA, F.; BORGES, C. Pré-tratamento por ultrassom como alternativa para melhoria da extração de óleos essenciais. **Ciencia Rural** v. 47, n. 9, p. 1–9, 2017.

GRIMONT, P.; WEILL, F. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. **Role of the WHO collaborating centre for reference and research on *Salmonella* (WHOCC-Salm)** v. 9th editio, p. 166, 2007.

GURTLER, J.; KELLER, S. Microbiological safety of dried spices. **Annual Review of Food Science and Technology** v. 10, p. 409–427, 2019.

HAN, F. *et al.* Chemical composition and antioxidant activities of essential oils from different parts of the oregano. **Journal of Zhejiang University: Science B** v. 18, n. 1, p. 79–84, 2017.

KAUR, K. *et al.* Impact of ozone treatment on food polyphenols – A comprehensive review. **Food Control** v. 142, n. January, p. 109207, 2022.

LV, Y.; TAHIR, I.; OLSSON, M. Effect of ozone application on bioactive compounds of apple fruit during short-term cold storage. **Scientia Horticulturae**. [S.l: s.n.], 2019

MEHARIYA, S. *et al.* Microalgae for high-value products: A way towards green nutraceutical and pharmaceutical compounds. **Chemosphere** v. 280, p. 130553, 2021.

MOURA, E. *et al.* Insecticidal activity of *Vanillosmopsis arborea* essential oil and of its major constituent α -bisabolol against *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Chrysomelidae). **Scientific Reports** v. 9, n. 1, p. 1–8, 2019.

NIKKHAH, M.; HASHEMI, M. Boosting antifungal effect of essential oils using combination approach as an efficient strategy to control postharvest spoilage and preserving the jujube fruit quality. **Postharvest Biology and Technology** v. 164, n. March, p. 111159, 2020.

PALAZZOLO, E.; LAUDICINA, V.; GERMANÀ, M. Current and potential use of citrus essential oils. **Current Organic Chemistry** v. 17, p. 3042–3049, 2013.

PANDISELVAM, R. *et al.* Impact of Ozone Treatment on Seed Germination—A Systematic Review. **Ozone: Science and Engineering** v. 42, n. 4, p. 331–346, 2020.

PANDISELVAM, R. *et al.* Ozone based food preservation: a promising green technology for enhanced food safety. **Ozone: Science and Engineering** v. 41, n. 1, p. 17–34, 2019.

RODONI, L. *et al.* Effect of short-Term ozone treatments on tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruit quality and cell wall degradation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v. 58, n. 1, p. 594–599, 2010.

SACHADYN-KRÓL, M. *et al.* Ozone-induced changes in the content of bioactive compounds and enzyme activity during storage of pepper fruits. **Food Chemistry** v. 211, p. 59–67, 2016.

SCALLAN, E. *et al.* Foodborne illness acquired in the United States—Major pathogens. **Emerging Infectious Diseases** v. 17, n. 1, p. 7–15, 2011.

SIRIWARDHANA, N. *et al.* Modulation of adipose tissue inflammation by bioactive food compounds. **Journal of Nutritional Biochemistry** v. 24, n. 4, p. 613–623, 2013.

SIVARANJANI, S. *et al.* Recent advances in applications of ozone in the cereal industry. **Lwt** v. 146, n. March, p. 111412, 2021.

UMAPATHY, V. *et al.* Anticancer Potential of the Principal Constituent of *Piper nigrum*, Piperine: A Comprehensive Review. **Cureus** v. 16, n. 2, p. 1–8, 2024.

VENCIA, W. *et al.* A *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serovar enteritidis foodborne outbreak after consumption of homemade lasagne. **Italian Journal of Food Safety** v. 4, n. 4, p. 195–198, 2015.

WANI, A. *et al.* An updated and comprehensive review of the antiviral potential of essential oils and their chemical constituents with special focus on their mechanism of action against various influenza and coronaviruses. **Microbial Pathogenesis** v. 152, n. November 2020, p. 104620, 2021.

WEI, X. *et al.* Radiofrequency pasteurization process for inactivation of *Salmonella* spp. and *Enterococcus faecium* NRRL B-2354 on ground black pepper. **Food Microbiology** v. 82, p. 388–397, 2019.

WIŃSKA, K. *et al.* Essential oils as antimicrobial agents—myth or real alternative? **Molecules** v. 24, n. 11, p. 1–21, 2019.

ZHANG, C. *et al.* Antioxidant, hepatoprotective and antifungal activities of black pepper (*Piper nigrum* L.) essential oil. **Food Chemistry** v. 346, n. March 2020, p. 128845, 2021.

ZHANG, G. *et al.* Prevalence of *Salmonella* in 11 spices offered for sale from retail establishments and in imported shipments offered for entry to the United States. **Journal of Food Protection** v. 80, n. 11, p. 1791–1805, 2017.

Capítulo I

**EFICIÊNCIA DO OZÔNIO APLICADO EM FLUXO E A BAIXAS PRESSÕES NA
INATIVAÇÃO DE *Salmonella* EM GRÃOS DE PIMENTA-PRETA (*Piper nigrum* L.)**

RESUMO

MASSANGO, Handina da Graça Lurdes Langa, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2024. **Eficiência do ozônio aplicado em fluxo e a baixas pressões na inativação de *Salmonella* em grãos de pimenta-preta.** Orientadora: Lêda Rita D'Antonino Faroni. Coorientadores: Ernandes Rodrigues de Alencar, Maria Cristina Dantas Vanetti e Alessandra Aparecida Zinato Rodrigues.

A contaminação de alimentos por *Salmonella* é um problema de saúde pública e torna o produto impróprio para o consumo. Objetivou-se com esse estudo avaliar a eficiência do gás ozônio (O_3), aplicado em fluxo e a baixas pressões na inativação de *Salmonella* em grãos de pimentapreta. Amostras de pimenta-preta foram contaminadas com um coquetel de quatro sorotipos de *Salmonella*, e submetidas ao processo de ozonização em fluxo e a baixas pressões em câmara hipobárica. No tratamento em fluxo, foi utilizada a concentração de 16 mg L^{-1} de gás ozônio, reumedecido ao passar por uma solução de cloreto de sódio 40% m/v, por 2, 4 e 8 h. Para o tratamento na câmara hipobárica, adotou-se a concentração de entrada de 60 mg L^{-1} de O_3 com 10, 15 e 20 injeções. Também foi avaliado um tratamento controle, que correspondeu a amostras de pimenta-preta contaminadas com *Salmonella* não ozonizadas. Como parâmetros de qualidade foram analisados o teor de fenólicos totais (TFT), antioxidantes (DPPH*), cor, teor de água, potencial hidrogeniônico (pH), acidez total titulável (ATT), rendimento de extração e concentração dos componentes majoritários do óleo essencial. Na ozonização em fluxo por 8 h foi constatada a ausência de *Salmonella* em 25 g do produto. O ozônio aumentou o pH, a ATT, a capacidade antioxidante, a luminosidade (L^*), a saturação de cor (C^*), o TFT e os compostos majoritários em todos os tratamentos. Na ozonização a baixas pressões, foi observada presença de *Salmonella* nas amostras submetidas aos tratamentos estudados, resultando em alteração de diferença de cor (ΔE^*), teor de água, ATT, DPPH*, L^* , C^* , pH, TFT e na concentração dos compostos majoritários do óleo essencial. O rendimento do óleo essencial não foi alterado. A aplicação do ozônio a baixas pressões nas condições testadas, embora tenha reduzido a contaminação com a *Salmonella*, não foi suficiente para eliminar a contaminação. Entretanto, verificou-se que a aplicação do gás ozônio em fluxo foi eficiente na inativação de *Salmonella* nos grãos de pimenta-preta.

Palavras chave: Ozonização; *Piper nigrum*; Desinfecção bacteriana; Óleos essenciais.

1. INTRODUÇÃO

Ervas aromáticas e especiarias constituem uma parte essencial da nutrição humana desde os primórdios da humanidade. Elas têm sido utilizadas há milhares de anos para acentuar o sabor, a cor e o aroma dos alimentos e também são reconhecidas por suas características conservantes e propriedades medicinais (JIANG, 2019; BHAMU e DABI, 2022). A pimenta-preta (*Piper nigrum* L.), também conhecida como “o rei das especiarias” é o condimento de maior importância econômica entre as especiarias comercializadas no mundo (NAIR, 2020). A produção mundial de pimenta-preta varia ao longo do ano em função do período de safra dos principais países produtores (US e SPICES, 2018). O Brasil é o segundo maior produtor e exportador mundial de pimenta-preta, ficando atrás apenas do Vietnã (FAO, 2022).

A pimenta-preta é utilizada principalmente no preparo de alimentos, como também na indústria farmacêutica para produção de cosméticos, perfumes (NAIR, 2020) e como inseticida natural (SINHA e RAY, 2021). Seu uso no preparo de alimentos pode ser uma fonte de contaminação por patógenos, resultando em problemas de saúde para os consumidores (LUCIANA *et al.*, 2017). As contaminações podem ocorrer em função do manejo inadequado durante a colheita, pós-colheita e processamento do produto, interferindo diretamente na qualidade e vida útil dos alimentos onde esse condimento for adicionado (VINHA *et al.*, 2017). Na pós-colheita de pimenta-preta, os grãos também estão sujeitos à contaminações durante a secagem, sendo altamente susceptíveis a contaminações por poeiras, fezes de animais e microrganismos (DHAS e KORINKATHIMATH, 2001; ASTA, 2017; VINHA *et al.*, 2017).

A bactéria *Salmonella* representa uma ameaça para a cadeia produtiva da pimenta-preta e após a contaminação, pode sobreviver por longos períodos em condições de baixa atividade de água (RISTORI I., 2007; KELLER *et al.*, 2013). À medida que a atividade de água reduz, as bactérias do gênero *Salmonella* demonstram resistência térmica crescente, o que torna sua inativação mais difícil (LIU *et al.*, 2018). O gênero *Salmonella* é composto por diversos sorotipos e, é um dos principais patógenos envolvidos em doenças bacterianas em humanos, pela ingestão de alimentos contaminados. A maioria dos sorotipos desse gênero é patogênica ao homem e apresenta diferença de sintomatologia em decorrência da variação no mecanismo de patogenicidade, além da idade e da resposta imune do hospedeiro (SHINOHARA *et al.*, 2008; ENG *et al.*, 2015).

Portanto, para a descontaminação microbiana de condimentos, cujos princípios ativos são suscetíveis ao efeito de temperaturas altas, tem sido utilizado a irradiação gama, que resulta em especiarias limpas e de melhor qualidade (SONG *et al.*, 2014). No entanto, apesar de ser regulamentada em muitos países, a irradiação ainda não encontrou aceitação por parte do consumidor, devido à possibilidade de redução da composição nutricional de alguns alimentos (FARKAS, 2006; SCHWEIGGERT *et al.*, 2007; RAHMATI *et al.*, 2022). Como alternativa, têm sido realizadas investigações científicas para encontrar tratamentos inovadores para a descontaminação microbiana de condimentos, sendo a utilização do gás ozônio uma dessas opções (GIBSON *et al.*, 2019).

O ozônio (O_3) é um poderoso agente oxidante encontrado na natureza (CUERDACORREA *et al.*, 2019; CATTEL *et al.*, 2021). Mesmo quando aplicado em pequenas concentrações é apontado como agente retardador do crescimento de bactérias, fungos filamentosos, leveduras, parasitas e vírus (PANDISELVAM *et al.*, 2019; MOHAMED e BARBARA, 2021). No entanto, pesquisas vêm sendo realizadas com o objetivo de melhorar a tecnologia de aplicação (UZOMA *et al.*, 2024). O ozônio apresenta um tempo de meia-vida de 20 a 50 min na pressão atmosférica (KELLS *et al.*, 2001) e, por esse motivo, sua aplicação em grãos é feita por meio de movimentação forçada do ar (MENDEZ *et al.*, 2002; HARDIN *et al.*, 2010; GRANILLA *et al.*, 2018; UZOMA *et al.*, 2024).

Outra estratégia de aplicação do gás ozônio para o controle de microrganismos seria a aplicação a baixas pressões (SILVA *et al.*, 2022). Efeitos positivos da aplicação do ozônio a baixas pressões já foram estudados em milho de pipoca (*Zea mays everta*) e feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) para o controle de insetos e fungos (SILVA *et al.*, 2022; SITOIE *et al.*, 2024). Portanto, é esperado que ao associar o uso do ozônio com um sistema de aplicação a baixas pressões, ele seja mais estável e atinja maiores níveis de eficácia no controle de bactérias como *Salmonella* principalmente em produtos embalados. Contudo, os efeitos do ozônio aplicado a baixas pressões em pimenta-preta ainda não foram investigados.

Para a utilização do O_3 na descontaminação microbiológica, tanto em fluxo quanto em sistemas de injeção a baixas pressões, seus efeitos sobre a qualidade dos grãos devem ser compreendidos. Portanto, objetivou-se avaliar a eficiência do gás ozônio, aplicado em fluxo e a baixas pressões, na descontaminação de grãos de pimenta-preta contaminados com *Salmonella*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção e caracterização inicial da matéria-prima

A pimenta-preta foi adquirida na Temperart Industria e Comércio de Produtos Alimentícios LTDA em São Paulo, Brasil. Antes da ozonização, foram retiradas amostras e realizada a avaliação de qualidade para caracterização inicial dos grãos. O teor de água dos grãos foi de 9,99 % (b.u), o potencial hidrogeniônico e acidez titulável foram 5,7 e 0,16, respectivamente. No que se refere à cor dos grãos, a luminosidade, diferença de cor e saturação de cor foram, 47,26, 1,98 e 2,23, respectivamente. As amostras para este estudo foram acondicionadas em sacos de polipropileno trançado e armazenadas a temperatura ambiente até à data do início dos experimentos. O armazenamento não alterou a qualidade dos grãos. Foram utilizadas amostras de pimenta-preta do mesmo lote para todos os experimentos realizados.

2.2. Preparo das amostras de pimenta-preta contaminadas

2.2.1. Culturas microbianas e condições de cultivo

Um coquetel de *Salmonella*, composto por quatro culturas de *S. enterica* (*S. Enteritidis* PT4, *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 e *Salmonella* Choleraesuis) foi preparado e utilizado para inocular as amostras de pimenta-preta. A ativação das culturas foi realizada a partir da cultura estoque de cada estirpe mantida a -80°C imediatamente antes de realizar a inoculação das amostras. Um volume de 100 μL de células bacterianas de cada estirpe foi inoculada em tubo de ensaio contendo 3 mL de caldo Triptona Soja (TSB). Os tubos foram incubados por 24 h a 35°C em B.O.D.

2.2.2. Preparação do coquetel do inóculo e inoculação da pimenta-preta

Para a inoculação da pimenta-preta, foram retiradas alíquotas de 1 e 2,5 mL de cada uma das quatro culturas ativas para a inoculação de 10 e 25 g de amostras de pimenta-preta para os testes quantitativos e qualitativos, respectivamente. O inóculo foi uniformemente distribuído nas amostras acondicionadas em sachês de organza. Foram inoculados cerca de 10^6 UFC g^{-1} de pimenta-preta. Para a confirmação da população bacteriana, amostras de pimenta-preta previamente contaminadas com um coquetel de *Salmonella* foi semeada em placas de petri contendo ágar *Salmonella* Shighela e incubadas invertidas por 48 h a 35°C em B.O.D.

2.3. Aplicação do gás ozônio em fluxo

Foi construída uma coluna cilíndrica em policloreto de vinila (PVC) com 0,5 m de comprimento e 0,15 m de largura, para a ozonização em fluxo das amostras de pimenta-preta. Na base da coluna cilíndrica foi colocado uma tela metálica na altura de 0,10 m em relação ao fundo do cilindro para a formação de um *plenum*. A tela metálica tinha como objetivo promover a sustentação dos grãos e realizar a distribuição uniforme do gás ozônio pela coluna de grãos. Na base e no topo da coluna cilíndrica foram instaladas conexões para a entrada e saída do gás ozônio. Amostras de 1,5 kg de grãos de pimenta-preta foram expostas ao gás O_3 na concentração de 16 mg L^{-1} e vazão volumétrica de $0,5 \text{ L min}^{-1}$, por 2, 4 e 8 h. Para ajuste da umidade relativa e reumedecimento, o gás ozônio passou por uma solução saturada de cloreto de sódio 40%, m/v. As condições ideais para a realização do experimento foram determinadas a partir de testes preliminares. Na Figura 1 é apresentado o esquema do procedimento experimental para a aplicação do ozônio em fluxo.

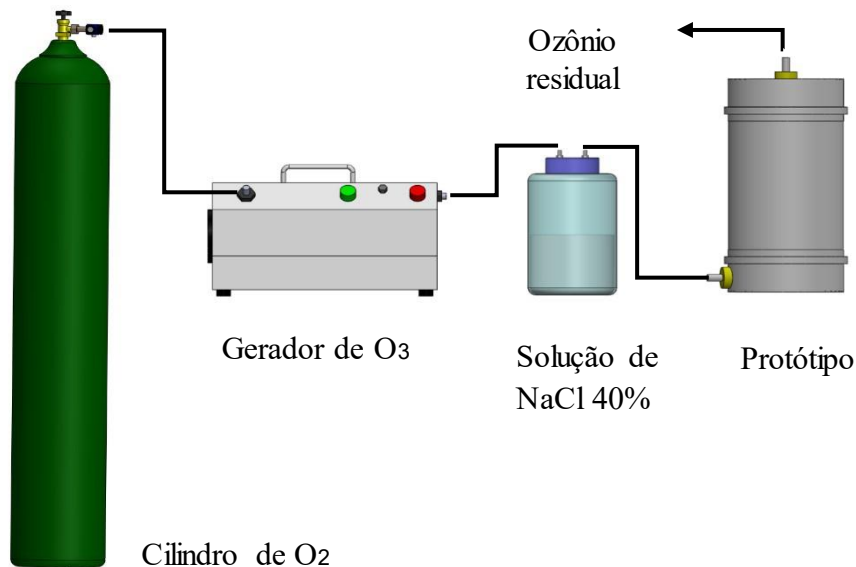


Figura 1. Esquema do procedimento experimental para aplicação do ozônio em fluxo.

O ozônio foi gerado pela técnica de descarga de corona, utilizando um gerador portátil modelo O&L 3.0 RM (Ozone & Life, São José dos Campos, SP, Brasil), alimentado por um cilindro de oxigênio industrial (99,9% de pureza). O ozônio gerado foi quantificado pelo método iodométrico descrito por Rakness *et al.* (1996), que consistiu no borbulhamento do gás ozônio gerado em um frasco erlenmeyer contendo 50 mL da solução de iodeto de potássio 2% e titulado com tiosulfato de sódio ($0,1$ e $0,001 \text{ mol L}^{-1}$).

Foi adotado delineamento inteiramente casualizado (DIC) com três tratamentos (2, 4 e 8 h) e três repetições. Cada repetição foi constituída por três sachês de organza contendo 10 g de pimenta-preta contaminada com *Salmonella* e utilizada no teste quantitativo. Enquanto, para o teste qualitativo da pimenta-preta, foram utilizados 25 g de amostra contaminada por um coquetel de *Salmonella* por sachê. Os sachês de organza contendo amostras contaminadas foram colocados no meio da massa de grãos. Para o tratamento controle, a pimenta-preta foi contaminada com *Salmonella*, após isso, foi deixada em condições ambientais por 2, 4 e 8 h, seguida de análises microbiológicas.

2.4. Aplicação do gás ozônio no sistema fechado a baixas pressões

O ozônio foi obtido através do gerador de ozônio industrial modelo M10i (myOZONE M10i, Jaguariúna, São Paulo, Brasil). O gás foi gerado a partir de oxigênio obtido por um concentrador de oxigênio modelo Mark 5 Plus (NIDEK Medical, Birmingham, Alabama, EUA). Foi utilizada uma câmara hipobárica modelo CV10 (myOZONE, CV10, Jaguariúna, São Paulo, Brasil) com capacidade volumétrica de 70 L (Figura 2) para a ozonização dos grãos de pimenta-preta. Com o auxílio de uma bomba de vácuo modelo VP 260ND (TIPI – Professional Refrigeration, Rio Grande do Sul, Caxias, Brazil) a pressão interna da câmara foi reduzida a 350 hPa. O gás ozônio foi injetado a uma vazão volumétrica de 1,0 L min⁻¹ até atingir a pressão de 1.000 hPa, empregando a metodologia descrita por Silva *et al.* (2022). Foi utilizada uma concentração de entrada de 60 mg L⁻¹, tendo sido adotado um delineamento inteiramente casualizado, com três tratamentos (10, 15 e 20 injeções do gás) e três repetições. As injeções foram realizadas em intervalos regulares de 47 min, tempo necessário para que a pressão de 1.000 hPa no interior da câmara hipobárica fosse atingida. Para o tratamento controle foi utilizada pimenta-preta contaminada e deixada em condições ambientais por 2, 4 e 8 h.

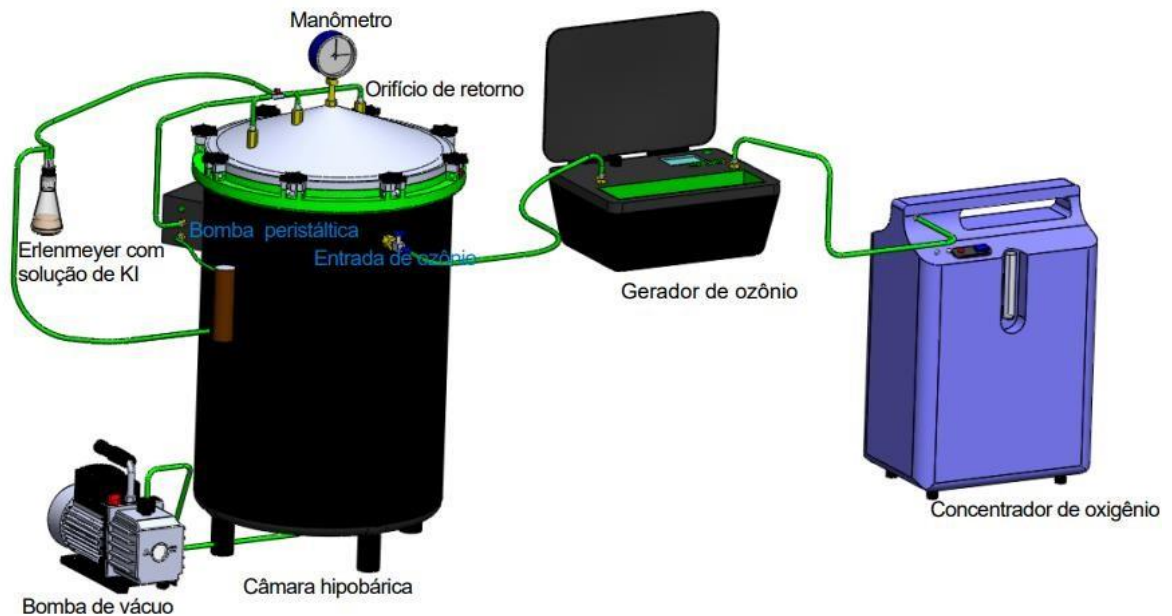


Figura 2. Esquema do procedimento experimental adotado para aplicação do ozônio a baixas pressões.

Foram realizados testes preliminares para determinar o tempo de meia-vida e o tempo necessário para o ozônio atingir a pressão de 1.000 hPa. O tempo de reação do ozônio na massa de grãos foi de 38 min, que correspondia ao tempo de meia-vida do ozônio na pimenta-preta. Para o tratamento com ozônio na câmara hipobárica, uma massa de 3,5 kg de grãos de pimenta-preta foi acondicionada em embalagens de polipropileno trançado (0,15 m x 0,50 m). Sachês de organza contendo 10 g e 25 g de pimenta-preta, contaminada com um coquetel de *Salmonella* foram distribuídas na massa de grãos na base, meio e topo da embalagem.

2.5. Análises microbiológicas

2.5.1. Teste quantitativo para análise de *Salmonella* e contagem de bactérias mesófilas

Amostras de pimenta-preta contaminadas com um coquetel de *Salmonella*, expostas e não expostas ao gás ozônio foram submetidas a análise microbiológica por plaqueamento em profundidade (*Pour-plate*), em duplicata, no meio de cultura *Salmonella Shigella* Ágar (SSA) conforme os critérios da American Public Health Association (APHA) e International Standards Organization (ISO), números 4833-1:2013 e 21527-1/2:2008. As amostras de 10 g de pimenta-preta foram diluídas em 90 mL de solução salina (0,8%) peptonada (0,1%) esterilizada e enriquecida com óleo de milho a 2% (JEAN-GILLES BEAUBRUN *et al.*, 2016), esterilizado por filtração. Em seguida, foram pipetadas alíquotas de 1 mL a partir de cada diluição seriada nas placas de Petri esterilizadas. Foram vertidos sobre as amostras diluídas, cerca de 15 a 20

mL de meio de cultura SSA (para a análise de *Salmonella*) e PCA (Plate Count Agar, Kasvi, Brasil), para a contagem de bactérias mesófilas, fundido e resfriado em banho-maria a 48-50 °C. Após serem agitadas em movimentos circulares para promover a homogeneização e a secagem do meio, as placas foram incubadas de forma invertida em estufa a 35 ± 2 °C por 48 h.

Após o tempo de incubação, foi realizada a contagem do número de colônias com o auxílio de um contador de colônias manual (Phoenix Lufenco CP-608). Para as duplicatas que apresentaram números entre 25 e 300 UFC (para *Salmonella*) e 25 a 250 UFC (para mesófilos), foi feita a média aritmética e multiplicada pelo respectivo fator de diluição e os resultados foram expressos em UFC g⁻¹.

2.5.2. Teste qualitativo (presença/ausência em 25 g da amostra) para análise de *Salmonella*

Para avaliar a presença ou ausência de *Salmonella* na pimenta-preta ozonizada em fluxo e a baixas pressões, foram adicionados assepticamente 25 g da amostra de pimenta-preta contaminada e exposta ao gás ozônio, a 225 mL de TSB. As amostras foram deixadas em repouso à temperatura ambiente por 1 hora, seguidas de incubação em B.O.D. a 37 °C por 24 h. Nenhum ajuste de pH foi realizado. O enriquecimento seletivo e isolamento de *Salmonella* foram realizados transferindo 100 µL da amostra pré-enriquecida para um tubo de ensaio contendo 10 mL de caldo Rappaport Vassiliadis (RV) e 1 mL da mesma amostra foi transferida para um tubo contendo 10 mL de caldo Tetracionato (TT). Ambos foram incubados a 37 °C por 24 h. Após 24 h de incubação, alças cheias de culturas foram semeadas em placas de ágar Xilose-Lisina-Desoxicolato (XLD), Hektoen Enteric e *Salmonella* Shigella (SS). As placas foram incubadas em B.O.D. a 37 °C por 24 h e verificadas quanto à presença de colônias típicas de *Salmonella*.

2.6. Análise dos compostos bioativos e de qualidade da pimenta-preta

Para avaliar os compostos bioativos e a qualidade da pimenta-preta foram utilizadas amostras não contaminadas por *Salmonella*, ozonizadas em fluxo por 2, 4 e 8 h e a baixas pressões por 10, 15 e 20 injeções. Para o tratamento controle foram usados grãos não ozonizados e não contaminados.

2.6.1. Preparo dos extratos de pimenta-preta para os compostos bioativos

Para o preparo dos extratos, foram pesados e identificados 1 g de cada amostra de pimenta-preta triturada e adicionados 20 mL de solução extratora constituída por metanol, água e ácido acético nas proporções de 70, 30 e 5 v/v. A mistura foi agitada em um agitador orbital (Shaker SL – 222) por 20 min a 240 rpm. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 2.000 rpm por 20 min a 25 °C em uma centrífuga para tubos (modelo: 0222TM2, QUIMIS aparelhos científicos LTDA, Diadema – São Paulo – Brasil). O sobrenadante foi reservado em tubos falcon para análises posteriores.

2.6.2. Compostos fenólicos totais

O método Folin-Ciocalteu foi adaptado e utilizado para determinar os compostos fenólicos totais das amostras, conforme descrito por Singleton e Rossi (1965). Foram utilizados 0,6 mL de cada amostra, e adicionados a 3 mL do reagente Folin-Ciocalteu (diluído 1:5). Após 3 min foram adicionados 2,4 mL de carbonato de sódio (Na_2CO_3) a 7,5 %, e a mistura permaneceu em repouso por 60 min em ambiente escuro. As leituras das absorbâncias foram feitas utilizando um espectrofotômetro (Femto – Cirrus 80 ST) a 760 nm de comprimento de onda. A reação foi realizada em sextuplicata. A curva padrão foi obtida utilizando ácido gálico (200 mg L^{-1}). A partir da curva padrão, o teor de fenólicos totais foi determinado, e os resultados foram expressos em mg de ácido gálico 100 g^{-1} da amostra. O cálculo do teor dos compostos fenólicos totais foi feito a partir da Equação 1.

$$\text{TFT (mg de ácido gálico } 100 \text{ g}^{-1} \text{ da amostra)} = \frac{\text{EAG} \times 100}{\text{D.extrato}} \quad (\text{Eq.1})$$

Onde:

TFT – teor de fenólicos totais

EAG – equivalente em ácido gálico (obtido através da curva padrão)

D.extrato – diluição do extrato ou da amostra (gramas)

2.6.3. Atividade antioxidante (DPPH*)

A atividade antioxidante foi determinada pelo método de eliminação do radical livre DPPH* (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), utilizando a metodologia adaptada de Brand-Williams *et al.* (1995). Foram adicionados 150 μL de cada amostra devidamente diluída, em tubos falcon, à 5,850 mL da solução de uso de DPPH*. A mistura permaneceu em repouso por 15 min em

ambiente escuro. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Femto Cirrus 80 ST) em comprimento de onda de 515 nm. O álcool etílico foi utilizado como branco. As análises foram realizadas em sextuplicatas. A curva de calibração foi construída com Trolox ($2 \mu\text{mol L}^{-1}$). Os resultados foram expressos em μM de Trolox Equivalente por grama da amostra (μM de TE g^{-1} da amostra) e a atividade antioxidante foi calculada utilizando a Equação 2.

$$\text{DPPH } (\mu\text{M de TE g}^{-1}\text{ da amostra}) = \frac{[\text{X}] \text{ Trolox } (\mu\text{mol}) \times \text{Volme total do extrato mL}}{\text{Massa da amostra (g)}} \quad (\text{Eq.2})$$

2.7. Potencial Hidrogeniônico (pH)

A aferição de potencial hidrogeniônico foi realizada por imersão de um eletrodo em solução resultante da imersão de 5 g de pimenta-preta em 50 mL de água deionizada ($0,5 \text{ mS m}^{-1}$), deixada em repouso por 30 min à temperatura ambiente e decantada, utilizando um medidor de pH digital portátil (modelo K39-0014PA, Kasvi, São José dos Pinhais, Brasil).

2.8. Acidez total titulável (%)

A acidez total titulável (ATT) expressa em porcentagem, foi determinada pelo método titulométrico com solução de hidróxido de sódio (NaOH $0,1 \text{ mol/L}$) padronizada com biftalato de potássio, segundo as normas do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008). Foram adicionados 50 mL de água destilada a 5 g de grãos inteiros de pimenta-preta. Em seguida, realizou-se a titulação com NaOH $0,1 \text{ mol/L}$, em triplicata, e com o auxílio de um pHmêtro digital portátil (modelo K39-0014PA, Kasvi, São José dos Pinhais, Brasil) mediu-se o pH da pimenta-preta até atingir 8,2. O volume de NaOH gasto na titulação foi usado para fazer o cálculo da acidez total titulável (Equação 3).

$$\text{Ácido cítrico } (\% \text{ } 100\text{g}^{-1}) = \frac{V \times f \times 10}{m} \quad (\text{Eq. 3})$$

Em que:

V – volume de hidróxido de sódio gasto na titulação (mL)

f – fator de correção

m – massa da amostra (g).

2.9. Cor

As medições de cor das amostras foram feitas utilizando um colorímetro (modelo CR – 410, Konica Minolta, Osaka, Japão). A avaliação da cor foi realizada através da reflectância das coordenadas L^* (intensidade de branco e preto), a^* (vermelho e verde) e b^* (amarelo e azul). As amostras foram colocadas em sacos plásticos transparentes. A cor de cada amostra foi medida em quatro locais seleccionados aleatoriamente. A partir dos valores de L^* , a^* e b^* , foram determinadas a diferença de cor (ΔE^*) e a saturação de cor ou chroma (C^*) com base nas equações 4 e 5, respectivamente.

$$\Delta E^* = \sqrt{(L^* - L_0^*)^2 + (a^* - a_0^*)^2 + (b^* - b_0^*)^2} \quad (\text{Eq. 4})$$

$$C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad (\text{Eq. 5})$$

Onde L_0^* , a_0^* , e b_0^* são as coordenadas antes do tratamento com gás ozônio.

2.10. Teor de água

O teor de água dos grãos de pimenta-preta foi determinado pelo método gravimétrico, a $105 \text{ }^\circ\text{C} \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24 h, conforme referenciado pela Association of Official Analytical Chemist (AOAC, 2002). O teor de água foi expresso em base úmida (% b.u.).

2.11. Extração do óleo essencial de pimenta-preta

O óleo essencial de pimenta-preta foi extraído por hidrodestilação. A pimenta-preta exposta ao gás ozônio e não contaminada com *Salmonella*, foi triturada em um liquidificador (modelo OLIQ601, Oster), com o tempo de 2 min. Após a trituração, os grãos foram peneirados em uma peneira de malha de 1,0 mm. Em seguida, 60 g de pimenta-preta e 500 mL de água destilada foram colocados em um balão volumétrico de 1.000 mL conectado ao aparelho Clevenger e aquecidos com manta de aquecimento (Warmnest). Foram realizadas três repetições para cada tratamento. Com o intuito de aumentar a eficiência e reduzir o tempo de extração, foi feito um pré-tratamento com ultrassom (Quimis, modelo Q335D) por 20 min. O tempo de extração foi iniciado quando a primeira gota de óleo essencial foi condensada e colocada no sistema de extração de óleo. Após a extração, o óleo essencial de pimenta-preta foi coletado e armazenado a temperatura de $4 \text{ }^\circ\text{C}$. O rendimento do óleo essencial de pimenta-preta extraído foi calculado pela Equação 6.

$$\text{Rendimento do OE de pimenta-preta (\%)} = \left(\frac{\text{Quantidade de OE obtida (g)}}{\text{Quantidade de pimenta-preta (g)}} \right) \times 100 \quad (\text{Eq.6})$$

Em que:

OE – óleo essencial

2.11.1. Identificação de compostos majoritários do óleo essencial de pimenta-preta

A identificação dos compostos majoritários foi feita por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GCMS-QP2010) usando o cromatógrafo Shimadzu (Kyoto, Japão), com um sistema de injeção automática (AOC-20i, Kyoto, Japão). As condições analíticas otimizadas para a separação cromatográfica dos analitos incluíram uma coluna capilar (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, SH-Rtx-5MS) com fase estacionária composta por 5% de fenila e 95% de dimetilpolissiloxano e hélio como gás de arraste com pureza de 99,999% (White Martins, Rio de Janeiro, Brasil) com fluxo de 1,17 mL min⁻¹. A temperatura inicial da coluna foi de 50 °C, com um aumento de 3 °C min⁻¹ até 150 °C, mantida por 10 min, e aquecida novamente a uma taxa de 20 °C min⁻¹ até atingir temperatura máxima de 260 °C, permanecendo por 10 min. O tempo total de análise foi de 59,83 min.

A temperatura do injetor foi mantida a 220 °C, da interface no detector a 300 °C e nas fontes de ionização a 230 °C. Um volume de 1 µL de amostra diluída em etanol foi injetado no cromatógrafo, usando a razão de split de 1:100. O espectrômetro de massa foi operado no modo SCAN, onde os espectros de massas foram obtidos por impacto de elétrons a 70 eV, com varredura de 35 a 500 (m/z). A identificação dos analitos foi realizada por meio da comparação dos índices de retenção (IR) obtidos pela injeção de padrões de hidrocarbonetos (C₇ a C₄₀), com banco de dados do equipamento (biblioteca NIST-14) e com dados de literatura (Adams, 2007). O percentual relativo de cada composto foi calculado através da razão entre a área cada pico e a área total de todos os constituintes da amostra.

2.11.2. Quantificação dos compostos majoritários do óleo essencial de pimenta-preta

A quantificação dos compostos majoritários do óleo essencial de pimenta-preta foi feita utilizando um cromatógrafo a gás (Shimadzu, modelo GC-2014) equipado com um detetor de ionização de chama (GC-FID). Foram utilizadas as seguintes condições: coluna capilar DB-5 de 30 m, com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e espessura de filme de 0,25

μm (DB-5, Shimadzu, Japão), onde a temperatura inicial do forno foi 45 °C (2 min), com aumento de 30 °C min^{-1} até 260 °C. A temperatura do injetor foi ajustada para 240 °C e do detector para 280 °C. O nitrogênio (Air Products, 99,999 %, Brasil) foi usado como gás de arraste com fluxo de 1,3 mL min^{-1} , com razão de split de 1:50 e tempo total de execução de 13,83 min.

Para o processo de otimização, as amostras dos óleos essenciais foram diluídas por 1000 vezes no solvente etanol. Os compostos foram identificados comparando os tempos de retenção dos picos obtidos para os extratos das amostras com os dos padrões. A concentração do β -pineno e limoneno foi obtida por GC-FID a partir das curvas analíticas de cada analito. A curva analítica de β -pineno e limoneno foi construída utilizando-se concentrações de ambos compostos, que variaram de 10 a 200 mg L^{-1} .

2.12. Análises estatísticas

Aos dados referentes às análises microbiológicas foram analisados com base na estatística descritiva. Os dados dos compostos bioativos, cor, pH, acidez total titulável e teor de água, rendimento de extração e composição do óleo essencial foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e regressão. Os modelos de regressão foram selecionados de acordo com a significância dos coeficientes de regressão, utilizando-se o teste “t” de Student a 5 % de probabilidade e pelo coeficiente de determinação (r^2 ou R^2). Para realizar os procedimentos estatísticos, foi utilizado o programa computacional SAEG versão 9.1 (2007).

3. RESULTADOS

3.1. Ozonização em fluxo

3.1.1. Desinfecção microbiológica

O efeito da exposição ao gás ozônio em fluxo na descontaminação de grãos de pimenta-preta pode ser verificado na Tabela 1. O gás ozônio reumedecido com solução de cloreto de sódio quando aplicado em fluxo reduziu os níveis de contaminação por *Salmonella* nos diferentes tempos de exposição até à sua total descontaminação. A redução de patógenos aumentou com o aumento do tempo de exposição ao gás ozônio, tendo sido constatada a ausência de *Salmonella* em 25 g de pimenta-preta ozonizada por 8 h em fluxo. Por outro lado, nos tempos de exposição de 2 e 4 h o teste qualitativo indicou a presença de *Salmonella* em 25 g da amostra e no teste quantitativo a população de patógenos estava abaixo do limite de detecção ($<1,0$ UFC g^{-1}). Em relação a contagem de bactérias mesófilas observou-se redução de contagem igual a $3,01$ log UFC g^{-1} para o tratamento com exposição por 2 horas e uma redução igual a $2,17$ log UFC g^{-1} para o tratamento com exposição por 8 horas.

Tabela 1. Valores obtidos após o tratamento com gás ozônio umedecido com solução de cloreto de sódio em fluxo nos diferentes tempos de exposição e tratamento controle na descontaminação de *Salmonella* e mesófilos em pimenta-preta.

Tratamentos	Determinação de <i>Salmonella</i>		Contagem de bactérias mesófilas (log UFC g^{-1}) ^a
	Quantitativo (log UFC g^{-1}) ^a	Qualitativo (UFC 25 g^{-1})	
Controle/0 h	$3,87 \pm 0,26$	*	$8,37 \pm 0,02$
Controle/2 h	$4,21 \pm 0,06$	-	$8,38 \pm 0,04$
16 mg L^{-1} /2 h	$< 1,0$	Presente	$5,37 \pm 0,04$
Controle/4 h	$3,13 \pm 0,11$	-	$8,38 \pm 0,06$
16 mg L^{-1} /4 h	$< 1,0$	Presente	$8,23 \pm 0,06$
Controle/8 h	$4,62 \pm 0,07$	-	$8,41 \pm 0,08$
16 mg L^{-1} /8 h	$< 1,0$	Ausente	$6,24 \pm 0,04$

^a Representa a média e o desvio padrão para cada tratamento.

* Análise qualitativa não realizada

3.1.2 Teor de fenólicos totais, atividade de eliminação de radicais DPPH* e análises de qualidade

A Tabela 3 apresenta as equações de regressão ajustadas e os coeficientes de determinação (r^2/R^2) que descrevem o teor de compostos fenólicos totais (mg de ácido gálico 100 g^{-1} da amostra), atividade antioxidante pelo método de eliminação de radicais DPPH* (μM de Trolox), teor de água (%), potencial hidrogeniônico, acidez titulável (%) e cor (ΔE^* , L^* e C^*), nos tratamentos de com gás ozônio aplicado em fluxo. As variáveis que não apresentaram efeitos significativos foram descritas pela média geral. Foi observado efeito linear para o teor de compostos fenólicos totais, potencial hidrogeniônico, acidez titulável e um comportamento descrito por uma função do tipo raiz quadrada para a atividade antioxidante, luminosidade e saturação de cor.

Foram obtidas reduções médias a cada hora de exposição ao ozônio, de 25,475 mg de ácido gálico 100 g^{-1} da amostra dos compostos fenólicos totais. Por outro lado, foi observado um valor de 45,8853 μM de Trolox na atividade antioxidante quando o tempo de ozonização atingiu o ponto crítico de 9 h e 55 min. Enquanto para a luminosidade e saturação de cor os valores de 46,4745 e 1,2836 foram observados quando se atingiu os pontos críticos de 52,26 min e de 4 h e 58 min de ozonização, respectivamente. Porém, a diferença de cor não apresentou variação significativa após o tratamento com ozônio, com média de 2,06.

O tratamento com o ozônio aumentou o potencial hidrogeniônico dos grãos de pimenta-preta em 0,0695 a cada hora de ozonização. Por sua vez, o nível de acidez titulável das amostras também aumentou com o incremento do tempo de exposição dos grãos ao ozônio. Na Tabela 3 é apresentada a matriz de correlação de Pearson entre os parâmetros de qualidade da pimenta-preta. Não é observada correlação significativa entre os parâmetros de qualidade estudados, exceto para o pH e acidez titulável, onde foi verificada uma correlação negativa.

Tabela 2 - Equações de regressão ajustadas do teor de fenólicos totais (TFT), atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical DPPH*, teor de água, potencial hidrogeniônico (pH), acidez total titulável (ATT), luminosidade (L^*), diferença de cor (ΔE^*) e saturação de cor (C^*) em grãos de pimenta-preta ozonizados em fluxo, em função do tempo de exposição (te) e os respectivos coeficientes de determinação (r^2/ R^2).

Variáveis	Tipo do modelo	Equações	r ² / R ²
TFT	Linear	$\hat{y}_i = 1126,65 - 25,475 * te$	0,8916
DPPH*	Raiz quadrada	$\hat{y}_i = 43,7272 + 0,8146 * te^{1/2} - 0,1293^0 te$	0,9952
Teor de água	-	$\hat{y}_i = 10,01$	-
pH	Linear	$\hat{y}_i = 5,6266 + 0,0695 ** te$	0,9697
ATT	Linear	$\hat{y}_i = 0,1507 + 0,0115 ** te$	0,9767
L	Raiz quadrada	$\hat{y}_i = 47,26 - 1,8129 ** te^{1/2} + 0,9713 ** te$	0,9998
ΔE	-	$\hat{y}_i = 2,06$	-
C	Raiz quadrada	$\hat{y}_i = 2,2138 - 0,5379 * te^{1/2} + 0,1206^{\square} te$	0,9212

** Significativo a 1 % de probabilidade pelo teste t, * significativo a 5 % de probabilidade pelo teste t, ^o significativo a 10 % de probabilidade pelo teste t, ^{*} significativo a 15% de probabilidade pelo teste t, [□] significativo a 20 % de probabilidade pelo teste t.

Tabela 3. Matriz de correlação de Pearson entre os parâmetros de qualidade dos grãos de pimenta-preta ozonizados em fluxo

Variáveis	TFT ¹	DPPH ²	Teor de água (%)	pH	ATT (%)	L*	ΔE*	C*
TFT	1,000	-0,130	0,239	0,163	-0,204	-0,373	-0,021	-0,356
DPPH*		1,000	-0,307	-0,477	0,287	-0,024	0,198	-0,325
Teor de água			1,000	-0,412	0,484	0,279	0,386	-0,048
pH				1,000	-0,922*	-0,260	-0,275	-0,117
ATT					1,000	0,251	0,316	0,042
L*						1,000	0,036	0,313
ΔE*							1,000	-0,388
C*								1,000

* Significativo a 5% de probabilidade

¹ Expresso em mg de ácido gálico 100 g⁻¹ da amostra

² Expresso em μM de Trolox

3.2. Aplicação de ozônio em sistema fechado a baixas pressões

3.2.1. Desinfecção microbiológica

A Tabela 4, mostra os resultados do efeito do ozônio na pimenta-preta embalada, quando aplicado a baixas pressões na câmara hipobárica. Estima-se redução maior do que três ciclos log de *Salmonella*, quando o número de injeções foi de 10, sendo que com o aumento para 15 e 20 injeções, observaram-se contagens abaixo do limite de detecção (< 1,0 UFC g⁻¹). No tratamento controle a população de células de *Salmonella* que se conseguiu recuperar pela técnica de contagem em placas foi de 10³ UFC g⁻¹ (Tabela 1). No teste qualitativo, foi observada a presença de *Salmonella* em 25 g das amostras submetidas a todos os números de injeções de

ozônio estudados. Em relação a contagem de bactérias mesófilas, não foi observada nenhuma redução quando o gás ozônio foi aplicado em sistemas de injeção a baixas pressões.

Tabela 4. Valores obtidos após o tratamento com ozônio no sistema fechado de baixa pressão na descontaminação de *Salmonella* e mesófilos em pimenta-preta.

Tratamentos	Determinação de <i>Salmonella</i>		Contagem de bactérias mesófilas (log UFC g ⁻¹) ^a
	Quantitativo (log UFC* g ⁻¹) ^a	Qualitativo (UFC 25 g ⁻¹)	
0 injeções	3,87 ± 0,26	-	8,37 ± 0,02
10 injeções	3,25 ± 0,104	-	8,18 ± 0,11
15 injeções	< 1,0**	Presente	8,30 ± 0,033
20 injeções	< 1,0**	Presente	8,12 ± 0,038

^a - Representa a média e desvio padrão de três repetições. *UFC-unidade formadora de colônia. ** Abaixo do limite de detecção da técnica.

3.2.2 Teor de fenólicos totais, capacidade antioxidante pelo método de eliminação do radical DPPH* e análises de qualidade

As equações de regressão ajustadas e os respectivos coeficientes de determinação (r^2/R^2) que descrevem os comportamentos dos compostos fenólicos totais (mg de ácido gálico 100 g⁻¹ da amostra), atividade antioxidante pelo método DPPH* (μM de Trolox), teor de água (%), potencial hidrogeniônico, acidez total titulável (%) e cor (ΔE , L^* e C^*) da pimenta-preta submetida à ozonização a baixa pressão, são apresentadas na Tabela 5. Foi observado efeito linear para a atividade antioxidante, efeito quadrático na acidez titulável, diferença de cor e saturação de cor e raiz quadrada nas demais variáveis.

O sistema de injeção do ozônio a baixas pressões alterou os compostos bioativos da pimenta-preta, onde, pela equação $\hat{y}_i = 1119,69 - 97,8567* ni^{1/2} + 8,2652^0 ni$ estimou-se que o ponto crítico seria com 35 injeções com uma concentração de 589,3262 μM de Trolox g⁻¹ da amostra de teor de fenólicos totais. Por sua vez, os antioxidantes registraram um incremento médio de 0,1259 μM de Trolox g⁻¹ da amostra à medida em que se aumentou o número de injeções de ozônio na câmara hipobárica. Enquanto, os valores de teor de água, potencial hidrogeniônico e acidez titulável, foram de 14,2765 %, 4,7565 e 0,2456 %, quando os pontos de mínimo foram estimados em 30, 10 e 11 injeções de ozônio, respectivamente.

Por outro lado, a cor (luminosidade, diferença de cor e saturação de cor) apresentou valores de 46,0474; 2,4079 e 1,4201, nos pontos de mínimo de 2, 8 e 0,002 injeções, respectivamente. A Tabela 6 indica que houve uma correlação positiva entre os antioxidantes pelo método de sequestro do radical DPPH e o teor de água (0,906), teor de água e acidez titulável (0,708) e correlação negativa entre os antioxidantes pelo método de sequestro do radical DPPH e o pH (-0,753), teor de água e pH (-0,917) e entre pH e acidez titulável (-0,842). As demais variáveis avaliadas não se correlacionaram significativamente.

Tabela 5. Equações de regressão ajustadas de teor de fenólicos totais (TFT), antioxidantes pelo método de sequestro do radical DPPH*, teor de água, potencial hidrogeniônico (pH), acidez total titulável (ATT), luminosidade (L*), diferença de cor (ΔE^*) e saturação de cor (C*) em grãos de pimenta-preta embalados, ozonizados num sistema fechado de baixa pressão, em função do número de injeções (ni) e os respectivos coeficientes de determinação (r^2/R^2).

Variáveis	Modelo	Equações	r^2/R^2
TFT	Raiz quadrada	$\hat{y}_i = 1119,69 - 97,8567^* ni^{1/2} + 8,2652^0 ni$	0,9992
DPPH*	Linear	$\hat{y}_i = 55,5732 + 0,1259^{**} ni$	0,9922
Teor de água	Raiz quadrada	$\hat{y}_i = 9,9903 + 0,8536^{**} ni^{1/2} - 0,0773^* ni$	0,9999
pH	Raiz quadrada	$\hat{y}_i = 5,6652 - 0,3431^0 ni^{1/2} + 0,0545^0 ni$	0,9835
ATT	Quadrático	$\hat{y}_i = 0,1565 + 0,0158^{**} ni - 0,0007^{**} ni^2$	0,9996
L*	Raiz quadrada	$\hat{y}_i = 47,2132 - 1,2412^0 ni^{1/2} + 0,4312^0 ni$	0,5762
ΔE^*	Quadrático	$\hat{y}_i = 1,9399 + 0,1185^0 ni - 0,0075^0 ni^2$	0,7379
C*	Quadrático	$\hat{y}_i = 2,2280 - 0,0557^* ni + 0,0009^* ni^2$	0,9993

** Significativo a 1 % de probabilidade pelo teste t, * significativo a 5 % de probabilidade pelo teste t, ⁰ significativo a 10 % de probabilidade pelo teste t.

Tabela 6. Matriz de correlação de Pearson entre os parâmetros de qualidade dos grãos de pimenta-preta ozonizado a baixa pressão

Variáveis	TFT	DPPH*	Teor de água (%)	pH	ATT (%)	L	ΔE	C
TFT	1,000	0,182	0,304	-0,135	0,271	-0,330	0,224	-0,491
DPPH*		1,000	0,906*	-0,753*	0,479	0,457	-0,029	-0,031
Teor de água (%)			1,000	-0,917*	0,708*	0,353	-0,100	0,002
pH				1,000	-0,842*	-0,236	0,040	-0,126
ATT (%)					1,000	0,174	0,081	0,038
L						1,000	-0,370	0,384
ΔE							1,000	-0,353

C

1,000

* Significativo a 5% de probabilidade

¹ Expresso em mg de ácido gálico 100 g⁻¹ da amostra² Expresso em µM de Trolox

3.3. Rendimento de extração e composição dos constituintes do óleo essencial de pimenta-preta ozonizada em fluxo e a baixas pressões

Os comportamentos observados de rendimento do óleo essencial e quantificação de β-pineno e limoneno, são descritos pela Tabela 5, que apresenta as equações de regressão e os coeficientes de determinação (R^2). As variáveis que não apresentaram efeitos significativos do número de injeções foram descritas pela média geral. Os resultados mostram que o rendimento do óleo essencial de pimenta-preta ozonizada em fluxo e a baixas pressões não foi influenciado significativamente ($P > 0,05$) pelo tratamento com ozônio. Isto indica que não houve interferência dos tempos de ozonização (2, 4 e 8 h) e do número de injeções (10, 15 e 20 injeções) no rendimento de extração do óleo essencial.

Da mesma forma, na composição dos constituintes principais do óleo essencial de pimenta-preta não foram observadas alterações significativas ($P > 0,05$) pelo tratamento dos grãos em fluxo. Por outro lado, o tratamento da pimenta-preta na câmara hipobárica alterou a composição química dos componentes β-pineno e limoneno, observando-se efeito raiz quadrada e quadrático respectivamente. Por sua vez, a exposição dos grãos de pimenta-preta ao gás ozônio por 2, 4 e 8 h, não apresentou diferenças significativas ($P > 0,05$) para o rendimento do óleo essencial de pimenta-preta (Tabela 5). Foram observados valores médios de rendimento de extração, β-pineno e limoneno, de 0,7368, 117,99 e 90,34, respectivamente.

Tabela 7. Equações ajustadas do rendimento de extração, β-pineno e limoneno do óleo essencial de pimenta-preta ozonizada em fluxo e a baixas pressões, em função do tempo de exposição, do número de injeções e os respectivos coeficientes de determinação (R^2).

Variáveis	Modelo	Equações	R ²
Fluxo			
Rendimento	-	$\hat{y}_i = 0,7368$	-
β-pineno	-	$\hat{y}_i = 117,99$	-
Limoneno	-	$\hat{y}_i = 90,34$	-
Câmara hipobárica			
Rendimento	-	$\hat{y}_i = 0,7868$	-

β -pineno	Raíz quadrada	$\hat{y}_i = 131,08 - 29,2906^0 T^{1/2} + 4,9403^0 T$	0,9058
Limoneno	Quadrático	$\hat{y}_i = 97,9042 - 5,587 * T + 0,2651 * T^2$	0,9887

Significativo a 5 % de probabilidade pelo teste t, ⁰ significativo a 10 % de probabilidade pelo teste t.

4. DISCUSSÃO

4.1. Ozonização em fluxo

4.1.1. Desinfecção microbiológica

A eficácia do ozônio em fluxo, durante 8 horas, na descontaminação dos grãos de pimenta-preta contaminados com *Salmonella* pode estar associada ao uso da solução de cloreto de sódio para umedecimento do gás durante o processo de ozonização e ao tempo de exposição dos grãos. A presença da solução de cloreto de sódio reumedecendo o gás evitou o ressecamento dos grãos, tendo mantido o teor de água em 10,01 %, durante o tratamento, sem comprometer o teor de água ideal para o armazenamento, tornando a *Salmonella* mais suscetível ao tratamento (GRUZDEV; PINTO; SELA, 2011). Além disso, a solução de cloreto de sódio pode ter melhorado a solubilidade e aumentado a reatividade do ozônio, o que facilitou a sua penetração causando a ruptura da membrana celular e levando à morte bacteriana.

Pesquisas apontam que a inativação microbiana por ozônio envolve dois mecanismos. Primeiro ocorre a oxidação sulfidrílica de grupos de aminoácidos de enzimas, em seguida ocorre a oxidação de ácidos graxos polinsaturados da parede celular (PANDISELVAM *et al.*, 2017; AFSAH-HEJRI *et al.*, 2020). É importante salientar que outros estudos mencionam outros modos de ação indicando que o ozônio pode influenciar na polaridade global da superfície bacteriana (FENG *et al.*, 2018) e envolvendo mecanismos de peroxidação lipídica (GIRGIN *et al.*, 2019). A eficiência do uso da solução salina no reumedecimento do gás ozônio durante a inativação de *Salmonella*, pode estar relacionada ao fato de o gás ozônio reumedecido não reduzir o teor de água das amostras de pimenta.

O processo de geração do gás ozônio por descarga de barreira dielétrica requer uma fonte de ar livre de umidade e rica em oxigênio. Associado a isto, em função das descargas elétricas que ocorrem para a formação do ozônio existe ainda um aumento na temperatura do gás (JODZIS e BARCZYŃSKI, 2019). Estes fatores podem contribuir para que o gás ozônio apresente um potencial de secagem. Portanto, o reumedecimento permite controlar a umidade relativa de aplicação do gás ozônio e atingir maiores níveis de eficiência. Ao controlar a umidade relativa de aplicação, o gás não altera o teor de água dos grãos.

Como já foi evidenciado por outros autores, o gás ozônio aplicado em produtos com maiores teores de água apresenta maiores níveis de eficiência em relação a descontaminação microbiológica (ZHAO e CRANSTON, 1995; RAILA *et al.*, 2006 e QI *et al.*, 2016). Zhao e

Cranston (1995) observaram uma redução de 3 ciclos log em grãos de pimenta-preta umedecidos antes do tratamento com o ozônio. Estes autores relataram que quanto maior foi o teor de água dos grãos, maior foi a redução de *Salmonella*. O aumento do teor de água dos grãos, umidade relativa e temperatura de tratamento tende a promover a morte microbiana pelo gás ozônio (WU *et al.*, 2006). Isto porque, existe uma correlação positiva entre o aumento da umidade relativa e a toxicidade do gás ozônio (OZKAN *et al.*, 2011).

A redução de cerca de 99,9 a 99,99 % no número de *Salmonella* inoculada na pimenta-preta observada com o tratamento com gás ozônio umedecido com cloreto de sódio em fluxo, por 2, 4 e 8 h, demonstra a efetividade do método para a desinfecção deste grão contaminado por este patógeno. Valores aproximados de redução foram encontrados utilizando outros métodos de desinfecção. Gabriel *et al.* (2020) verificaram uma redução de 99,86 % de *Salmonella enterica* em grãos de pimenta-preta irradiados com UV-C. Song e Kang (2022) relataram uma redução de 4,52 log UFC g⁻¹ (99,99 %) ao descontaminarem pimenta-preta e pimenta vermelha contaminadas com *Salmonella* Typhimurium utilizando o vapor de peróxido de hidrogênio.

Kim *et al.* (2023) em seu estudo ao empregarem métodos combinados de radiação ultravioleta de lâmpada de amálgama a vácuo e o aquecimento por radiação infravermelha próxima na descontaminação de pimenta-preta contaminada com *Escherchia coli* O157:H7 e *Salmonella enterica* sorovar Thyphimurium, observaram uma redução de mais de 5 log (99,999 %). Entretanto, com a utilização de ozônio, os valores de redução no número de células de *Salmonella* encontrados foram menores. Foi relatada redução de 1,57 e 1,66 log (97 %) em pimenta-vermelha tratada com ozônio gasoso de alta concentração curto tempo de exposição e baixa concentração longo tempo de exposição, respectivamente, sobre a população do patógeno e a concentração de aflatoxina B₁, respectivamente (OZEL e KARACA, 2024). Por sua vez, El Darra *et al.* (2021) observaram a ausência de *Salmonella* em 25 g de pimenta-preta tratada com ozônio aplicado em leito fluidizado.

4.1.2. Teor de fenólicos totais, atividade de eliminação de radicais DPPH* e análises de qualidade de pimenta-preta ozonizada

Os compostos fenólicos possuem atividade antioxidante e propriedades anti-inflamatórias, anticancerígenas, antimicrobianas, antitumorais e antiúlceras (ALENISAN *et al.*, 2017). Portanto, os compostos fenólicos nas plantas podem atuar como antioxidantes. Alothman

et al. (2010) relataram uma redução do teor de compostos fenólicos totais no tratamento controle em frutas tropicais frescas cortadas, de $178,51 \pm 3,60$ mg EAG 100 g^{-1} para $167,96 \pm 0,12$ mg GAE 100 g^{-1} , $145,78 \pm 0,12$ mg GAE 100 g^{-1} e $96,51 \pm 0,12$ mg EAG 100 g^{-1} após 10, 20 e 30 min de exposição ao ozônio, respectivamente. Por outro lado, Nagy *et al.* (2015), ao estudarem os compostos fenólicos de diversas especiarias incluindo a pimenta-preta, observaram concentração de 338 mg EAG 100 g^{-1} da amostra de fenólicos totais na pimenta sem aplicação de nenhum tratamento.

Por sua vez, Shelake *et al.*, (2023) observaram um aumento do teor de fenólicos totais em bulbos de cebola de $57,71 \pm 0,09$ mg EAG 100 g^{-1} (controle) para $59,98 \pm 0,12$ mg EAG 100 g^{-1} na amostra tratada com ozônio gasoso numa concentração de 400 ppm. Os mesmos autores, verificaram que a exposição dos bulbos a concentrações de ozônio de 600 e 900 ppm levou à degradação dos compostos fenólicos. Fato que pode ser atribuído à capacidade que o ozônio tem de promover a produção de vários radicais livres, como radicais hidroxil, hidroxil e superóxido (HOIGNÉ; BADER, 1983), que eliminam os compostos fenólicos dos produtos básicos, quando aplicado em concentrações elevadas (ALOTHMAN *et al.*, 2010).

Resultados similares aos deste estudo foram observados por Liu *et al.*, (2021), tendo verificado que a exposição do alho a 5 ppm de ozônio por 15 min, induziu a um aumento da acidez total titulável para 13,87% após 10 dias de armazenamento em comparação com o controle (12,38%). A acidez é um parâmetro fundamental na conservação de produtos alimentares, pois quando ocorre um processo de decomposição do mesmo por hidrólise, fermentação ou oxidação, a alteração é quase sempre notada na concentração de íons de hidrogênio (IAL, 2003).

A perda da cor em pimenta-preta durante o processo de descontaminação é um fator importante para a aceitação dos grãos pelo consumidor (DOGU-BAYKUT e GUNES, 2022). Neste estudo foram observados valores de 46,4745 e 1,2836 nos pontos de mínimo de 52,26 min e 4 h e 58 min de exposição ao gás ozônio, para a luminosidade e saturação de cor, respectivamente. Resultados contrários foram encontrados por Wang *et al.* (2016) que ao avaliarem a cor da farinha de trigo tratada com ozônio, observaram um incremento do valor da luminosidade de $93,64 \pm 0,12$ (tratamento controle) para $94,25 \pm 0,02$ após 30 min de ozonização da farinha de trigo. Por outro lado, Sharma *et al.* (2022), ao trabalharem com farinha de milheto rabo-de-raposa (*Setaria italica*), observaram que houve um incremento do brilho

com o aumento do tempo de ozonização. A cor mais clara das amostras de pimenta-preta tratadas com ozônio pode ser atribuída à ação branqueadora do ozônio, devido ao seu potencial de atuar como um forte oxidante. Por sua vez, Dogu-Baykut e Gunes (2022) não verificaram diferenças significativas nos valores de luminosidade em pimenta-preta tratada com ozônio.

Neste estudo, o teor de água de 10,01 % observado em grãos de pimenta-preta, para todos os tratamentos, encontra-se abaixo do máximo permitido pela Instrução Normativa nº 10, de 15 de maio de 2006 (BRASIL, 2006), que estabelece 14% como valor máximo de umidade aceitável em pimenta-preta. Este teor de água, não favorece o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis que possam ocasionar futuras contaminações, que coloquem em risco a saúde do consumidor. O teor de água não altera somente a qualidade, como também a segurança da pimenta-preta, pois a resistência e a atividade microbiana variam com a atividade da água (WEI *et al.*, 2019).

4.2. Aplicação de ozônio em sistema fechado a baixas pressões

4.2.1. Desinfecção microbiológica

A injeção de ozônio a baixas pressões é uma técnica que vem sendo estudada para o tratamento e descontaminação microbiológica em produtos embalados (SILVA *et al.*, 2022; SITOE *et al.*, 2023). Não há registros de pesquisas relatando a eficiência do ozônio no controle de bactérias quando aplicado em sistemas de injeção a baixas pressões em produtos embalados. O presente trabalho é o primeiro a apresentar resultados sobre o efeito do tratamento com ozônio em câmara hipobárica na descontaminação de *Salmonella* em pimenta-preta. Foi observado que a partir de 15 injeções houve uma redução expressiva nas contagens de *Salmonella* pelo teste quantitativo (Tabela 4). A população de patógenos esteve abaixo do limite de detecção pela técnica de plaqueamento por *pour plate*. O número baixo de células sobreviventes pode ter sido resultante do aumento da concentração do gás no interior da massa de grãos. Apesar das reduções observadas no teste quantitativo, o teste qualitativo indicou presença de *Salmonella* em 25 g de amostra mesmo quando foram adotadas 20 injeções (Tabela 4).

Para atingir maiores níveis de eficiência e estabelecer uma condição de ausência de contaminação por *Salmonella* em 25 g da amostra, sugere-se a utilização de um maior número de injeções e uma maior redução da pressão interna da câmara hipobárica. Neste trabalho, a pressão interna da câmara foi reduzida para 350 hPa, entretanto Silva *et al.* (2022) quando

investigaram a ação do ozônio injetado a baixas pressões no controle de *Sitophilus zeamais* em milho de pipoca reduziram a pressão interna da câmara para 250 hPa. Quanto maior o gradiente de pressão estabelecido entre o ponto de injeção de gás ozônio e o interior da câmara hipobárica, maiores níveis de concentração serão atingidos no interior da embalagem e conseqüentemente maior será a eficiência do tratamento. A grande vantagem do tratamento com injeção de ozônio a baixas pressões se refere a possibilidade de tratar produtos embalados sem manipulação. Esta pode ser uma estratégia de aplicação em centros de distribuição onde os produtos já se encontram embalados. Neste contexto, esta estratégia de aplicação necessita de mais investigações científicas para o aprimoramento desta tecnologia na descontaminação microbiológica de condimentos.

4.2.2. Teor de fenólicos totais, capacidade antioxidante pelo método de eliminação do radical DPPH* e análises de qualidade

O aumento no teor de fenólicos totais e nos antioxidantes pode ser atribuído à capacidade que o gás ozônio tem de quebrar ligações covalentes presentes e liberar antioxidantes e polifenóis de polímeros (OBADI *et al.*, 2018). Os antioxidantes têm uma grande importância na neutralização dos radicais livres que levam à deterioração das moléculas biológicas (BOATENG *et al.*, 2008).

Foi observado um aumento no teor de água que pode ser explicado pelo fato de que todo o gás que foi injetado na câmara hipobárica permaneceu em seu interior, fato que evitou a perda de umidade dos grãos (SILVA *et al.*, 2022). A ausência de perda de umidade também foi observada em outros estudos, como no tratamento de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L.), milho (*Zea mays* L.), arroz em casca (*Oryza sativa*), arroz polido e milho pipoca (*Zea mays everta*) tratados com ozônio aplicado em baixas pressões (SILVA *et al.*, 2022; SITO E *et al.*, 2023).

Verificou-se um aumento da luminosidade e saturação de cor com o aumento do número de injeções. Enquanto a diferença de cor registrou uma redução a cada injeção de ozônio na câmara hipobárica. Este resultado contraria aos achados na literatura, que indicaram não ter havido alteração na diferença de cor de grãos de feijão comum, feijão-caupi, milho, arroz em casca, arroz polido e em milho pipoca embalados e expostos ao gás ozônio (SILVA *et al.*, 2022; SITO E *et al.*, 2023).

4.3. Rendimento de extração e composição dos constituintes do óleo essencial de pimenta-preta ozonizada em fluxo e em baixa pressão

Neste estudo, o processo de hidrodestilação com o ultrassom (20 min) como pré-tratamento, antecedido pela utilização do ozônio como agente oxidante, não foram suficientes para promover a quebra das glândulas que contém os óleos essenciais localizadas no exocarpo do grão, e consequentemente, não favoreceu à liberação dos compostos voláteis.

O tratamento da pimenta-preta na câmara hipobárica não interferiu no rendimento de extração do óleo essencial, mas alterou a composição química dos componentes β -pineno e limoneno. Esta alteração pode ter sido causada pelo fato de o ozônio possuir uma grande capacidade oxidativa, que contribuiu para a degradação dos componentes majoritários do óleo essencial. Ouf e Ali (2021) em seu estudo, observaram um aumento do principal constituinte biologicamente ativo atribuído às propriedades médicas da flor de camomila e uma degradação por oxidação em compostos de baixo peso molecular da hortelã-pimenta, após a exposição a 3 ppm de ozônio por 280 min. Além disso, Zhao e Cranston (1995) apontaram que o tratamento com ozônio em pimenta-preta triturada levou a uma pequena oxidação dos constituintes voláteis do óleo essencial. O ozônio influenciou os constituintes voláteis do óleo extraído, tendo alterado cerca de 8,33 % para β -pineno e 3,05 % para limoneno.

Na presente pesquisa, a ozonização em fluxo com umedecimento do gás ozônio com o uso da solução de cloreto de sódio mostrou-se eficiente, pois evitou a perda de água da pimenta-preta, apresentando desempenho superior tanto na descontaminação quanto na preservação dos atributos físicos-químicos dos grãos. Por outro lado, a aplicação do ozônio a baixas pressões não foi eficiente na inativação da *Salmonella* nos grãos de pimenta-preta.

5. CONCLUSÕES

O tratamento da pimenta-preta com gás ozônio reumedecido com solução de cloreto de sódio em fluxo, por 8 h, demonstrou ser a condição de aplicação mais eficiente para a descontaminação de pimenta-preta contaminada com *Salmonella* e para a preservação da qualidade físico-química dos grãos. Nas condições testadas, o sistema de injeção a baixas pressões apesar de ter atingido reduções nas contagens de bactérias, não atingiu a condição de ausência de contaminação por *Salmonella* em 25 g de amostra.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFSAH-HEJRI, L.; HAJEB, P.; EHSANI, R. Application of ozone for degradation of mycotoxins in food: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety** v. 19, n. 4, p. 1777–1808, 2020.

ALENISAN, M. *et al.* Antioxidant properties of dairy products fortified with natural additives: A review. **Journal of the Association of Arab Universities for Basic and Applied Sciences** v. 24, p. 101–106, 2017.

ALOTHMAN, M. *et al.* Ozone-induced changes of antioxidant capacity of fresh-cut tropical fruits. **Innovative Food Science and Emerging Technologies** v. 11, n. 4, p. 666–671, 2010.

ASTA. Guidance from the American Spice Trade Association. p. 12, 2017.

BHAMU, P.; DABI, S. **Indian Spices**. [S.l: s.n.], 2022. 19–51 p.

BOATENG, J. *et al.* Effect of processing on antioxidant contents in selected dry beans (*Phaseolus* spp. L.). **Lwt** v. 41, n. 9, p. 1541–1547, 2008.

BOLOURI, P. *et al.* Applications of Essential Oils and Plant Extracts in Different Industries. **Molecules** v. 27, n. 24, p. 1–17, 2022.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology** v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento BINAGRI SISLEGIS. p. 9, 2006.

CATTEL, F. *et al.* Ozone therapy in COVID-19: A narrative review. **Virus Research** v. 291, n. August 2020, p. 198207, 2021.

CUERDA-CORREA, E.; ALEXANDRE-FRANCO, M.; FERN, C. Antibiotics from Water. An Overview. **Water** v. 12, p. 102, 2019.

DHAS, P.; KORINKATHIMATH, V. Processing and quality of black pepper. **Journal of Spices and Aromatic Crops**. [S.l: s.n.]. 2001.

DOGU-BAYKUT, E.; GUNES, G. Effect of Ultraviolet (Uv-C) Light and Gaseous Ozone on Microbial and Color Qualities of Whole Black Pepper Seeds (*Piper nigrum* L.). **Carpathian Journal of Food Science and Technology** v. 14, n. 2, p. 122–131, 2022.

EL DARRA, N. *et al.* Decontamination of *Escherichia coli* on dried onion flakes and black pepper using Infra-red, ultraviolet and ozone hurdle technologies. **Heliyon** v. 7, n. 6, p. e07259, 2021.

ENG, S. *et al.* *Salmonella*: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. **Frontiers in Life Science** v. 8, n. 3, p. 284–293, 2015.

FENG, L. *et al.* Inactivation of *Vibrio parahaemolyticus* by aqueous ozones. **Journal of Microbiology and Biotechnology** v. 28, n. 8, p. 1233–1246, 2018.

GABRIEL, A. *et al.* Decontamination of dried whole black peppercorns using ultraviolet-c irradiation. **Food Microbiology** v. 88, n. June 2019, p. 103401, 2020.

GIBSON, K. *et al.* Inactivation of bacteria on fresh produce by batch wash ozone sanitation. **Food Control** v. 106, n. May, p. 106747, 2019.

GIRGIN ERSOY, Z.; BARISCI, S.; DINC, O. Mechanisms of the *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* inactivation by ozone. **Lwt** v. 100, n. August 2018, p. 306–313, 2019.

GRANELLA, S. *et al.* Effect of drying and ozonation process on naturally contaminated wheat seeds. **Journal of Cereal Science** v. 80, p. 205–211, 2018.

HARDIN, J. *et al.* Ozone fumigation of stored grain; closed-loop recirculation and the rate of ozone consumption. **Journal of Stored Products Research** v. 46, n. 3, p. 149–154, 2010.

ISO - International Standard Organization, 4833-1:2013. Microbiology of the food chain. Horizontal method for the enumeration of micro-organisms. Part 1: Colony count at 30 degrees C by the pour plate technique. 2013.

ISO - International Standard Organization, 21527-1:2008. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of yeasts and molds. Part 1: Colony count technique in products with water activity greater than 0,95. 2008.

JEAN-GILLES BEAUBRUN, J. *et al.* Evaluation of corn oil as an additive in the pre-enrichment step to increase recovery of *Salmonella enterica* from oregano. **Food Microbiology** v. 57, p. 195–203, 2016.

JIANG, T. Health benefits of culinary herbs and spices. **Journal of AOAC International** v. 102, n. 2, p. 395–411, 2019.

JODZIS, S.; BARCZYŃSKI, T. Ozone synthesis and decomposition in oxygen-fed pulsed DBD system: effect of ozone concentration, power density, and residence time. **Ozone: Science & Engineering**, 41(1), 69-79, 2019.

KELLER, S. *et al.* Growth and survival of *Salmonella* in ground black pepper (*Piper nigrum*). **Food Microbiology** v. 34, n. 1, p. 182–188, 2013.

KELLS, S. *et al.* Efficacy and fumigation characteristics of ozone.pdf. v. 37, p. 371–382, 2001.

KIM, Y.; LEE, J.; KANG, D. Simultaneous vacuum ultra violet-amalgam lamp radiation and near-infrared radiation heating for a synergistic bactericidal effect against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* in black peppercorn. **Food Research International** v. 169, n. March, p. 112827, 2023.

LIMA, J. Instituto Adolfo Lutz. **Revista do Instituto Adolfo Lutz** v. 1, n. 1, p. 5–20, 1941.

- LIU, H. *et al.* Effects of different ozone treatments on the storage quality and stability of fresh peeled garlic. **RSC Advances** v. 11, n. 37, p. 22530–22543, 2021.
- LIU, S. *et al.* *Enterococcus faecium* as a *Salmonella* surrogate in the thermal processing of wheat flour: Influence of water activity at high temperatures. **Food Microbiology** v. 74, p. 92–99, 2018.
- LUCIANA, M. *et al.* 530 2017. n. October 2019, p. 530–543, 2017.
- MCDONOUGH, Marissa X. *et al.* Ozone application in a modified screw conveyor to treat grain for insect pests, fungal contaminants, and mycotoxins. **Journal of Stored Products Research** v. 47, n. 3, p. 249–254, 2011.
- MOHAMED, Z.; BARBARA, R. Inactivation of microbes by ozone in the food industry: A review. **African Journal of Food Science** v. 15, n. 3, p. 113–120, 2021.
- NAGY, M. *et al.* Determination of Total Phenolics, Antioxidant Capacity and Antimicrobial Activity of Selected Aromatic Spices. **Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Food Science and Technology** v. 72, n. 1, 2015.
- NAIR, K. **The Geography of Black Pepper (*Piper nigrum*)**. [S.l: s.n.], 2020.
- OBADI, M. *et al.* Characterization of oil extracted from whole grain flour treated with ozone gas. **Journal of Cereal Science** v. 79, p. 527–533, 2018.
- OUF, S.; ALI, E. Does the treatment of dried herbs with ozone as a fungal decontaminating agent affect the active constituents? **Environmental Pollution** v. 277, p. 116715, 2021.
- OZEL, M.; KARACA, H. Effects of High Concentration-Short Time and Low Concentration Long Time Ozone Treatments on Growth and Aflatoxin B1 Production of *Aspergillus flavus* in Red Pepper. **Ozone: Science and Engineering** v. 00, n. 00, p. 1–13, 2024.
- OZKAN, R.; SMILANICK, J.; KARABULUT, O. Toxicity of ozone gas to conidia of *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum*, and *Botrytis cinerea* and control of gray mold on table grapes. **Postharvest Biology and Technology** v. 60, n. 1, p. 47–51, 2011.
- PANDISELVAM, R. *et al.* Application and Kinetics of Ozone in Food Preservation. **Ozone: Science and Engineering** v. 39, n. 2, p. 115–126, 2017.
- PANDISELVAM, R. *et al.* Ozone based food preservation: a promising green technology for enhanced food safety. **Ozone: Science and Engineering** v. 41, n. 1, p. 17–34, 2019.
- Qi, L. *et al.* Detoxification of zearalenone and ochratoxin A by ozone and quality evaluation of ozonised corn. **Food Additives & Contaminants: Part A**, 33(11), 1700-1710, 2016.
- RAHMATI, E. *et al.* Decontamination technologies for medicinal and aromatic plants: A review. **Food Science and Nutrition** v. 10, n. 3, p. 784–799, 2022.

- RAILA, A. *et al.*, E. Application of ozone for reduction of mycological infection in wheat grain. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, 13(2), 2006.
- RAKNESS, K. *et al.* Guideline for measurement of ozone concentration in the process gas from an ozone generator. **Ozone: Science and Engineering** v. 18, n. 3, p. 209–229, 1996.
- RISTORI, C.; DOS SANTOS PEREIRA, M.; GELLI, D. Behavior of *Salmonella* Rubislaw on ground black pepper (*Piper nigrum* L.). **Food Control** v. 18, n. 3, p. 268–272, 2007.
- ROBERTS, M. *et al.* Extraction of essential oils from *Lavandula intermedia.*, 2022.
- SHARMA, M.; HUDSON, J. Ozone gas is an effective and practical antibacterial agent. **American Journal of Infection Control** v. 36, n. 8, p. 559–563, 2008.
- SHARMA, R. *et al.* Molecular interactome and starch–protein matrix, functional properties, phytochemical constituents, and antioxidant activity of foxtail millet (*Setaria italica*) flour as influenced during gaseous ozonation. **Cereal Chemistry** v. 99, n. 5, p. 1101–1111, 2022.
- SHELAKE, P. *et al.* Explicating the effect of the ozonation on quality parameters of onion (*Allium cepa* L.) in terms of pungency, phenolics, antioxidant activity, colour, and microstructure. **Ozone: Science and Engineering** v. 45, n. 1, p. 75–88, 2023.
- SHINOHARA, N. *et al.* *Salmonella* spp., important pathogenic agent transmitted through foodstuffs. **Ciencia e Saude Coletiva** v. 13, n. 5, p. 1675–1683, 2008.
- SILVA, M. *et al.* Ozone Injection at Low Pressure: Decomposition Kinetics, Control of *Sitophilus zeamais*, and Popcorn Kernel Quality. **Ozone: Science and Engineering** v. 44, n. 1, p. 66–7, 2022.
- SINHA, N.; RAY, S. Scope of black pepper *Piper nigrum* L. extract in pest control. **International Journal of Pharmacognosy (Panchkula, India)** v. 8, n. 9, p. 351–360, 2021.
- SITOE, E. *et al.* Application of ozone at low-pressure: Control of egg and larval phases of *Zabrotes subfasciatus*, inactivation of *Aspergillus flavus* and qualitative changes in bean grains. **Food Control** v. 158, n. July 2023, p. 110238, 2024.
- SITOE, E. *et al.* Low-pressure ozone injection system: relationship between reaction kinetics and physical properties of grains. **Journal of the Science of Food and Agriculture** v. 103, n. 3, p. 1183–1193, 2023.
- SONG, W. *et al.* Inactivation of *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella* Typhimurium in black pepper and red pepper by gamma irradiation. **International Journal of Food Microbiology** v. 172, p. 125–129, 2014.
- SONG, W.; KANG, Dong Hyun. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium in black and red pepper by vacuumed hydrogen peroxide vapour. **Journal of Applied Microbiology** v. 132, n. 1, p. 290–297, 2022.

TIWARI, B. *et al.* Application of ozone in grain processing. **Journal of Cereal Science** v. 51, n. 3, p. 248–255, 2010.

TORLAK, E.; SERT, D.; ULCA, P. Efficacy of gaseous ozone against *Salmonella* and microbial population on dried oregano. **International Journal of Food Microbiology** v. 165, n. 3, p. 276–280, 2013.

US, About; SPICES, Indian. Harvest calendar. p. 15–17, 2018.

UZOMA, S. *et al.* Association between low-temperature drying and ozonation processes to control pests and preserve maize quality. **Food Control** v. 156, n. December 2022, 2024.

VINHA, M.; LIMA, I.; SECUNDINO, W. Contaminantes que comprometem a segurança da pimenta-do-reino ao longo de sua cadeia produtiva. **Research Gate** v. 8, n. March, p. 55–67, 2017.

WEI, X. *et al.* Radiofrequency pasteurization process for inactivation of *Salmonella* spp. and *Enterococcus faecium* NRRL B-2354 on ground black pepper. **Food Microbiology** v. 82, p. 388–397, 2019.

WU, J.; DOAN, H.; CUENCA, M. Investigation of gaseous ozone as an anti-fungal fumigant for stored wheat. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology** v. 81, n. 7, p. 1288–1293, 2006.

ZHAO, J.; CRANSTON, P. Microbial decontamination of black pepper by ozone and the effect of the treatment on volatile oil constituents of the spice. **Journal of the Science of Food and Agriculture** v. 68, n. 1, p. 11–18, 1995.

Capítulo II

PRÉ-TRATAMENTO ULTRASSÔNICO ASSOCIADO À HIDRODESTILAÇÃO: UMA ALTERNATIVA PROMISSORA PARA A EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL E SUA APLICAÇÃO EM AMOSTRAS DE PIMENTA-PRETA OZONIZADAS

VIÇOSA – MINAS GERAIS 2024

RESUMO

MASSANGO, Handina da Graça Lurdes Langa, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2024. **Pré-tratamento ultrassônico associado à hidrodestilação: uma alternativa promissora para a extração do óleo essencial e sua aplicação em amostras de pimenta-preta ozonizadas.** Orientadora: Lêda Rita D'Antonino Faroni. Coorientadores: Ernandes Rodrigues de Alencar, Maria Cristina Dantas Vanetti e Alessandra Aparecida Zinato Rodrigues.

O óleo essencial de pimenta-preta (*Piper nigrum* L.) é um dos componentes que contribui para o aumento do seu valor no mercado de condimentos e pode ser extraído por diversas técnicas. O presente trabalho, objetivou otimizar e validar o processo de extração do óleo essencial de pimenta-preta pela associação de técnicas de ultrassom e hidrodestilação. Na etapa de otimização foi utilizado um planejamento experimental Doehlert, onde um maior rendimento do óleo essencial e concentração dos seus principais compostos fenólicos (β -pineno e o limoneno) foram alcançados empregando 60 g de pimenta-preta moída e o tempo de 20 min de sonicação. A identificação dos constituintes voláteis do óleo essencial e a sua quantificação foram realizados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) e cromatografia gasosa com detector por ionização em chama (GC-FID), respectivamente. O desempenho do método foi avaliado por meio do estudo de seletividade, linearidade, limites de detecção (LD), de quantificação (LQ), precisão e exatidão. O método validado foi aplicado em amostras de pimenta-preta ozonizadas em fluxo com reumedecimento do gás por uma solução de cloreto de sódio (40 % m/v) e sem o uso da solução de cloreto de sódio por 24, 48, 72 e 96 H e em amostras controle (sem tratamento). Após os tratamentos foram avaliados os parâmetros de qualidade como teor de fenólicos totais (TFT), capacidade antioxidante (DPPH*), cor, teor de água, potencial hidrogeniônico (pH) e acidez total titulável (ATT). Os valores de LD e LQ para β -pineno e limoneno foram de 0,7 e 2,33 mg L⁻¹, respectivamente. Os coeficientes de determinação (r^2/R^2) foram superiores a 0,99 e os coeficientes de variação ≤ 20 . No tratamento com gás ozônio reumedecido com solução de cloreto de sódio (40% m/v) o ponto de mínimo para o pH foi de 4,5663 e para a ATT foi de 0,4141, atingidos com 69 e 67 h de ozonização, respectivamente, sem causar alteração nos demais parâmetros estudados nos grãos de pimenta-preta. Contudo, foi observado um aumento significativo no rendimento de extração do óleo essencial. Por sua vez, a ozonização sem o reumedecimento pela solução de cloreto de sódio alterou a concentração do TFT e do teor de água dos grãos de pimenta-preta, mas não foram verificadas diferenças significativas no rendimento de extração do óleo essencial e na concentração de β -pineno e limoneno.

Palavras-chave: *Piper nigrum*; β -pineno; Limoneno; Hidrodestilação; método de extração e matriz de Doehlert

1. INTRODUÇÃO

A pimenta-preta (*Piper nigrum* L.), pertencente à família *Piperaceae*, é nativa do Sul da Índia e é uma das especiarias mais populares e utilizadas em todo mundo (TURRINI; SESTILI; FIMOGNARI, 2020). O aroma forte e a pungência da pimenta-preta são características marcantes atribuídas, principalmente, à piperina e aos óleos essenciais (SRINIVASAN, 2007). Devido a sua composição química, pode ser usada para diferentes propósitos, na dieta humana, na medicina, como conservante, como aromatizante e como agente de biocontrole (DAMANHOURI, 2014; CHANDRAN *et al.*, 2017).

O óleo essencial de pimenta-preta tem uma grande importância na indústria alimentar, pois além de agregar valor aos produtos processados, serve como agente ativo para prolongar a vida útil dos alimentos, sem alteração das suas características iniciais (MELO *et al.*, 2021). Dentre os compostos majoritários presentes no óleo essencial da pimenta-preta destaca-se β pineno e o limoneno (ASHOKKUMAR *et al.*, 2021). Os efeitos terapêuticos do β -pineno e do limoneno têm sido extensivamente estudados, comprovando efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes, anticancerígenos, antidiabéticos, anti-hiperalgésicos, antivirais e gastroprotetores, entre outros efeitos benéficos à saúde (VIEIRA *et al.*, 2018; SALEHI *et al.*, 2019). O limoneno é um dos principais ingredientes dos óleos essenciais de várias plantas, e a sua atividade antibacteriana já foi demonstrada em estudos (O'BRYAN *et al.*, 2008; GAMBINO *et al.*, 2022).

A qualidade do óleo essencial está relacionada à sua composição química e a escolha de um método de extração adequado é de extrema importância (DALLA NORA e BORGES, 2017). O método aplicado não deve influenciar negativamente a composição, evitando a decomposição dos compostos de interesse, a fim de preservar a qualidade do produto final (DJOUAHRI; BOUDARENE; MEKLATI, 2013) e proporcionar rendimentos máximos (ULLAH; WILFRED; SHAHARUN, 2019). Assim, o processo de extração desempenha um papel importante tanto no rendimento, quanto na qualidade dos óleos essenciais, particularmente devido à sua baixa quantidade nas plantas.

Técnicas como a hidrodestilação, destilação a vapor e extração por solventes são os métodos convencionais mais aplicados para a extração de óleos essenciais de especiarias (ROOHINEJAD *et al.*, 2017). A hidrodestilação tem sido apresentada como o método mais comum para a extração de óleos essenciais de especiarias e plantas medicinais (ROBERTS *et*

al., 2022). No entanto, esse método apresenta desvantagens devido ao longo tempo de extração. Novas abordagens, como extração assistida por micro-ondas (MARKOVIĆ *et al.*, 2019), extração com solvente pressurizado (WANG e WELLER, 2006), extração com fluido supercrítico (XIONG; CHEN; SHEN, 2019) e extração assistida por ultrassom (CHEMAT, *et al.*, 2017), têm sido estudadas com intuito de melhorar o tempo e possivelmente o rendimento de extração. Nos últimos anos, com o desenvolvimento do conceito de “Química verde”, técnicas de extração verdes e ecologicamente sustentáveis são cada vez mais atraentes, que normalmente são caracterizadas por maior taxa de extração, menor consumo de tempo e energia, menor uso de solventes e fácil transferência de massa e calor (WANG *et al.*, 2018).

O uso do ultrassom como pré-tratamento de óleos essenciais tem se mostrado como uma técnica promissora, pois além de contribuir para a diminuição do tempo médio de extração, também evita o uso de solventes nas extrações (DALLA NORA e BORGES, 2017). A sonicação por ultrassom também resulta no aumento da extração de componentes e extratos mais puros em menor tempo e temperatura (CHEN *et al.*, 2021). O aumento do rendimento de extração se dá após a interação das ondas de ultrassom com material vegetal, alterando as suas propriedades físicas e químicas e seu efeito cavitacional facilita a liberação de compostos extraíveis melhorando o transporte de massa com o rompimento das paredes celulares do tecido vegetal (CHEMAT, *et al.*, 2017). Hashemi *et al.* (2018) e Morsy (2015) utilizaram o ultrassom como pré-tratamento seguido de hidrodestilação, para a extração de óleos essenciais de *Aloysia citriodora* Palau em sementes de cardamomo. Para a extração de óleo essencial, a eficiência do processo pode ser afetada significativamente pelos parâmetros de extração. Assim, a otimização de condições ideais de extração para cada matriz deve ser realizada (CHEN *et al.*, 2021).

Em concordância com a Associação Europeia de Especiarias (ESA, 2011), dentre distintos indicadores de qualidade, a contaminação microbiológica, a cor, a composição e a concentração do óleo essencial de especiarias desempenham um papel importante. A aplicação do ozônio é tida como uma técnica promissora, pois não deixa resíduos (PANDISELVAM *et al.*, 2019) e é ecologicamente correta, em comparação com outros métodos desenvolvidos para a descontaminação microbiológica de especiarias (TORLAK; SERT; ULCA, 2013). No entanto, o ozônio possui alto poder oxidante (PANDISELVAM *et al.*, 2019) que poderiam causar a degradação dos componentes do óleo essencial de especiarias quando usado por um longo período e/ou em altas concentrações.

Assim, este trabalho objetivou otimizar e validar um método para extração de óleo essencial de pimenta-preta ozonizada utilizando o pré-tratamento ultrassônico combinado a hidrodestilação.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Amostragem

As amostras de pimenta-preta (*Piper nigrum* L.) foram adquiridas da empresa Temperat Indústria e Comércio de Produtos Alimentícios LTDA em São Paulo, Brasil. Foram acondicionadas em sacos de polipropileno trançado e armazenadas à temperatura ambiente até o início das atividades. Os experimentos de ozonização e moagem da pimenta-preta foram realizados nos Laboratórios de Pós-colheita do Departamento de Engenharia Agrícola, a extração do óleo essencial foi feita no Laboratório de Plantas Medicinais da EPAMIG e as análises da composição química do óleo essencial de pimenta-preta foram feitas no Laboratório de Química Analítica Aplicada do Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa.

2.2. Reagentes

O etanol (Sigma-Aldrich, 99,9%, Darmstadt, Alemanha) foi usado como solvente para o preparo dos padrões analíticos de β -pineno e limoneno (Sigma-Aldrich, 99,9%) e diluição das amostras de óleo essencial de pimenta-preta. A solução padrão de alcanos (C7–C40) (49452U, Supelco, 99,0%) também foi adquirida da Sigma-Aldrich e usada para a confirmação dos compostos voláteis. Para a lavagem do sistema clevenger foi utilizado o pentano (Sigma-Aldrich). Soluções de trabalho nas concentrações apropriadas foram preparadas diretamente das soluções estoque dos padrões e usadas para a construção de curvas analíticas do β -pineno e limoneno. Soluções saturadas de cloreto de sódio, 40% m/v, foram usadas no processo de ozonização das amostras de pimenta-preta. Todas as soluções padrão foram armazenadas em freezer (Consul, modelo 280, São Paulo, Brasil) à temperatura de aproximadamente -18°C .

2.3. Planejamento experimental

A extração do óleo essencial de pimenta-preta foi otimizada com o intuito de obter maior rendimento do óleo e maiores concentrações dos compostos fenólicos. Assim, foi empregado

um planejamento experimental baseado na matriz de Doehlert considerando duas variáveis (massa da pimenta-preta e o tempo no banho de ultrassom). O planejamento foi realizado considerando o método *stepwise* modificado (ANDRADE *et al.*, 2016), onde, os termos não significativos foram omitidos na obtenção de um novo modelo linear múltiplo. Na Tabela 1, X_1 , X_2 , Y_1 e Y_2 representam os valores codificados e reais da massa de pimenta-preta e tempo de ultrassom, respectivamente. Pré-tratamento 0 min, corresponde ao tratamento controle (sem exposição a ondas ultrassônicas). Foram realizados 7 pré-tratamentos, com 3 repetições cada, totalizando 21 extrações dos óleos essenciais.

Tabela 1 – Matriz Doehlert com valores codificados e reais dos parâmetros (massa de pimenta-preta e tempo de sonicação).

Parâmetros				
Valores Codificados		Valores reais		
X_1	X_2	Y_1	Y_2	
-1,0	0,000	20,0	20,0	
-0,5	-0,866	40,0	40,0	
-0,5	0,866	40,0	0,0	
0,0	0,000	60,0	20,0	
0,5	-0,866	80,0	40,0	
0,5	0,866	80,0	0,0	
1,0	0,000	100,0	20,0	

Y_1 = massa de pimenta-preta (g) e Y_2 = tempo de sonicação (min)

Assim, um método utilizando o pré-tratamento ultrassônico combinado com a hidrodestilação foi desenvolvido para a extração do óleo essencial de pimenta-preta. As extrações foram realizadas com o uso do aparelho tipo Clevenger, utilizando-se amostras com massas de 20, 40, 60, 80 e 100 g de pimenta-preta moída. As amostras de pimenta-preta moídas foram colocadas em um balão volumétrico de fundo redondo com capacidade para 1.000 mL e adicionadas a 500 mL de água destilada. O balão volumétrico foi colocado em um banho no aparelho de ultrassom (Quimis model Q335D, São Roque, São Paulo, Brasil) sob potência ultrassônica constante de 135 W (frequência operacional de 40 kHz) e as amostras foram individualmente submetidas a três diferentes tempos de sonicação (0, 20 e 40 min). Após o período estabelecido, o balão contendo a mistura era removido e submetido ao método de hidrodestilação. O tempo de extração dos óleos foi de 180 min, onde era contabilizado a partir do início da ebulição da mistura (água + pimenta-preta). Este tempo foi baseado em testes preliminares e estudos da literatura (TRAN *et al.*, 2019).

Após o processo de extração, o óleo essencial de pimenta-preta era coletado, calculado o seu rendimento e armazenado a uma temperatura de 8 °C. O rendimento do óleo essencial extraído foi realizado pela pesagem das amostras em balança analítica com precisão de 0.001 g. O cálculo do rendimento de extração foi realizado conforme a Equação 1, onde os resultados foram expressos em porcentagem de óleo essencial em relação à matéria seca do produto (% m. s). Em que OE – óleo essencial.

$$\text{Rendimento do OE de pimenta-preta (\%)} = \left(\frac{\text{Quantidade de OE obtida (g)}}{\text{Quantidade de pimenta-preta (g)}} \right) \times 100 \quad (\text{Eq.1})$$

2.4. Identificação dos componentes químicos (perfil do óleo essencial)

A identificação e o teor dos constituintes voláteis do óleo essencial de pimenta-preta foram realizados em um cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas tipo quadrupolo (GCMS-QP2010) da Shimadzu (Kyoto, Japão), com um sistema de injeção automática (AOC-20i, Kyoto, Japão). As condições analíticas otimizadas para a separação cromatográfica dos analitos incluíram uma coluna capilar (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, SHRtx-5MS) com fase estacionária composta por 5% de fenila e 95% de dimetil polissiloxano e hélio como gás de arraste com pureza de 99,999% (White Martins, Rio de Janeiro, Brasil) com fluxo de 1,17 mL min⁻¹.

A temperatura inicial da coluna foi de 50 °C, com um aumento de 3 °C min⁻¹ até 150 °C, mantida por 10 min, e aquecida novamente a uma taxa de 20 °C min⁻¹ até atingir temperatura máxima de 260 °C, permanecendo por 10 min. O tempo total de análise foi de 59,83 min. A temperatura do injetor foi mantida a 220 °C, da interface no detector a 300 °C e nas fontes de ionização a 230 °C. Um volume de 1 µL de amostra diluída em etanol foi injetado no cromatógrafo, usando a razão de split de 1:100. O espectrômetro de massa foi operado no modo SCAN, onde os espectros de massas foram obtidos por impacto de elétrons a 70 eV, com varredura de 35 a 500 (m/z).

A identificação dos analitos foi realizada por meio da comparação dos índices de retenção (IR) obtidos pela injeção de padrões de hidrocarbonetos (C₇ a C₄₀), com banco de dados do equipamento (biblioteca NIST-14) e com dados de literatura (ADAMS, 2007). O percentual relativo de cada composto foi calculado através da razão entre a área cada pico e a área total de todos os constituintes da amostra.

2.5. Quantificação dos componentes majoritários

Os compostos majoritários do óleo essencial de pimenta-preta foram quantificados usando um cromatógrafo a gás (Shimadzu, modelo GC-2014), equipado com um detector de ionização de chama (GC-FID). Foram utilizadas as seguintes condições: coluna capilar DB-5 de 30 m, com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e espessura de filme de 0,25 μm (DB-5, Shimadzu, Japão), onde a temperatura inicial do forno foi 45 °C (2 min), com aumento de 30 °C min^{-1} até 260 °C. A temperatura do injetor foi ajustada para 240 °C e do detector para 280 °C.

O nitrogênio (Air Products, 99,999 %, Brasil) foi usado como gás de arraste com fluxo de 1,3 mL min^{-1} , com razão de split de 1:50 e tempo total de execução de 13,83 min. Para o processo de otimização, as amostras dos óleos essenciais foram diluídas por 1000 vezes no solvente etanol. Os compostos foram identificados comparando os tempos de retenção dos picos obtidos para os extratos das amostras com os dos padrões. A concentração do β -pineno e limoneno foi obtida por GC-FID a partir das curvas analíticas de cada analito. A curva analítica de β -pineno e limoneno foi construída utilizando-se concentrações de ambos compostos, que variaram de 10 a 200 mg L^{-1} .

2.6. Validação do método para a quantificação dos componentes majoritários

Após a etapa de otimização, as melhores condições alcançadas para extração do óleo essencial de pimenta-preta foram utilizadas para validar o método proposto. A validação da análise de β -pineno e limoneno pela associação das técnicas de ultrassom e hidrodestilação e análise por GC-FID foi baseada nos seguintes parâmetros analíticos: seletividade, linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão (intra e inter-dia) e comparação de métodos de detecção. O método validado buscou atender aos critérios estabelecidos pelos órgãos regulamentadores: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução RDC nº 166/17 (ANVISA, 2017) e International Conference on Harmonization (ICH, 2022).

Para avaliar a linearidade do método, construiu-se uma curva analítica com oito níveis de concentração dos padrões analíticos em estudo, utilizando o intervalo entre 10 - 200 mg L^{-1} para os compostos β -pineno e limoneno. Após a análise cromatográfica dos extratos foram construídas curvas analíticas, relacionando as áreas dos analitos com as concentrações

mencionadas. Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) do método proposto foram determinados pela relação sinal/ruído. Assim, amostras do óleo essencial de pimenta-preta foram diluídas de modo que a concentração proporcionasse um sinal superior ao ruído da linha de base em 3 e 10 vezes, que foram estabelecidos como limite de detecção e de quantificação, respectivamente.

A precisão do método foi avaliada em termos de repetibilidade (precisão intra-dia) e precisão intermediária (precisão inter-dias), determinando o coeficiente de variação (CV%). Para a realização dos ensaios de repetibilidade, amostras do óleo essencial de pimenta-preta foram extraídas pelo método proposto e analisadas pelo mesmo analista sob as mesmas condições de trabalho. Os ensaios foram feitos em quintuplicatas com três concentrações distintas. Para tal, o óleo foi diluído com etanol nas proporções de 1.000, 2.000 e 2.500 vezes e as análises realizadas no mesmo dia. Já a precisão intermediária foi realizada em 3 dias consecutivos, usando 5 replicatas da mesma concentração, onde as amostras de óleo essencial foram diluídas 2.000 vezes ($n = 15$).

2.7. Aplicação do método validado em amostras de pimenta-preta ozonizadas

A fim de verificar o efeito da aplicação do gás ozônio (O_3) nos grãos de pimenta-preta, a qualidade do óleo essencial extraído e seu rendimento foram avaliados utilizando o pré-tratamento ultrassônico combinado com a hidrodestilação. Para a ozonização dos grãos de pimenta-preta em fluxo, foi utilizada uma coluna cilíndrica construída em PVC com 0,5 metros de comprimento e 0,15 metros de diâmetro. Para sustentação dos grãos no interior do cilindro e promover a distribuição uniforme do gás ozônio uma tela metálica foi instalada na altura de 0,10 m do fundo do protótipo para a formação de um *plenum*. Uma massa de 1,5 kg de pimenta-preta foi exposta ao gás O_3 a uma concentração de 16 mg L^{-1} e vazão volumétrica de $0,5 \text{ L min}^{-1}$, determinados em testes preliminares. Foi aplicado gás ozônio reumedecido e sem reumedecimento com solução de cloreto de sódio 40 % m/v aos grãos por 24, 48, 72 e 96 h. O intuito de reumedecer o gás ozônio com a solução de cloreto de sódio era aumentar a umidade relativa do gás e conseqüentemente aumentar as suas taxas de reação.

O ozônio foi obtido pela técnica de descarga de corona, utilizando um gerador portátil modelo O&L 3.0 RM (Ozone & Life, São José dos Campos, SP, Brasil) alimentado por um cilindro de oxigênio industrial. O ozônio gerado foi quantificado pelo método iodométrico descrito por Rakness *et al.* (1996), que consistiu no borbulhamento do ozônio gerado em frasco Erlenmeyer contendo 50 mL da solução de iodeto de potássio 2% e titulado com uma solução padronizada de tiosulfato de sódio (0,1 e 0,01 mol L⁻¹).

Após os diferentes períodos de exposição ao gás ozônio, amostras de pimenta-preta ozonizadas, juntamente com as amostras controle (não expostas ao gás ozônio) eram recolhidas, moídas em liquidificador (Oster-liquidificador, modelo OLIQ601) e armazenadas em ambiente refrigerado com temperatura de 5 °C e umidade relativa de 87%. Posteriormente, o óleo essencial foi extraído das amostras utilizando o método proposto e analisado por GC-FID. Todas as análises foram realizadas em triplicatas.

2.8. Análise dos compostos bioativos dos grãos de pimenta-preta

2.8.1. Preparo dos extratos de pimenta-preta

Foram pesados e identificados 1 g de cada amostra de pimenta-preta triturada e adicionados 20 mL de uma solução extratora que continha metanol, água e ácido acético nas proporções de 70, 30 e 5 v/v. A mistura foi agitada em um shaker orbital (Shaker SL – 222) por 20 minutos a 240 rpm. Em seguida a mistura foi centrifugada a 2.000 rpm por 20 minutos a 25 °C em uma centrífuga para tubos (modelo: 0222TM2, QUIMIS aparelhos científicos LTDA, Diadema – São Paulo – Brasil). O sobrenadante foi reservado em tubos falcon para análises posteriores.

2.8.2. Determinação do conteúdo fenólico total

Os compostos fenólicos totais foram mensurados pelo método colorimétrico Folin-Ciocalteu descrito por Singleton e Rossi (1965), com pequenas modificações. Um volume de 0,6 mL de extrato de cada amostra foi adicionado a 3 mL do reagente Folin-Ciocalteu (1:5) e 2,4 mL de carbonato de sódio (7,5 %). A absorbância foi lida a 760 nm, em um espectrofotômetro (Femto-Cirrus 80 ST), após incubação no escuro por 60 min. Todas as reações foram realizadas em triplicata. Os resultados foram expressos em mg de ácido gálico/100 g da amostra (mg EAG 100 g⁻¹ da amostra).

$$\text{TFT (mg de ácido gálico } 100 \text{ g}^{-1}\text{ da amostra)} = \frac{\text{EAG} \times 100}{\text{D.extrato}}$$

Em que:

EAG – equivalente em ácido gálico (obtido através da curva padrão)

2.8.3. Determinação da atividade antioxidante (DPPH*)

A atividade de antioxidante foi determinada pelo método de eliminação de radicais DPPH* (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) utilizando a metodologia descrita por Brand-Williams *et al.*, (1995), com modificações. Uma alíquota de 150 μL da amostra foi adicionada a 5.850 mL da solução de uso de DPPH*. Após 15 min de incubação no escuro, as absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro (Femto Cirrus 80 ST), em um comprimento de onda de 515 nm. As análises foram realizadas em triplicata. Os resultados foram expressos em μM de Trolox Equivalente por grama da amostra (μM de TE g^{-1} da amostra) e a atividade antioxidante foi calculada usando a Equação 2.

$$\text{DPPH } (\mu\text{M de TE } \text{g}^{-1}\text{ da amostra)} = \frac{[\text{X}] \text{ Trolox } (\mu\text{mol}) \times \text{Volme total do extrato mL}}{\text{Peso da amostra (g)}} \quad (\text{Eq.2})$$

2.9. Acidez titulável e potencial hidrogeniônico

Foram pesados 5 g de grãos de pimenta-preta, acrescentado 50 mL de água destilada e deixada de repouso por 30 min à temperatura ambiente. Em seguida, foram descartados os grãos e a solução resultante usada para as análises subsequentes. A acidez titulável dos grãos foi determinada por titulação com solução padronizada de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 M e o potencial hidrogeniônico foi medido com um pHmetro de bancada (HANNA, modelo FT-P21), segundo normas do Instituto Adolfo Lutz (LIMA, 1941).

2.10. Teor de água

O teor de água das amostras de pimenta-preta foi determinado pelo método gravimétrico, conforme referenciado pela Association of Official Analytical Chemist, método 925.10 (AOAC, 2022).

2.11. Parâmetros de cor

A análise de cor das amostras de pimenta-preta foi realizada utilizando um colorímetro (modelo CR – 410, Konica Minolta, Osaka, Japão), os parâmetros L^* , a^* e b^* foram determinados. Depois de calibrado, a cor foi medida em vários locais diferentes de cada amostra. A diferença de cor (ΔE^*) e o croma (C^*) foram calculados com base nas Equações 3 e 4, respectivamente.

$$\Delta E^* = \sqrt{(L^* - L_0^*)^2 + (a^* - a_0^*)^2 + (b^* - b_0^*)^2} \quad (\text{Eq. 3})$$

$$C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad (\text{Eq. 4})$$

2.12. Análises estatísticas

Os dados experimentais do rendimento do óleo essencial, análise dos compostos bioativos, a acidez titulável, o pH, o teor de água, e os parâmetros de cor foram submetidos à análise de variância (ANOVA) conjunta e foi aplicado o teste de Tukey a 5 % (SAEG 9.1) para as médias. Os valores obtidos pelas curvas analíticas foram submetidos a ANOVA e análise de regressão e os modelos foram selecionados de acordo com a significância dos coeficientes de regressão, utilizando-se o teste “t” de Student a 5 % de probabilidade e pelo coeficiente de determinação (r^2 ou R^2). Para avaliar a relação entre o tratamento os parâmetros de qualidade dos grãos de pimenta-preta, uma análise de correlação de Pearson foi usada.

Com auxílio do software Statistica®, os coeficientes da equação foram obtidos pelo modelo de regressão múltipla dos dados experimentais usando uma variação da seleção das variáveis utilizando o método *stepwise* (ANDRADE *et al.*, 2016).

3. RESULTADOS

3.1. Otimização da extração do óleo essencial de pimenta-preta

Na Tabela 2 estão ilustrados os resultados da otimização do processo de extração do óleo essencial de pimenta-preta pela associação das técnicas de ultrassom e hidrodestilação e análise por GC-FID. Foi utilizado um planejamento de experimentos baseado na matriz Doehlert, a fim de investigar os efeitos dos parâmetros (massa de pimenta-preta e tempo de ultrassom) sobre o rendimento do óleo essencial e das concentrações dos compostos majoritários β -pineno e limoneno. A matriz Doehlert com as variáveis codificadas, variáveis reais e respostas experimentais são ilustrados na Tabela 2.

Tabela 2- Efeito do tempo de ultrassom e massa da pimenta-preta no rendimento do óleo essencial e concentração de β -pineno e limoneno.

Rn° Exp.	Parâmetros				Respostas experimentais		
	Variáveis codificadas		Variáveis reais		Rendimento do óleo (%)	β -pineno (g L ⁻¹)*	Limoneno (g L ⁻¹)*
	x ₁	x ₂	M	T			
1	-1,0	0,000	20,0	20,0	1,27	95,58	88,53
2	-1,0	0,000	20,0	20,0	1,42	99,40	96,20
3	-1,0	0,000	20,0	20,0	1,13	125,63	107,77
4	-0,5	0,866	40,0	40,0	0,98	103,13	115,99
5	-0,5	0,866	40,0	40,0	1,06	103,66	82,83
6	-0,5	0,866	40,0	40,0	1,06	124,61	100,89
7	-0,5	0,866	40,0	0,0	0,81	119,47	96,62
8	-0,5	0,866	40,0	0,0	0,92	95,15	87,92
9	-0,5	0,866	40,0	0,0	1,05	101,85	86,22
10	0,0	0,000	60,0	20,0	1,08	109,16	83,00
11	0,0	0,000	60,0	20,0	1,32	118,75	93,10
12	0,0	0,000	60,0	20,0	1,13	124,70	95,82
13	0,5	0,866	80,0	40,0	1,03	125,35	93,68
14	0,5	0,866	80,0	40,0	0,93	94,59	81,03
15	0,5	0,866	80,0	40,0	1,07	133,40	103,97
16	0,5	0,866	80,0	0,0	1,15	123,32	92,42
17	0,5	0,866	80,0	0,0	1,19	112,27	90,04
18	0,5	0,866	80,0	0,0	1,22	108,48	98,61
19	1,0	0,000	100,0	20,0	0,57	132,83	133,56
20	1,0	0,000	100,0	20,0	0,66	112,27	113,07

21	1,0	0,000	100,0	20,0	0,63	113,23	122,84
-----------	-----	-------	-------	------	------	--------	--------

M e x_1 se referem à massa de pimenta-preta e T e x_2 , ao tempo de ultrassom, das variáveis reais e codificadas, respectivamente; * concentração do β -pineno e limoneno presente no óleo.

A concentração de β -pineno foi influenciada pelo termo constante, termos lineares e quadráticos da massa da pimenta-preta e pelo termo de interação entre as duas variáveis, com desvio padrão de $6,9 \text{ mg L}^{-1}$. Para massas maiores, houve uma maior concentração do β -pineno. Essa avaliação foi apresentada na forma de um modelo de Boltzmann (Figura 1). Observou-se que os grupos apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$), podendo se afirmar que os dois grupos apresentaram comportamentos distintos entre si. Essa quase descontinuidade observada na massa pode estar associada a algum aspecto relacionado com o fluxo de vapor dentro do extrator. A partir de uma certa quantidade, o próprio material auxiliou na homogeneização e extração. O modelo múltiplo linear não foi capaz de identificar esse padrão de comportamento, uma vez que é baseado apenas no comportamento linear e quadrático, enquanto o modelo necessário não pode ser aproximado por nenhum dos dois.

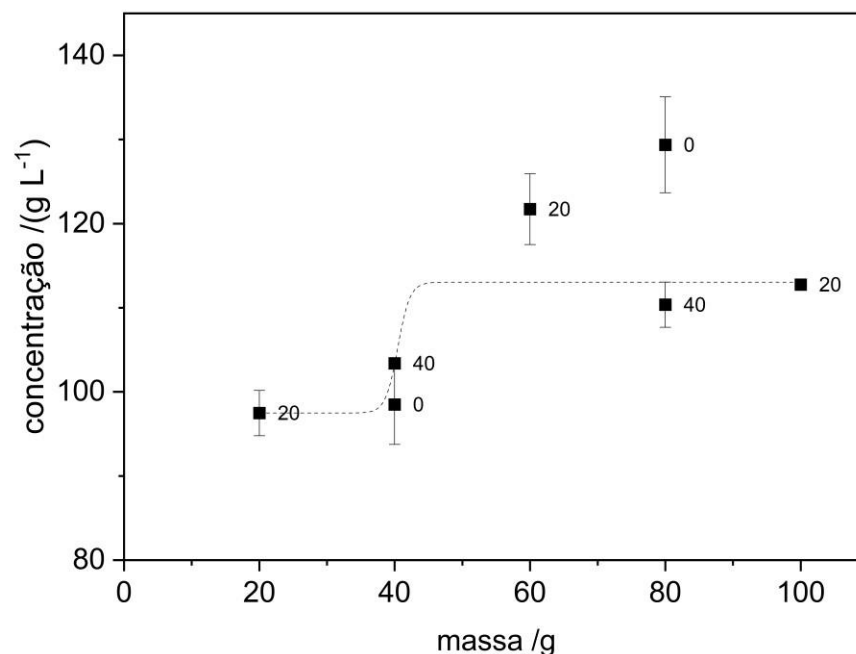


Figura 1. Comportamento de β -pineno em função da massa de pimenta-preta

Para massas menores ou iguais a 40 g, não houve influência do tempo de ultrassom ($P > 0,05$). Por outro lado, para massas maiores, foi observado um efeito pouco significativo ($R^2 = 0,555$ e $P = 0,098$), de diminuição da concentração com o tempo de ultrassom. Devido à dispersão observada nas concentrações de limoneno, não foi possível identificar nenhuma

correlação com termos associados à massa de pimenta-preta ou ao tempo de ultrassom. A Figura 3, mostra que o modelo quadrático para a massa de pimenta-preta não apresentou diferença significativa ($P > 0,05$) em relação ao erro, de acordo com a análise de variância do modelo.

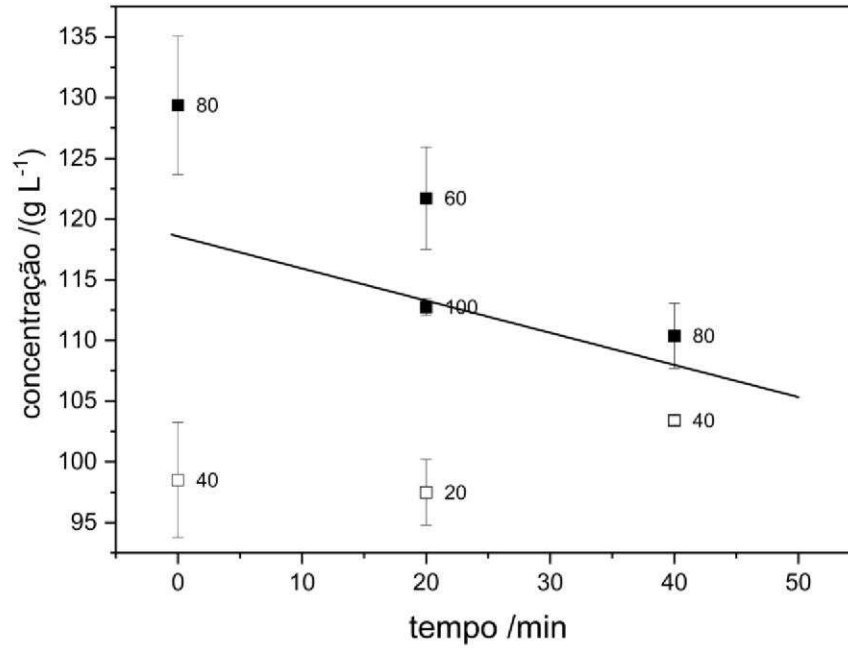


Figura 2. Comportamento da concentração de β -pineno em função do tempo no banho de ultrassom (■: massa de pimenta-preta maior que 40 g; □: massa de pimenta-preta igual ou menor que 40 g), determinado pelo modelo linear ponderado.

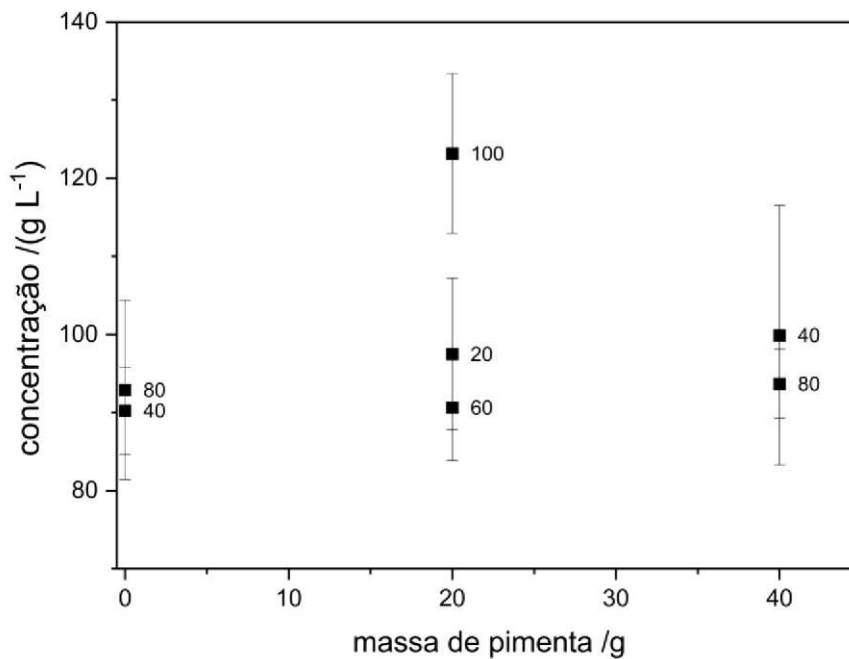


Figura 3. Comportamento da concentração de limoneno em função da massa de pimenta-preta.

Assim, a condição ótima encontrada para se obter um maior rendimento do óleo essencial e maior concentração de limoneno e β -pineno foram alcançadas empregando 60 g de pimenta-preta moída e o tempo de 20 min de sonicação.

3.2. Rendimento de extração do óleo essencial de pimenta-preta

Os dados referentes ao rendimento (Tabela 3) mostram que, para a ozonização com o uso da solução de cloreto de sódio, houve um aumento médio de 0,0035 % para cada hora de exposição dos grãos de pimenta-preta ao ozônio. Para a ozonização sem a solução salina, não foram verificadas diferenças significativas durante a exposição dos grãos ao ozônio.

Tabela 3 – Equações de regressão ajustadas de rendimento, β -pineno e limoneno em função do tempo para os respectivos tratamentos e coeficientes de determinação (r^2/R^2).

Tratamento	Variável	Modelo	Equações ajustadas	r^2/R^2
Ozonização com solução salina	Rendimento β -pineno Limoneno	Linear	$\bar{Y} = 0,7693 + 0,0035 * T$ $\bar{Y} = 129,02$	0,8653 -
		Raiz quadrada	$\bar{Y} = 97,279 - 9,1594 * T^{1/2} + 1,4008 ** T$	0,82251
Ozonização sem solução salina	Rendimento β -pineno Limoneno		$\bar{Y} = 1,04$	-
			$\bar{Y} = 122,21$	-
			$\bar{Y} = 100,04$	-

** Significativo a 1 % de probabilidade pelo teste t, * significativo a 5 % de probabilidade pelo teste.

3.3. Identificação dos compostos majoritários

A análise cromatográfica mostrou a presença de 8 constituintes do óleo essencial de pimenta-preta (Tabela 4). As principais classes detectadas foram monoterpenos e sesquiterpenos, com os principais monoterpenos compreendendo, limoneno e β -pineno, e o principal sesquiterpeno o β -cariofileno. Devido às suas importantes atividades biológicas (CAI *et al.*, 2019; SALEEM *et al.*, 2022), os compostos majoritários β -pineno e limoneno foram escolhidos para dar continuidade aos estudos.

Tabela 4 – Composição química e porcentagem relativa dos compostos identificados no óleo essencial de pimenta-preta por meio da análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS).

Número	Compostos	TR (min)	ILR _{calculado}	ILR _{tabelado}	Área relativa (%)
1	α -pineno	6,9	933	932	4,18
2	Sabineno	6,9	972	969	7,49
3	β -pineno	6,9	974	974	11,04
4	Limoneno	10,6	1026	1024	14,37
5	A-copaeno	24,1	1375	1374	5,4
6	β -cariofileno	28,4	1419	1417	53,37
7	α -humuleno	28,4	1453	1452	2,43
8	γ -bisaboleno	32,5	1522	1528	1,73

RT - Tempo de retenção (min); ILR_{calculado} - Índice de retenção linear calculado; ILR_{tabelado} - Índice de retenção linear tabelado (ADAMS, 2007).

3.4. Validação do método analítico

3.4.1. Seletividade

Uma das formas de se avaliar a seletividade quando os compostos a serem avaliados já fazem parte da matriz estudada é avaliação das amostras com detectores modernos como os espectrômetros de massas, que comparam o espectro do pico obtido na separação com o de um padrão e utiliza-se isto como uma indicação da presença do composto puro (RIBANI *et al*, 2004). Desta forma, na Figura 4 estão ilustrados os espectros de massa do β -pineno e limoneno presentes nos padrões analíticos e nas amostras de óleo essencial de pimenta-preta. Pode se observar nos espectros de massa uma coincidência dos picos entre os padrões, amostra e os dados disponíveis na biblioteca NIST 14, confirmando a seletividade do método.

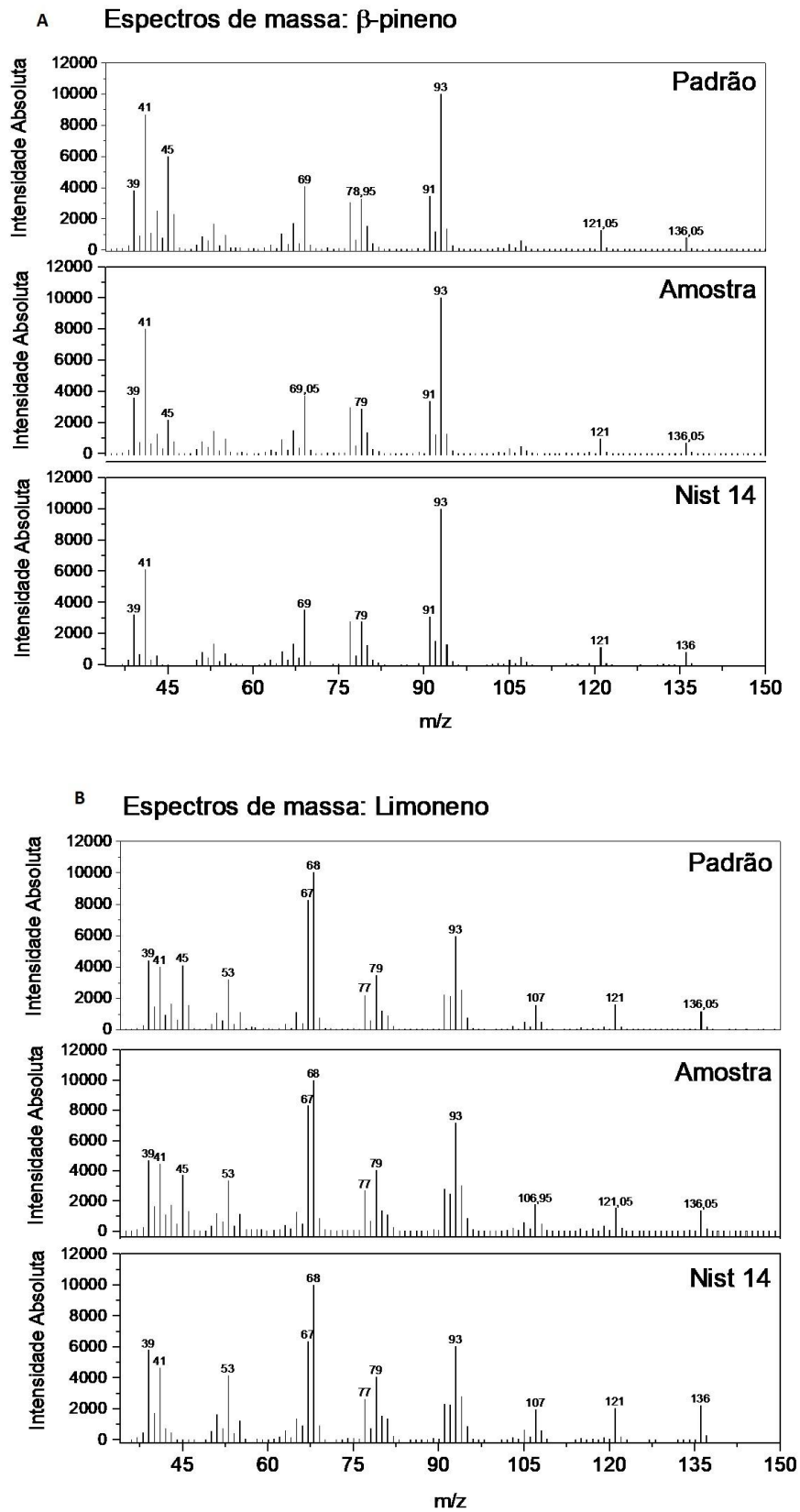


Figura 4. Espectros de massa obtidos através de amostras padrão de β -pineno e limoneno, óleo essencial de pimenta-preta e dados obtidos na biblioteca Nist 14.

Fonte: A autora, 2024.

3.5. Limites de detecção e quantificação do método e linearidade

Após as análises cromatográficas por GC-FID, o valor do limite de detecção encontrado para β -pineno e limoneno foi de $0,7 \text{ mg L}^{-1}$ e o limite de quantificação foi de $2,33 \text{ mg L}^{-1}$ (Tabela 3). A linearidade foi avaliada pelos coeficientes de determinação (r^2) obtidos pela regressão linear e pelos resíduos das curvas analíticas. As curvas foram significativas ($p < 0,0001$) para os modelos lineares $y = 207,13x + 74,63$ (β -pineno) e $y = 213,8x - 755,0$ (limoneno) (Figuras 5 e 6), respectivamente. O método apresentou linearidade de resposta adequada nos intervalos de concentração avaliada e coeficiente de determinação (r^2) igual a $0,9994$ e $0,9985$ para β -pineno e limoneno, respectivamente.

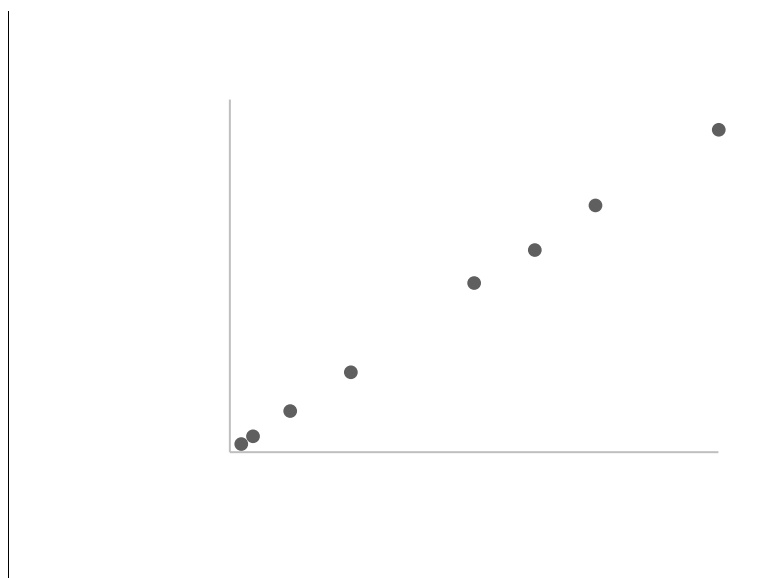


Figura 5 – Curva analítica da resposta cromatográfica em função da concentração de β -pineno em mg L^{-1} .

Fonte: A autora, 2024.

Figura 6 – Curva analítica da resposta cromatográfica em função da concentração de limoneno em mg L⁻¹.

Fonte: A autora, 2024.

3.6. Precisão do método

A precisão intra-dia apresentou coeficiente de variação de 14,30 % para o β-pineno e 13,74 para o limoneno (Tabela 5). Enquanto a precisão interdiária apresentou coeficientes de variação de 13,15 e 14,87 % para β-pineno e limoneno (Tabela 5), respectivamente, indicando boa precisão interdiária dos dados. Em amostras complexas, coeficientes de variação de até 20 % são geralmente aceitáveis, o que significa que este estudo demonstrou boa repetibilidade dos dados (ANVISA, 2017).

Tabela 5. Parâmetros de validação do método de extração do óleo essencial de pimenta-preta: equações de regressão, coeficientes de determinação, intervalo linear (mg L⁻¹), limites de detecção e quantificação, nível de diluição, concentração (mg L⁻¹) e coeficiente de variação intra e inter-dia.

Composto	Regressão linear/ R ²	Faixa linear mg L ⁻¹	LD/LQ ND	Concentração média (n = 5)	Intra-dia CV (%) (n = 5)	Concentração média (n = 15)	Inter-dia CV (%) (n = 15)
β-pineno	y = 207,13x + 74,63 0,9994	10-200	0,7/2,331000	30991,82	19,39		
			2000	18632,38	13,97	18131,42	13,05
			2500	16151,04	18,27		
Limoneno	y = 213,8x – 755,05 0,9985	10-200	0,7/2,331000	28731,26	19,86		
			2000	14890,2	7,83	15003,58	8,14
			2500	13684,86	18,82		

R² = coeficiente de determinação; DP= desvio padrão; LD = limites de detecção; LQ= limite de quantificação; ND = nível de diluição, CV= coeficiente de variação e n= número de replicatas.

3.7. Comparação de métodos de detecção

Amostras de óleo essencial de pimenta-preta foram diluídas 2.000 vezes e injetadas no GC-FID e GC-MS. Não foi observada diferença significativa entre os diferentes métodos de detecção para β-pineno com médias de 90,24 e 89,84 mg L⁻¹ para GC-FID e GC-MS, respectivamente. Contudo houve diferença significativa para o limoneno pelo teste Tukey, cuja maior média (66,11 mg L⁻¹) foi verificada para GC-FID.

3.8. Avaliação da qualidade dos óleos extraídos de amostras ozonizadas (aplicação do método)

Na Tabela 6 estão ilustrados os valores médios do rendimento de extração, concentração de β -pineno e limoneno, extraídos das amostras de pimenta-preta tratadas com ozônio nos diferentes tempos de exposição (24, 48, 72 e 96 h) com e sem reumedecimento em solução de cloreto de sódio. Foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as amostras ozonizadas com solução de cloreto de sódio e sem a solução por 24 h, para todas as variáveis estudadas. Quando as amostras de pimenta-preta foram ozonizadas por 96 h com e sem solução de cloreto de sódio, verificaram-se diferenças estatísticas ($p < 0,05$) nas concentrações de β pineno e limoneno (Tabela 6). Nos demais tempos de ozonização não foram verificadas diferenças significativas entre os tratamentos nas variáveis estudadas.

Tabela 6. Valores médios do rendimento dos óleos, concentração de β -pineno e limoneno para as respectivas combinações de tratamento e tempos de ozonização das amostras de óleo essencial de pimenta-preta.

Tempo de exposição ao ozônio (h)	Rendimento		Concentração de β -pineno (mg L ⁻¹)		Concentração de Limoneno (mg L ⁻¹)	
	Com solução de NaCl	Sem solução de NaCl	Com solução de NaCl	Sem solução de NaCl	Com solução de NaCl	Sem solução de NaCl
0 (controle)	0,78 a	0,78 a	131,63 a	129,59 a	98,47 a	97,24 a
24	0,88 b	1,36 a	94,19 b	145,85 a	81,33 b	118,01 a
48	0,85 a	1,003 a	121,48 a	92,78 a	97,29 a	74,73 a
72	1,07 a	1,01 a	158,85 a	137,93 a	137,25 a	115,79 a
96	1,11 a	1,04 a	138,98 a	104,89 b	132,44 a	94,42 b

As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra na linha para cada variável não diferem entre si ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey.

3.9. Compostos bioativos e análises de qualidade da pimenta-preta

O efeito dos tempos de exposição da pimenta-preta ao ozônio com e sem reumedecimento em solução de cloreto de sódio para o teor de fenólicos totais (mg de ácido gálico 100 g⁻¹ da amostra), antioxidantes pelo método de sequestro do radical DPPH*, teor de água, potencial hidrogeniônico, acidez titulável total e cor (L*, ΔE^* e C*) podem ser verificados na Tabela 7. As variáveis em que o tratamento não apresentou efeito significativo foram

descritas pela média geral. Para a pimenta-preta exposta ao gás ozônio reumedecido com uma solução de cloreto de sódio 40 % m/v foi observado efeito quadrático para o potencial hidrogeniônico e acidez titulável. Nas demais variáveis o tratamento com ozônio reumedecido com uma solução de cloreto de sódio a 40 % m/v não apresentou efeitos significativos pelo teste t. Por outro lado, foi observado efeito quadrático para o teor de fenólicos totais (mg de ácido gálico 100 g⁻¹ da amostra), raiz quadrada para o teor de água e efeito não significativo para as demais variáveis.

O tratamento com ozônio em fluxo com o uso de solução de cloreto de sódio afetou significativamente ($p < 0,05$) o potencial hidrogeniônico, tendo sido observado um valor de 4,5663 quando foi atingido o ponto de mínimo de 69 horas. Enquanto, a acidez titulável total apresentou um valor de 0,4141 quando o ponto de mínimo foi de 67 horas de ozonização. Por sua vez, na ozonização da pimenta-preta sem o uso da solução de cloreto de sódio o teor de fenólicos totais e o teor de água, apresentaram valores de 1713,2872 mg de ácido gálico 100 g⁻¹ da amostra e 6,0294 % nos pontos de mínimo de 1,1184 e 137,4006 horas de ozonização, respectivamente.

Tabela 7 – Equações de regressão ajustadas de teor de fenólicos totais (TFT), antioxidantes pelo método DPPH*, teor de água, potencial hidrogeniônico (pH), acidez total titulável (ATT), luminosidade de cor (L*), diferença de cor (ΔE^*) e saturação de cor (C*) em função do tempo de exposição (te) para os respectivos tratamentos e os coeficientes de determinação (r^2/R^2).

Tratamentos	Variáveis	Modelo	Equações ajustadas	r^2/R^2
Ozonização com solução salina	TFT	-	$\bar{Y} = 1875,82$	-
	DPPH	-	$\bar{Y} = 34,97$	-
	Teor de água	-	$\bar{Y} = 9,85$	-
	pH	Quadrático	$\bar{Y} = 5,0424 - 0,0138^0te + 0,0001^0te^2$	0,8673
	ATT	Quadrático	$\bar{Y} = 0,1896 + 0,0067^*te - 0,00005^*te^2$	0,9640
	L	-	$\bar{Y} = 48,4160$	-
	ΔE	-	$\bar{Y} = 3,5307$	-
	C	-	$\bar{Y} = 1,5793$	-
Ozonização sem solução salina	TFT	Quadrático	$\bar{Y} = 1702,212 + 6,6019^0te + 2,9514^0te^2$	0,7623
	DPPH	-	$\bar{Y} = 32,6987$	-
	Teor de água	Raiz quadrada	$\bar{Y} = 9,5295 - 0,3119^*te^{1/2} + 0,0133^{\square}te$	0,9661
	pH	-	$\bar{Y} = 4,9533$	-
	ATT	-	$\bar{Y} = 0,2473$	-
	L	-	$\bar{Y} = 49,7660$	-

ΔE	-	$\bar{Y} = 2,8607$	-
C	-	$\bar{Y} = 1,6147$	-

* significativo a 5 % de probabilidade pelo teste t, ^o significativo a 10 % de probabilidade pelo teste t, [□] significativo a 15 % de probabilidade pelo teste t.

Foi possível estabelecer uma análise de correlação de Pearson entre os parâmetros de qualidade dos grãos de pimenta-preta expostos ao gás ozônio umedecido com uma solução de cloreto de sódio a 40% m/v e ao gás ozônio não umedecido (Tabela 8). Existe uma correlação positiva entre o teor de fenólicos totais e os antioxidantes pelo método de sequestro do radical DPPH (0,547), DPPH* e pH (0,736) e teor de água e acidez titulável (0,571), para as amostras de pimenta-preta ozonizadas com o uso da solução de cloreto de sódio a 40% m/v para o umedecimento do gás.

Contudo, nas mesmas amostras de pimenta-preta, foi verificada uma correlação negativa entre teor de fenólicos totais e teor de água (-0,656), antioxidantes pelo método do sequestro do radical DPPH e teor de água (-0,552) e entre teor de água e pH (-0,543). Por outro lado, nas amostras de pimenta-preta expostas ao gás ozônio que não foi reumedecido foi observada correlação positiva entre os antioxidantes pelo método de sequestro do radical DPPH e pH (0,580) e teor de fenólicos totais e acidez titulável. Correlação negativa foi verificada entre pH e acidez titulável (-0,557) e entre pH e luminosidade de cor (-0,663). Não foi verificada correlação significativa para as demais variáveis nos dois tratamentos avaliados.

Tabela 8. Matriz de correlação de Pearson entre os parâmetros de qualidade dos grãos de pimenta-preta ozonizado em fluxo com e sem o uso da solução de cloreto de sódio 40% m/v

Tratamento	Variável	TFT	DPPH	Teor de água (%)	pH	ATT (%)	L	ΔE	C
Ozonização com solução salina	TFT	1,000	0,547*	-0,656*	0,422	-0,294	-0,266	-0,173	0,172
	DPPH		1,000	-0,552*	0,736*	-0,397	-0,399	-0,034	-0,166
	Teor de água (%)			1,000	-0,543*	0,571*	0,130	0,418	0,023
	pH				1,000	-0,306	-0,413	-0,451	-0,328
	ATT (%)					1,000	0,279	0,098	0,163
	L						1,000	0,100	-0,109
	ΔE							1,000	-0,050
	C								1,000
	Ozonização sem solução	TFT	1,000	0,045	-0,298	0,066	0,614*	-0,142	-0,310
DPPH			1,000	0,126	0,580*	0,210	0,300	-0,048	-0,019
Teor de água				1,000	0,039	-0,389	-0,149	-0,083	0,091
pH					1,000	-0,557*	-0,663*	0,086	-0,565*
ATT						1,000	0,384	0,025	-0,416

salin	L	1,000	0,314	-0,451
a	ΔE		1,000	-0,297
	C			1,000

* Significativo a 5% de probabilidade

¹ Expresso em mg de ácido gálico 100 g⁻¹ da amostra

² Expresso em μM de Trolox

4. DISCUSSÃO

4.1. Identificação dos componentes majoritários

O β -pineno e o limoneno constituem 25,41% dos componentes majoritários das amostras de óleo essencial de pimenta-preta estudado. Estes resultados estão em parcial concordância com as descobertas de pesquisas anteriores sobre a composição química dos óleos essenciais de pimenta-preta. Em pesquisas realizadas por Milenković *et al.* (2024), foi verificado que o β -pineno e o limoneno constituíam 27,4% do óleo essencial após 15 minutos de hidrodestilação, resultados que estão em concordância com os obtidos em nosso estudo. Enquanto, Bhatia *et al.* (2024) relataram a presença de β -cariofileno, limoneno, β -felandreno, pineno, copaeno e α -humuleno em óleo essencial de pimenta-preta.

Por sua vez, Milenković e Stanojević (2021) ao estudarem a composição química e atividade biológica da pimenta-preta, observaram que β -cariofileno, limoneno e β -pineno eram os componentes mais abundantes do óleo essencial de pimenta-preta por eles estudado. Estudos realizados por Wang *et al.* (2019) demonstraram que 2 das 4 amostras de óleo essencial de pimenta-preta produzida em 4 países (Índia, Brasil, Sri Lanka e China), continham β -cariofileno. Os mesmos autores relataram que a pimenta-preta produzida no Brasil continha quantidades relativamente maiores de β -cariofileno.

Por outro lado, Tran *et al.* (2019) quando estudavam o processo de extração e análise de componentes majoritários em óleos essenciais de sementes de pimenta-preta colhidas na província de Gia Lai, Vietnã, descobriram que o óleo era constituído majoritariamente por 3-careno, D-limoneno, β -cariofileno e β -pineno. As mudanças no conteúdo dos óleos essenciais podem ser devidas a fatores genéticos, origem geográfica, condições climáticas, sazonalidade e ao uso de diferentes métodos de extração do óleo (BURT, 2004; BHATIA *et al.*, 2024). Além disso, o intervalo entre a colheita da matéria-prima e a extração do óleo essencial desempenham um papel fundamental na composição química do óleo (BHATIA *et al.*, 2023).

4.2. Seletividade e linearidade

Para os métodos cromatográficos, a seletividade é utilizada para garantir que o pico de resposta do analito (avaliado no tempo de retenção característico) seja proveniente exclusivamente do mesmo e não de outros compostos presentes na amostra. A seletividade é

avaliada através da análise de interferências que podem ocorrer em uma matriz complexa (PASCHOAL *et al.*, 2008). A linearidade de um método deve ser demonstrada por meio da sua capacidade de respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração de um analito em uma mesma amostra (ANVISA, 2017). O método analítico usado nesse estudo apresentou uma boa seletividade e linearidade, resultados que corroboram com os encontrados por Da Silva Moura *et al.* (2020), que verificaram uma boa seletividade e linearidade do método analítico validado, quando estudavam a extração ótima do óleo essencial de *Ocimum basilicum* pela associação de ultrassom e hidrodestilação e seu potencial como biopesticida contra umas das principais pragas de grãos armazenados.

4.3. Comparação de métodos de detecção

A diferença verificada entre os métodos de detecção para o limoneno pode não ter sido devido à concentração dos voláteis durante o procedimento de extração, visto que a concentração de voláteis em ambos os métodos são é realizada aplicando o mesmo processo. Por outros lado, Aparicio-Ruiz *et al.* (2018) relataram que motivos como a seletividade e a sensibilidade do detector GC-FID e GC-MS são possíveis razões para as diferenças na precisão, juntamente com uma maior variação na fonte de ionização ao analisar voláteis.

4.4. Rendimento de extração do óleo essencial de pimenta-preta

A utilização do cloreto de sódio durante a ozonização da pimenta-preta, bem como o pré-tratamento com ultrassom, não favoreceu o acréscimo do rendimento do óleo essencial nos diferentes tempos de exposição (0, 24, 48, 72 e 96 h). Resultados contrários aos nossos foram verificados por Tran *et al.* (2019), onde observaram um aumento do rendimento de extração em pimenta-preta emergida ao cloreto de sódio a 2% antes da extração do óleo essencial. Por sua vez, Wang *et al.* (2018) observaram que o banho ultrassônico alterou positivamente o rendimento de extração do óleo essencial de pimenta-preta. Os prováveis benefícios do banho de ultrassom são a intensificação da transferência de massa, notável efeito térmico, ruptura celular e efeitos de penetração aprimorados (CHEMAT, *et al.*, 2017). Estudo comprova que a extração assistida por ultrassom pode ser considerada como uma tecnologia verde e eficaz para a extração do óleo essencial de pimenta-preta, devido aos altos rendimentos e menor tempo de extração sem o uso de solventes (WANG *et al.*, 2018).

4.5. Compostos bioativos e análises de qualidades da pimenta-preta

A ozonização da pimenta-preta com reumedecimento em solução de cloreto de sódio nos tempos de 24, 48, 72 e 96 h, não alterou o teor de fenólicos totais dos grãos. Por outro lado, a ozonização sem a solução salina promoveu um aumento do teor de fenólicos totais nos grãos de pimenta-preta com o aumento do tempo de exposição. Uma possível explicação para este aumento, pode ser devido ao fato de o ozônio ser considerado um forte agente oxidante capaz de levar à ruptura da membrana celular, promovendo a liberação dos compostos fenólicos (ALOTHMAN *et al.*, 2010). No entanto, Tanino *et al.* (2019) observaram uma redução de aproximadamente 30% de antioxidantes em grãos de pimenta-preta tratados com plasma não térmico. Resultados similares foram obtidos por Liu *et al.* (2023), onde relataram uma redução de aproximadamente 8,5 % do poder antioxidante da pimenta-preta tratada com jato de plasma de pressão atmosférica.

Por sua vez Kahar *et al.* (2024) observaram um aumento de 0,11 % do conteúdo fenólico de pimenta-preta tratada com plasma frio atmosférico. Contudo, o aumento do teor de fenólicos foi observado com o aumento do tempo de exposição dos grãos ao ozônio. Os compostos fenólicos, são considerados como um tipo de antioxidante natural, que preserva as células dos tecidos contra danos causados por espécies reativas de oxigênio e espécies de nitrogênio (HOU *et al.*, 2019). A atividade antioxidante também não foi alterada pelo tratamento com ozônio. Ao contrário das nossas observações, Kahar *et al.* (2024) verificaram uma perda de 6,76 % da capacidade antioxidante dos grãos de pimenta-preta tratada com 170 V de plasma frio atmosférico por 10 min.

Foi verificada uma redução do teor de água nos grãos de pimenta-preta ozonizados sem a solução de cloreto de sódio. Essa diminuição pode ser atribuída ao ressecamento dos grãos durante o tratamento com ozônio. Os grãos de pimenta-preta têm uma coloração preta brilhante e a cor é um atributo de qualidade muito importante, que contribui de forma vital para a sua aceitação pelo consumidor (KAHAR; SHELAR; ANNAPURE, 2024). No presente estudo não foi verificada a alteração dos valores de luminosidade, diferença de cor e saturação de cor para a ozonização com e sem umedecimento em solução de cloreto de sódio. Por sua vez, Bang *et al.* (2020) também verificaram não haver diferenças entre os parâmetros de cor da pimenta-preta tratada em simultâneo com plasma frio e luz ultravioleta C. Enquanto, Kahar *et al.* (2024) relataram haver alteração nos valores de luminosidade e diferença de cor depois do tratamento

de pimenta-preta tratada com plasma frio atmosférico. Por sua vez, Liu *et al.* (2023) também relataram não haver diferenças significativas entre os valores de a^* e b^* com o aumento do tempo de tratamento da pimenta-preta com jatos de plasma de pressão atmosférica, mas o valor de luminosidade diminuiu significativamente, resultando em pimentas mais escuras.

Os resultados obtidos no presente trabalho corroboram com os observados por Dogu-Baykut e Gunes, (2022) que verificaram não haver diferenças significativas nos parâmetros de cor para pimenta-preta tratada com ozônio e luz UV-C, constituindo desta forma, evidências complementares do potencial do gás ozônio na manutenção da qualidade dos grãos de pimentapreta. A correlação positiva (0,547) verificada entre o teor de fenólicos totais e a atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical DPPH são contrários aos resultados obtidos por Elhussein *et al.* (2018) que observaram uma correlação relativamente baixa (0,4877) entre o conteúdo fenólico e a atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical DPPH quando faziam a triagem das bebidas e especiarias mais consumidas quanto aos seus conteúdos de nutrientes não bioativos.

5. CONCLUSÕES

Neste estudo as condições ideais (massa de 60 g e 20 min de banho de ultrassom) para a extração do óleo essencial de pimenta-preta por hidrodestilação com o uso do ultrassom como pré-tratamento foram otimizadas e validadas. Foram identificados 8 compostos no óleo essencial de pimenta-preta, nos quais foram objeto de estudo β -pineno e limoneno. O método de quantificação apresentou uma boa linearidade nas faixas de trabalho testadas, com bons limites de detecção e quantificação. Após o tratamento com ozônio dos grãos de pimenta-preta não foi verificado o aumento do rendimento de extração do óleo essencial.

De igual modo, não foram observadas diferenças entre as concentrações de β -pineno e limoneno nos dois tratamentos estudados para diferentes tempos de exposição. Não houve impacto dos tratamentos no pH, acidez titulável e parâmetros de cor, provando que não houve alterações prejudiciais na qualidade da pimenta-preta. Uma mudança notável nos compostos bioativos foi observada, devido à qual o teor de fenólicos foi aumentada, o que sugere que o ozônio podia ser mais usado nas indústrias de extração para aumentar o rendimento do composto bioativo desejado.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA-Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. Brasília, DF, 2017.

ALOTHMAN, M. *et al.* Ozone-induced changes of antioxidant capacity of fresh-cut tropical fruits. **Innovative Food Science and Emerging Technologies** v. 11, n. 4, p. 666–671, 2010.

APARICIO-RUIZ, R. *et al.* Comparison of two analytical methods validated for the determination of volatile compounds in virgin olive oil: GC-FID vs GC-MS. **Talanta** v. 187, n. February, p. 133–141, 2018.

BANG, I. *et al.* Microbial decontamination of black peppercorns by simultaneous treatment with cold plasma and ultraviolet C. **Innovative Food Science and Emerging Technologies** v. 63, n. May, p. 102392, 2020.

BHATIA, S. *et al.* Novel applications of black pepper essential oil as an antioxidant agent in sodium caseinate and chitosan based active edible films. **International Journal of Biological Macromolecules** v. 254, n. P3, p. 128045, 2024.

BHATIA, S. *et al.* The Effect of Sage (*Salvia sclarea*) essential oil on the physiochemical and antioxidant properties of sodium alginate and casein-based composite edible films. **Gels** v. 9, n. 3, 2023.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology** v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.

BRASIL. Resolução RDC no 166, de 24 de julho de 2017. **Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências** v. 2017, p. 87, 2017.

BURT, S. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods - A review. **International Journal of Food Microbiology** v. 94, n. 3, p. 223–253, 2004.

CAI, R. *et al.* Antifungal activity and mechanism of citral, limonene and eugenol against *Zygosaccharomyces rouxii*. **Lwt** v. 106, n. August 2018, p. 50–56, 2019.

CHANDRAN, J. *et al.* Oxidative stability, thermal stability and acceptability of coconut oil flavored with essential oils from black pepper and ginger. **Journal of Food Science and Technology** v. 54, n. 1, p. 144–152, 2017.

CHEMAT, F. *et al.* Review of green food processing techniques. Preservation, transformation, and extraction. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**. [S.l: s.n.], 2017

CHEMAT, F. *et al.* Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. **Ultrasonics Sonochemistry** v. 34, p. 540–560, 2017.

- CHEN, G. *et al.* Enhanced extraction of essential oil from *Cinnamomum cassia* bark by ultrasound assisted hydrodistillation. **Chinese Journal of Chemical Engineering** v. 36, p. 38–46, 2021.
- DA SILVA MOURA, E. *et al.* Optimal extraction of *Ocimum basilicum* essential oil by association of ultrasound and hydrodistillation and its potential as a biopesticide against a major stored grains pest. **Molecules** v. 25, n. 12, p. 2781, 2020.
- DALLA NORA, F.; BORGES, C. Pré-tratamento por ultrassom como alternativa para melhoria da extração de óleos essenciais. **Ciencia Rural** v. 47, n. 9, p. 1–9, 2017.
- DAMANHOURI, Z. A review on therapeutic potential of *Piper nigrum* L. (Black Pepper): The king of spices. **Medicinal & Aromatic Plants** v. 03, n. 03, 2014.
- DJOUAHRI, A.; BOUDARENE, L.; MEKLATI, B. Effect of extraction method on chemical composition, antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oil from the leaves of Algerian *Tetralina articulata* (Vahl) Masters. **Industrial Crops and Products** v. 44, p. 32–36, 2013.
- DOGU-BAYKUT, E.; GUNES, G. Effect of ultraviolet (uv-c) light and gaseous ozone on microbial and color qualities of whole black pepper seeds (*Piper Nigrum* L.). **Carpathian Journal of Food Science and Technology** v. 14, n. 2, p. 122–131, 2022.
- ELHUSSEIN, E. *et al.* Screening of the most consumed beverages and spices for their bioactive non-nutrient contents. **Journal of Food Measurement and Characterization** v. 12, n. 4, p. 2289–2301, 2018.
- ESA. European Spice Association Quality Minima Document. v. rev 4, n. December, p. 1–20, 2011.
- GAMBINO, E. *et al.* Evaluation of the pathogenic-mixed biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*/*Staphylococcus aureus* and treatment with limonene on three different materials by a dynamic model. **International Journal of Environmental Research and Public Health** v. 19, n. 6, p. 1–12, 2022.
- HASHEMI, S. *et al.* Extraction of essential oil from *Aloysia citriodora* Palau leaves using continuous and pulsed ultrasound: Kinetics, antioxidant activity and antimicrobial properties. **Process Biochemistry** v. 65, n. August 2017, p. 197–204, 2018.
- HOU, Y. *et al.* Effect of cold plasma on blueberry juice quality. **Food Chemistry** v. 290, n. March, p. 79–86, 2019.
- KAHAR, S.; SHELAR, A.; ANNAPURE, U. Effect of pin-to-plate atmospheric cold plasma (ACP) on microbial load and physicochemical properties in cinnamon, black pepper, and fennel. **Food Research International** v. 177, n. December 2023, p. 113920, 2024.
- LIMA, J. Instituto Adolfo Lutz. **Revista do Instituto Adolfo Lutz** v. 1, n. 1, p. 5–20, 1941.

- LIU, Y. *et al.* Inactivation mechanisms of atmospheric pressure plasma jet on *Bacillus cereus* spores and its application on low-water activity foods. **Food Research International** v. 169, n. April, p. 112867, 2023.
- MARKOVIĆ, M. *et al.* A new kinetic model for the *Common juniper* essential oil extraction by microwave hydrodistillation. **Chinese Journal of Chemical Engineering** v. 27, n. 3, p. 605–612, 2019.
- MELO, A. *et al.* Extração, identificação e estudo do potencial antimicrobiano do óleo essencial de pimenta-preta (*Piper nigrum* L.), biomonitorado por *Artemia salina* Leach. **Holos** v. 1, n. 0, p. 1–16, 2021.
- MILENKOVIĆ, A. *et al.* Chemical composition and antioxidant activity of black pepper (*Piper nigrum* L.) fructus essential oil hydrodistillation fractions. **Journal of Essential Oil-Bearing Plants** v. 27, n. 1, p. 166–176, 2024.
- MILENKOVIĆ, A.; STANOJEVIĆ, L. Black pepper: Chemical composition and biological activities. **Advanced Technologies** v. 10, n. 2, p. 40–50, 2021.
- MORSY, N. A short extraction time of high quality hydrodistilled cardamom (*Elettaria cardamomum* L. Maton) essential oil using ultrasound as a pretreatment. **Industrial Crops and Products** v. 65, p. 287–292, 2015.
- O'BRYAN, C. *et al.* Orange essential oils antimicrobial activities against *Salmonella* spp. **Journal of Food Science** v. 73, n. 6, p. 264–267, 2008.
- PANDISELVAM, R. *et al.* Ozone based food preservation: a promising green technology for enhanced food safety. **Ozone: Science and Engineering** v. 41, n. 1, p. 17–34, 2019.
- PASCHOAL, J. *et al.* Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Quimica Nova** v. 31, n. 5, p. 1190–1198, 2008.
- RAKNESS, K. *et al.* Guideline for measurement of ozone concentration in the process gas from an ozone generator. **Ozone: Science and Engineering** v. 18, n. 3, p. 209–229, 1996.0191951960854.
- ROBERTS, M. *et al.* Extraction of Essential Oils from Lavandula × intermedia. , 2022.
- SALEEM, A. *et al.* Therapeutic Role of *Piper nigrum* L (Black Pepper) and Pharmacological Activities. **Scholars International Journal of Biochemistry** v. 5, n. 1, p. 15–21, 2022.
- SANTE, D. Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed SANTE 11312/2021. **Document N° SANTE 11945/2015** p. 1–57, 2021.
- SRINIVASAN, K. Black pepper and its pungent principle-piperine: A review of diverse physiological effects. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition** v. 47, n. 8, p. 735–748, 2007.

TANINO, T. *et al.* Inactivation of *Aspergillus* sp. spores on whole black peppers by nonthermal plasma and quality evaluation of the treated peppers. **Food Control** v. 97, n. October 2018, p. 94–99, 2019.

TORLAK, E.; SERT, D.; ULCA, P. Efficacy of gaseous ozone against *Salmonella* and microbial population on dried oregano. **International Journal of Food Microbiology** v. 165, n. 3, p. 276–280, 2013.

TRAN, T. *et al.* The study on extraction process and analysis of components in essential oils of black pepper (*Piper nigrum* L.) seeds harvested in Gia Lai Province, Vietnam. **Processes** v. 7, n. 2, 2019.

TURRINI, E.; SESTILI, P.; FIMOIGNARI, C. Overview of the Anticancer Potential of the “King of Spices” *Piper nigrum* and Its Main Constituent Piperine. **Toxins** v. 12, n. 12, 2020.

ULLAH, H.; WILFRED, C.; SHAHARUN, M. Comparative assessment of various extraction approaches for the isolation of essential oil from *Polygonum minus* using ionic liquids. **Journal of King Saud University - Science** v. 31, n. 2, p. 230–239, 2019.

WANG, L.; WELLER, C. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. **Trends in Food Science and Technology** v. 17, n. 6, p. 300–312, 2006.

WANG, M. *et al.* *Piper nigrum* Oil - Determination of Selected Terpenes for Quality Evaluation. **Planta Medica** v. 85, n. 3, p. 185–194, 2019.

WANG, Y. *et al.* Green and solvent-free simultaneous ultrasonic-microwave assisted extraction of essential oil from white and black peppers. **Industrial Crops and Products** v. 114, n. February, p. 164–172, 2018.

XIONG, K.; CHEN, Y.; SHEN, S. Experimental optimization and mathematical modeling of supercritical carbon dioxide extraction of essential oil from *Pogostemon cablin*. **Chinese Journal of Chemical Engineering** v. 27, n. 10, p. 2407–2417, 2019.