

**CENTRO FEDERAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA DE MINAS GERAIS
(CEFET-MG)**

Jhonatan Bispo de Oliveira

**AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA DE METODOLOGIAS VERDES DE EXTRAÇÃO
DOS TERPENOS VOLÁTEIS DO CAPIM CIDREIRA
(*Cymbopogon citratus* Stapf)**

Belo Horizonte (MG)

2019

Jhonatan Bispo de Oliveira

**AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA DE METODOLOGIAS VERDES DE EXTRAÇÃO
DOS TERPENOS VOLÁTEIS DO CAPIM CIDREIRA
(*Cymbopogon citratus* Stapf)**

**Trabalho de conclusão de curso
apresentado como requisito parcial
para a obtenção do título de Bacharel
em Química Tecnológica.**

**Orientador: Prof^ª. Dra. Esther Maria
Ferreira Lucas.**

**Coorientadora: Prof^ª. Dra. Ana Maria
de Resende Machado.**

CEFET-MG

Belo Horizonte (MG)

2019

Jhonatan Bispo de Oliveira

**AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA DE METODOLOGIAS VERDES DE EXTRAÇÃO
DOS TERPENOS VOLÁTEIS DO CAPIM CIDREIRA
(*Cymbopogon citratus* Stapf)**

**Trabalho de conclusão de curso do Bacharelado
em Química Tecnológica
CEFET-MG**

Belo Horizonte, 17 de junho de 2019

**Prof^ª. Dra. Esther Maria Ferreira Lucas
(orientador – CEFET-MG)**

**Prof^ª. Dra. Ana Maria de Resende Machado.
(coorientadora – CEFET-MG)**

.

**Prof. Dr. Cleverson Fernando Garcia.
(avaliador – CEFET-MG)**

**Prof. Dr. Patterson Patrício de Souza
(avaliador – CEFET-MG)**

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por ser essencial em minha vida, autor de meu destino, meu guia, que me foi fonte de força e sabedoria para que realizasse mais essa caminhada. Dedico também ao meu pai Donizete e minha mãe Vilcivane, minha irmã Natália e aos meus familiares e amigos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus que permitiu que tudo isso acontecesse. Ao longo de minha vida, e não somente nestes anos como universitário, mas em todos os momentos é o maior mestre que alguém pode ter. Agradeço a Deus pela oportunidade de ser aprovado no Cefet-MG, onde tenho muito a agradecer pelos cinco anos que estive nessa instituição, agradecer pela estrutura, corpo docente e pelas experiências que foram proporcionadas nesse período.

Agradeço a todos os professores por me proporcionar o conhecimento não apenas racional, mas caráter e afetividade da educação no processo de formação profissional, por tanto que se dedicaram a mim, não somente por terem me ensinado, mas por terem me feito aprender. A palavra mestre, nunca fará justiça aos professores dedicados os quais, sem nominar, terão os meus eternos agradecimentos.

Agradeço minhas orientadoras Esther Maria Ferreira Lucas e Ana Maria de Resende Machado que abriram as portas para mim com a primeira oportunidade de iniciação científica e sempre me apoiaram, incentivaram e se empenharam para que eu pudesse realizar todos os trabalhos, inclusive na elaboração e revisão do trabalho de conclusão de curso. As duas com muito carinho meus eternos agradecimentos. Agradeço também ao professor Cleverson Fernando Garcia que me auxiliou nesse trabalho com muito carinho e disposição em todos os momentos.

Aos meus pais, Donizete e Vilcivane, que apesar de todas as dificuldades me fortaleceram e me apoiaram em todos os momentos e que, para mim, foram muito importantes e essenciais para que eu conquistasse esse sonho. Obrigada a minha irmã, que nos momentos de minha ausência dedicados ao estudo superior, sempre fez entender que o futuro é feito a partir da constante dedicação no presente! Aos meus avós, tios e tias, primos e amigos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação e com contribuições valiosas, o meu muito obrigado!

RESUMO

OLIVEIRA, J. B.; MACHADO, A. M. R.; LUCAS, E. M. F. Avaliação estatística de metodologias verdes de extração de terpenos voláteis do capim cidreira (*Cymbopogon citratus* Stapf)

O emprego de chás e fitoterápicos preparados a partir de diferentes plantas para o tratamento de enfermidades, infecções e inflamações é uma prática culturalmente consolidada em nosso país. Os processos utilizados em muitos casos são rudimentares ou caseiros, não se preocupando com a integridade do material vegetal que será usado para esse fim. A qualidade e perfil químico dos fitoterápicos são fatores importantes e podem variar significativamente, conforme o tipo de extração empregado, cujo processo pode ser ineficiente ou até mesmo ocasionar volatilização, degradação, oxidação ou reações paralelas dos metabólitos secundários do vegetal. No presente projeto foi investigada a influência de três fatores no preparo de infusões de capim limão (*Cymbopogon citratus* Stapf) aplicando planejamento fatorial e análise estatística, com intuito de determinar os melhores fatores ou condições de preparo para fitoterápicos preparados com esta espécie vegetal. Para a execução do projeto, o material vegetal utilizado foi plantado e colhido com seis meses de vida. Foram construídas duas matrizes, onde foram comparados os fatores: tipo de extração (infusão, infusão com ultrassonificação e decocção), tempo de contato entre material vegetal e sistema extrator (5 e 25 minutos) e condição das plantas (seca, fresa e resfriada). Após o preparo dos extratos, empregou-se a microextração líquido-líquida dispersiva para promover a migração dos metabólitos da solução aquosa (infusão) para o solvente orgânico, possibilitando preparar as amostras para análise na cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-MS), que possibilitou determinar o perfil químico dos metabólitos voláteis em cada amostra preparada. A análise comparativa dos cromatogramas obtidos foi realizada, e a identificação da presença das substâncias bioativas foi possível utilizando o índice de Kovats e a comparação dos espectros de massas obtidos com banco de dados do equipamento. Os resultados foram processados estatisticamente, possibilitando observar que: em relação ao preparo, não fez diferença estatística o uso de folhas secas ou frescas e o resfriamento do capim resultou em extratos mais pobres em relação aos compostos bioativos. A infusão simples e infusão com ultrassonificação apresentaram capacidade de extração similar, contudo em tempos maiores na infusão já houve formação dos compostos da classe dos epóxidos. A decocção mostrou ser uma técnica agressiva para esse tipo de material vegetal, pois houve grande extração dos compostos oxidados, que são indesejáveis para os fitoterápicos. Com relação ao tempo, quanto maior contato entre solvente e o vegetal maior foram os teores dos bioativos. Assim, utilizou-se de uma matriz de análise onde houve um estudo univariado do fator tempo, variando o tempo de extração entre 5 à 65 minutos, com intuito de determinar o ponto máximo de extração. Os resultados mostraram que a concentração dos metabólitos continuou crescendo e tempos maiores até 65 minutos. Por fim, as condições indicadas para a obtenção de um fitoterápico de qualidade de capim limão foi empregando infusão, com folhas secas ou frescas e tempo 25 e 30 minutos, sendo um período viável para a produção do chá e com redução da formação de compostos oxidados.

Palavras-chave: Capim limão. Extração. Fitoterápico. Perfil químico.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Exemplo de capim limão.....	7
Figura 2 - Estruturas dos principais terpenos que compõem os extratos de capim cidreira.....	8
Figura 3: Estrutura do isopreno.	9
Figura 4: Representação esquemática da biossíntese de terpenos, rota do ácido mevalônico.	10
Figura 5: Representação esquemática da biossíntese de terpenos, rota DXP.....	10
Figura 6 - Etapas envolvidas na microextração líquida-líquida dispersiva.	13
Figura 7 - Perfil cromatográfico do óleo essencial de capim limão, analisado por cromatógrafo gasoso da marca Varian.	15
Figura 8 - Cromatograma referente ao teste com Acetato de Etila como solvente extrator.....	25
Figura 9 - Cromatograma referente ao teste com Diclorometano como solvente extrator.	26
Figura 10 - Perfil cromatográfico do extrato obtido por infusão empregando ultrassonificação por 25 minutos.....	27
Figura 11: Espectro de massas atribuído ao nerol.	29
Figura 12: Espectro de massas atribuído ao neral.	29
Figura 13: Espectro de massas atribuído ao geraniol.	30
Figura 14: Espectro de massas atribuído ao geranial.	30
Figura 15: Esquema de proposta de fragmentações do espectro de massas.....	31
Figura 16: Espectro de massas atribuído ao epóxido não identificado.....	32
Figura 17: Espectro de massas atribuído ao epoxi-linalol.....	32
Figura 18 - Possíveis rotas e produtos de epoxidação do linalol.....	33
Figura 19- Gráfico da distribuição em cubo da soma da área absoluta dos álcoois.....	36
Figura 20 - Efeitos dos fatores para a soma da área dos álcoois.	37
Figura 21 - Efeitos de interação entre fatores para a soma da área dos álcoois.	38
Figura 22 - Avaliação de Pareto dos efeitos padronizados.....	39
Figura 23 - Distribuição em cubo da soma das áreas absolutas dos epóxidos.	42
Figura 24 - Efeitos dos fatores para a soma das áreas dos epóxidos.	43
Figura 25 - Efeitos de interação dos fatores para a soma das áreas dos epóxidos.....	44

Figura 26 - Avaliação de Pareto dos efeitos padronizados.....	45
Figura 27 – Soma das áreas absolutas dos picos dos aldeídos (Neral +Geranial) com relação ao tempo.....	47
Figura 28 - Respostas enquanto aos resíduos do modelo, com intuito de verificar adequabilidade da regressão dos aldeídos. A – teste da normalidade. B – teste para constância da variância. C – teste para comportamento normal. D – teste da independência dos resíduos.	48
Figura 29 - Soma das áreas absolutas dos picos dos álcoois (Nerol+Geraniol) com relação ao tempo.....	49
Figura 30 - Respostas enquanto aos resíduos do modelo, com intuito de verificar adequabilidade da regressão dos álcoois. A – teste da normalidade. B – teste para constância da variância. C – teste para comportamento normal. D – teste da independência dos resíduos.....	50
Figura 31 - Soma das áreas absolutas dos picos dos epóxidos com relação ao tempo...	51
Figura 32 - Respostas enquanto aos resíduos do modelo, com intuito de verificar adequabilidade da regressão dos epóxidos. A – teste da normalidade. B – teste para constância da variância. C – teste para comportamento normal. D – teste da independência dos resíduos.....	51

.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Relação 1 dos ensaios de extração dos compostos voláteis do capim cidreira.	19
Tabela 2 - Relação 2 dos ensaios de extração dos compostos voláteis do capim cidreira	20
Tabela 3 - Matriz de ensaios do estudo univariado (fator tempo).	24
Tabela 4 - Substâncias identificadas nos extratos, e com seus respectivos tempos de retenção, kovats teóricos e calculados e similaridade com espectrômetro de massas....	28
Tabela 5 - Resultados das áreas dos picos referente a primeira matriz de ensaios.....	34
Tabela 6 - Resultados das áreas dos picos referente a segunda matriz de ensaios.....	41
Tabela 7 – Áreas absolutas dos picos dos compostos voláteis de capim cidreira relacionados à análise de influência do tempo.	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

GC-MS	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massas
DECC	Decocção
DLLME	Dispersive Liquid-Liquid Microextraction (Microextração Líquido-Líquido Dispersiva)
DXP	1-desoxilulose 5-fosfato
EK	Erro relativo do Kovats
INF	Infusão
INFU	Infusão com ultrassonificação
KC	Kovats calculado
KT	Kovats teórico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PNPMF	Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos
rpm	Rotação por minuto
SPE	Solid Phase Extraction (Extração em Fase Sólida)
SPME	Solid Phase Micro Extraction (Microextração em Fase Sólida)
TR	Tempo de Retenção
μL	Microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	2
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 Plantas Medicinais.....	4
2.2 Fitoterapia, Fitoterápicos e Fitofármacos	5
2.3 Capim Cidreira (<i>Cymbopogon citratus</i> Stapf) e sua bioatividade	7
2.4 Principais Metabólitos Secundários do Capim Cidreira	8
2.5 Biogênese dos metabólitos secundários (terpenóides)	9
2.6 Métodos de Extração	11
2.7 Tratamento dos extratos aquosos para a análise cromatográfica.....	12
2.8 Métodos de Análises	13
2.8.1 Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas.....	13
2.8.2 Perfil Cromatográfico do Óleo de Capim Cidreira.....	15
2.9 Planejamento de Experimentos.....	16
3 MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1 Equipamentos	17
3.2 Método de Análise Cromatográfica	17
3.3 Cultivo e Colheita da Amostra de Capim Cidreira	18
3.4 Secagem das folhas	18
3.5 Armazenamento sob-refrigeração das folhas	18
3.6 Escolha do Solvente Extrator	18
3.7 Planejamento fatorial do preparo dos extratos	19
3.7.1 Preparo dos Extratos a partir das Folhas de Capim Cidreira Frescas.....	20
3.7.2 Preparo dos Extratos a partir das Folhas de Capim Cidreira Secas.....	21
3.7.3 Preparo dos extratos a partir das Folhas de Capim Cidreira Resfriadas.....	22
3.8 Microextração Líquido-Líquido Dispersiva.....	22
3.9 Análise por Cromatografia Gasosa.....	23

3.10 Processamento de dados.....	23
3.11 Análise univariada.....	23
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	24
4.1 Definição do solvente extrator empregado na microextração líquida-líquida dispersiva.....	25
4.2 Perfil Cromatográfico	27
4.3 Análise da matriz de ensaios 1.....	33
4.4 Análise da matriz de ensaios 2.....	40
4.5 Análise do teor de compostos voláteis em função do tempo	45
5 CONCLUSÕES.....	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
ANEXOS	65

1 INTRODUÇÃO

Um ramo da medicina, que é uma das mais abrangentes é a fitoterapia, que é baseada no emprego de produtos vegetais no tratamento de enfermidades, onde se baseia em conhecimentos científicos e, às vezes de tradições, para aplicação desse tipo de tratamento. Na fitomedicina são empregadas plantas medicinais (planta que possui substâncias com ação terapêutica) na obtenção do fitoterápico, e também para o isolamento dos fitofármacos, que são princípios ativos que não teve alteração molecular (ANVISA, 2018). Esses compostos são em muitos casos parte do metabolismo secundário das plantas, que não estão diretamente envolvidos nos processos de crescimento, desenvolvimento e reprodução, mas que auxiliam na interação com o ambiente (STAMP, 2003).

Atualmente há uma crescente busca de tratamentos com base em produtos e processos naturais, evitando o uso excessivo de medicamentos sintéticos. Isso acontece devido a grande onda e propaganda de grupos antimedicação, pessoas que evitam ao máximo utilizar remédios e até vacinas e a falta de recurso financeiro de algumas camadas da população (SIMÕES *et al.* 2017).

Diante dessa situação, muitas desses grupos buscam na cultura popular caminhos de tratamentos menos agressivos, mais naturais e baratos, como a produção de extratos a partir de plantas, usando recurso disponível para tratamento de enfermidades como enxaquecas, reumatismo, inflamações dentre outras (SINGI *et al.* 2005).

Além de ser uma alternativa para a população, o uso de plantas medicinais é também uma valorização da flora brasileira, sendo que a biota brasileira está estipulada entre 170 e 210 mil de espécies (SIMÕES *et al.* 2017). Por isso há diversas pesquisas dentro desse campo de interesse, pois é necessário promover o desenvolvimento tecnológico dos fitoterápicos. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 65% da população mundial utiliza produtos naturais como medicina tradicional (OLIVEIRA *et al.* 2011), apresentando indícios de que é de interesse público a intensificação nos estudos em farmacognosia e farmacologia química dos produtos naturais.

Dentro da flora brasileira existe uma planta que é amplamente utilizada como calmante e antiespasmódico, diurético, contra gripes, dores de cabeça, disenteria, e ainda apresenta ações antifúngica e bactericida (MORAES, OLIVEIRA E SOUSA,

2007), sendo essa a *Cymbopogon citratus* Stapf, também conhecida como capim-limão ou capim-cidreira. Os fitoterápicos de capim-limão são preparados a partir da secagem das folhas para remoção da água e conservação das mesmas e, posteriormente, a infusão ou decocção das folhas secas para a extração dos metabólitos bioativos (MARTINAZZO *et al.* 2007). As características farmacológicas do capim-cidreira são atribuídas aos terpenos voláteis, como: nerol, geraniol, mirceno, ocimeno, linalol, neral, geranial (GUIMARÃES *et al.* 2008). Nesse trabalho foi possível detectar a presença de seis compostos, sendo quatro com características farmacológicas de interesse: nerol, neral, geraniol e geranial e, dois compostos epoxidados. Esses compostos foram denominados como oxidados.

Em busca de aperfeiçoar o processo de fabricação de extratos de capim-limão, utilizou-se de metodologias que possibilitam a extração dos terpenos voláteis que seguem o princípio da Química Verde, principalmente empregando o uso de solventes menos tóxicos e promovendo geração de menor volume de resíduos. A infusão (consiste em verter água em fervura sobre a planta, ficando em repouso) ou decocção (consiste em manter o material vegetal em contato com água até seu ponto ebulição) e são métodos que apresentam características que englobam metodologias verdes, por utilizar água como solvente (não tóxico), menor gasto energético e menor tempo do processo, já que a extração se baseia em tempos que variam de 5 e 25 minutos. O único resíduo gerado que necessita de tratamento é a parte vegetal que, poderá ser utilizada em plantações como adubo.

Esse trabalho teve como objetivo geral buscar os melhores parâmetros de extração dos terpenos para a obtenção de fitoterápicos com maior potencial farmacológico, ou seja, definir o método que permite a extração de maiores concentrações dos metabólitos secundários bioativos. Com o intuito de desenvolver futuras pesquisas no tema, o trabalho tem como objetivos específicos:

- Determinar qual dos métodos de extração: infusão, infusão com ultrassom ou decocção que conduz a extração mais eficiente dos terpenos bioativos;
- Aplicar a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) como alternativa de metodologia verde de preparo de amostras de matriz aquosa para análise em GC/MS;
- Utilizar a análise multivariada para promover o planejamento de experimentos;

- Utilizar de ferramentas estatísticas para formular a melhor metodologia de produção do fitoterápico de capim-limão.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nesse tópico do trabalho foi tratado todo embasamento teórico, com conceitos já fundamentados que foram essenciais para execução do projeto. Foram abordados os assuntos: plantas medicinais, metabólitos secundários bioativos, fitoterapia, fitoterápicos, fitofármacos, métodos de extração e análise de produtos naturais e capim-cidreira.

2.1 Plantas Mediciniais

É de conhecimento do uso das plantas como alimento, porém, o uso das plantas como medicamentos começou devido à observação empírica dos efeitos benéficos ou maléficos provocados pela utilização de diversos vegetais no tratamento de enfermidades. As plantas utilizadas no tratamento de patologias ou ferimentos foram denominadas como plantas medicinais (FIRMO *et al.* 2011).

O homem primitivo buscou na natureza as soluções para os diversos males que o assolava, fossem esses de ordem espiritual ou física. Aos feiticeiros, considerados intermediários entre os homens e os deuses cabia a tarefa de curar os doentes, unindo-se, desse modo, magia e religião ao saber empírico das práticas de saúde, a exemplo do emprego de plantas medicinais. A era Antiga inaugurou outro enfoque, quando, a partir do pensamento hipocrático, que estabelecia relação entre ambiente e estilo de vida das pessoas, os processos de cura deixaram de ser vistos apenas com enfoque espiritual e místico (ALVIM *et al.* 2006).

Com o crescimento da indústria farmacêutica, a dependência dos medicamentos industriais para o tratamento de diversas enfermidades se torna cada vez mais evidente, porém o preço de venda dos medicamentos alopáticos e números de etapas de processamentos para produção vêm fazendo com que grupos de pessoas busquem novas

alternativas para o tratamento de enfermidades. Logo, a utilização de produtos naturais se torna um caminho cada vez mais atraente para a população. Desde os primórdios da humanidade, os materiais naturais mais utilizados na medicina foram às partes que compõem as plantas, como: folhas, raízes, sementes, caule e frutos (SIMÕES *et al.* 2017).

Entretanto, oposto à crença popular, o uso de plantas medicinais não é isento de riscos, podendo acarretar danos à saúde, uma vez que, além do princípio ativo terapêutico, as plantas podem conter substâncias tóxicas, podendo existir ainda contaminações por agrotóxicos ou por metais pesados (alumínio, chumbo, mercúrio, manganês, entre outros). Todo princípio ativo terapêutico é benéfico dentro de um determinado intervalo de concentração, abaixo desta quantidade pode ser ineficaz e acima pode ser tóxico. Uma vez que não há o controle na variação da concentração do princípio ativo nos preparos caseiros de fitoterápicos, é difícil atingir a faixa terapêutica com segurança (FONSECA, 2005). Para que haja segurança no uso de plantas medicinais é necessário o desenvolvimento de pesquisas que possibilitam efetiva comprovação científica da eficácia e segurança de seu uso extratos para o tratamento de patologias.

2.2 Fitoterapia, Fitoterápicos e Fitofármacos

Com o avanço das pesquisas medicinais e farmacêuticas descobriu-se que ações terapêuticas promovidas pelos extratos vegetais eram provenientes principalmente dos metabolitos secundários produzidos pelas plantas. Os metabolitos secundários são provenientes do metabolismo secundário das plantas, sendo compostos que não participam em funções vitais para a sobrevivência das plantas, como produção de carboidratos, proteínas e gorduras, mas que auxiliam na interação das plantas com o meio ambiente. E, os metabolitos secundários que conferem às plantas medicinais suas propriedades farmacológicas são denominados fitofármacos. Como a preocupação com a cura de doenças sempre se fez presente ao longo da história da humanidade, atualmente, a população ainda tem o costume de ingerir diversas plantas medicinais em preparados farmacêuticos que são os denominados fitoterápicos (PEREIRA, CARDOSO, 2012).

Os fatores extrínsecos como ambiente de cultivo, temperatura, umidade relativa, exposição ao sol, localização (latitude, longitude e altitude), tempo de vida, competição

e características do solo (nutrientes e presença de microrganismos) são fatores determinantes na produção dos metabólitos secundários vegetais. Por se tratarem de substâncias alelopáticas (produzidas para mediar as relações inter e intra específicas da espécie em questão) os metabólitos secundários possuem um papel contra a herbivoria, ataque de patógenos, competição entre plantas e atração de organismos benéficos como polinizadores, dispersores de semente e microrganismos simbiotes de acordo com suas estruturas químicas. Existem três grandes grupos de metabólitos secundários: terpenos, compostos fenólicos e alcaloides (NETO, LOPES, 2007; SIMÕES *et al.* 2017).

Os fitofármacos (princípio ativo isolado da planta medicinal, que não passa por qualquer alteração molecular) e os fitoterápicos (medicamento obtido de matérias-primas vegetais) são as bases da fitoterapia, sendo essa a medicina integrativa que mais cresce ao longo dos anos com medicamentos e comércio. Isso é reflexo ao crescimento dos estudos científicos que destacam a descoberta da eficácia de plantas medicinais (SANTOS *et al.* 2011, VASCONCELLOS *et al.* 2002). A partir da extração dos fitofármacos pode-se produzir um fitoterápico, sendo esse um medicamento obtido exclusivamente de matérias-primas vegetais, que necessitam de avaliação farmacológica pré-clínica, toxicológica e clínica para que possa ser utilizado sem riscos (VASCONCELLOS *et al.* 2002; SIMÕES *et al.* 2017). Dessa maneira, a fitoterapia pode ser aplicada de maneira segura, porém ainda são necessários vários estudos que possibilitam determinar se os fitofármacos e/ou substâncias tóxicas estarão presentes nos preparados fitoterápicos.

Visando a regulamentação e controle dos fitoterápicos, em 2006, o Governo Federal decretou a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF), Decreto nº 5.813. O programa visa o acesso às plantas medicinais e fitoterápicos a toda população, tendo como principais princípios: a segurança alimentar e nutricional; uso sustentável e valorização da biodiversidade brasileira; geração de empregos e renda; desenvolvimento tecnológico e industrial; promover melhorias na qualidade de vida da população. Como consequência, o PNPMF, é uma atuação do governo a fim de reduzir o uso indevido das plantas medicinais e fitoterápicos e potencializar os recursos disponíveis a sociedade (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

2.3 Capim Cidreira (*Cymbopogon citratus* Stapf) e sua bioatividade

O *Cymbopogon citratus* Stapf (Capim Cidreira ou Capim Limão) é uma planta pertencente à família Poaceae, originária da Índia e distribuída nos países tropicais, representada na Figura 1. É uma erva com formato de um capim longo, apresenta aroma semelhante ao do limão com coloração verde-pálida (GOMES, ESCHER, 2013).

Figura 1 – Exemplo de capim limão.



Fonte: FERRO, 2008.

O capim limão é largamente utilizado no Nordeste do Brasil para produção de óleos essenciais que é amplamente aplicado à indústria na produção de fragrâncias e aromatizantes, sabões, detergentes, cremes, bebidas, solventes, doces, xaropes, condimentos e conservas (CRAVEIRO, QUEIROZ, 1993). Além do uso industrial, os extratos de capim limão são utilizados na medicina popular devido a propriedades bioativas e biológicas já comprovadas, por exemplo:

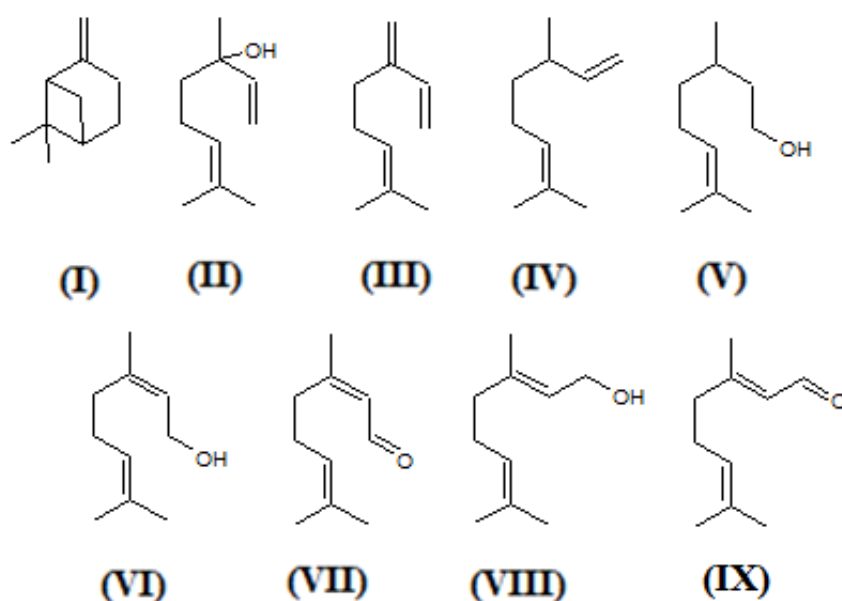
- Propriedades antioxidantes, devidos à presença de compostos fenólicos e flavonoides (SHAH *et al.* 2011);
- Fortalecimento do sistema imunológico, por inibir os efeitos das citoquinas, substâncias envolvidas em reações inflamatórias (BACHIEGA, SFORCIN, 2011);
- Combate a insônia tendo efeito sedativo (BLANCO *et al.* 2009);
- Prevenção e no tratamento de alguns tipos de câncer, como o câncer de pele, fígado e mama, além da proteção do DNA evitando danos causados pelos radicais livres (NAKAMURA *et al.* 2003; PUATANACHOKCHA *et al.* 2002);
- Propriedades antibacterianas (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*) e antifúngicas (*Rhizoctonia solani* e *Sclerotium oryzae*), poder curativo em algumas infecções causadas por esses microrganismos (NEGRELLE, GOMES, 2007);

- Propriedades antipiréticas e indutoras do suor (BAKHURU, 2008);
- Forte repelente de insetos, ajudando a prevenir doenças como malária e dengue (OYEDELE *et al.* 2002).

2.4 Principais Metabólitos Secundários do Capim Cidreira

Dentro os principais metabólitos secundários já identificados no capim cidreira podem se destacar os terpenos: β -Pinoeno (I), β -Linalol (II), Mirceno (III), Ocimeno (IV), β -Citronelol (V), Nerol (VI), β -Citral (Neral) (VII), Geraniol (VIII) e α -Citral (Geranial) (IX), cujas estruturas estão apresentadas na Figura 2.

Figura 2 - Estruturas dos principais terpenos que compõem os extratos de capim cidreira.



Fonte: Autoria própria. Software: ChemSketch, 1994.

As propriedades bioativas do capim cidreira estão relacionadas a cada um de seus componentes, sendo que cada um dos terpenos tem um ação biológica específica. O β -Pinoeno tem propriedade antibacteriana comprovada sobre bactérias envolvidas na etiopatogênese da endocardite infecciosa (LEITE, 2015). O β -Linalol apresenta atividade antimicrobiana e antioxidante (FERNANDES, 2016).

Estudos de plantas da espécie *Lippia* comprovaram atividade antimicrobiana, antiparasitária, antiinflamatória, analgésica, anestésica e antitumoral relacionados com o

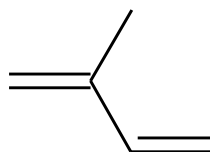
β -linalol, mircenol e neral (SOARES, DIAS, 2013). Para o mircenol também é comprovada efeito inseticida contra lagarta-do-cartucho do milho (LIMA, 2006). Propriedades fumigante e repelente foram atribuídas ao ocimeno e ao geraniol/nerol em testes em diversos fungos e insetos (BRITO *et al.* 2015; LORENZETTI *et al.* 2011).

O citronelol, por sua vez, apresentou fungitoxicidade a diversos fungos, principalmente *Amphobotrys ricini*, *Didymella bryoniae* e *Colletotrichum gloeosporioides* (VELOSO, *et al.* 2012). O citral, juntamente com seus dois isômeros, neral e geraniol, apresentaram ação antiinflamatória e promoveram o fortalecimento imunológico, por estimular as citocinas, além de ser em fungicida (FILHO, 2007; EL ASSAL, 2012; LEITE, 2015).

2.5 Biogênese dos metabólitos secundários (terpenóides)

A biogênese dos metabólitos secundários ocorre a partir de compostos simples resultantes do metabolismo primário do carbono dentro da planta. Para os terpenos o resultado dessas rotas secundárias é a formação do isopreno, Figura 3, sendo esse a unidade estrutural de cinco carbonos, comum a todos os terpenos. Dessa forma os terpenos podem ser classificados quanto ao número de isoprenos que há na sua estrutura, como: monoterpenos (2 isoprenos), diterpenos (4 isoprenos), triterpenos (6 isoprenos), tetraterpenos (8 isoprenos), sesquiterpenos (3 isoprenos) e politerpenos (PAVARANI, LOPES, 2016).

Figura 3: Estrutura do isopreno.

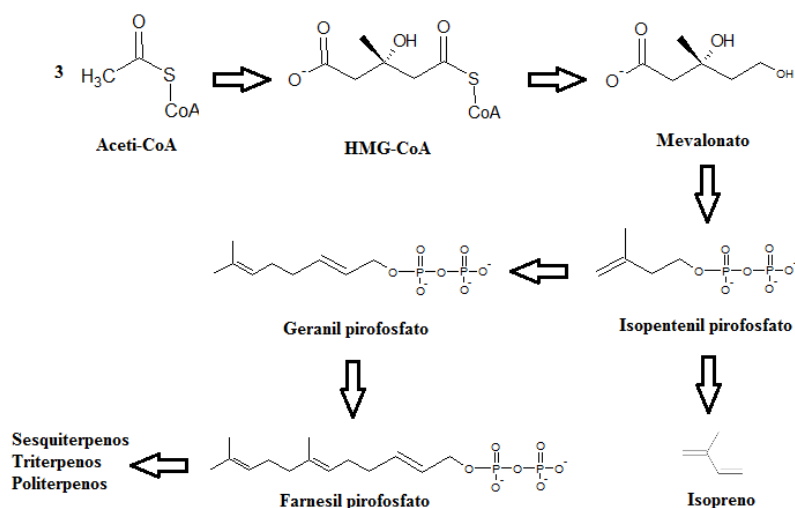


Fonte: Autoria própria. Software: ChemSketch, 1994.

O isopreno tem sua origem bioquímica derivado do isopentenil pirofosfato, que é formado a partir de duas vias metabólicas secundárias, a rota do ácido mevalônico e via do DXP (1-desoxilulose 5-fosfato). A primeira rota ocorre no citoplasma das células vegetais, mais específico nas mitocôndrias. Por essa via são formados os sesquiterpenos, triterpenos e os politerpenos. Tem como precursora a molécula de

Acetil-CoA, composto resultante do metabolismo primário do carbono (FELIPE, BICAS, 2017). Essa rota pode exemplificada na Figura 4.

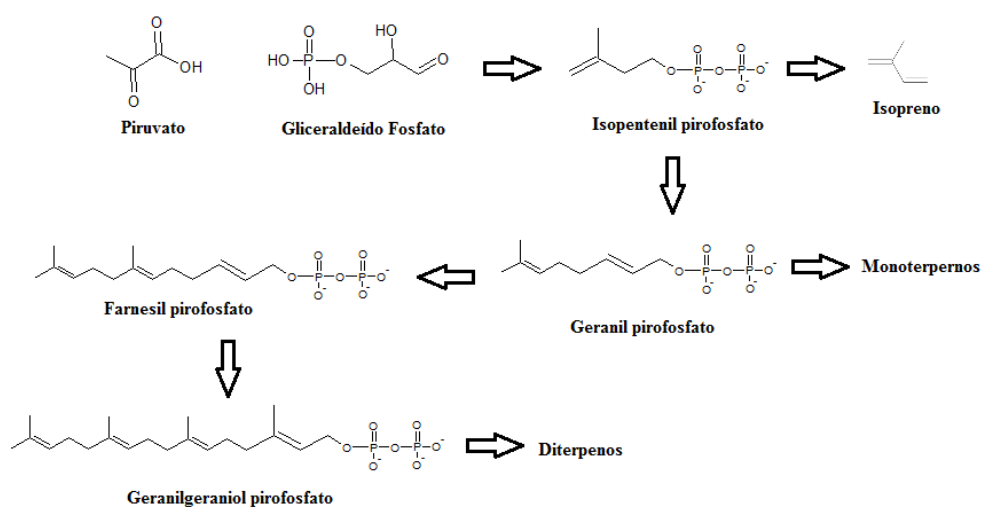
Figura 4: Representação esquemática da biossíntese de terpenos, rota do ácido mevalônico.



Fonte: FELIPE, BICAS, 2017 (MODIFICADO).

A segunda rota metabólica para formação dos terpenos ocorre nos cloroplastos das células vegetais. O piruvato e o gliceraldeído fosfato são metabólitos primários precursores dessa via. Por essa via são formados os monoterpenos, diterpenos e os tetraterpenos (FELIPE, BICAS, 2017). Essa rota pode exemplificada na Figura 5.

Figura 5: Representação esquemática da biossíntese de terpenos, rota DXP.



Fonte: FELIPE, BICAS, 2017 (MODIFICADO).

2.6 Métodos de Extração

Os métodos de extração de substâncias naturais de vegetais nos últimos anos vêm evoluindo através do surgimento de novas técnicas e combinação de diferentes técnicas. Tais métodos, quando envolvem plantas, sempre são voltados para extração de maior teor possível dos metabólitos de acordo com sua finalidade e aplicação.

Os metabólitos secundários apolares e de média polaridade, no geral, são extraídos na forma de óleo essencial, por diversas técnicas, tais como: enfloração (onde o extrato vegetal é depositado sobre uma camada de gordura durante certo período, depois há um tratamento com álcool para obtenção dos componentes); a destilação e a hidrodestilação (que se baseiam na imersão do vegetal em água ou outro solvente que, são submetidos a aquecimento promovendo a volatilização dos componentes que depois são condensados); e a prensagem que é uma extração em que não há emprego de calor, baseia-se na ruptura das glândulas dos vegetais onde estão presentes os metabólitos evitando assim a perda de componentes por volatilização ou degradação. Porém a técnica mais usada é a extração por solvente, que pode ser à quente (infusão e decocção) ou à frio (maceração e percolação). A maceração é um processo estático, no qual o material vegetal é mantido em contato com o solvente por um tempo e a partir das interações entre as moléculas do soluto e solvente, ocorre extração dos metabólitos. A percolação, por sua vez, é um processo dinâmico, onde se faz o arrastar do princípio ativo pela passagem contínua do líquido extrator através do material vegetal. No segundo processo há possibilidade do solvente ser saturado e com isto seu potencial extrator ser minimizado enormemente (SIMÕES *et al.* 2017).

Quando o caso é a produção de fitoterápicos caseiros, produzidos artesanalmente, o ideal é empregar a extração com solvente, utilizando água, permitindo o consumo do produto final que é conhecido popularmente como chá. Essas extrações devem sempre tender a máxima extração dos metabólitos bioativos do vegetal, controlando tempo e temperatura de extração para alcançar esse objetivo. A infusão (extração por solvente a quente) consiste na água ser aquecida até ponto de fervura, então a água quente é vertida sobre a planta e a mistura fica em repouso, durante determinado tempo, de preferência em um recipiente fechado, sendo geralmente aplicável a partes vegetais moles (NISHIYAMA *et al.* 2010). Já a decocção, consiste em manter o material vegetal em contato, durante determinado tempo, com água e aquecer este sistema até seu ponto ebulição. Este processo geralmente emprega vegetais duros e

de natureza lenhosa (GNOATTO, BASSANI, 2007). Em pesquisas científicas e industriais as duas técnicas podem ser combinadas com banho de ultrassom, onde se utilizam ondas sonoras de alta frequência, que promovem a fragmentação celular das estruturas do material vegetal, permitindo acesso aos metabólitos secundários. É possível combinação com o uso de micro-ondas para otimizar a extração, em que a temperatura é um suporte para extração, porém em alguns a energia fornecida pode ocasionar degradação de alguns compostos (NAVARRO, 2005).

2.7 Tratamento dos extratos aquosos para a análise cromatográfica

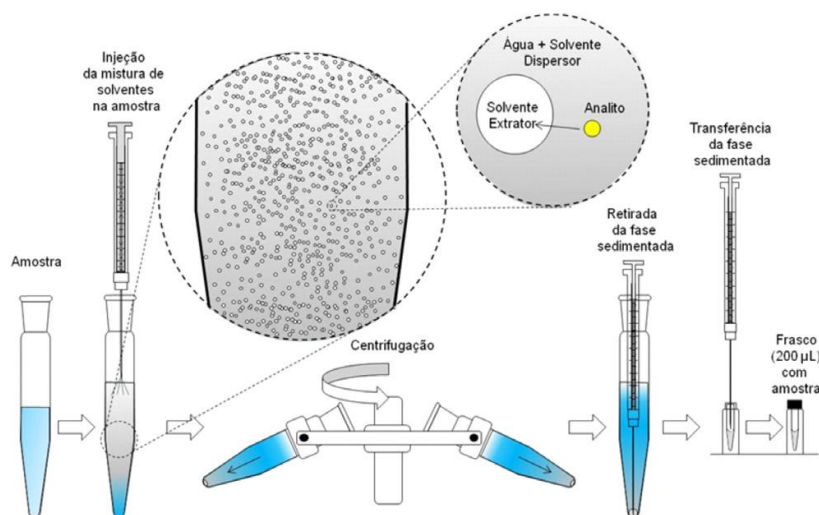
Para verificar a presença dos metabólitos bioativos garantindo a eficácia dos fitoterápicos produzidos é preciso realizar testes ou técnicas de análise de sua composição. Assim, a cromatografia gasosa é largamente empregada quando os metabólitos de interesse são voláteis, contudo, pelo fato dos extratos serem uma matriz aquosa, a aplicação direta do extrato no equipamento pode danificar a coluna cromatográfica do aparelho. Com isso, técnicas de extração e concentração dos compostos orgânicos que possibilitam transferir os metabólitos da matriz aquosa para um solvente orgânico são utilizadas, como a partição líquido-líquido que é baseada na adição de frações de solventes orgânicos e contato com a fase aquosa a fim de extrair os constituintes de interesse. Porém o alto gasto de solvente orgânico, que geralmente é tóxico se torna inviável nos conceitos de Química Verde.

Outro método aplicável para este fim é a extração em fase sólida (SPE) em que os analitos em matriz aquosa são extraídos após passarem por um cartucho contendo sorvente. Posteriormente é utilizado um solvente para dessorção do analito no cartucho, entretanto existe dificuldade nesse processo final, fazendo que haja o uso de grandes volumes de solvente orgânico (BARRIONUEVO, LANÇAS, 2001). Recentemente, surgiram as técnicas miniaturizadas de solventes, denominadas de microtécnica, tal como a, microextração em fase sólida (SPME), em que se emprega uma fibra de sílica revestida com polímero ou adsorvente, e essa fibra é exposta na matriz e assim ocorre a extração (OLIVEIRA, 2007).

Nesse trabalho buscou-se realizar a extração dos metabólitos da fase aquosa para um solvente orgânico aplicando metodologias verdes para extração dos bioativos, como é o caso da microextração líquida-líquida dispersiva (DLLME). Tal metodologia é baseada no uso de microlitros de um solvente imiscível em água (extrator) e um solvente com dupla polaridade (dispersor). Esses solventes entram em contato com o

extrato aquoso e após agitação em vortex, microgotas são formadas, como é esquematizada na Figura 6.

Figura 6 - Etapas envolvidas na microextração líquida-líquida dispersiva.



Fonte: CALDAS *et al.* 2011.

Após agitação e mistura dos solventes, há separação de fases e as microgotas sedimentam, essas microgotas são o solvente extrator junto com o analito de interesse, que depois é retirada com auxílio de uma micropipeta. Ao final, o uso de solventes e o gasto de energia são mínimos respeitando assim princípios da Química Verde (DUARTE *et al.* 2016; MARTINS *et al.* 2012; CALDAS *et al.* 2011).

2.8 Métodos de Análises

Para análise dos compostos presentes nos extratos preparados foi usado à Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas através da qual foi possível determinar o perfil cromatográfico, e identificar os componentes químicos de cada extrato para determinar qual método de extração foi mais eficiente.

2.8.1 Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas

A cromatografia gasosa (GC) é uma técnica que é fundamentada na migração dos componentes por uma fase estacionária que está dentro de uma coluna (tubo cilíndrico de sílica contendo um polímero) arrastados por uma fase móvel (inerte, no caso um gás), essa separação depende da interação do analito com a fase estacionária da coluna. O cromatógrafo a gás geralmente é composto por um cilindro de gás com

regulador de vazão, injetor de amostra, uma coluna cromatográfica, forno de controle de temperatura, detector e um sistema de dados. Para as análises cromatográficas é importante controlar variáveis que podem interferir no resultado final como: vazão do gás, temperatura e volume de injeção e programação do forno. A busca por um perfil cromatográfico mais adequado é o desafio dessa técnica, já que é preciso buscar a separação dos picos, sem que eles sejam alargados indicando que os compostos estão sendo arrastado corretamente, de modo a favorecer a obtenção de tempos de retenção específicos para cada componente, sendo o tempo de retenção um parâmetro de identificação (SKOOG *et al.* 2015).

Uma técnica acoplada de identificação dos metabólitos ao GC é espectrometria de massas. O espectrômetro de massas (MS) mede a razão massa carga dos íons produzidos, por impactos de elétrons ou ionização química de uma molécula. Pelo padrão de quebra das moléculas correspondente à cada pico obtido no cromatograma e comparação com a biblioteca do equipamento pode-se identificar o composto referente a cada pico, observado em cada tempo de retenção. No caso de terpenos, as análises por GC-MS são menos eficientes, uma vez que tais substâncias rearranjam-se facilmente formando fragmentos com m/z iguais, o que origina espectros que diferem apenas quanto às intensidades relativas dos picos (BROCHINI *et al.* 1999). Para minimizar esse entrave associa-se a espectrometria de massas com a determinação do índice de retenção linear (MUHLEN, 2009). Esse índice foi desenvolvido pelo professor Ervin Kováts que utilizou uma série homóloga de n-alcenos para formular uma equação linear (Equação 1), relacionando os tempos de retenção com o número de carbonos da estrutura dos compostos (KOVÁTS, 1958). Como as colunas envelhecem e uso de diferentes métodos, o tempo de retenção dos compostos tendem a mudar, sabendo disso, o índice de retenção linear pode ser uma forma útil de comparação e confirmação na identificação do composto (GAMA *et al.* 2017).

$$IRL = \left(\frac{t_{R X} - t_{R N}}{t_{R N+1} - t_{R N}} \right) \times 100 + 100n$$

(Equação 1)

$t_{R X}$ = tempo de retenção do componente X.

$t_{R N}$ = tempo de retenção do alcano N com t_{R} anterior ao componente X.

$t_{R N+1}$ = tempo de retenção do alcano N com t_{R} posterior ao componente X.

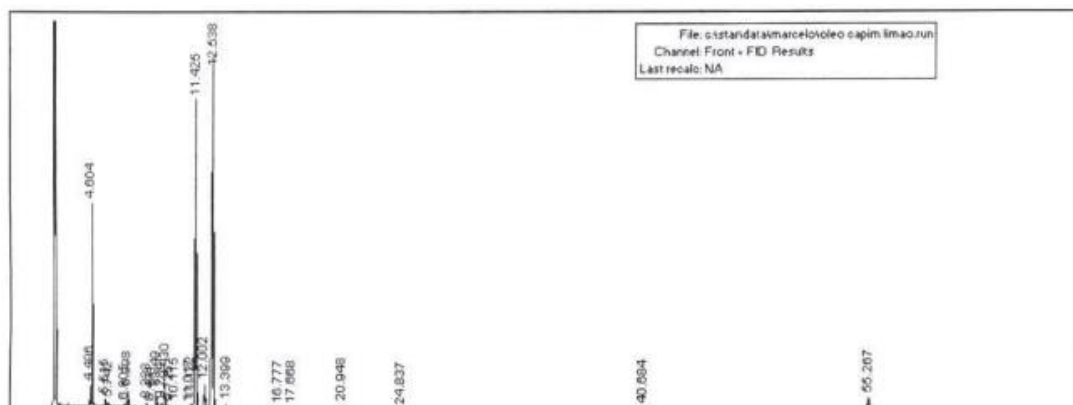
n = número de átomos de carbono do alcano N.

O índice de retenção linear é utilizado quando o método cromatográfico usado é programado, ou seja, presença de rampas de temperatura durante sua execução. Para métodos isotérmicos, ou com temperatura constante, é usado o índice de Kovats (KI). Porém, é convencionado na literatura o emprego do índice de retenção linear como índice de Kovats, sendo comum observar o KI no lugar de IRL.

2.8.2 Perfil Cromatográfico do Óleo de Capim Cidreira

O perfil cromatográfico dos extratos de capim cidreira é bem característico, sendo semelhante dentro da literatura e em diferentes métodos de extração, com a presença dos mesmos componentes e tempos de retenção próximos. O estudo do perfil desses extratos se torna importante para verificar a eficiência da extração e do método de análise. A Figura 7 é exemplo do perfil cromatográfico de um óleo essencial de capim limão, extraído por hidrodestilação, em que as condições cromatográficas foram: Coluna capilar DB5 30 m x 0,25mm x 0,25 mm. Injetor: 250°C. Detector: FID-290°C. Gás de arraste: hélio. Fluxo: 1,0 mL/min, 60°C a 240°C; 3°C/min. Volume de injeção 1 mL. Split: 1/20. (MARTINS *et al.* 2004).

Figura 7 - Perfil cromatográfico do óleo essencial de capim limão, analisado por cromatógrafo gasoso da marca Varian.



Fonte: MARTINS *et al.* 2004

Os perfis dos extratos do capim limão descritos em outras literaturas seguem o padrão apresentado anteriormente, pela presença de dois picos majoritários, variando entre os tempos de retenção de 10 a 15 minutos, sendo esses compostos o citral nas formas dos seus isômeros, neral e geranial, respectivamente. Observou-se ainda a presença de outro pico relevante, estando no tempo de retenção entre 3 a 5 minutos, que

em sua maioria foi identificado como β -Pineno. Há outros picos característicos que representam componentes que apresentam a propriedade de fitofármaco sendo o β -Linalol, mirceno, citronolol, nerol e geraniol, detectados respectivamente nos cromatogramas (BRITO *et al.* 2011).

2.9 Planejamento de Experimentos

Na maioria dos trabalhos de pesquisa envolvendo a química com um número de variáveis e combinações podem resultar em um grande e inalcançável números de experimentos, fazendo que ocorra principalmente perda de tempo, reagentes e material. Diante desse problema muitos grupos de pesquisa estão aplicando em suas metodologias técnicas de planejamento de experimentos, e já tem obtidos muitos resultados como: redução da variação do processo; melhor visualização e concordância entre os resultados; redução do tempo e custo operacional; comparação direta entre diferentes configurações nos projetos; determinação de parâmetros significativos; possibilitando propor parâmetros para melhoria do estudo (CALADO, MONTGOMERY, 2003).

Dento do planejamento de experimentos, onde há duas ou mais variáveis independentes, é usual o emprego do planejamento fatorial completo, onde é possível medir influências entre essas variáveis (fatores). Com intuito de detectar os efeitos entre os fatores é importante fazê-los variar e observar a resposta dessa variação. Esses ensaios realizados de um fator específico são chamados de níveis, portanto, para um planejamento fatorial é necessário no mínimo 2 níveis, ou seja, análise de dois parâmetros dentro de um fator, por exemplo, fator tempo nos tempos 5 e 15 minutos (CUNICO *et al.* 2008).

É comum denominar o planejamento fatorial em dois níveis com 2^k , onde k é o número de fatores, sendo esse o mais comum dos planejamentos experimentais. O uso de mais níveis pode acarretar o aumento do número de dados e experimentos sendo oposto aos objetivos de uma boa organização experimental (MARINHO, 2005).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os equipamentos e vidrarias utilizadas para o desenvolvimento desse trabalho foram disponibilizados pelo Departamento de Química do Cefet-MG, e se encontram nos laboratórios de química orgânica (sala 414), pesquisa (sala 301E) laboratório de cromatografia (sala 408) do prédio escolar do Campus I do Cefet-MG em Belo Horizonte.

3.1 Equipamentos

Para a execução desse trabalho foram necessários: balança digital da marca: Bel Enginee ring. Centrifuga da marca: Centrifuge 5410. Chapa de aquecimento da marca: IKA C-MAG HS 7. Estufa da Marca: Didática. Geladeira. Pipeta automática 100-1000 μL da marca: Expendorf Research Plus. E o Vortex Mixer da Marca: Kasvi basic K45-28. O Cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas da marca: Agilent Technologie/Modelo: 7890A, acoplado ao detector seletivo de massas (Agilent Technologies 5975C inert MSD Triple-Axis Detector), com coluna capilar do tipo DB-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm).

3.2 Método de Análise Cromatográfica

Para definição do método de análise cromatográfica, foram realizados testes empregando o óleo essencial comercial de capim limão (marca: YVY Destilaria, lote: 2018OE0106), diluído em diclorometano na proporção de 1:2. As condições testadas foram: volumes de Split, temperaturas de injeção, temperaturas de rampas e tempo de corrida.

As condições definidas para a realização das análises em cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) foram as seguintes: coluna capilar de sílica fundida (HP5-MS), fluxo de hélio, como gás de arraste, split 1:25, temperatura do injetor de 250°C, aquecimento com temperatura programada de 60°C por 1 minuto, 5°C por minuto até 100°C, 4°C por minuto até 150°C e mantidos por 2 minutos.

3.3 Cultivo e Colheita da Amostra de Capim Cidreira

O material vegetal (folhas frescas de *C. citratus*) foi cultivado no município de Contagem – MG/Brasil (coordenadas: latitude -19.9694499 e longitude -44.0628486). A coleta foi realizada no período da manhã do dia 07 de dezembro de 2018, garantindo-se que o tempo de vida do vegetal fosse equivalente à seis meses. De acordo com a literatura, estas são as condições que garantem a maior produção dos metabólitos do capim limão (GUIMARÃES *et al.* 2008; GOMES *et al.* 2007). Foram coletadas folhas jovens, cortadas a uma altura de 30 cm do solo.

3.4 Secagem das folhas

O material foi levado para secagem no dia em que ele foi colhido, cerca de 50 g de material foi espalhada em uma bandeja de alumínio e preparada para operação. Para a secagem do material vegetal, foi utilizada a estufa disponível no laboratório do Campus I, Belo Horizonte, do Cefet-MG, em uma temperatura de 60°C (aferida constantemente por termômetro) até obter-se massa constante, que foi atingido em um período de aproximadamente 4 horas, segundo MARTINS *et al.* (2002) é o tempo necessário para remoção completa da água no vegetal.

3.5 Armazenamento sob-refrigeração das folhas

Cerca de 50 g de material vegetal, logo após a colheita, foram levados a geladeira no laboratório 414 do Campus I, Belo Horizonte, do Cefet-MG. Dentro de uma embalagem plástica transparente com lacre, permaneceram em refrigeração por 7 dias após a colheita.

3.6 Escolha do Solvente Extrator

Foram medidos 0,50 g de material vegetal em um béquer no qual foi se adicionado 10 mL de água destilada. A mistura foi aquecida até a fervura (cerca de 98°C). A partir da fervura, o sistema ficou em repouso, por 5 minutos após os quais foi filtrado.

Após o extrato preparado, iniciou-se o teste para escolha dos solventes extratores da microextração líquida-líquida dispersiva. Antes da extração a amostra foi homogeneizada, segunda a metodologia empregada por Caldas *et al.* (2011), e com uma pipeta automática, duas alíquotas de 700 µL do extrato foram transferidos para dois *ependorfs*, nos quais foram também adicionados, em cada, 100 µL de etanol como solvente dispersor e 250 µL de acetato de etila em dos um *ependorf* e o mesmo volume de diclorometano no outro *ependorf*, os dois como solventes extratores. A mistura foi levada ao vortex por um minuto e posteriormente para centrífuga onde houve a centrifugação por 2 minutos com velocidade de 4000 rpm. Posteriormente, com auxílio da microseringa transferiu-se a fase orgânica para o microvial, denominado de *insert vial*, que foi levado para análise cromatográfica (MARTINS *et al.* 2012).

3.7 Planejamento fatorial do preparo dos extratos

No preparo dos extratos, utilizou-se água como solvente, nos modos de extração por infusão ou decocção com ou sem o uso de ultrassom. As folhas das plantas foram utilizadas na forma fresca, resfriada e seca. Para tanto utilizou-se de um planejamento fatorial 2^3 que foi definido por base de duas matrizes de ensaio, a matriz 1 que está representada pela Tabela 1 e a matriz 2 representada na Tabela 2 (p. 20).

Tabela 1: Relação 1 dos ensaios de extração dos compostos voláteis do capim cidreira.

Ensaio	Extração	Preparo	Tempo (min)
1	Infusão c/ Ultrassom	Fresca	5
2	Infusão	Fresca	5
3	Infusão c/ Ultrassom	Resfriada	5
4	Infusão	Resfriada	5
5	Infusão c/ Ultrassom	Fresca	25
6	Infusão	Fresca	25
7	Infusão c/ Ultrassom	Resfriada	25
8	Infusão	Resfriada	25
9	Infusão c/ Ultrassom	Fresca	5
10	Infusão	Fresca	5
11	Infusão c/ Ultrassom	Resfriada	5
12	Infusão	Resfriada	5
13	Infusão c/ Ultrassom	Fresca	25
14	Infusão	Fresca	25
15	Infusão c/ Ultrassom	Resfriada	25
16	Infusão	Resfriada	25

Fonte: Autoria própria.

Tabela 2 - Relação 2 dos ensaios de extração dos compostos voláteis do capim cidreira

Ensaio	Extração	Preparo	Tempo (min)
1	Infusão c/ Ultrassom	Fresca	5
2	Decocção	Fresca	5
3	Infusão c/ Ultrassom	Seca	5
4	Decocção	Seca	5
5	Infusão c/ Ultrassom	Fresca	25
6	Decocção	Fresca	25
7	Infusão c/ Ultrassom	Seca	25
8	Decocção	Seca	25
9	Infusão c/ Ultrassom	Fresca	5
10	Decocção	Fresca	5
11	Infusão c/ Ultrassom	Seca	5
12	Decocção	Seca	5
13	Infusão c/ Ultrassom	Fresca	25
14	Decocção	Fresca	25
15	Infusão c/ Ultrassom	Seca	25
16	Decocção	Seca	25

Fonte: Autoria própria.

3.7.1 Preparo dos Extratos a partir das Folhas de Capim Cidreira Frescas

Esses extratos foram preparados no mesmo dia da coleta, com folhas frescas que foram fragmentas em tamanhos homogêneos, cerca de 1 cm. Segundo Costa *et al.* (2005) o tamanho dos fragmentos não interfere na análise. Foram preparados extratos por infusão e decocção empregando como solvente a água, empregando ultrassom e sem o emprego de ultrassom.

3.7.1.1 Infusão em Água empregando ultrassom

Foram medidos 0,50 g de material vegetal em béqueres (50 mL) nos quais foram adicionados 10 mL de água em fervura (cerca de 98 °C). Os sistemas foram submetidos à ultrassonificação sem agitação por períodos de 5 e 25 minutos. Foram retirados 10 mL de amostras de cada sistema e estas foram armazenadas em frascos âmbar protegidos da exposição direta de luz e calor (PEREIRA, 2010).

3.7.1.2 Infusão em Água

Foram medidos 0,50 g de material vegetal em béqueres (50 mL). Foram adicionados 10 mL de água destilada em fervura (cerca de 98 °C) ao material vegetal e os sistemas foram mantidos durante períodos de 5 e 25 minutos, após os quais,

retiraram-se 10 mL de amostras de cada sistema e estas foram armazenadas em frascos âmbar protegidos da exposição direta de luz e calor (PEREIRA, 2010).

3.7.1.3 Decocção em Água

Foram medidos 0,50 g de material vegetal em béqueres (50 mL) nos quais foram se adicionaram 50 mL de água destilada. As misturas foram aquecidas até a fervura (cerca de 98°C). A partir da fervura, os sistemas ficaram em repouso, nos períodos de 5 e 25 minutos, foram retirados 10 mL de amostras de cada sistema e estas foram armazenadas em frascos âmbar protegidos da exposição direta de luz e calor (PEREIRA, 2010).

3.7.2 Preparo dos Extratos a partir das Folhas de Capim Cidreira Secas

Esses extratos foram preparados no mesmo dia da coleta, após secagem das folhas em estufa e posterior fragmentação em tamanhos homogêneos, cerca de 1 cm. Segundo Costa *et al.* (2005). Foram preparados extratos em infusão em água empregando ultrassom e decocção em água.

3.7.2.1 Infusão em água empregando ultrassom

Foram medidos 0,50 g de material vegetal em béqueres (50 mL) nos quais foram adicionados 10 mL de água em fervura (cerca de 98 °C). Os sistemas foram submetidos à ultrassonificação sem agitação por um período de 5 e 25 minutos. Foram retirados 10 mL de amostras de cada sistema e estas foram armazenadas em frascos âmbar protegidos da exposição direta de luz e calor (PEREIRA, 2010).

3.7.2.2 Decocção em Água

Foram medidos 0,50 g de material vegetal em béqueres (50 mL) nos quais foram se adicionaram 10 mL de água destilada. As misturas foram aquecidas até a fervura (cerca de 98°C). A partir da fervura, os sistemas ficaram em repouso, nos períodos de 5 e 25 minutos, foram retirados 10 mL de amostras de cada sistema e estas foram armazenadas em frascos âmbar protegidos da exposição direta de luz e calor (PEREIRA, 2010).

3.7.3 Preparo dos extratos a partir das Folhas de Capim Cidreira Resfriadas

Esses extratos foram preparados no mesmo dia de coleta, com folhas frescas que permaneceram sob-refrigeração por 7 dias e fragmentadas em tamanhos homogêneos, cerca de 1 cm, o tamanho da fragmentação não interfere na análise (COSTA *et al.* 2005). Foram preparados extratos utilizando infusão em acetato de etila empregando ultrassom, infusão em água empregando ultrassom e infusão em água sem ultrassom.

3.7.3.1 Infusão em Água empregando ultrassom

Foram medidos 0,50 g de material vegetal em béqueres (50 mL) nos quais foram adicionados 10 mL de água em fervura (cerca de 98 °C). Os sistemas foram submetidos à ultrassonificação sem agitação por um período de 5 e 25 minutos. Foram retirados 10 mL de amostras de cada sistema e estas foram armazenadas em frascos âmbar protegidos da exposição direta de luz e calor (PEREIRA, 2010).

3.7.3.2 Infusão em Água

Foram medidos 0,50 g de material vegetal em béqueres(50 mL). Foram adicionados 50 mL de água destilada em fervura (cerca de 98 °C) ao material vegetal e os sistemas foram mantidos durante períodos de 5 e 25 minutos, após os quais, retiraram-se 10 mL de amostras de cada sistema e estas foram armazenadas em frascos âmbar protegidos da exposição direta de luz e calor (PEREIRA, 2010).

3.8 Microextração Líquido-Líquido Dispersiva

Após todos os extratos aquosos terem sido preparados, iniciou-se a fase da microextração líquida-líquida dispersiva. Antes da extração a amostra foi homogeneizada, segunda a metodologia de Caldas *et al.* (2011) modificado. Com uma pipeta automática, 700 µL do extrato foram transferidos para o eppendorf, ao qual foram também adicionados 100 µL de etanol como solvente dispersor e 250 µL de diclorometano como solvente extrator. A mistura foi levada ao vórtex e agitada por 1 minuto e posteriormente para centrifuga onde houve a centrifugação por 2 minutos com velocidade de 4000 rpm. Posteriormente, com auxílio da microseringa transferiu-se a

fase orgânica para o microvial que foi levado para análise cromatográfica (MARTINS *et al.* 2012). Esse processo foi repetido com todos os extratos preparados.

3.9 Análise por Cromatografia Gasosa

Os cromatogramas obtidos pela técnica cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas foram analisados de acordo com seus perfis cromatográficos buscando-se realizar, identificação e quantificação dos metabólitos voláteis presentes nos extratos.

A identificação dos compostos presentes nos extratos correspondente à cada pico foi realizada mediante a aplicação do método de Kovats, segundo o qual uma mistura de hidrocarbonetos C6 até C15 foi empregada como padrão. Comparando o Kovats calculado com Kovats teóricos (ADAMS, 2007) e também por comparação dos espectros de massas obtidos com aqueles disponíveis na biblioteca do equipamento.

Os teores de cada metabólito foram definidos a partir da área relativa de cada pico presente no cromatograma que é equivalente a cada terpeno.

3.10 Processamento de dados

Os valores das áreas dos picos presentes nos cromatogramas dos extratos de cada condição de extração foram aplicados no software Minitab 18.1. Com as áreas dos picos relacionados com cada compostos, foram feitas análise em distribuição em cubo, efeitos dos fatores e entre os fatores e avaliação de Pareto.

Para análise das regressões, foram feitas testes com os resíduos das regressões. Foram realizados: teste da normalidade, teste para constância da variância, teste com histograma e teste da independência dos resíduos.

3.11 Análise univariada

Baseado nos resultados das duas matrizes de ensaio foi proposto um estudo univariado (fator tempo de extração), da extração com ultrassom e uso de folhas secas, onde avaliou se há um modelo matemático que rege a extração e/ou produção de compostos voláteis de interesse ou compostos oxidados. A Tabela 3 (p. 24) apresenta as condições de extração do estudo univariado.

Tabela 3 - Matriz de ensaios do estudo univariado (fator tempo).

Ensaio	Tempo (min)
1	5
2	5
3	15
4	15
5	25
6	25
7	35
8	35
9	45
10	45
11	55
12	55
13	65
14	65

Fonte: Autoria própria.

Portanto, o preparo dos extratos aquosos por infusão assistida com ultrassom foi realizada da seguinte forma: foram medidos 0,50 g de material vegetal em um béquer, para cada ensaio, no qual foram adicionados 10 mL de água em fervura (cerca de 98 °C). Cada sistema foi submetido à ultrassonificação sem agitação por períodos de 5, 15, 25, 35, 45, 55 e 65 minutos. Após os extratos preparados, foi feita a microextração líquido-líquido dispersiva nas mesmas condições já descritas anteriormente.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

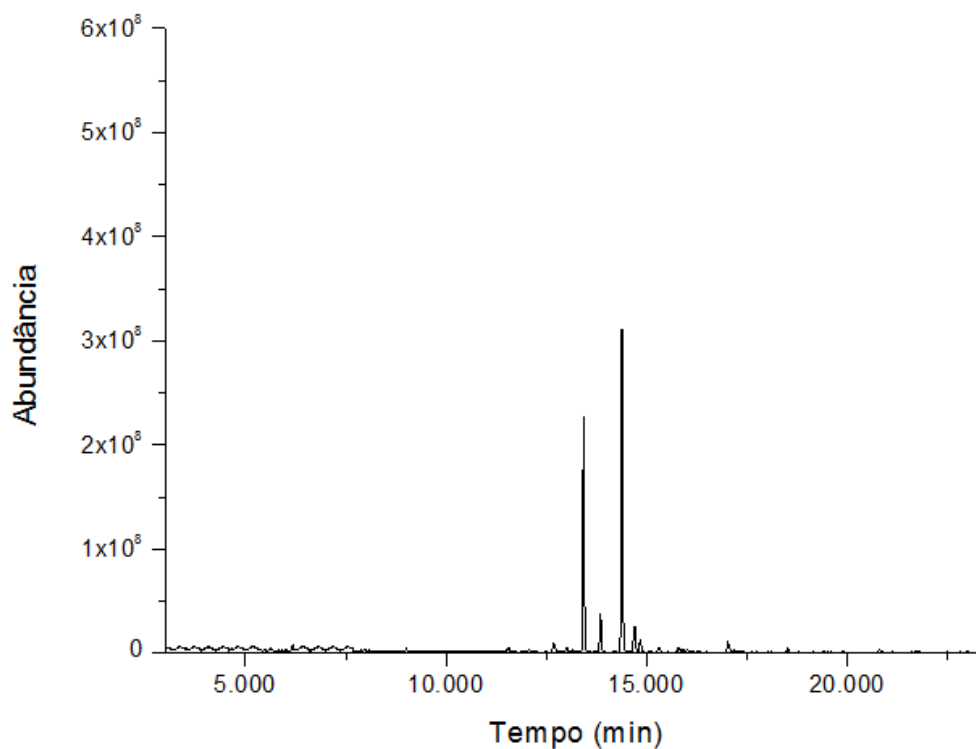
Nesse tópico do trabalho são apresentados todos os resultados relacionados aos extratos, após análise dos cromatogramas obtidos pelo GC-MS. Nos cromatogramas, avaliou-se os tempos de retenção as áreas dos picos referente à de cada composto. O que possibilitou a comparação do perfil químico dos extratos empregando métodos estatísticos para correlacionar variáveis como tempo de extração, metodologia de preparo material vegetal e tipo de extração. Por fim, buscou definir melhores condições de preparo de um fitoterápico com maior potencial farmacológico, ou seja, com maior teor dos metabolitos bioativos.

4.1 Definição do solvente extrator empregado na microextração líquida-líquida dispersiva

Para definir o solvente extrator a ser usado, foram feitos testes nas mesmas condições e no mesmo extrato com diferentes solventes, com intuito de observar qual solvente extrator foi mais eficiente, tanto no número de metabólitos extraídos quanto na abundância relativa de cada pico. A Figura 8 refere-se ao cromatograma da fase orgânica obtida pela microextração realizada com acetato de etila e a Figura 9 (p. 26) refere-se ao cromatograma da fase orgânica obtida pela microextração realizada com diclorometano.

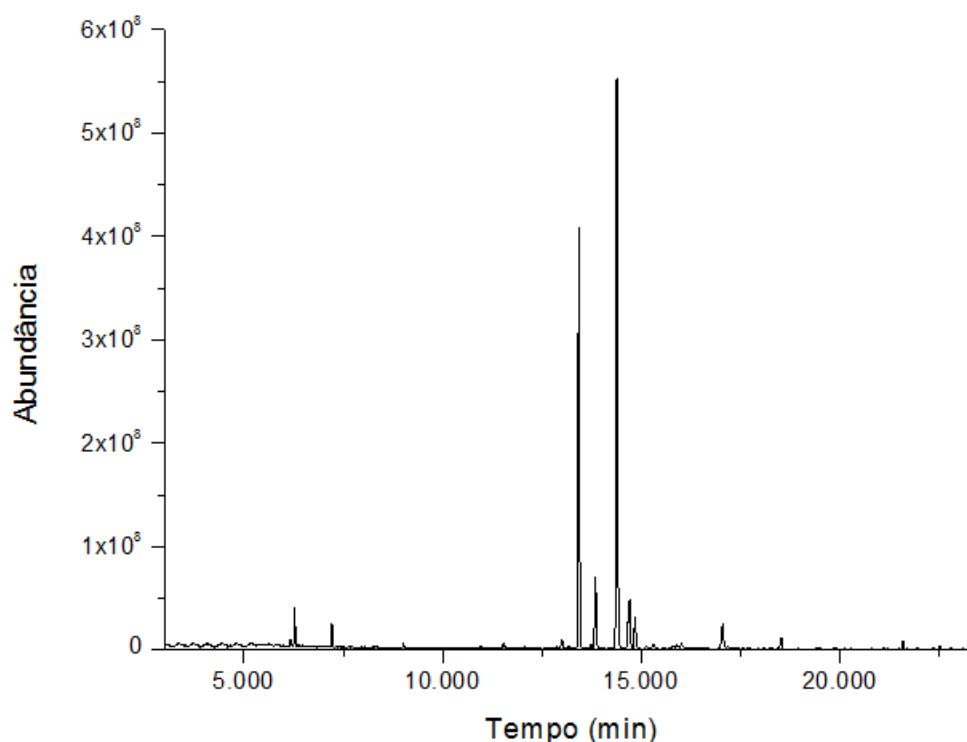
A química verde considera o acetato de etila um solvente verde e o diclorometano tóxico, porém a microextração líquido-líquido é uma técnica verde, já que há o emprego de microlitros de solvente, e não há produção de resíduo tóxico. Portanto, mesmo o uso do diclorometano, o processo continua sendo considerado uma metodologia verde.

Figura 8 - Cromatograma referente ao teste com Acetato de Etila como solvente extrator.



Fonte: Data Analyse – Agilent Technologie. Software: OriginPro 8, 2010.

Figura 9 - Cromatograma referente ao teste com Diclorometano como solvente extrator.



Fonte: Data Analyse – Agilent Technologie. Software: OriginPro 8, 2010.

Observando os dois cromatogramas anteriores, foi possível perceber que ambos mantêm perfis cromatográficos semelhantes. Porém o cromatograma do extrato obtido pela extração com diclorometano apresenta picos entre os tempos de 5 e 7,5 minutos que não são vistos na extração com acetato de etila. Desta forma o diclorometano apresentou maior afinidade com os compostos mais voláteis do capim limão, possibilitando a extração de maior número de compostos dessa matriz.

Outro aspecto a ser observado nos cromatogramas foi abundância relativa dos picos que são concomitantes nas duas extrações. Nos cromatogramas, os principais picos, encontrados no intervalo de 13 e 14 minutos, são respectivamente, o neral e o geranial, os dois principais compostos marcadores do capim limão. Estes picos apresentam maior abundância na segunda extração, indicando que o diclorometano tem maior interação com esses metabólitos.

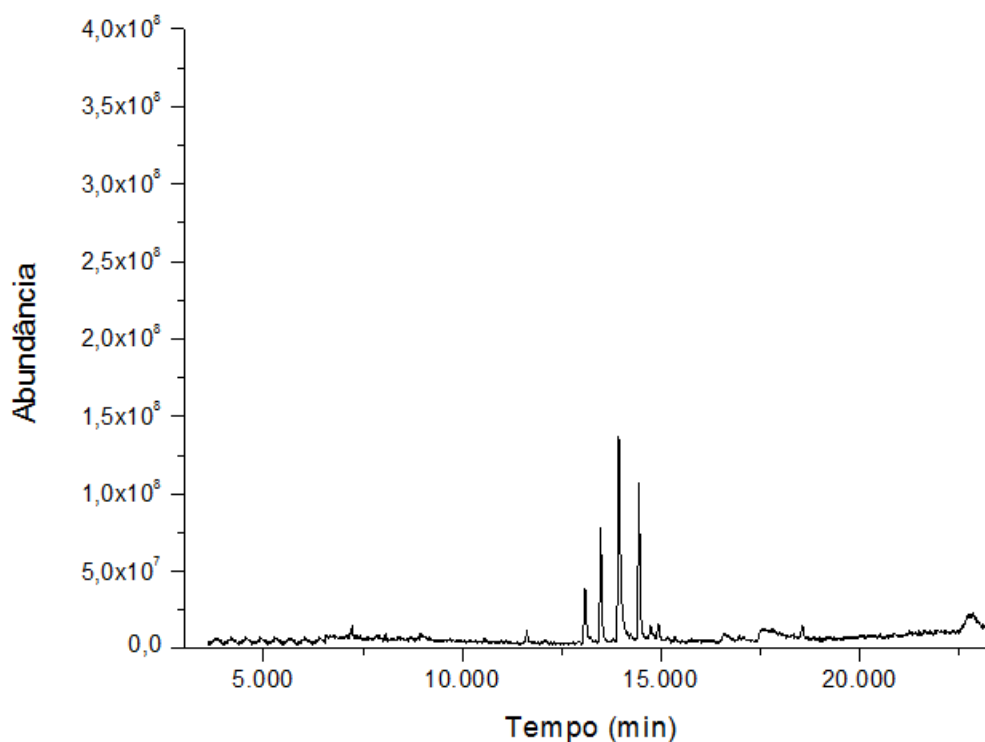
Diante disso, em busca de maior extração, maior detecção no GC-MS e maior afinidade com os principais componentes de extratos de capim limão o diclorometano foi o solvente escolhido para as demais microextrações.

4.2 Perfil Cromatográfico

Para garantir a qualidade dos chás e se a extração está sendo eficiente, foi realizada uma análise dos perfis cromatográficos das amostras a fim de avaliar se o comportamento estava dentro do esperado. Nem todos cromatogramas apresentaram todos os componentes bioativos. Para essa análise foi escolhido um cromatograma em que houve a detecção e identificação de um número maior de compostos.

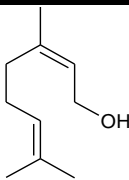
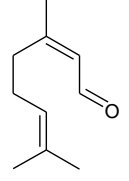
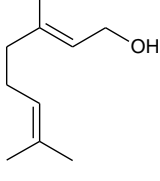
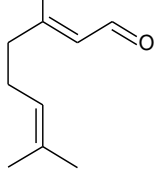
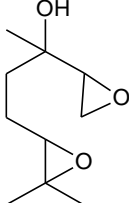
A Figura 10 mostra um cromatograma base para análise do perfil cromatográfico e a Tabela 4 (p. 28) indicou os metabólitos identificados, acompanhados com a comprovação de sua identidade através do Índice de Kovats.

Figura 10 - Perfil cromatográfico do extrato obtido por infusão empregando ultrassonificação por 25 minutos.



Fonte: Data Analyse – Agilent Technologie. Software: OriginPro 8, 2010.

Tabela 4 - Substâncias identificadas nos extratos, e com seus respectivos tempos de retenção, kovats teóricos e calculados e similaridade com espectrômetro de massas.

Nome	Estrutura	TR (min)	KT	KC	EK (%)	Similaridade (%)
Nerol		13,087	1229	1228	0,05	40,7
Neral		13,480	1238	1240	0,18	43,4
Geraniol		13,931	1252	1252	0,08	40,7
Geranial		14,444	1267	1267	0,05	43,4
Epóxido não identificado**	---	14,734	---	1275	---	---
Óxido de epoxi-linalol*		14,927	---	1281	---	84,9

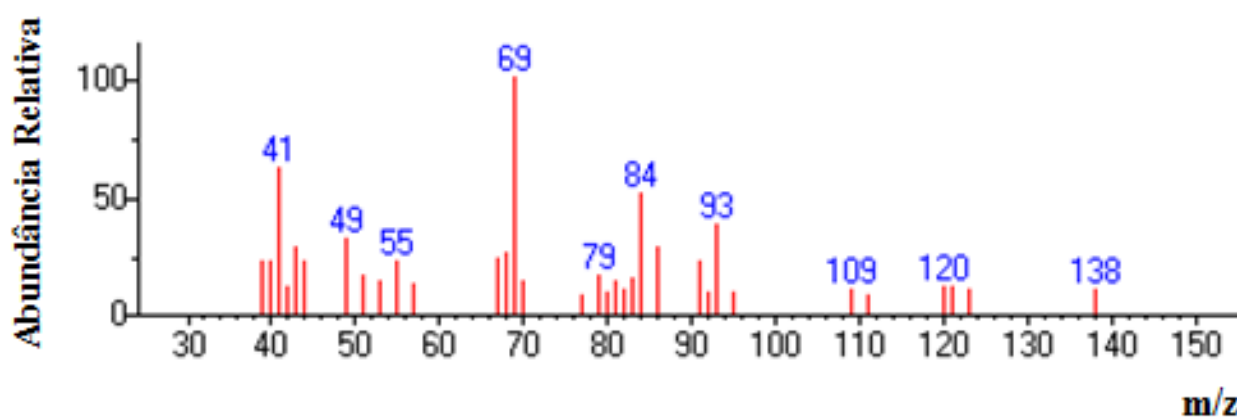
TR = Tempo de retenção. KT = Kovats Teórico. KC = Kovats Calculado. EK = Erro relativo do Kovats.* Identificado apenas pelo espectro de massas. ** Não identificado pelo espectro de massas nem pelo índice de Kovats.

Fonte: Autoria própria.

Para a identificação dos compostos por espectro de massas foi considerado que a similaridade mínima com a biblioteca do equipamento deveria ser de 40%. O perfil químico do extrato segue o esperado de acordo com os dados da literatura, com a

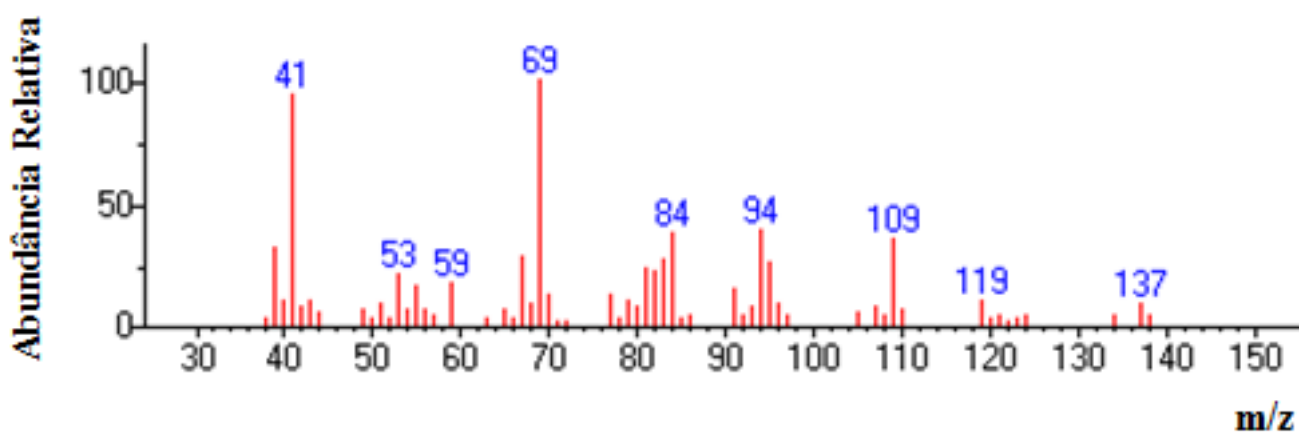
presença de três picos principais nos tempos de retenção de 13,480; 13,931 e 14,444 minutos, sendo eles respectivamente o, neral, geraniol e o geranial, principais componentes do capim limão. Ainda foi possível observar a presença de um pico anterior ao neral, no tempo de retenção de 13,087 minutos, sendo este correspondenteo nerol. Estes quatro compostos referem-se aos terpenóides das classes álcoois e aldeídos. Assim, foi realizado um estudo dos espectros de massas desses terpenos, nerol (Figura 11), neral (Figura 12), geraniol (Figura 13, p. 30) e geranial (Figura 14. p. 30), afim de garantir a identificação desses compostos.

Figura 11: Espectro de massas atribuído ao nerol.



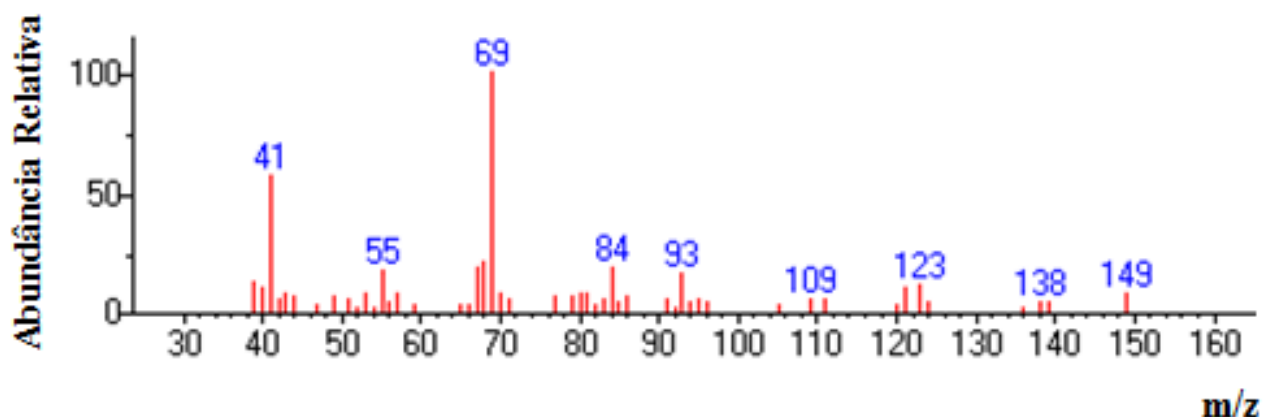
Fonte: Data Analyse – Agilent Technologie (MODIFICADO).

Figura 12: Espectro de massas atribuído ao neral.



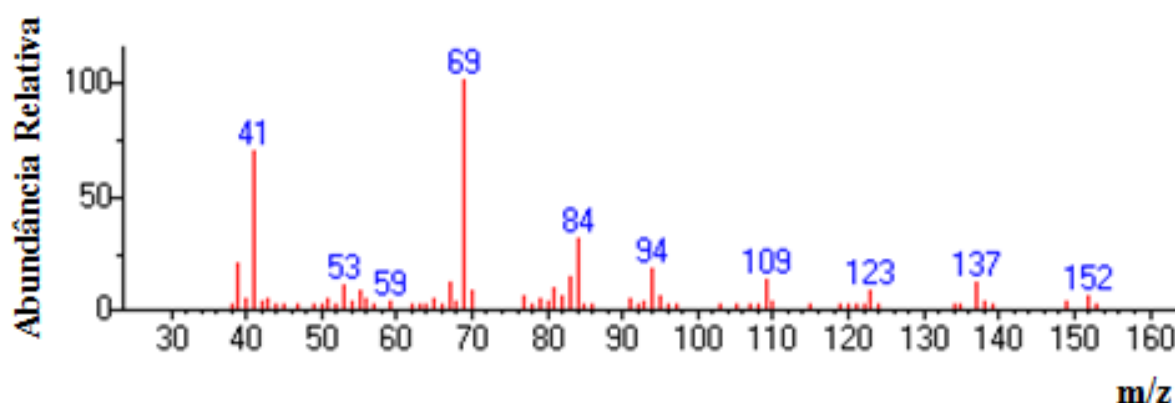
Fonte: Data Analyse – Agilent Technologie (MODIFICADO).

Figura 13: Espectro de massas atribuído ao geraniol.



Fonte: Data Analyse – Agilent Technologie (MODIFICADO).

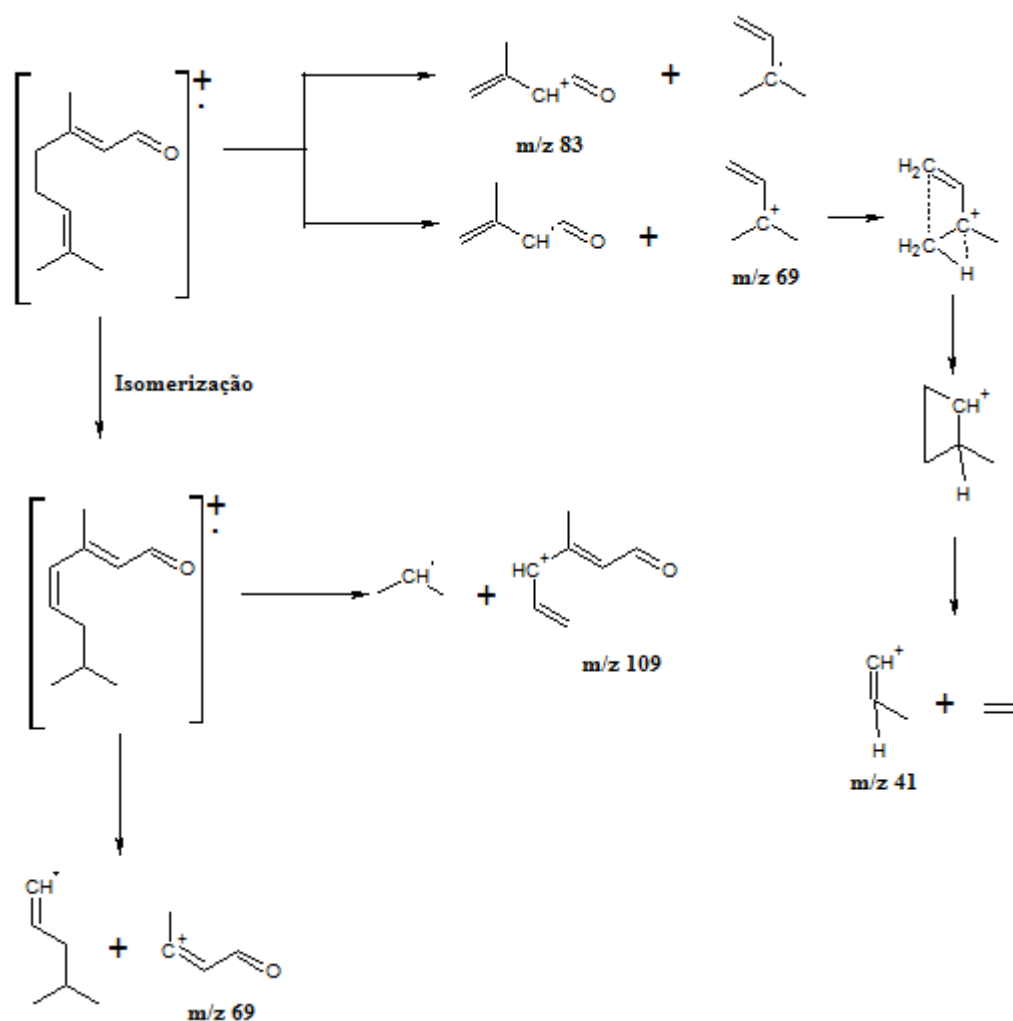
Figura 14: Espectro de massas atribuído ao geraniol.



Fonte: Data Analyse – Agilent Technologie (MODIFICADO).

Os primeiros terpenos identificados apresentam fragmentações no espectro de massas, mostrando que as estruturas dessas moléculas são semelhantes e pertencem ao mesmo grupo de terpenos. Os íons m/z 69 e m/z 84 (m/z 83 para os aldeídos) são resultados de uma clivagem bialfílica da cadeia desses compostos. A partir do íon m/z 69 sofre uma eliminação e perda de uma molécula de eteno resultando o íon m/z 41 (RODRIGUES, ALMEIDA, 2018). Nos terpenos pode ocorrer uma isomerização (provocada pelo aumento da conjugação), em seguida pode ocorrer uma clivagem alfílica onde pode resultar em íons m/z 69 e m/z 109 (FERNANDES, 2011). A Figura 15 exemplifica uma proposta de mecanismo de fragmentação para esses espectros de massa.

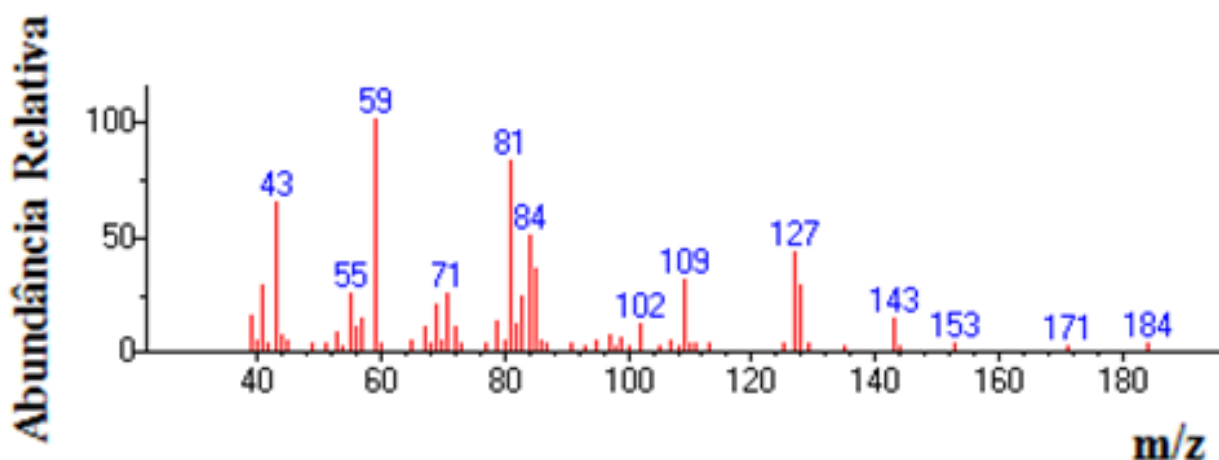
Figura 15: Esquema de proposta de fragmentações do espectro de massas.



Fonte: Autoria própria. Software: ChemSketch, 1994.

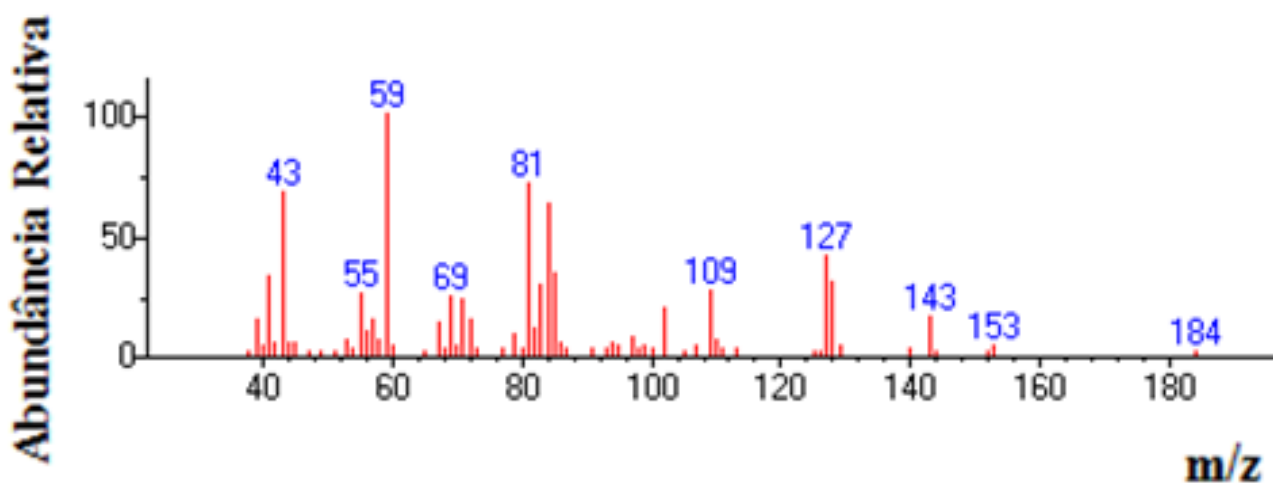
Ainda percebe-se a presença de outros dois picos após o geranial, nos tempos de retenção de 14,734 e 14,927 minutos. Contudo, pelo espectro de massas foi possível identificar apenas o segundo pico que foi atribuído ao óxido de epoxi-linalol, um composto comum em folhas secas de capim limão. O espectro de massas do primeiro epóxido não identificado é a Figura 16 (p. 32) e o espectro do epoxi-linalol é Figura 17 (p. 32). Ambos apresentam fragmentações características de epóxidos, ou seja, m/z de 109, 81, 59, 55 e 43 (CLOSSA *et al.* 2014).

Figura 16: Espectro de massas atribuído ao epóxido não identificado.



Fonte: Data Analyse – Agilent Technologie (MODIFICADO).

Figura 17: Espectro de massas atribuído ao epoxi-linalol.

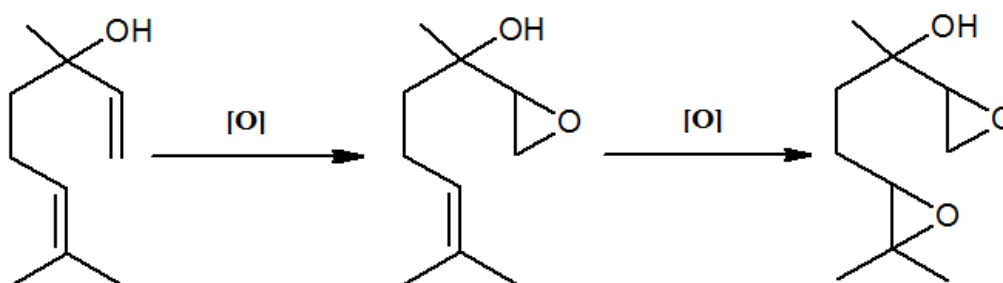


Fonte: Data Analyse – Agilent Technologie (MODIFICADO).

Para confirmação da identidade das substâncias, foi aplicado o índice de Kovats (KI) relacionando com a série de hidrocarbonetos (C6-C15). Para o nerol, neral, geraniol e geraniol os erros relativos ao índice de Kovats calculado (KC) com o índice de Kovats tabelado (KT) foram menores que 1,00 %, portanto são valores aceitáveis. Para a quinta substância, cujo pico no cromatograma corresponde ao tempo de retenção 14,734 minutos não foi possível identificar pelo índice de Kovats, uma vez que não se encontrou o valor tabelado para ele.

Observou-se que, os epóxidos não são detectados na maioria dos extratos dessa matriz, mostrando que, possivelmente, esse tipo de molécula não é comum no metabolismo secundário do capim limão. O que leva à hipótese de que elas foram formadas durante o processo de extração, devido ao tempo de contato e temperatura de extração que fornece energia na forma de calor. Este epóxido pode ter sido formado à partir do linalol. Este terpeno não oxidado, o linalol (comum em extratos de capim limão), não foi detectado, reforçando a hipótese de ter ocorrido a sua oxidação. A Figura 18 é uma proposta da rota de epoxidação do linalol (SILVA, 2005).

Figura 18 - Possíveis rotas e produtos de epoxidação do linalol.



Fonte: SILVA, 2005 (Modificado). Software: ChemSketch, 1994

4.3 Análise da matriz de ensaios 1

Nesta análise utilizou-se o método de extração por infusão com ou sem ultrassom das folhas frescas e resfriadas nos tempos de 5 a 25 minutos, conforme Tabela 1 (p. 19).

Para análise dessa matriz, inicialmente houve a identificação dos picos determinando a presença ou ausência dos componentes esperados Também foi feita a integração dos picos, obtendo assim as áreas de cada. Tais resultados foram usados nos cálculos estatísticos para verificar um padrão no comportamento e interações entre as variáveis. Os resultados das integrações podem ser encontrados na Tabela 5 (p. 35).

A primeira observação realizada através análise dos dados da Tabela 5 foi que as folhas resfriadas não apresentaram o metabolito mais volátil, nerol, Além disso,

percebe-se que as áreas dos picos das folhas resfriadas são menores que das folhas frescas, mostrando que também houve perda dos demais compostos.

Este resultado evidencia que o armazenamento das folhas em refrigerador por sete dias não garante a conservação de todos os metabólitos bioativos. Deste modo, chás preparados empregando material refrigerado pode não apresentar a mesma eficiência farmacológica do que chás preparados com folhas frescas.

Tal resultado pode ser compreendido se considerar que no refrigerador, a temperatura não foi suficientemente baixa para prevenir a volatilização dos compostos, e/ou reações de degradação dos metabólitos pelas enzimas vegetais, presentes nas folhas. Também foi possível encontrar um padrão no comportamento dos epóxidos.

Foi possível encontrar um padrão no comportamento dos epóxidos. Outro aspecto observado nessa matriz é o aumento da área dos picos com a mudança do tipo de extração. Neste caso houve, um aumento nas áreas dos picos nas extrações por infusão, porém houve formação dos epóxidos, compostos não desejáveis nos chás, pois não apresentarem atividade fitoterápica.

Tabela 5 - Resultados das áreas dos picos referente a primeira matriz de ensaios.

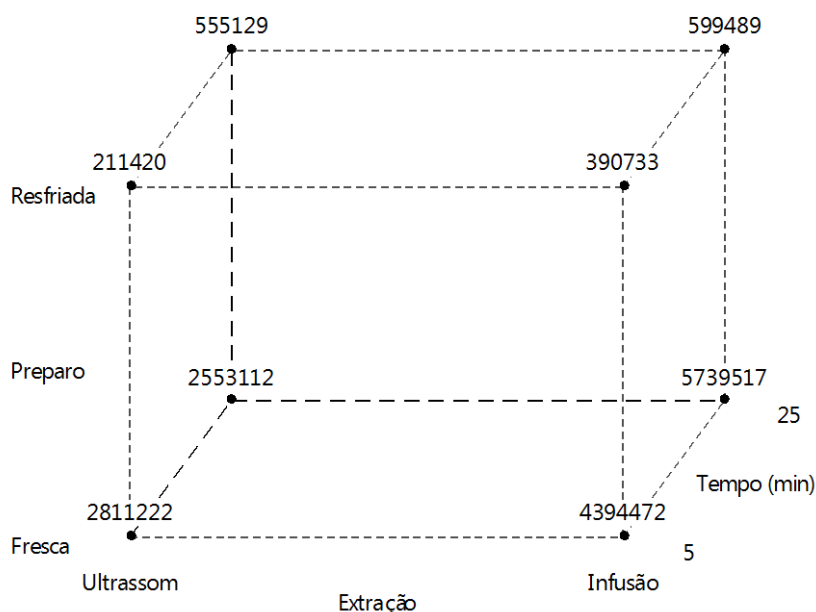
Ensaio	Extração	Preparo	Tempo (min)	Nerol	Nerol	Geraniol	Geranial	Epóxido não identificado	Óxido de epoxi-linalol
1	INFU	Fresca	5	716894	1201500	3623459	1735171	---	---
2	INF	Fresca	5	224761	2024913	1282715	4263783	---	---
3	INFU	Resfriada	5	---	172396	211420	282916	---	---
4	INF	Resfriada	5	---	847438	352912	1513559	---	---
5	INFU	Fresca	25	681805	5318526	3325583	9789237	---	---
6	INF	Fresca	25	1326979	3434550	6245262	4317817	531842	776005
7	INFU	Resfriada	25	---	2140666	715024	4053710	---	---
8	INF	Resfriada	25	---	1804857	508919	3288258	---	---
9	INFU	Fresca	5	236081	377442	1046010	548481	---	---
10	INF	Fresca	5	1358275	2299656	5923193	3306411	---	---
11	INFU	Resfriada	5	---	142347	---	---	---	---
12	INF	Resfriada	5	---	849259	428554	1735057	---	---
13	INFU	Fresca	25	187748	532322	911088	735055	---	---
14	INF	Fresca	25	718538	1367423	3188255	1824982	305275	321514
15	INFU	Resfriada	25	---	1285515	395234	2714327	---	---
16	INF	Resfriada	25	---	1883523	690058	3457786	---	---

INFU = Infusão com ultrassonificação. INF = Infusão

Fonte: A autoria própria.

Posteriormente foi realizado o estudo dos dados de ensaio via análise descritiva da matriz, cujos dados foram processados e foi encontrado padrão de comportamento dos álcoois, nerol e geraniol, e foram fornecidos gráficos de respostas para esses comportamentos. A Figura 19 apresenta como as áreas dos picos dos álcoois se comportaram dentro das três variáveis.

Figura 19- Gráfico da distribuição em cubo da soma da área absoluta dos álcoois.



Fonte: Autoria própria. Software: Minitab 18.1, 2018.

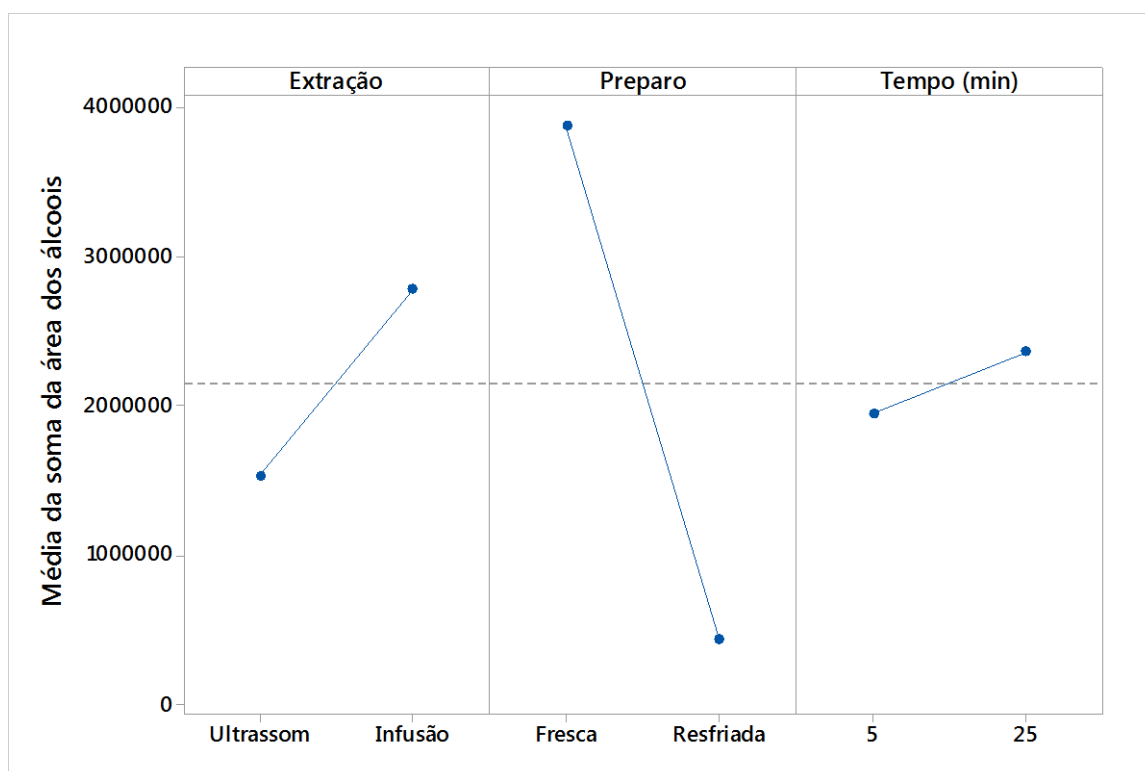
O gráfico de cubos traz informações importantes quanto ao comportamento dos extratos dentro do universo de variáveis. O ponto de destaque são os vértices superiores do cubo, que representam as extrações de folhas resfriadas, reforçando a hipótese de que esse resfriamento não foi eficiente. Por outro lado o aumento do tempo de extração promoveu aumento da quantidade extraída.

Quando são avaliados os vértices inferiores do cubo, que correspondem as áreas dos picos referentes aos compostos que foram extraídos das folhas frescas, observou-se que houve, um aumento nos valores de área, portanto foi mais eficaz extrair os compostos bioativos de folhas frescas não resfriadas. O aumento do tempo conduziu ao aumento das áreas dos picos referente aos álcoois, tendo uma melhora nas extrações.

Por fim, as áreas laterais do cubo definem a diferença do tempo de extração. Desta forma foi possível observar o aumento das áreas com o aumento do tempo de extração, portanto quanto maior o tempo de contato do material vegetal com o solvente, maior foi extração dos terpenóides da classe dos álcoois.

Como as variações das áreas não foram constantes em todos os pontos e a distribuição em cubo representa a interação de todos os fatores juntos, não foi possível definir qual ou quais fatores foram que são significativos para as extrações. Buscando avaliar se os efeitos principais são significativos, foi elaborado a Figura 20. Tal figura apresenta uma análise separada de cada fator a fim de verificar se algum deles foi significativo no processo.

Figura 20 - Efeitos dos fatores para a soma da área dos álcoois.



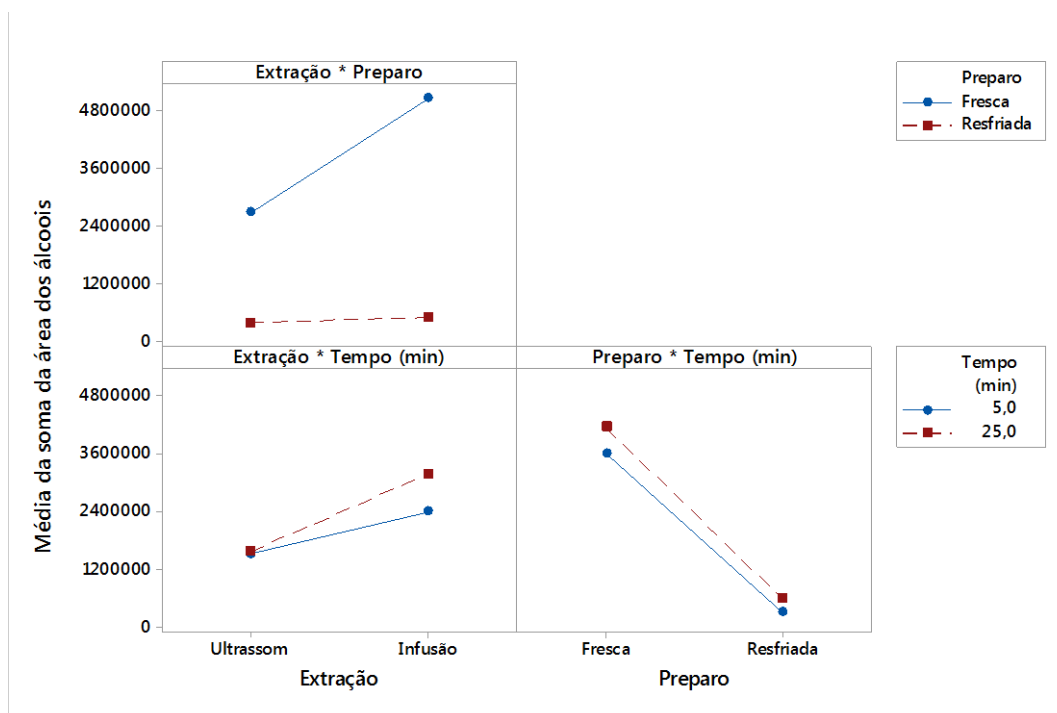
Fonte: Autoria própria. Software: Minitab 18.1, 2018.

Cada ponto do gráfico acima representa a soma das áreas dos álcoois em cada fator e em cada variável. Por exemplo, o ponto ligado no ultrassom representa a soma de todas as áreas onde houve extração por infusão com ultrassonificação (5 e 25

minutos, folhas frescas e resfriadas). Observando o gráfico foi verificado que houve maiores inclinações da reta ao se referir ao tipo de extração e no preparo, indicando que a infusão apenas foi mais eficiente e o preparo utilizando folhas frescas é mais indicado para obtenção de um bom fitoterápico. Outra característica importante foi o fator tempo, onde a inclinação aparenta ser menor que as demais. Logo, esse fator parece ser indiferente para extração.

A Figura 21 foi construída com intuito de verificar os efeitos de interações entre os fatores. Levando em conta se houve interferência entre os fatores ou se alguma variável específica foi mais relevante que as demais.

Figura 21 - Efeitos de interação entre fatores para a soma da área dos álcoois.



Fonte: Autoria própria. Software: Minitab 18.1, 2018.

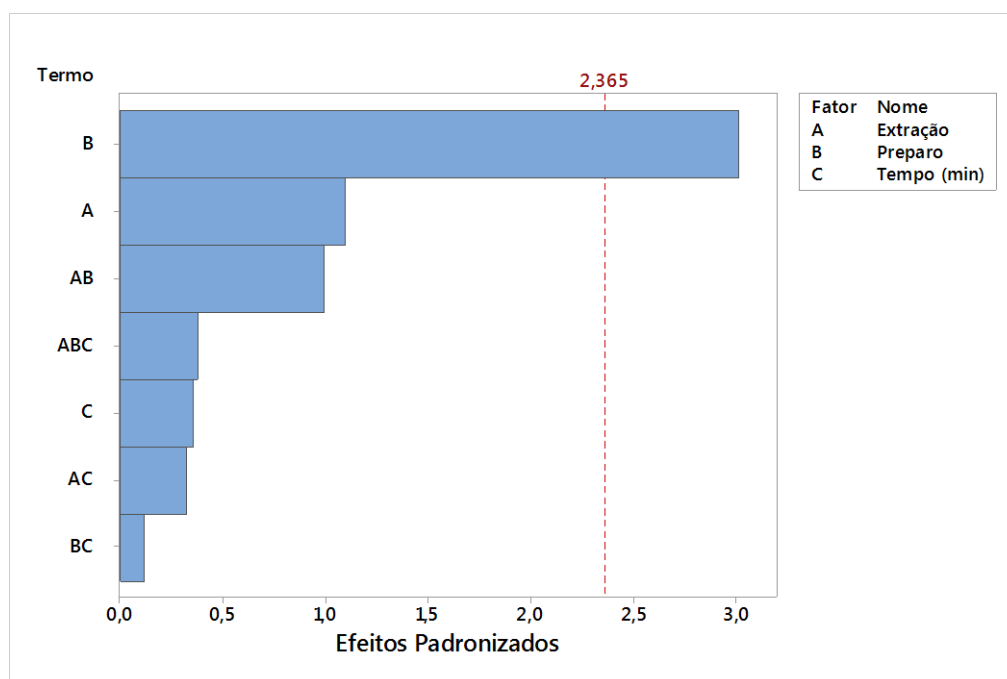
Avaliando os três gráficos pode-se perceber que a extração em relação ao tempo apresentou comportamento semelhante, indicando que não houve uma diferença significativa entre esses fatores. O mesmo pode ser observado quanto ao preparo com o tempo. Nesse caso uma característica evidenciada no terceiro gráfico foi que independente do tempo de extração as áreas do álcoois foram sempre

menores nas folhas resfriadas. Tudo isso levou a conclusão que o tempo não foi um fator significativo para essas condições de extração, corroborando com os dados apresentados na Figura 20.

Porém quando se compara a extração com o preparo a diferença aparenta ser considerável, independentemente do tipo de extração, as áreas dos álcoois foram sempre maiores nas folhas frescas. Com isso, pode-se inferir que os fatores tipo de extração e tipo de preparo apresentaram interação.

Por fim, para determinar o fator que ocasionou a maior diferença significativa dentre todos os fatores, utilizou-se avaliação de Pareto, sendo mostrado na Figura 22.

Figura 22 - Avaliação de Pareto dos efeitos padronizados.



Fonte: Autoria própria. Software: Minitab 18.1, 2018.

Para a avaliação do gráfico de Pareto o fator mais significativo dentre todas foi o tipo de preparo das folhas das plantas, fresca ou resfriada. Confirmando hipóteses preliminares sobre a significância sobre o diferente tipo de preparo. Contudo, o fator tipo de extração não foi significativo, provavelmente só com maior reprodutibilidade

dos dados para serem significativos. Portanto, com base nas análises anteriores, não é indicado manter as folhas em refrigeração por um período de 7 dias.

4.4 Análise da matriz de ensaios 2

Nesta análise utilizou-se o método de extração por infusão com ultrassom e por decocção das folhas frescas e secas nos períodos de 5 a 25 minutos conforme a Tabela 2 (p. 20).

Para análise da segunda matriz, inicialmente houve a identificação dos picos determinando a presença ou ausência dos componentes esperados. Também foi feita integração dos picos, obtendo assim as áreas de cada pico, tais resultados foram usados nos cálculos estatísticos para verificar um padrão no comportamento e interações entre as variáveis, os resultados das integrações podem ser encontradas na Tabela 6 (p.41).

A primeira observação foi a ausência do nerol na maioria dos extratos dessa matriz, principalmente onde houve o emprego das folhas secas e a utilização da decocção como forma de extração. A ausência desse álcool em todos extratos de folha seca pode indicar que esse terpeno foi volatilizado ou degradado durante o processo de secagem. E a inexistência do nerol nos extratos de folha fresca empregando decocção também pode indicar volatilização ou degradação, já que a decocção é uma técnica mais agressiva.

Em relação aos compostos da classe dos epóxidos, os mesmos foram detectados na maioria dos extratos dessa matriz, mostrando que, possivelmente, o processo de secagem estimula a formação dos compostos oxidados, ou cria condições possíveis para extração desses compostos, como remoção da água ou degradação de algum tecido do vegetal. Os epóxidos também são observados nos extratos decorrentes de decocção de folhas frescas. Logo essa técnica aparenta ser agressiva o suficiente para que a extração de certas substâncias possibilitam a sua oxidação gerando os compostos do tipo epóxidos

Outro aspecto observado nessa matriz foi a alteração da área dos picos com a mudança do tipo de extração. Houve um aumento nas áreas dos picos nas extrações por decocção, onde a presença dos compostos da classe dos epóxidos se torna predominante. .

Tabela 6 - Resultados das áreas dos picos referente a segunda matriz de ensaios.

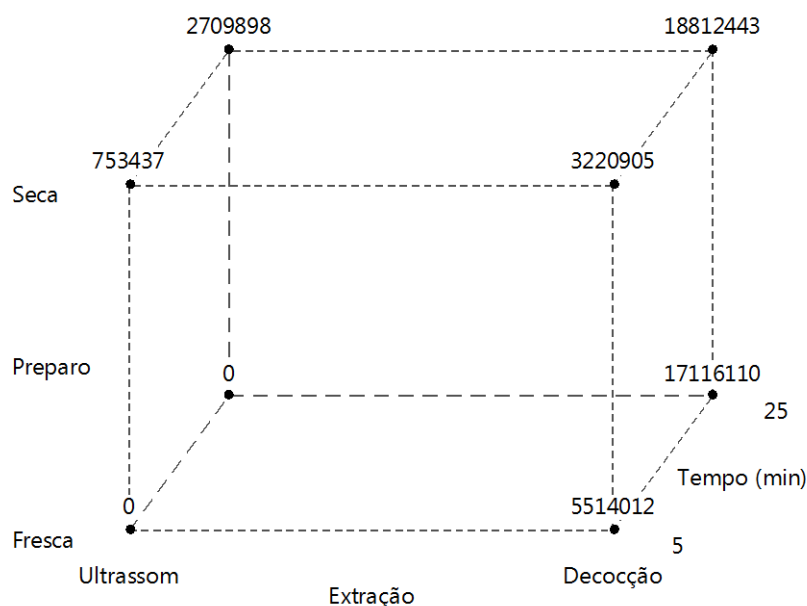
Ensaio	Extração	Preparo	Tempo (min)	Nerol	Neral	Geraniol	Geranial	Epóxido não identificado	Óxido de epoxi-linalol
1	INFU	Fresca	5	716894	1201500	3623459	1735171	---	---
2	DECC	Fresca	5	---	9878017	1512971	13410881	2214962	2603393
3	INFU	Seca	5	---	2817211	---	4326021	407054	491897
4	DECC	Seca	5	---	879399	45437	1131910	273933	293280
5	INFU	Fresca	25	681805	5318526	3325583	9789237	---	---
6	DECC	Fresca	25	---	2565213	401612	3644353	4071405	4215813
7	INFU	Seca	25	---	6700743	497904	9623062	1016922	1335721
8	DECC	Seca	25	---	6156662	564892	8571999	9562711	10316180
9	INFU	Fresca	5	236081	377442	1046010	548481	---	---
10	DECC	Fresca	5	---	---	1465934	11209722	2634264	3575404
11	INFU	Seca	5	---	1800639	---	2968377	313282	294640
12	DECC	Seca	5	---	9392720	660974	13515842	2456484	3418113
13	INFU	Fresca	25	187748	532322	911088	735055	---	---
14	DECC	Fresca	25	---	875880	---	1456284	12608151	13336851
15	INFU	Seca	25	---	8463732	601829	11868500	1346986	1720166
16	DECC	Seca	25	---	18033194	1642572	22363858	7982394	9763600

INFU = Infusão com ultrassonificação. DECC = Decocção

Fonte: Autoria própria.

No processamento desses dados foi encontrado padrão de comportamento dos compostos oxidados (epóxidos) e foram fornecidos gráficos de respostas para esses comportamentos. A Figura 23 mostra como as áreas dos picos dos epóxidos se comportam dentro das três variáveis.

Figura 23 - Distribuição em cubo da soma das áreas absolutas dos epóxidos.



Fonte: Autoria própria. Software: Minitab 18.1, 2018.

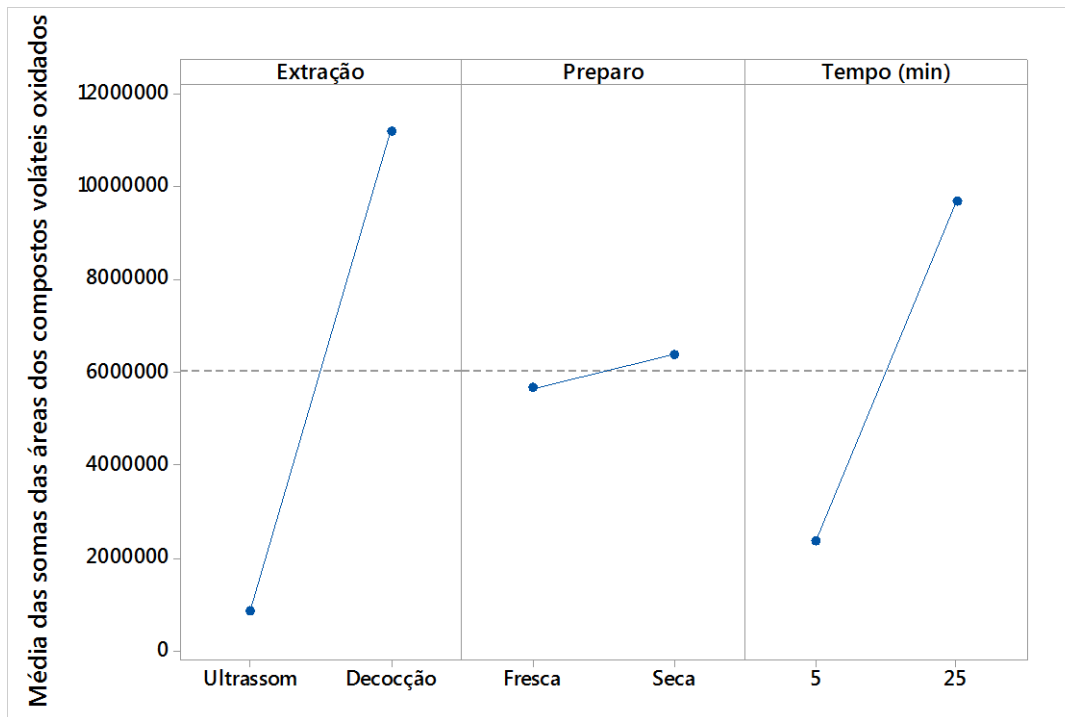
Os vértices superiores do cubo, que representam as extrações de folhas secas, mostraram a presença dos epóxidos em todas as condições de extração, reforçando a hipótese de que as folhas secas já contêm os epóxidos disponíveis para extração, e que estes possivelmente foram formados no processo de secagem das folhas.

Quando foram avaliados os vértices inferiores do cubo, que se trata das extrações de folhas frescas, observou-se que houve um crescente aumento nos valores de área, portanto a mudança da técnica de extração influenciou a extração e/ou a formação dos epóxidos, sendo mais indicado o emprego da infusão com ultrassom a fim de evitar a formação desse tipo de composto. O aumento do tempo de extração também gerou um aumento das áreas dos compostos oxidados.

Como as variações das áreas não foram constantes em todos os pontos e como a distribuição em cubo representa a interação de todos os fatores juntos, não foi possível definir qual ou quais fatores que foram supostamente significativos para as extrações. A

Figura 24 apresenta uma análise separada de cada fator a fim de verificar se algum fator foi significativo no processo.

Figura 24 - Efeitos dos fatores para a soma das áreas dos epóxidos.

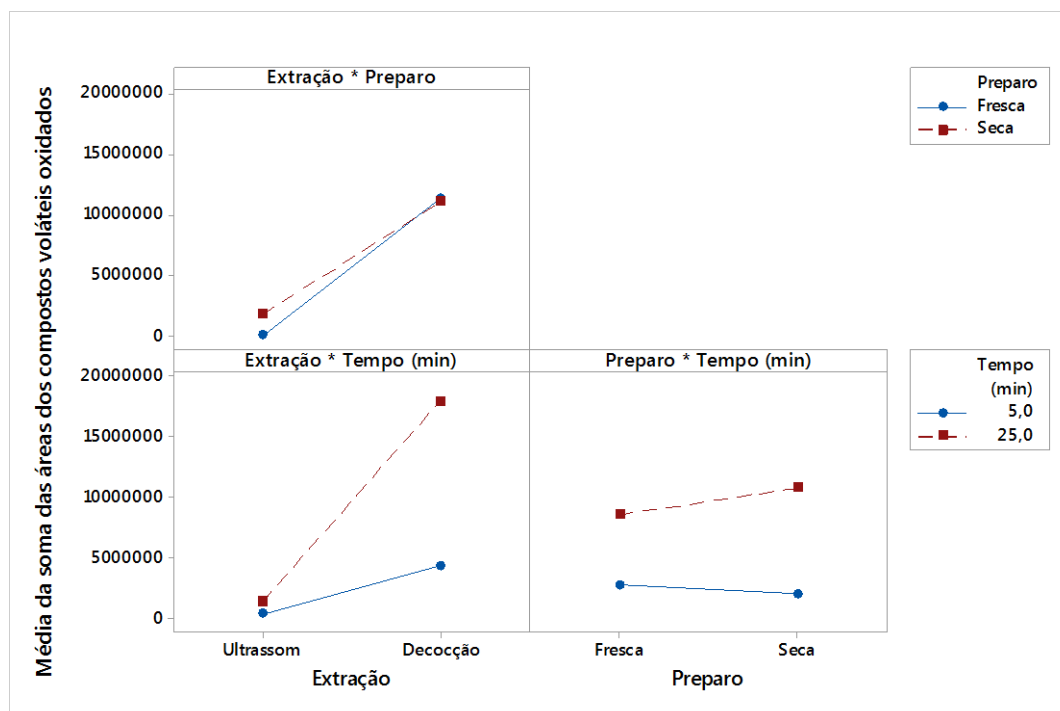


Fonte: Autoria própria. Software: Minitab 18.1, 2018.

Observando o gráfico foi verificado que houve maiores inclinações da reta referente ao tipo de extração e ao tempo, mostrando que o emprego de decocção e tempo muito longos de extração favoreceram a formação dos epóxidos. Outra característica importante foi o fator preparo, onde a inclinação da reta foi menor que as demais, indicando que possivelmente o uso de folhas frescas é indiferente.

A Figura 25 (p. 44) foi construída com intuito de verificar os efeitos de interações entre os fatores. Levando em conta se houve interferência entre os fatores ou se alguma variável específica foi mais relevante que as demais.

Figura 25 - Efeitos de interação dos fatores para a soma das áreas dos epóxidos.

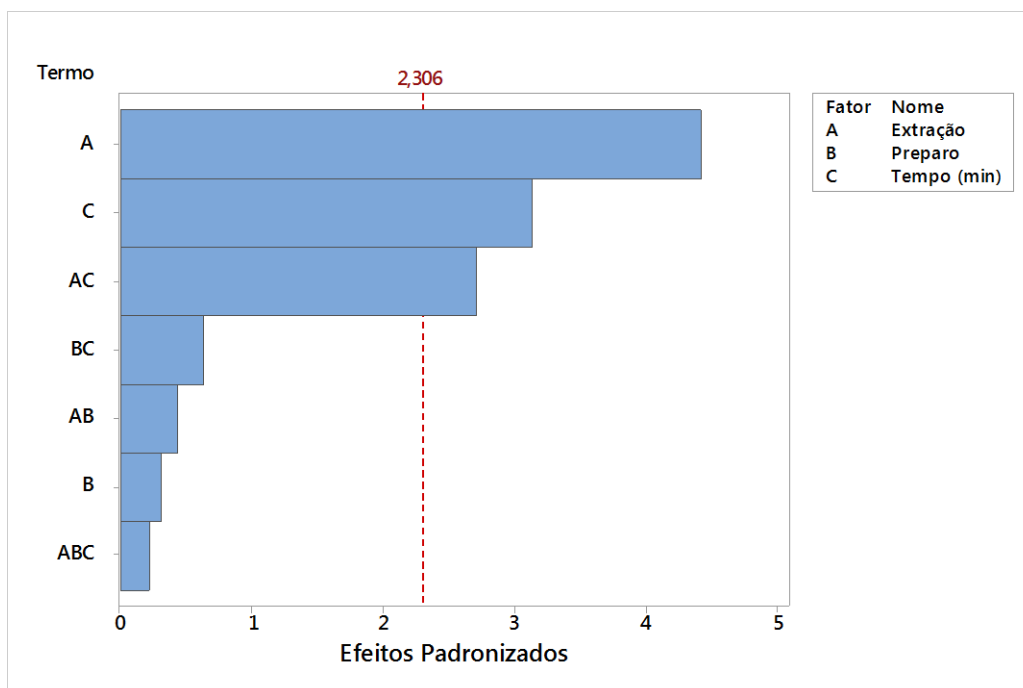


Fonte: Autoria própria. Software: Minitab 18.1, 2018.

Avaliando os três gráficos pode-se perceber que a extração em relação ao preparo tem comportamento semelhante, indicando que não houve uma diferença significativa entre esses fatores. Porém, mostrou maior formação/extração dos epóxidos na decocção independente do preparo empregado. Em relação a variação da extração com o tempo foi perceptível a presença dos compostos oxidados no tempo de 25 minutos empregando decocção, sendo evidente uma forte interação entre esses dois fatores durante os processos. No terceiro gráfico, que relaciona preparo e tempo, foi observado que não houve uma grande inclinação da reta na mudança de preparo, levando a conclusão que o preparo não foi um fator significativo, indo de encontro com a análise feita a partir da Figura 24.

Por fim, para determinar o fator que ocasionou maior diferença significativa dentre todos os fatores, utilizou-se avaliação de Pareto, sendo mostrado na Figura 26 (p. 45).

Figura 26 - Avaliação de Pareto dos efeitos padronizados.



Fonte: Autoria própria. Software: Minitab 18.1, 2018.

Para a avaliação do gráfico de Pareto três fatores foram mais expressivos, sendo o tipo de extração, o tempo e a interação entre esses dois fatores. Portanto a escolha do tipo de extração com o tempo de contato do solvente foi decisiva para a presença ou não dos epóxidos, confirmando todas as análises preliminares feitas anteriormente. Logo não foi indicado empregar decocção em tempos muito longos de extração.

4.5 Análise do teor de compostos voláteis em função do tempo

Nesta análise utilizou-se o método de extração por infusão com ultrassom das folhas secas nos tempos variando de 5 a 65 minutos, conforme a Tabela 3 (p. 24). A escolha de realizar a extração até o tempo de 65 minutos teve como intuito verificar se dentro desse intervalo há um tempo ótimo de extração, a fim de obter o fitoterápico mais eficaz.

Como observado anteriormente a extração empregando infusão com ultrassonificação tem eficiência similar à infusão para extrair os álcoois. E foi mais adequada que a decocção, pelo fato de evitar a formação de compostos voláteis oxidados.

O uso de folhas secas tem eficiência similar ao uso de folhas frescas, mas as resfriadas acabam dificultando a extração dos álcoois. Então, a utilização de folhas frescas ou secas foi indiferente.

Com relação ao período de extração, dentro da faixa estudada verificou-se que em tempos maiores de extração podem favorecer a síntese ou extração dos compostos oxidados. Entretanto, não foi observada uma variação significativa na soma da área dos álcoois dentro do período estudado de 5 a 25 minutos.

Com isso, foi proposta uma análise unvariada, com o fator tempo como variável independente. Foi escolhida infusão com ultrassonificação como técnica de extração e folhas secas dessa matriz. A escolha de folhas secas foi devida o fato de que comercialmente as folhas são encontradas secas. O intuito foi verificar se há um modelo matemático que rege a produção de compostos voláteis oxidados e/ou, quem sabe, a extração dos demais compostos voláteis e tempo ótimo de extração. A Tabela 7 apresenta os resultados das áreas dos compostos identificados para essa matriz.

Tabela 7 – Áreas absolutas dos picos dos compostos voláteis de capim cidreira relacionados à análise de influência do tempo.

Tempo (min)	Neral	Geraniol	Geranial	Epóxido não identificado	Óxido de epoxilinalol
5	2817211	-	4326021	407054	491897
5	1800639	-	2968377	313282	294640
25	6700743	497904	9623062	1016922	1335721
25	8463732	601829	11868500	1346986	1720166
35	10902819	1253772	19150209	1042773	1532715
35	12423025	1232436	22486918	1007433	1326232
45	16092557	1574660	27043066	1226846	1797581
45	15181215	1522217	27581427	1019929	1472038
65	28535523	3635468	45134478	2884991	3983794
65	31923379	3545312	54698795	2551871	3904743

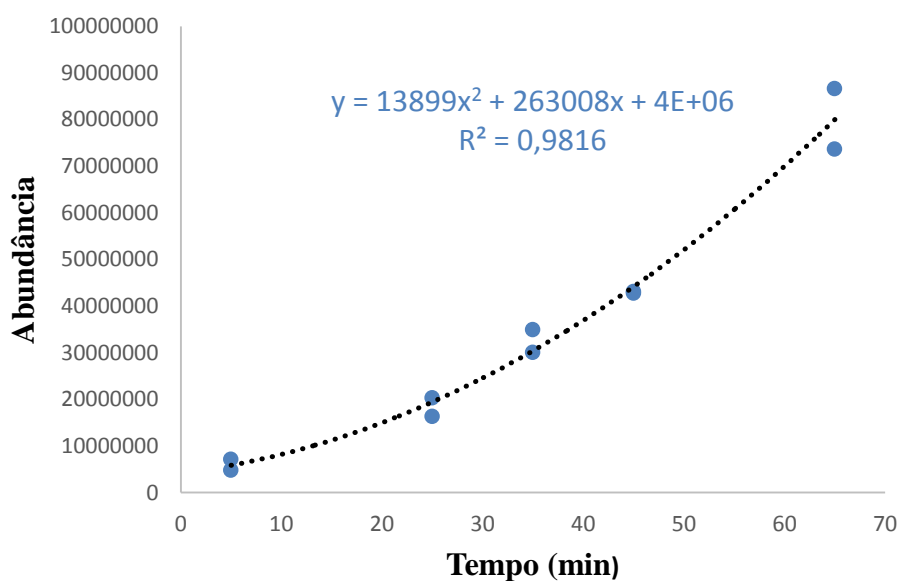
Fonte: Autoria própria.

Ao analisar a tabela 11 foi possível observar a ausência dos ensaios de 15 e 55 minutos, isso foi devido a um erro experimental, durante a eluição dos extratos no GC/MS, onde houve um erro de programação de análise e essas amostras secaram. Também foi verificado que as duplicatas apresentam o mesmo comportamento, ou seja, valores próximos de abundância relativa em todos os compostos.

Não foi detectado o nerol em nenhum dos extratos, possivelmente este metabólito foi volatilizado ou degradado durante o processo de secagem. Do mesmo modo, o geraniol não foi detectado nos extratos cuja infusão foi promovida no tempo de 5 minutos, onde o processo de secagem dificultou essa extração rápida, portanto apenas em maiores tempos de contato entre material vegetal e solvente ocorreu a extração desse álcool.

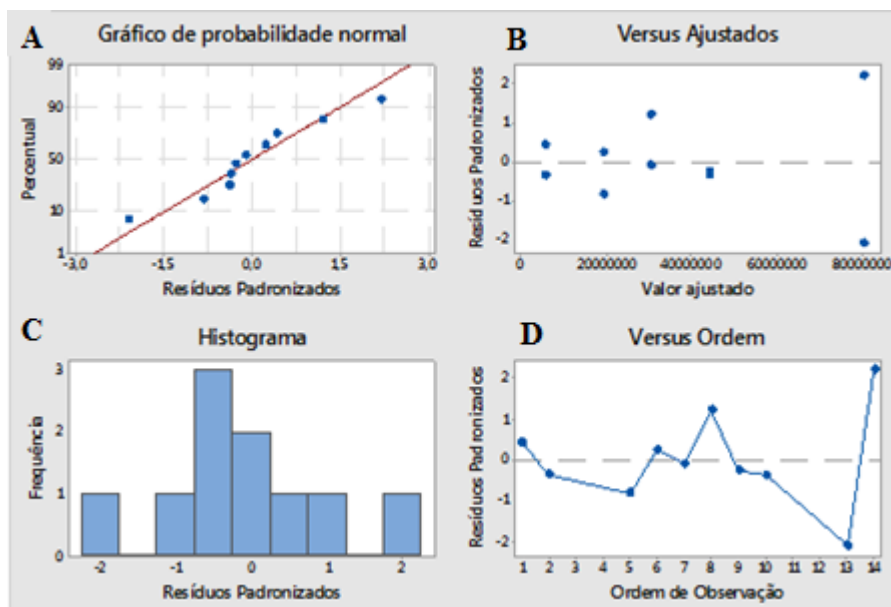
Quanto aos aldeídos houve um crescimento nas áreas com o aumento do tempo de extração, até os 65 minutos de extração. Era esperado uma saturação e um limite de extração antes desse tempo. Para observar esses comportamentos foram montadas regressões com a soma das áreas de cada classe de terpeno, a fim de verificar se existe um modelo matemático para extração. A Figura 27 representa a regressão dos aldeídos enquanto a Figura 28 (p. 48) as análises de resíduos a fim de verificar a adequabilidade do modelo proposto.

Figura 27 – Soma das áreas absolutas dos picos dos aldeídos (Neral +Geranial) com relação ao tempo.



Fonte: Autoria própria. Software: Minitab 18.1, 2018.

Figura 28 - Respostas enquanto aos resíduos do modelo, com intuito de verificar adequabilidade da regressão dos aldeídos. A – teste da normalidade. B – teste para constância da variância. C – teste para comportamento normal. D – teste da independência dos resíduos.



Fonte: Autoria própria. Software: Minitab 18.1, 2018.

Pela regressão anterior, pode se observar que houve um crescimento no teor de aldeídos à medida que houve aumento do tempo de extração, não sendo possível determinar um máximo tempo para a extração dos aldeídos, já que para tempos superiores a 30 minutos são impraticáveis para produção de um fitoterápico. Dos quatro testes realizados para os resíduos, o único que apresentou fragilidade enquanto seu resultado foi gráfico C.

O primeiro teste realizado (gráfico A) foi para o diagnóstico da normalidade, isso pode ser observado com um gráfico de probabilidade da normal, onde o comportamento linear dos dados indica uma normalidade dos dados. Isso pode ser visualizado, já que os resíduos padronizados seguem um comportamento linear, sendo adequados para a regressão.

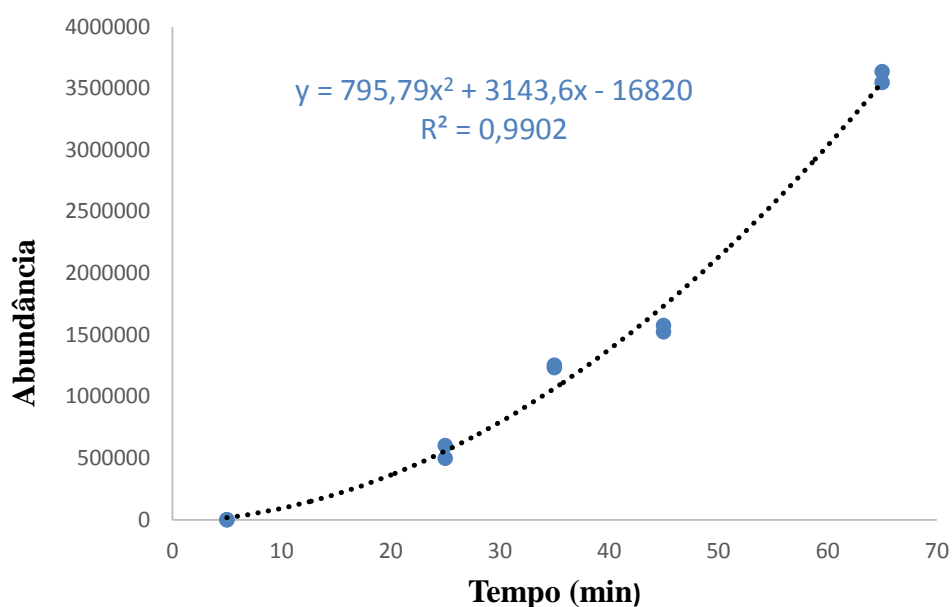
O segundo teste (gráfico B) foi para averiguar se os dados são homocédásticos, ou seja, há variância constante entre os dados utilizados na regressão. Nesse teste, é possível observar graficamente se existe uma tendência entre os resíduos. Quando não há tendência dos dados, infere-se que a variância é constante para os dados, quando há tendência dos dados, indica que a variância é diferente e a regressão não é adequada.

Nesse teste não foi observado um comportamento tendencioso para os resíduos e as variâncias são constantes.

O último teste realizado teve o objetivo de verificar a independência dos resíduos. Se os resultados apresentarem um comportamento padrão que remete a alguma tendência em alguma região do gráfico indica que os dados são dependentes. Analisando o gráfico 4, não foi observado uma repetição dos dados, portanto os resíduos são independentes. Analisando os três testes, pode-se concluir que a regressão dos aldeídos foi válida e adequada.

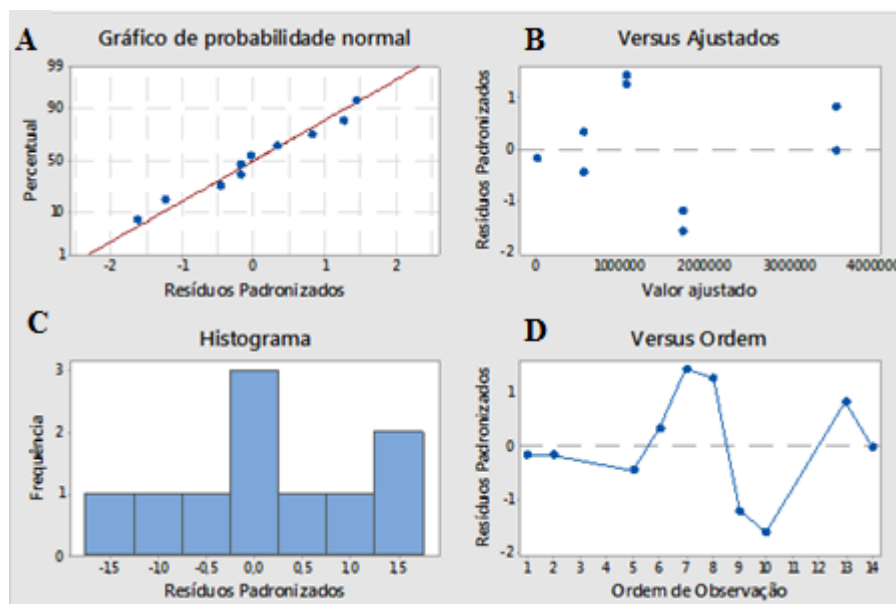
Seguindo a mesma metodologia dos aldeídos, a Figura 29 representa a regressão dos álcoois enquanto a Figura 30 (p. 50) as análises de resíduos do modelo.

Figura 29 - Soma das áreas absolutas dos picos dos álcoois (Nerol+Geraniol) com relação ao tempo.



Fonte: Autoria própria. Software: Minitab 18.1, 2018.

Figura 30 - Respostas enquanto aos resíduos do modelo, com intuito de verificar adequabilidade da regressão dos álcoois. A – teste da normalidade. B – teste para constância da variância. C – teste para comportamento normal. D – teste da independência dos resíduos.



Fonte: Autoria própria. Software: Minitab 18.1, 2018.

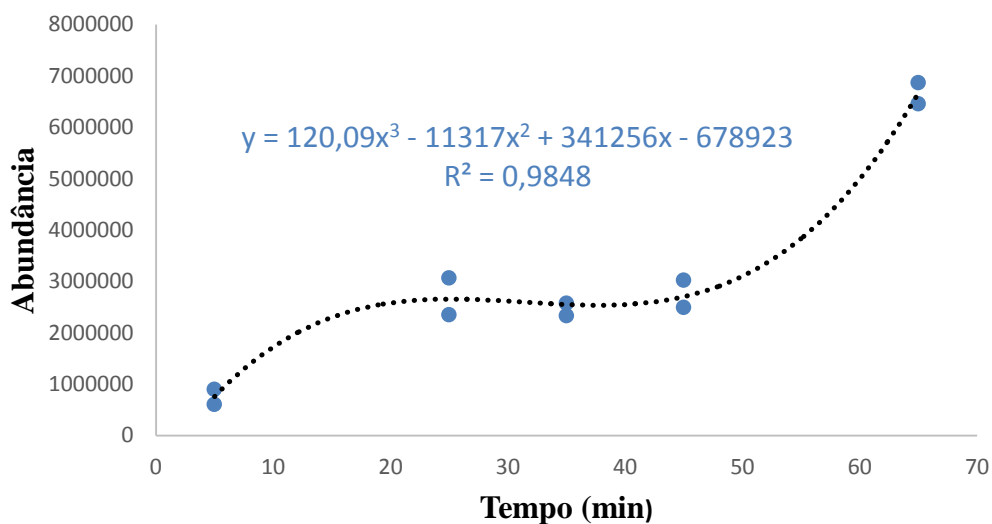
A regressão anterior apresenta comportamento semelhante à regressão dos aldeídos, ou seja, não foi possível determinar um tempo máximo de extração dos álcoois, já que tempos superiores a 30 minutos são inviáveis num processo para obtenção de fitoterápicos.

Dos quatro testes realizados para os resíduos, todos tiveram uma resposta que indicaram a adequação do modelo matemático. No primeiro teste realizado (gráfico A) foi visualizado um comportamento linear, portanto sendo adequado para a regressão. No segundo teste (gráfico B) foi possível observar que não existe uma tendência entre os resíduos, indicando que a variância foi constante para os dados.

O terceiro teste, do gráfico C, mostrou um comportamento de normal dos dados, indicando a validade da regressão. Analisando o último teste (gráfico D) não foi observado uma repetição padrão que remete uma tendênciadados dados em uma área do gráfico, portanto os resíduos são independentes. Analisando os quatro testes, pode-se concluir que a regressão dos álcoois também foi válida e adequada.

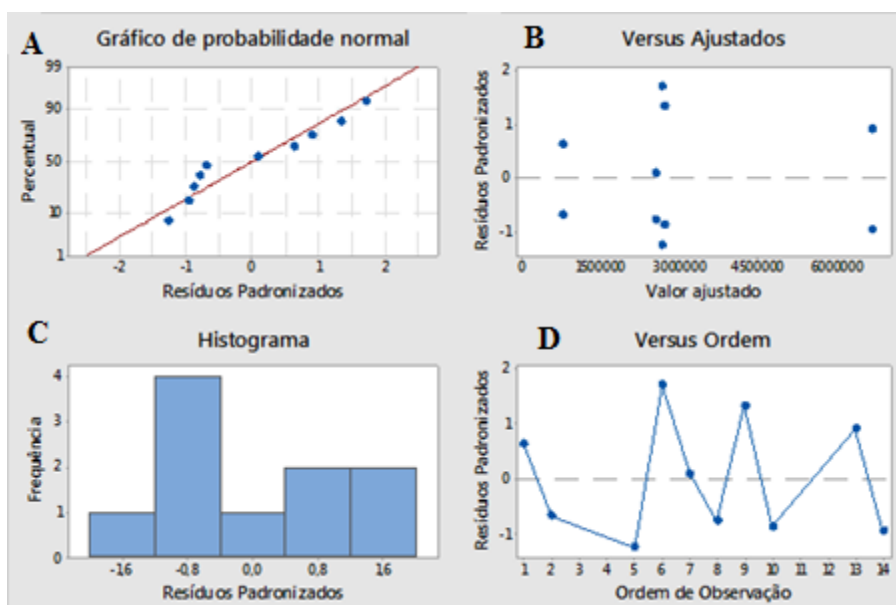
Por fim, a Figura 31 representa a regressão dos epóxido enquanto a Figura 32 as análises de resíduos do modelo.

Figura 31 - Soma das áreas absolutas dos picos dos epóxidos com relação ao tempo..



Fonte: Autoria própria. Software: Minitab 18.1, 2018.

Figura 32 - Respostas enquanto aos resíduos do modelo, com intuito de verificar adequabilidade da regressão dos epóxidos. A – teste da normalidade. B – teste para constância da variância. C – teste para comportamento normal. D – teste da independência dos resíduos.



Fonte: Autoria própria. Software: Minitab 18.1, 2018.

Diferentemente das regressões anteriores, os epóxidos apresentaram um comportamento incomum, onde inicialmente houve um aumento na extração, seguida de uma estagnação (constância) e posterior aumento na extração. Não há nada na literatura que justifique essa constância e posterior crescimento. Uma hipótese é que o aumento da extração inicial e estabilidade da abundância relativas das áreas pode ser referente a extração dos compostos oxidados provenientes da secagem que atingem um ponto máximo de sua formação durante o processo na estufa que depois estabiliza. Já o aumento posterior deve-se provavelmente à, formação de epóxidos durante a extração, uma vez que a presença de oxigênio e em temperatura mais elevadas favorecem a epoxidação de terpenos.

Dos quatro testes realizados para os resíduos, apenas o teste para a normalidade (gráfico C) não apresentou um resultado adequado.

No primeiro teste realizado (gráfico A) foi visualizado um comportamento linear, portanto sendo adequado para a regressão. No segundo teste (gráfico B) foi possível observar que não existe uma tendência entre os resíduos, indicando que a variância foi constante para os dados. Para o último teste (gráfico D) não foi observado uma repetição dos dados em uma área do gráfico, portanto os resíduos são independentes. Analisando os três testes, pode-se concluir que a regressão dos álcoois também foi válida e adequada.

5 CONCLUSÕES

Durante esse projeto foram analisados três fatores iniciais para produção de fitoterápicos de capim limão, sendo estes: estado inicial das folhas (fresca, refrigerada ou seca); tipo de métodos de extração (decoção, infusão sem e com ultrassonificação); tempo de contato entre material vegetal e água, durante a extração.

Os terpenos que foram identificados e foram base para esse trabalho foram: nerol, neral, geraniol, geranial e os epóxidos.

Foi comprovada a eficiência da microextração líquido-líquida dispersiva na extração dos metabólitos dos extratos aquosos para o solvente orgânico no processo de partição dos extratos, reforçando que essa técnica pode ser utilizada para futuros estudos em produtos naturais.

Em relação ao preparo do material vegetal, não faz diferença estatística o uso de folhas secas ou frescas em relação ao teor dos epóxidos. O indicado então, seria o uso de folhas seca, por este ser um processo que garante a estabilização dos compostos e aumenta a vida útil da folha (redução da água).

Porém, nos extratos preparados com em folhas secas não foi possível observar a presença de compostos mais voláteis como o nerol, ao qual se atribui ação farmacológica. O armazenamento por 7 dias, sob refrigeração resfriamento das folhas do capim prejudicou a extração metabólitos bioativos, em relação a teor dos metabólitos e presença do nerol, não sendo indicado acondicionar as folhas em geladeira por 7 dias antes da produção desses fitoterápicos.

Quanto ao tipo de extração, a infusão e infusão com ultrassonificação apresentaram capacidade de extração similar. Contudo em tempos maiores na infusão já houve formação dos compostos epoxidados. A decoção mostrou ser uma técnica agressiva para esse tipo de material vegetal, pois mesmo promovendo a extração dos compostos de interesse também houve grande extração dos compostos oxidados, que são indesejáveis nos fitoterápicos. Portanto, o emprego de infusão com ultrassonificação foi a indicada, tendo uma boa eficiência e menor formação e/ou extração dos compostos do tipo epóxidos.

Com relação ao tempo de contato entre solvente e vegetal, inicialmente observou-se o comportamento esperado, quanto maior contato do solvente com o vegetal maior foi a extração, isso ocorreu em todos os casos. Logo, no estudo do fator tempo com variável independente, não foi possível determinar um ponto ótimo de extração, pois os resultados apresentaram extrações contínuas com tempos superiores a 50 minutos.

Os aldeídos e álcoois apresentaram um aumento na extração durante o tempo, os epóxidos apresentaram uma faixa de equilíbrio que depois voltou a crescer. A hipótese para esse comportamento foi que até o equilíbrio representa a extração dos compostos oxidados formados durante a secagem e o posterior aumento na extração refere-se sua formação durante a extração, em decorrência das condições favoráveis.

Portanto, a produção de um fitoterápico de capim limão com máxima de extração dos terpenos bioativos se torna inviável devido ao gasto energético e de tempo de extração, já que limite possivelmente será acima de 65 minutos.

Contudo, na fabricação de produtos caseiros, como repelentes, tempos superiores a 25 minutos podem ser úteis, a fim de produzir o produto mais potente para aquele fim desejável.

Por fim, as melhores condições para a fabricação de um fitoterápico de qualidade de capim limão seriam por infusão, de folhas secas e tempo de contato entre vegetal e solvente entre 25 e 30 minutos, por este ser um período viável para a produção do chá e não formação de mais compostos oxidados apenas aqueles provenientes do processo de secagem.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 4^a ed. Carol Stream, Allured Publishing Corporation, 2012.

ALVIM, N. A. T.; FERREIRA, M. A.; CABRAL, I. E.; FILHO, A. J. A. O uso de plantas medicinais como recurso terapêutico: das influências da formação profissional às implicações éticas e legais de sua aplicabilidade como extensão da prática de cuidar realizada pela enfermeira. *Revista Latina de Enfermagem*. Vol. 14, No. 3, 2006.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Primeiro Suplemento do Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira. 1^a Ed. Brasília. 2018.

BACHIEGA, T. F.; SFORCIN, J. M. Lemongrass and citral effect on cytokines production by murine macrophages. *Journal Ethnopharmacology*, Vol. 137, No. 1, 909-913, 2011.

BAKHURU, H. K. Herbs that Heal: Natural Remedies for Good Health. 21 Ed. Nova Deli: Oriente Paperbacks, 2008.

BARRIONUEVO, W. R., LANÇAS, F. M. Extração em fase sólida (SPE) e micro extração em fase sólida (SPME) de piretróides em água. *Química Nova*. Vol. 24, No. 2, 172-175, 2001.

BLANCO, M. M.; COSTA, C. A.; FREIRE, A. O.; SANTOS, J. G.; COSTA, M.. Neurobehavioral effect of essential oil of *Cymbopogon citratus* in mice. *Phytomedicine*, Vol. 15, No. 2, 265-270, 2009.

BRITO, S. S. S.; MAGALHÃES, C. R. I.; OLIVEIRA, C. R. F.; OLIVEIRA, C. H. C. M.; FERRAZ, M. S. S.; MAGALHÃES, T. A. Bioatividade de óleos essenciais sobre *Zabrotes subfasciatus* Boh.(Coleoptera: Chrysomelidae) em feijão-comum armazenado. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*. Vol.10, No.2, 243-248, 2015.

BRITO, E. S.; GARRUTI, D. S.; ALVES, P. B.; BLANK, A. F. Caracterização Odorífera dos Componentes do Óleo Essencial de Capim-Santo (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., Poaceae) por Cromatografia Gasosa (CG) – Olfatometria. *Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Agroindústria Tropical*. Vol. 42, 2011.

BROCHINI, C. B.; NUNEZ, C. V.; MOREIRA, I. C.; ROQUE, N. F. Identificação de componentes de óleos voláteis: análise espectroscópica de misturas de sesquiterpenos. *Química Nova*. Vol. 22, No. 1, 1999.

CALADO, V., MONTGOMERY, D. C. Planejamento de Experimentos usando o Statistica. E-Papers Serviços Editoriais. Rio de Janeiro. 2003.

CALDAS, S. S.; GONÇALVES, F. F.; PRIMEL, E. G.; PRESTES, O. D.; MARTINS, M. L.; ZANELLA, R. Principais técnicas de preparo de amostras para determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. *Química Nova*, Vol. 34, No. 9, 1604-1617, 2011.

CLOSS, M.; NICOLLI, K. P.; MANFROI, V.; ZINI, C. A. Diferenciação entre espumante moscatéis provenientes de duas variedades de uva moscato. Salão UFRGS 2014.

COSTA, L.C.B.; CORRÊA, R.M.; CARDOSO, J.C.W.; PINTO, J.E.B.P.; BERTOLUCCI, S.K.V.; FERRI, P.H. Secagem e fragmentação da matéria seca no

rendimento e composição do óleo essencial de capim-limão. *Horticultura Brasileira*, Brasília, Vol. 23, No.4, p.956-959, 2005.

CRAVEIRO, A. A.; DE QUEIROZ, D. C. Óleos Essenciais e Química Fina. *Química Nova*. Vol. 16, No. 3, 224-228, 1993.

CUNICO, M. W. M.; CUNICO, M. M.; MIGUEL, O. G.; ZAWADZKI, S. F.; PERALTA-ZAMORA, P.; VOLPATO, N. Planejamento fatorial: uma ferramenta estatística valiosa para a definição de parâmetros experimentais empregados na pesquisa cinética. *Visão Acadêmica*. Vol.9. No.1, 23-33. 2008.

DUARTE, J. da S.; DORES, E. F. G. de C.; VILLA, R. Microextração líquido-líquido dispersiva assistida por vórtex e ultrassom aplicada a determinação de agrotóxico triazinas, triazinonas e o triazol flutriafol em água. *Química Nova*. Vol. 39, No. 8, 925-931, 2016.

EL ASSAL, F. E. Bioatividade in vitro de Pimenta *pseudocaryophyllus* sobre *Candida spp* e complexo *Cryptococcus neoformans*. 2012. 69f. Tese de Doutorado – Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 2012.

FERNANDES, D. N. M. Composição Química, Atividade Antimicrobiana e Antioxidante do Óleo Essencial de *Croton tetradenius* Baill (Euphorbiaceae). 2016. 74f. Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Itapetinga, 2016.

FELIPE, L. O.; BICA, J. L. Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais. *Química Nova Escolar*. Vol. 39. No. 2. 120-130. 2017.

FERNANDES, R. P. Caracterização química, avaliação da toxicidade e atividade moluscicida dos óleos essenciais da folha dióica Lindl, casca de *Citrus limon* Linneo e

Rizoma de Zingiber officinale Roscoe. 2011. 130f. Teste de doutorado - Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 2011.

FERRO, D. Fitoterapia: conceitos clínicos. 1ª Ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2008.

FILHO, J. G. de S Iridóides glicosilados das raízes de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (*Verbenaceae*): obtenção, caracterização e bioatividade. 2007. 61f. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2007;

FIRMO, W. C. A.; MENEZES, V. J. M.; PASSOS, C. E. C.; DIAS, C. N.; ALVES, L. P. L.; DIAS, I. C. L.; NETO, M. S.; OLEA, R. S. G. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. *Caderno de Pesquisa*. Vol. 18, No especial, 2011.

FONSÊCA, S. G. C. Farmacotécnica de Fitoterápicos. Departamento de Farmácia – Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2005.

GAMA, P. E., BARBOZA, E. G., SANTOS, M. C. S., BIZZO, H. R. Automação de Planilhas Eletrônicas para o Cálculo de Índices de Retenção na Análise de Óleos Essenciais. Comunicado Técnico 226 – Embrapa. 2017.

GNOATTO, S. C. B.; BASSANI, V. L.. Influência do método de extração nos teores de metilxantinas em erva-mate (*Ilex paraguariensis*). *Química Nova*, Vol. 30, No. 2, 304-307, 2007.

GOMES, F. J. S.; ESCHER, S. K. S. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* Stapf. (Capim limão) sobre enterobactérias. *VIII Congresso de Ciência e Tecnologia da Amazônia*. Santarém, Pará, 2013.

GOMES, E. C.; NEGRELLE, R. R. B.; BIASI, L. A. Diagnóstico dos procedimentos de colheita e pós-colheita do capim-limão (*Cymbopogon citratus stapf*) no Estado do Paraná, Brasil. *Revista Brasil Plantas Mediciniais*. Vol. 9, No. 3, 70-75, 2007.

GUIMARÃES, L. G. de L.; CARDOSO, M. das G.; ZACARONI, L. M.; LIMA, R. K. Influência da luz e da temperatura sobre a oxidação de óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus stapf*). *Química Nova*. Vol. 31, No. 6, 1476-1480, 2008.

KOVÁTS, E. Gas-chromatographische charakterisierung organischer verbindungen. Teil 1: retentionsindices aliphatischer halogenide, alkohole, aldehyde und ketone. *Helvetica Chimica*. Vol. 41. No. 7, 1915-1932, 1958.

LEITE, M. C. A. Citral e geraniol: atividade antifúngica *in vitro* sobre leveduras do gênero *Candida* de importância hospitalar, 2015, 81f – Tese de Doutorado – Universidade Federal da Paraíba – João Pessoa, 2015.

LIMA, R. K. Caracterização química e bioatividade do óleo essencial de folhas de goiabeira sobre a lagarta-do-cartucho do milho. 2006. 57f - Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Lavras. Lavras, 2006;

LORENZETTI, E. R.; MONTEIRO, F. P.; SOUZA, P. E.; SOUZA, R. J.; SCALICE, H. K.; DIOGO JR, R.; PIRES, M. S. O. Bioatividade de óleos essenciais no controle de *Botrytis cinerea* isolado de morangueiro. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. Vol.13, No. especial, 619-627, 2011.

MARINHO, M. R. M. Planejamento fatorial: uma ferramenta poderosa para pesquisadores. XXXIII - Congresso Brasileiro de Ensino de Engenharia. Campo Grande. Paraíba. 2005.

MARTINAZZO, A. P.; CORRÊA P. C.; RESENDE, O.; MELO, E. de C. Análise e descrição matemática da cinética de secagem de folhas de capim-limão. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*. Vol.11, No 3, 301–306, 2007.

MARTINS, M. B. G.; MARTINS, A. R.; TELASCRÊA, M.; CAVALHEIRO, A. J. Caracterização anatômica da folha de *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf e perfil químico do óleo essencial. *Revista brasileira de plantas medicinais*. Vol. 6, No. 3, 20-29, 2004

MARTINS, M. L.; PRIMEL, E. G.; CALDAS, S. S.; PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME): fundamentos e aplicações. *Scientia Chromatographica*. Vol. 4, No. 1, 35-51, 2012.

MARTINS, P. M.; MELO, E.C.; BARBOSA, L.C.A.B.; SANTOS, R.H.S.; MACHADO, M.C. Influência da temperatura e velocidade do ar de secagem no teor e composição química do óleo essencial de capim-limão. *Acta Horti*. Vol. 569, 155-160, 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Política e Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos. 1ª Ed. Brasília. 2006.

MORAES, L. D.; OLIVEIRA, H. B.; SOUSA, O. V. Teores médios de flavonóides em amostras de *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf. *Revista Brasileira de Biociências*. Vol. 5. No. 2, 1035-1037, 2017.

MUHLEN, C. V. Índices de retenção em cromatografia gasosa bidimensional abrangente. *Scientia Chromatographica*. Vol. 1, No. 3, 21-29, 2009.

NAKAMURA, Y.; MIYAMOTO, M.; MURAKAMI, A.; OHIGASHI, H.; OSAWA, T.; UCHIDA, K. A phase II detoxification enzyme inducer from lemongrass: identification of citral and involvement of electrophilic reaction in the enzyme induction. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 302, No. 3, 593-600, 2003.

NAVARRO, D. F. Estudo químico, biológico e farmacológico das espécies *Allamanda blanchetti* e *Allamanda schottii* Pohl para a obtenção de frações e moléculas bioativas de potencial terapêutico. 293f. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. 2005.

NEGRELLE, R.R.B., GOMES, E.C. *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf : chemical composition and biological activities. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. Vol. 9 No. 1, 80-92, 2007.

NETO, L. G., LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*. Vol. 30, No. 2, 374-381, 2007.

NISHIYAMA, M. F.; COSTA, M. A. F.; COSTA, A. M.; SOUZA, C. G. M.; BOER, C. G.; BRACHT, C. K.; PERALTA, R. M. Chá verde brasileiro (*Camellia sinensis* var *assamica*): efeitos do tempo de infusão, acondicionamento da erva e forma de preparo sobre a eficiência de extração dos bioativos e sobre a estabilidade da bebida. *Ciência e Tecnologia dos Alimentos*. Vol. 30, No. 1, 191-196, 2010.

OLIVEIRA, A. R. M. Técnicas de microextração aplicadas à análise estereosseletiva do ibuprofeno, da hidroxicloroquina e de seus metabólitos em urina. 139f. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Riberão Preto - Universidade de São Paulo. Riberão Preto, 2007.

OLIVEIRA, L. S.; MUZITANO, M. F.; COUTINHO, M. A. S.; MELO, G. O.; COSTA, S. S. Plantas Medicinais como Recurso Terapêutico em Comunidade do Entorno da Reserva Biológica do Tinguá, RJ, Brasil – Metabólitos Secundários e Aspectos Farmacológicos. *Inter Science Place*. Vol. 4. No 17, 54-74, 2011.

OYEDELE, A. O.; GBOLADE, A. A.; SOSAN, M. B.; ADEWOYIN, F. B.; SOYELU, O. L.; ORAFIDIYA, O. O. Formulation of an effective mosquito-repellent topical product from lemongrass oil. *Phytomedicine*. Vol. 9, No. 3, 259-262, 2002.

PAVARANI, D. P.; LOPES, N. P. A ecologia química e a biossíntese dos terpenos voláteis das "Arnica-da-Serra" (*Lychnophora* spp.). *Revista Virtual de Química*. Vol. 8. No. 1. 242-261. 2016.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. *Journal of Biotechnology and Biodiversity*. Vol. 3, No. 4, 146-152, 2012.

PEREIRA, R. M. Determinação de constituintes inorgânicos em amostra de ervas e raízes medicinais por espectrometria de absorção atômica com chama. 2010. 120f. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

PUATANACHOKCHAI, R.; KISHIDA, H.; DENDA, A.; MURATA, N.; KONISHI, Y.; VINITKUMNUEN, U. NAKAE, D. Inhibitory effects of lemon grass (*Cymbopogon citratus*, Stapf) extract on the early phase of hepatocarcinogenesis after initiation with diethylnitrosamine in male Fischer 344 rats. *Cancer Letters*, Vol. 183, No. 1, 9-15, 2002.

RODRIGUES, A. B. L.; ALMEIDA, S. S. M. S. Identificação do mirceno em óleos essenciais por espectroscopia de massas: uma revisão sistemática. *Revista de biologia e ciências da terra*. Vol. 18. No. 1. 2019.

SANTOS, R.L.; GUIMARAES, G.P.; NOBRE, M.S.C.; PORTELA, A.S. Análise sobre a fitoterapia como prática integrativa no Sistema Único de Saúde. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. Vol. 13, No. 4, 486-491, 2011.

SILVA, J. M. S. Estéreo e sítio seletividade da epoxidação de diferentes terpenos com Al_2O_3 obtida via sol-gel. 94f. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas. 2005.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia do Produto natural ao Medicamento. 1, ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

SINGI, G., DAMESCENO, D.D., D'ANDRÉA, E.D., SILVA, G.A. Efeitos agudos dos extratos hidroalcoólicos do alho (*Allium sativum L.*) e do capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf) sobre a pressão arterial média de ratos anestesiados. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. Vol. 15. No. 2, 94-97, 2005.

SHAH, G.; SHRI, R.; PANCHAL, V.; SHARMA, N.; SINGH, B.; MANN, A. S. M. Scientific basis for the therapeutic use of *Cymbopogon citratus*, stapf (Lemon grass). *Journal of Advance Pharmaceutical Technology & Research*. Vol. 2, No. 1, 3-8, 2011.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. Fundamentos de química analítica. 9 Ed. São Paulo: Cengage Learning, 2015.

SOARES, B. V.; DIAS, M. T. Espécies de *Lippia* (Verbenaceae), seu potencial bioativo e importância na medicina veterinária e aquicultura. *Biota Amazônia*. Vol. 3. No. 1, 109-123, 2013;

STAMP, N. Out of the quagmire of plant defense hypotheses. *The Quarterly Review of Biology*. Vol. 78. No. 1, 23-55, 2003.

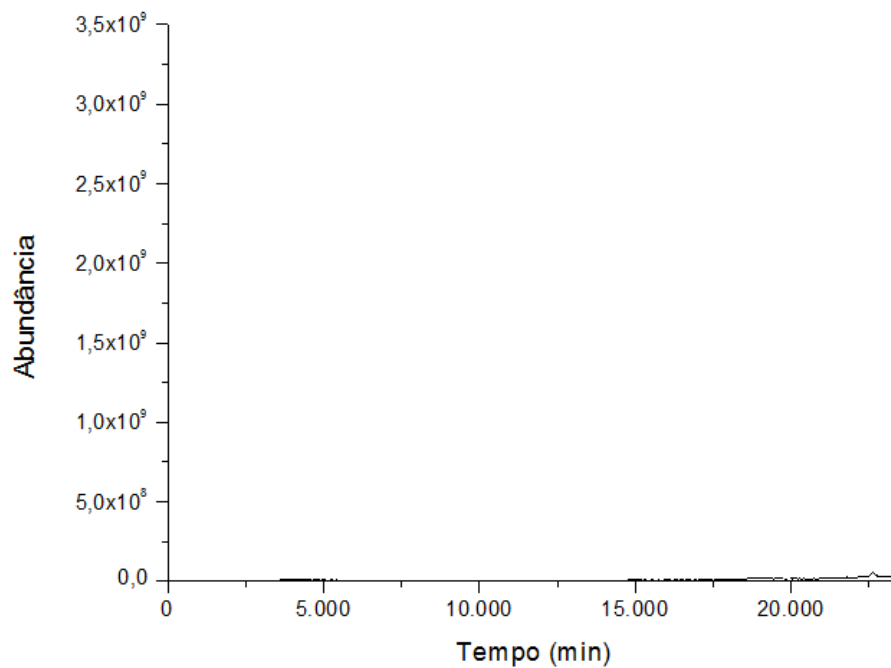
TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: Planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. *Química Nova*. Vol. 29. No. 2, 338-350, 2006.

VASCONCELLOS, A. G.; BRANQUINHO, F. B.; SÁNCHEZ, C.; LAGE, C. L. S. Fitofármaco, fitoterápico, plantas medicinais: o reducionismo e a complexidade na produção do conhecimento científico. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, Vol. 12, 103-105, 2002.

VELOSO, R. A.; CASTRO, H. G.; CARDOSO, D. P.; SANTOS, G. R.; BARBOSA, L. C. A.; SILVA, K. P. Composição e fungitoxicidade do óleo essencial de capim citronela em função da adubação orgânica. *Pesquisa agropecuária brasileira*. Vol.47, No.12, 1707-1713, 2012.

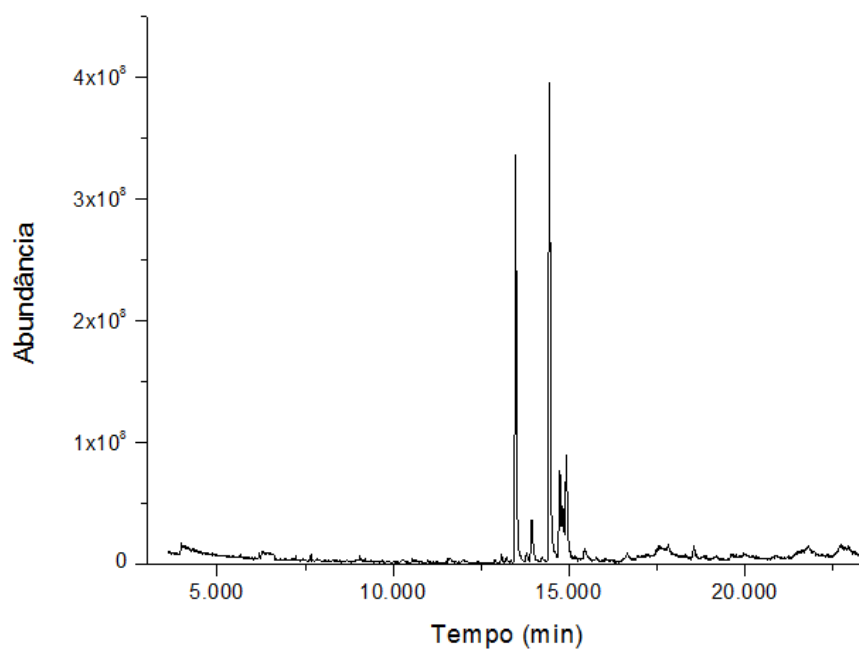
ANEXOS

Anexo A – Cromatograma dos solventes utilizados na microextração, etanol e diclorometano.



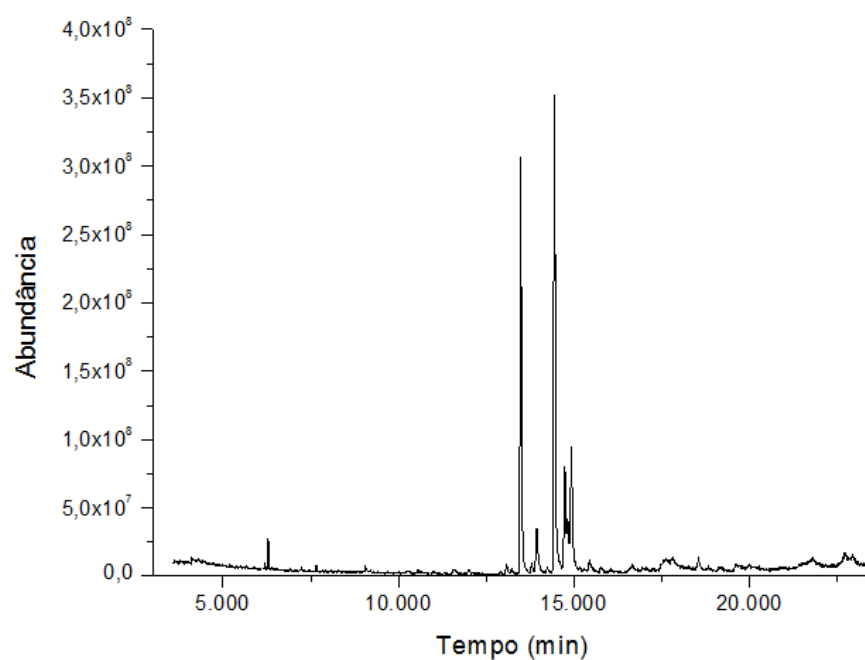
Fonte: Data Analyse – Agilent Technologie. Software: OriginPro 8, 2010.

Anexo B – Cromatograma do extrato folhas frescas em decocção por 5 minutos.



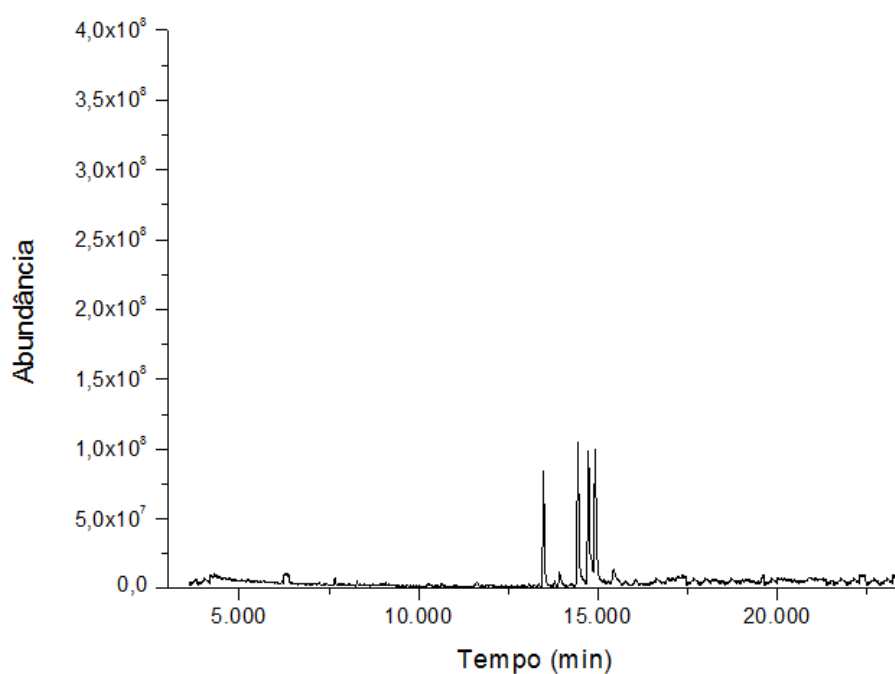
Fonte: Data Analyse – Agilent Technologie. Software: OriginPro 8, 2010.

Anexo C – Cromatograma do extrato das folhas frescas em decocção por 5 minutos.



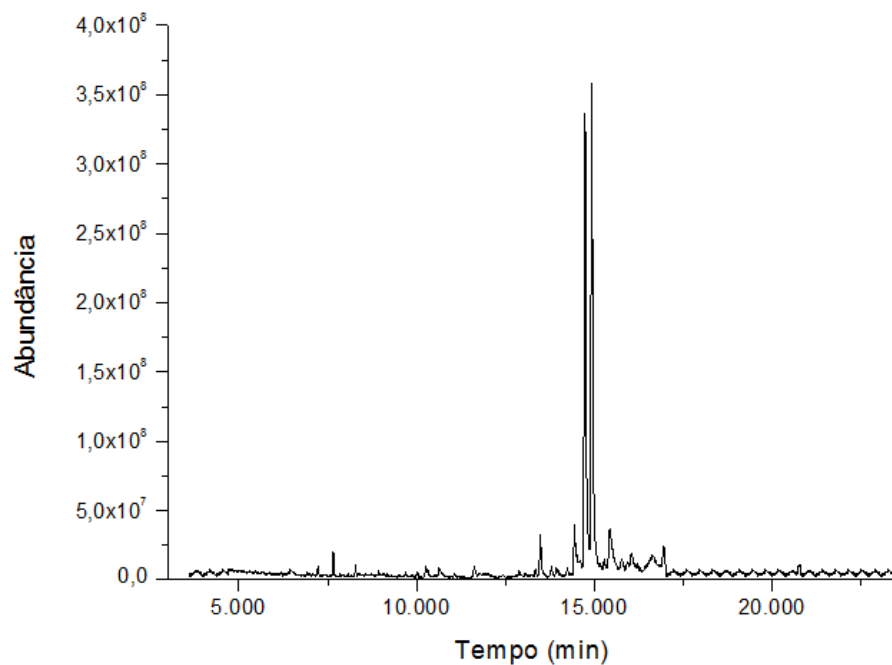
Fonte: Data Analyse – Agilent Technologie. Software: OriginPro 8, 2010.

Anexo D – Cromatograma do extrato das folhas frescas em decocção por 25 minutos.



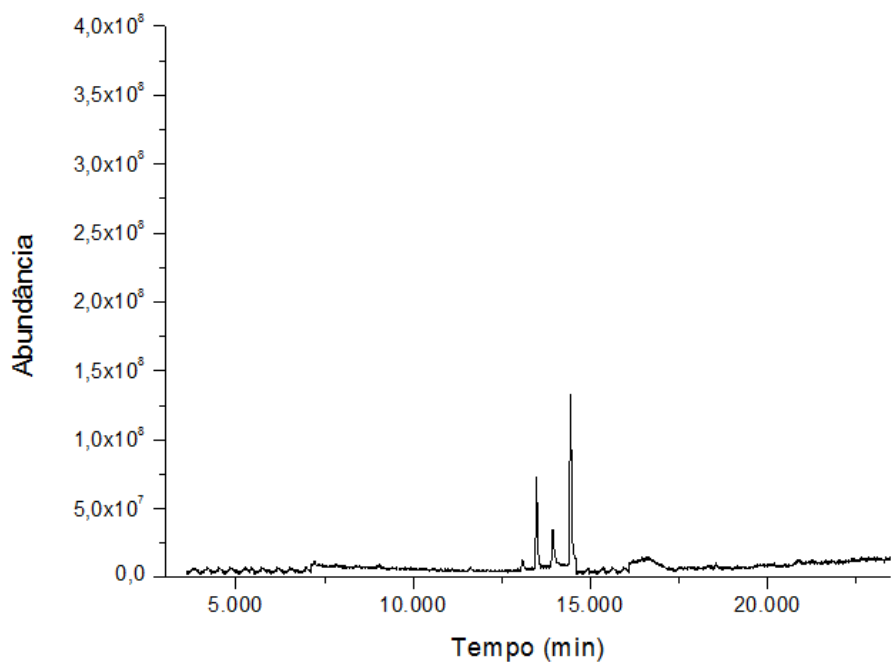
Fonte: Data Analyse – Agilent Technologie. Software: OriginPro 8, 2010.

Anexo E – Cromatograma do extrato das folhas frescas em decocção por 25 minutos.



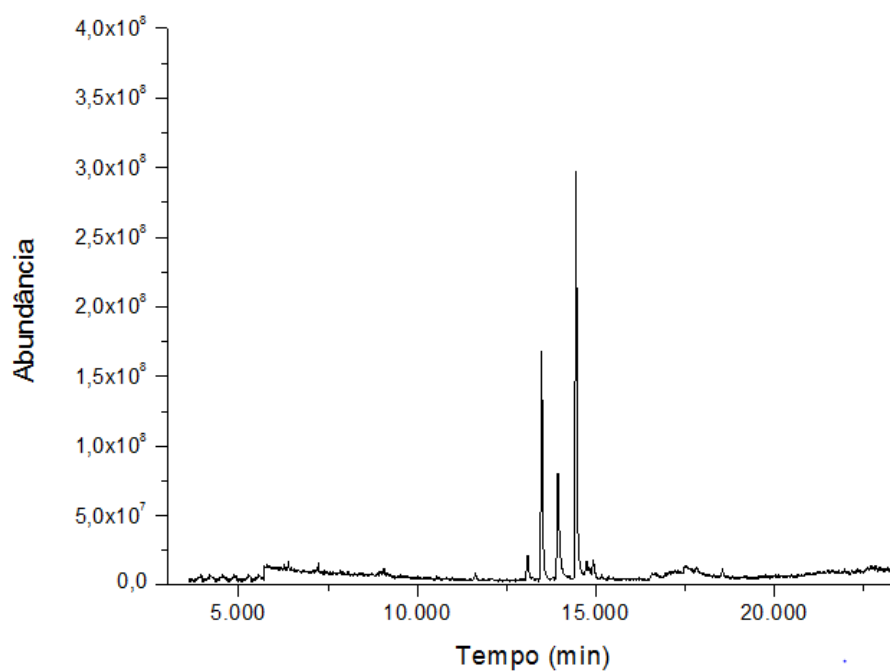
Fonte: Data Analyse – Agilent Technologie. Software: OriginPro 8, 2010.

Anexo F – Cromatograma do extrato das folhas frescas em infusão por 5 minutos.



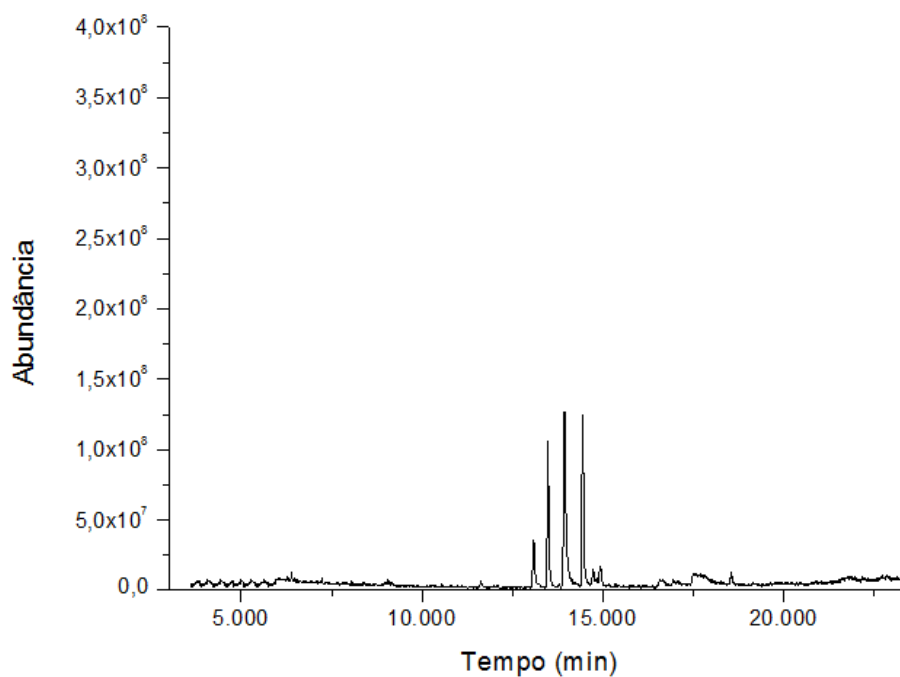
Fonte: Data Analyse – Agilent Technologie. Software: OriginPro 8, 2010.

Anexo G – Cromatograma do extrato das folhas frescas em infusão por 5 minutos.



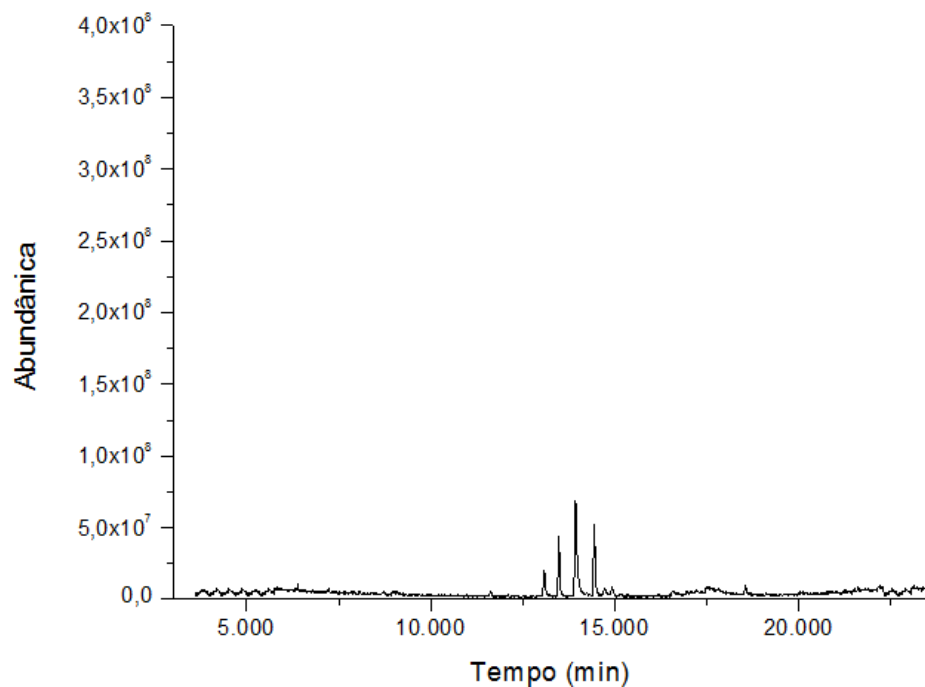
Fonte: Data Analyse – Agilent Technologie. Software: OriginPro 8, 2010.

Anexo H – Cromatograma do extrato das folhas frescas em infusão por 25 minutos.



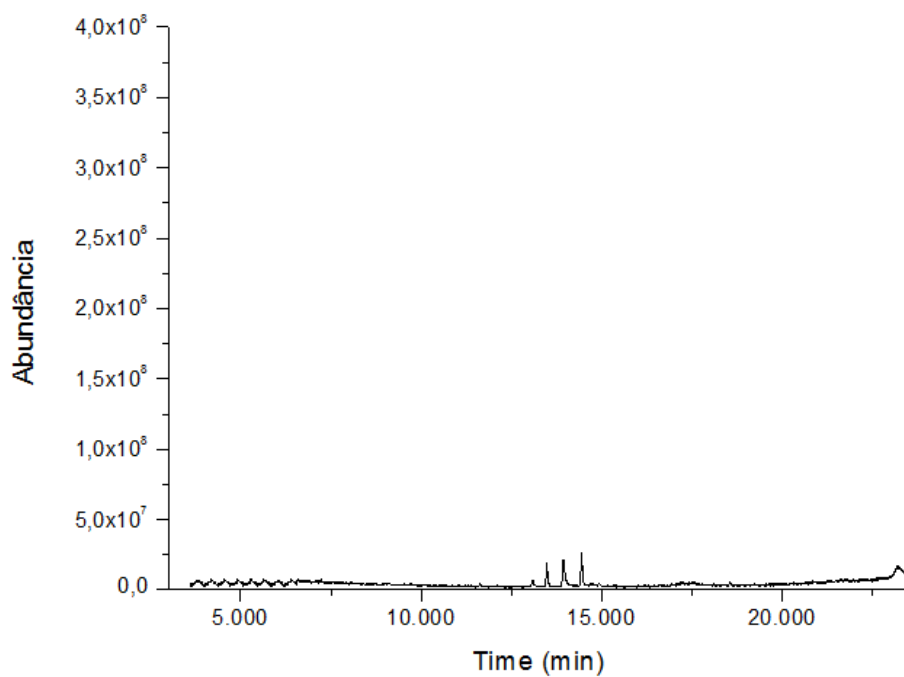
Fonte: Data Analyse – Agilent Technologie. Software: OriginPro 8, 2010.

Anexo I – Cromatograma do extrato das folhas frescas em infusão por 25 minutos.



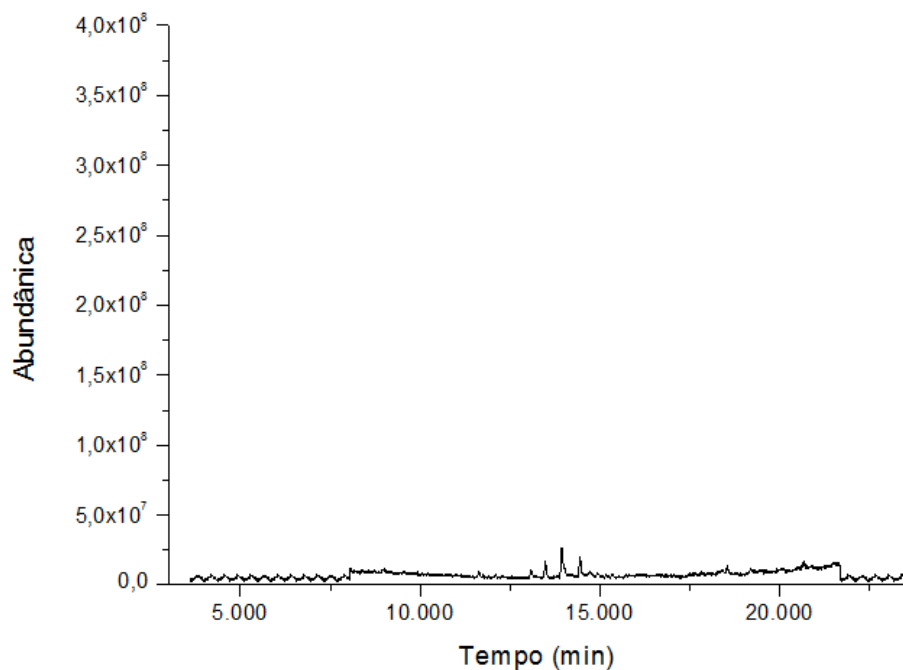
Fonte: Data Analyse – Agilent Technologie. Software: OriginPro 8, 2010.

Anexo J – Cromatograma do extrato das folhas frescas em infusão com ultrassonificação por 5 minutos.



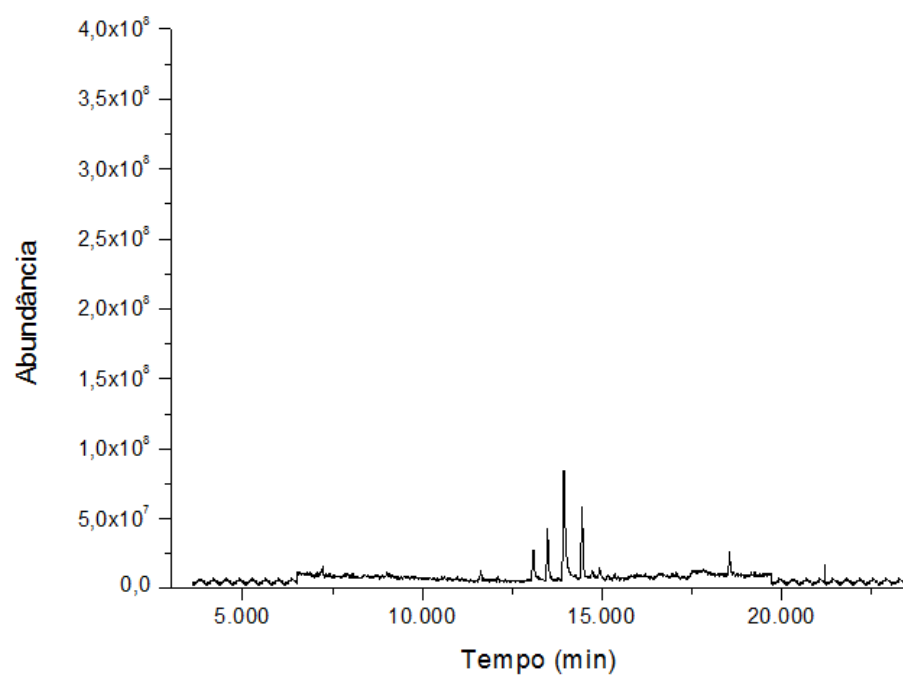
Fonte: Data Analyse – Agilent Technologie. Software: OriginPro 8, 2010.

Anexo K – Cromatograma do extrato das folhas frescas em infusão com ultrassonificação por 5 minutos.



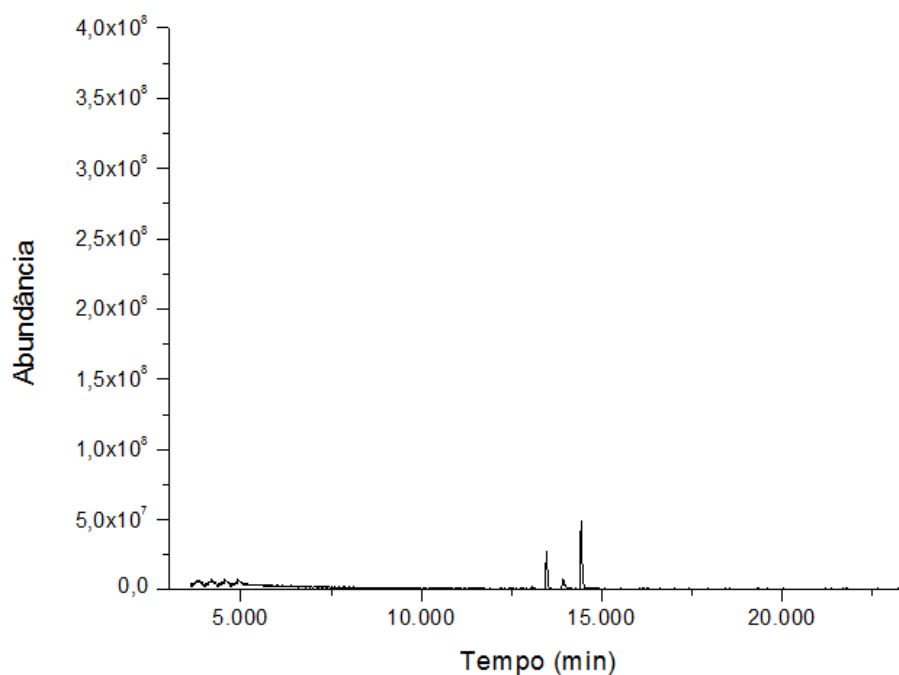
Fonte: Data Analyse – Agilent Technologie. Software: OriginPro 8, 2010.

Anexo L – Cromatograma do extrato das folhas frescas em infusão com ultrassonificação por 25 minutos.



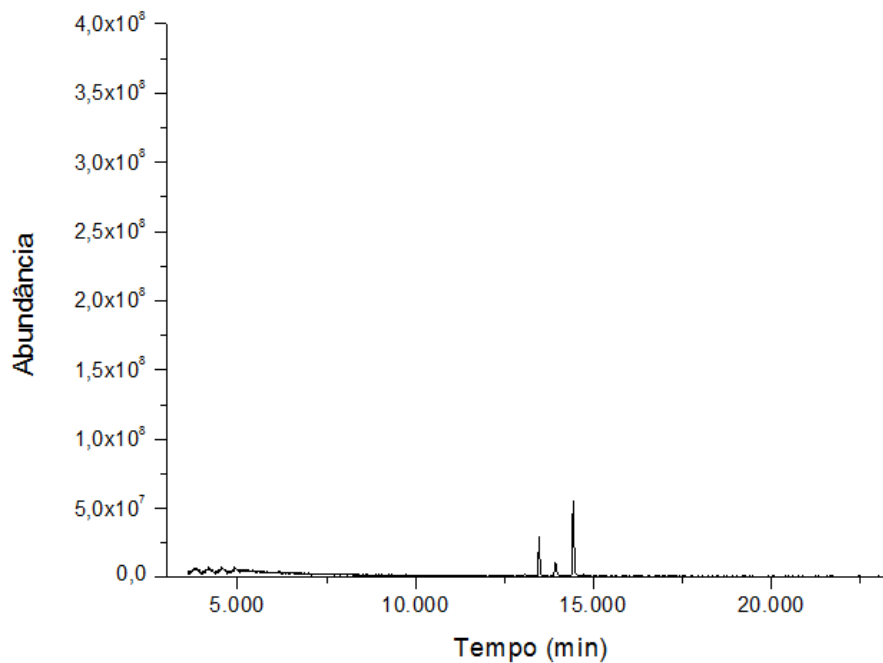
Fonte: Data Analyse – Agilent Technologie. Software: OriginPro 8, 2010.

Anexo M – Cromatograma do extrato das folhas resfriadas em infusão com por 5 minutos.



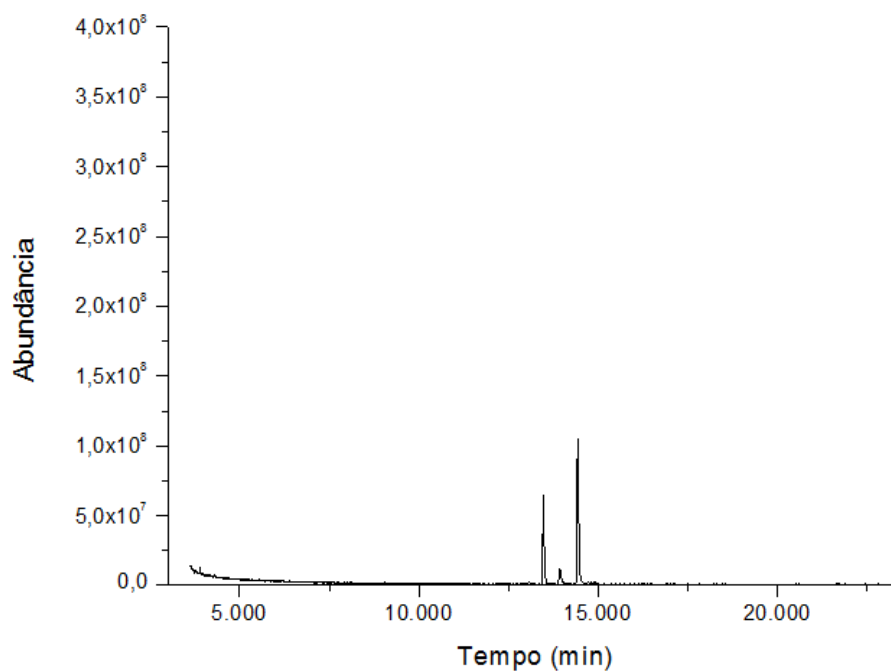
Fonte: Data Analyse – Agilent Technologie. Software: OriginPro 8, 2010.

Anexo N – Cromatograma do extrato das folhas resfriadas em infusão com por 5 minutos.



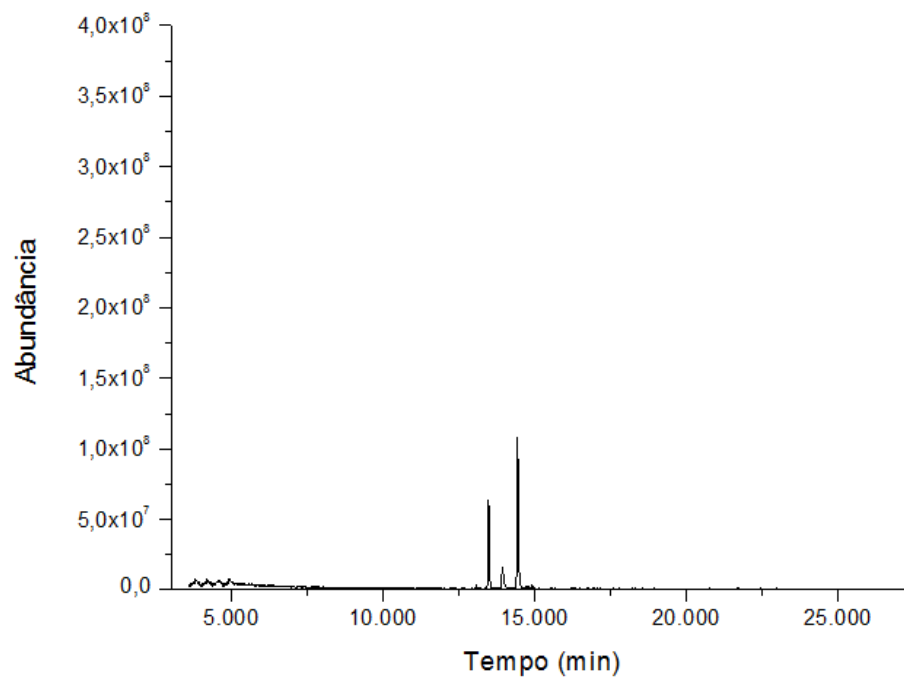
Fonte: Data Analyse – Agilent Technologie. Software: OriginPro 8, 2010.

Anexo O – Cromatograma do extrato das folhas resfriadas em infusão com por 25 minutos.



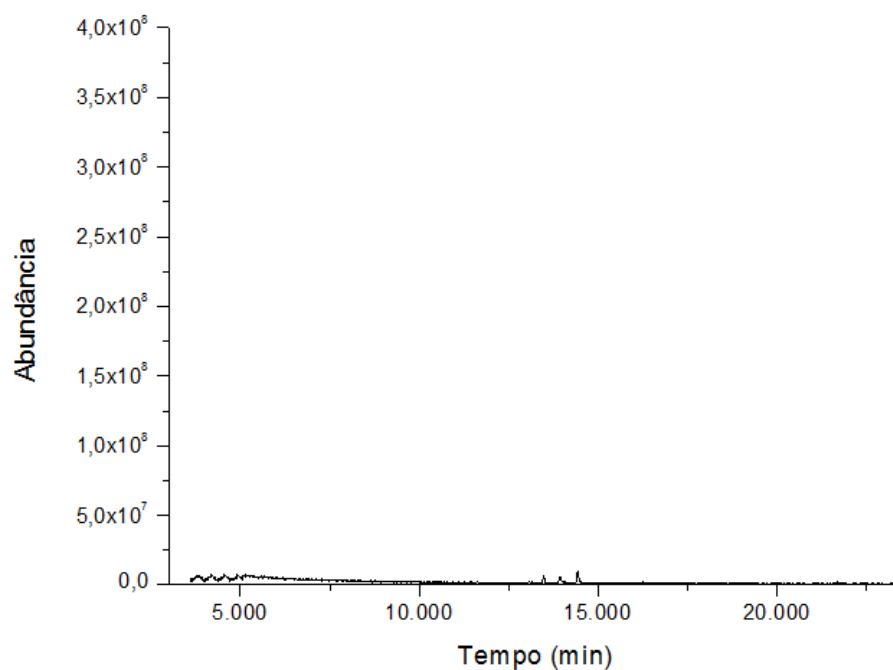
Fonte: Data Analyse – Agilent Technologie. Software: OriginPro 8, 2010.

Anexo P – Cromatograma do extrato das folhas resfriadas em infusão com por 25 minutos.



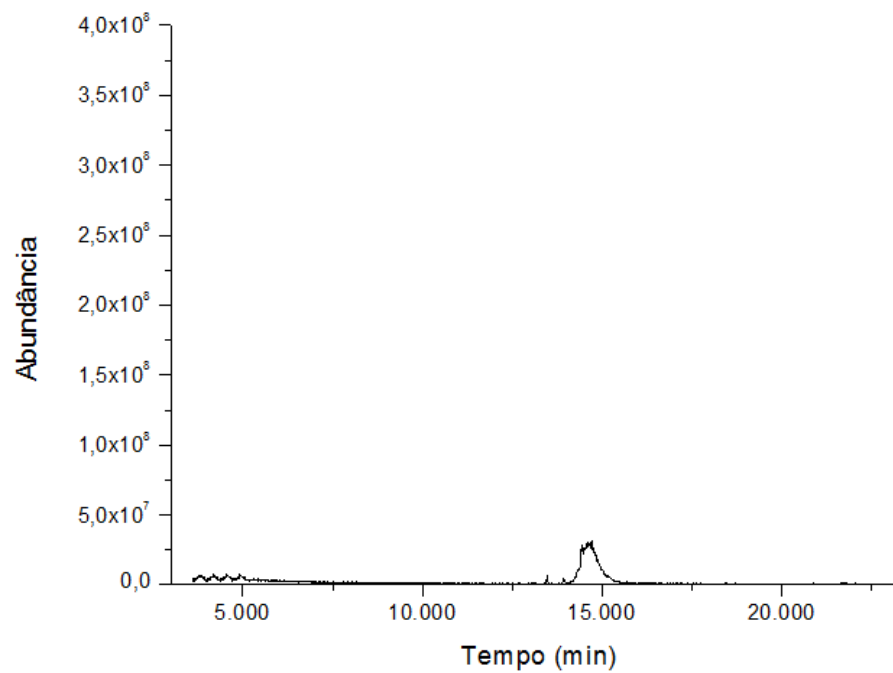
Fonte: Data Analyse – Agilent Technologie. Software: OriginPro 8, 2010.

Anexo Q – Cromatograma do extrato das folhas resfriadas em infusão com ultrassonificação por 5 minutos.



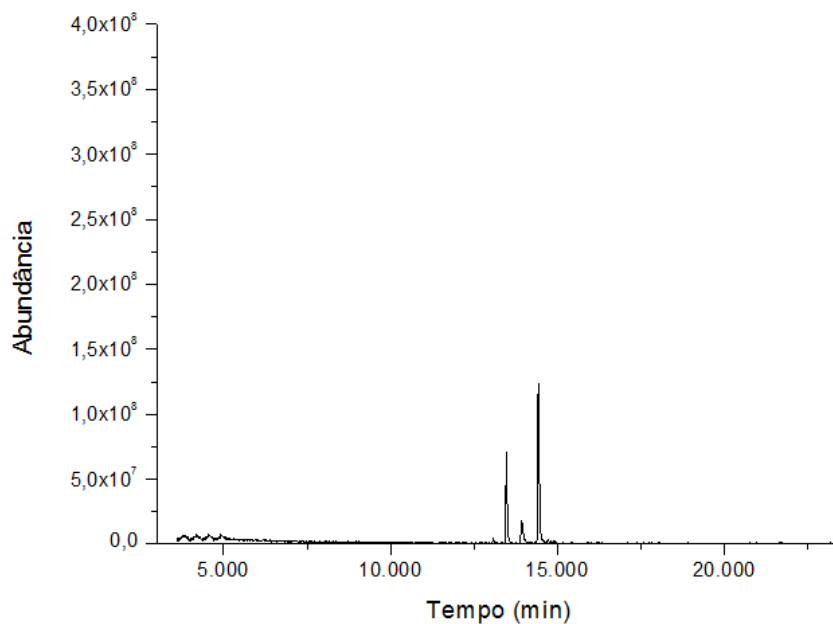
Fonte: Data Analyse – Agilent Technologie. Software: OriginPro 8, 2010.

Anexo R – Cromatograma do extrato das folhas resfriadas em infusão com ultrassonificação por 5 minutos.



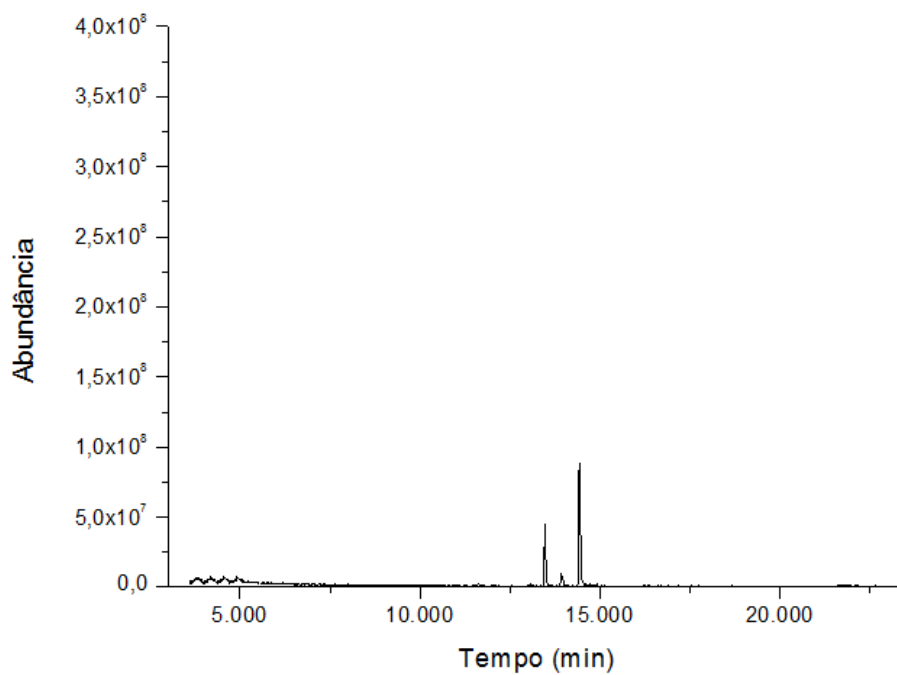
Fonte: Data Analyse – Agilent Technologie. Software: OriginPro 8, 2010.

Anexo S – Cromatograma do extrato das folhas resfriadas em infusão com ultrassonificação por 25 minutos.



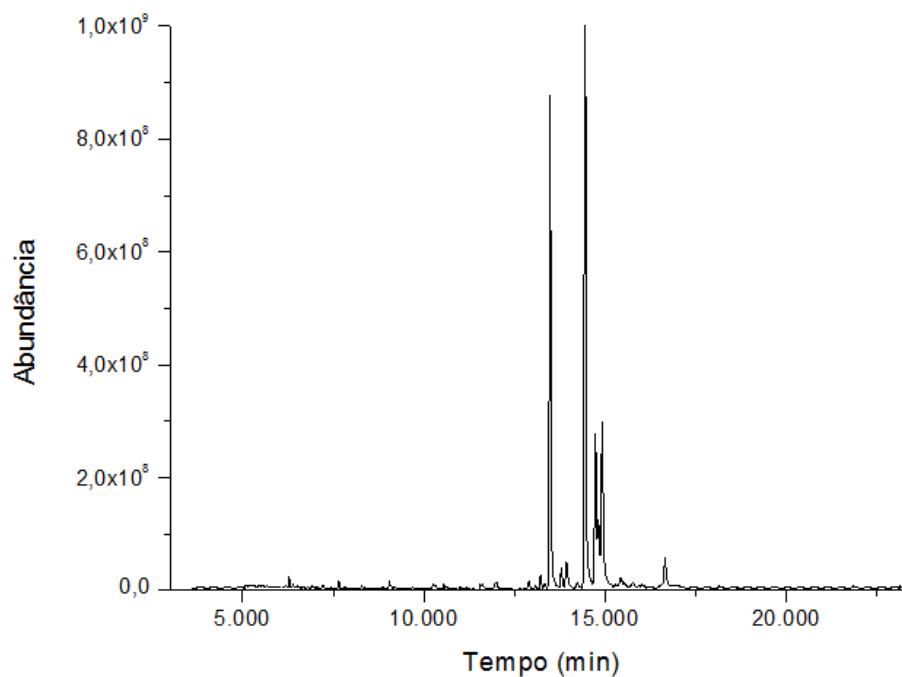
Fonte: Data Analyse – Agilent Technologie. Software: OriginPro 8, 2010.

Anexo T – Cromatograma do extrato das folhas resfriadas em infusão com ultrassonificação por 25 minutos.



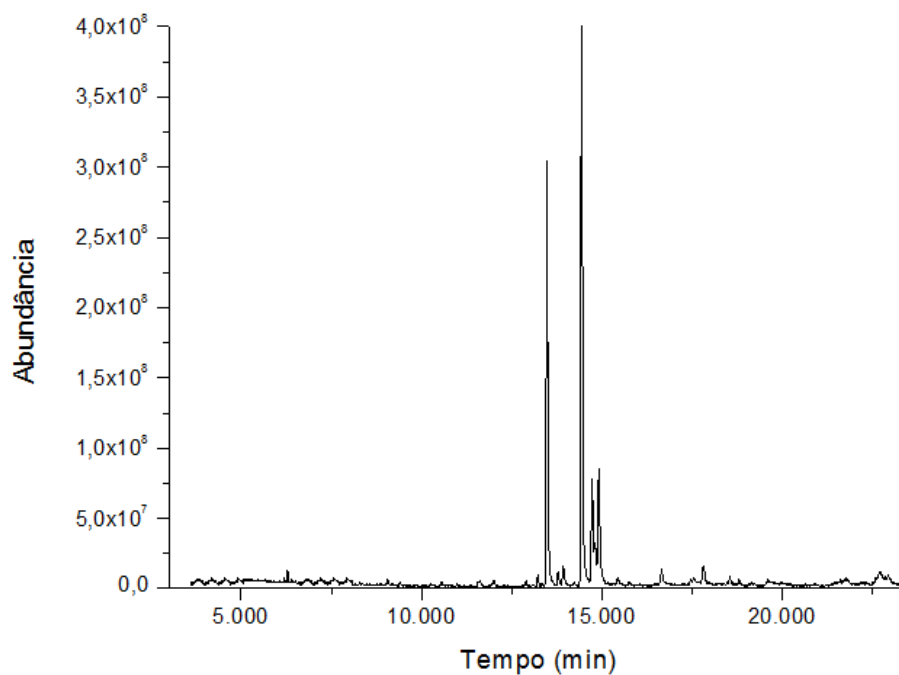
Fonte: Data Analyse – Agilent Technologie. Software: OriginPro 8, 2010.

Anexo U – Cromatograma do extrato das folhas secas em decocção por 5 minutos.



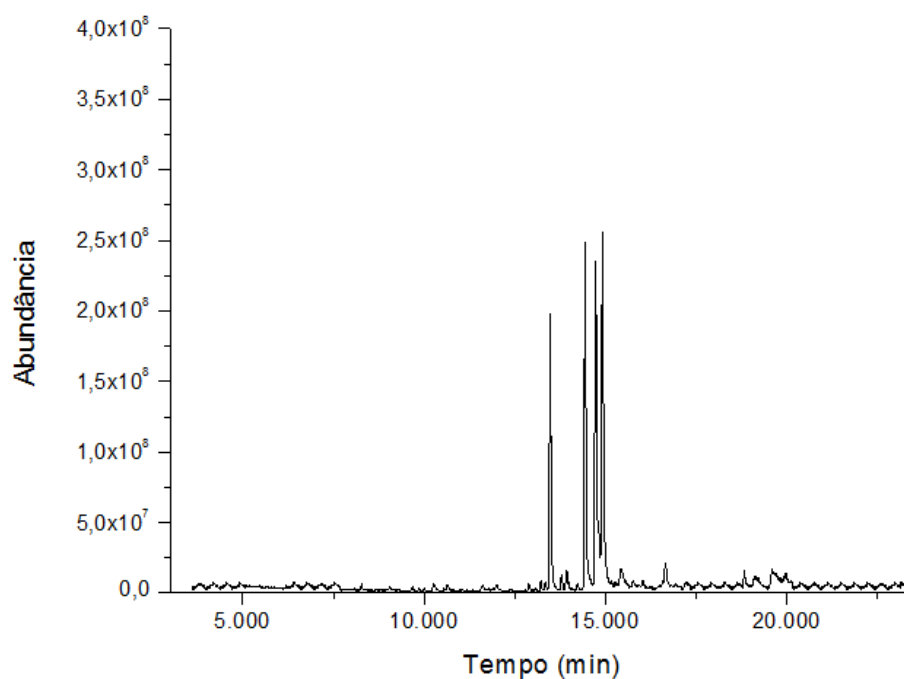
Fonte: Data Analyse – Agilent Technologie. Software: OriginPro 8, 2010.

Anexo V – Cromatograma do extrato das folhas secas em decocção por 5 minutos



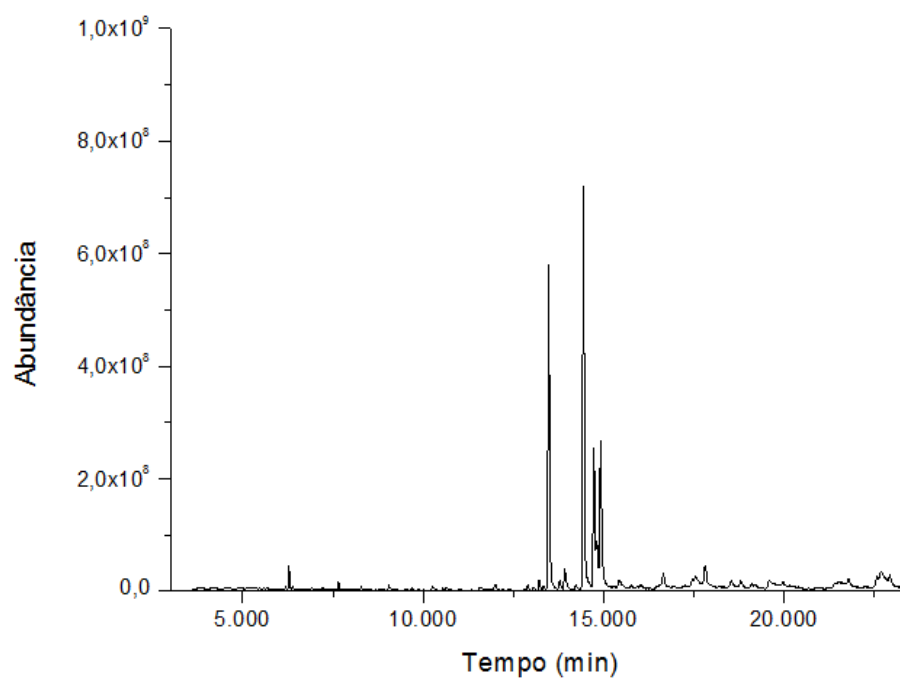
Fonte: Data Analyse – Agilent Technologie. Software: OriginPro 8, 2010.

Anexo W – Cromatograma do extrato das folhas secas em decocção por 25 minutos



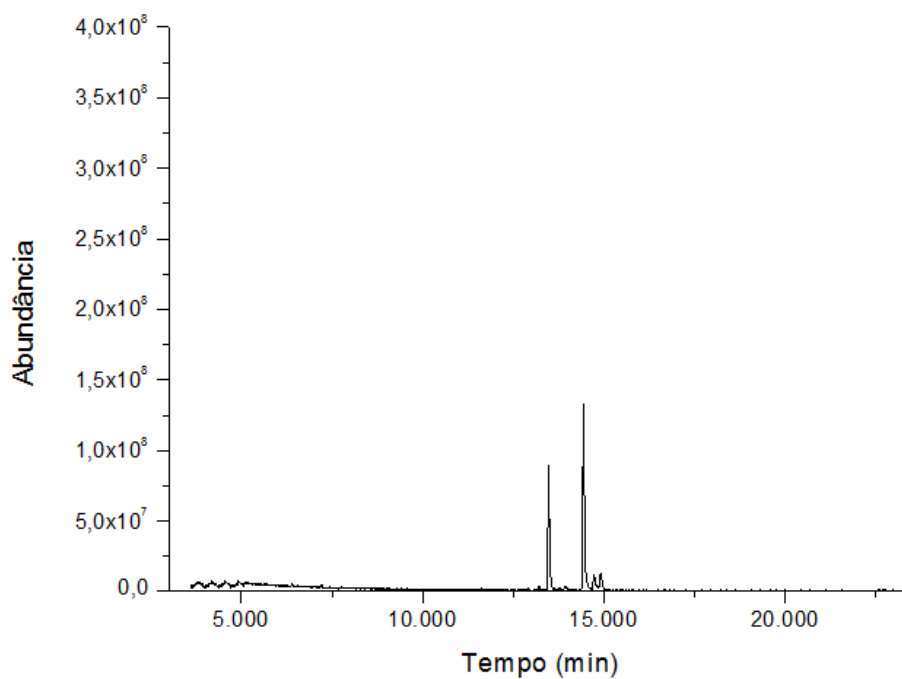
Fonte: Data Analyse – Agilent Technologie. Software: OriginPro 8, 2010.

Anexo X – Cromatograma do extrato das folhas secas em decocção por 25 minutos



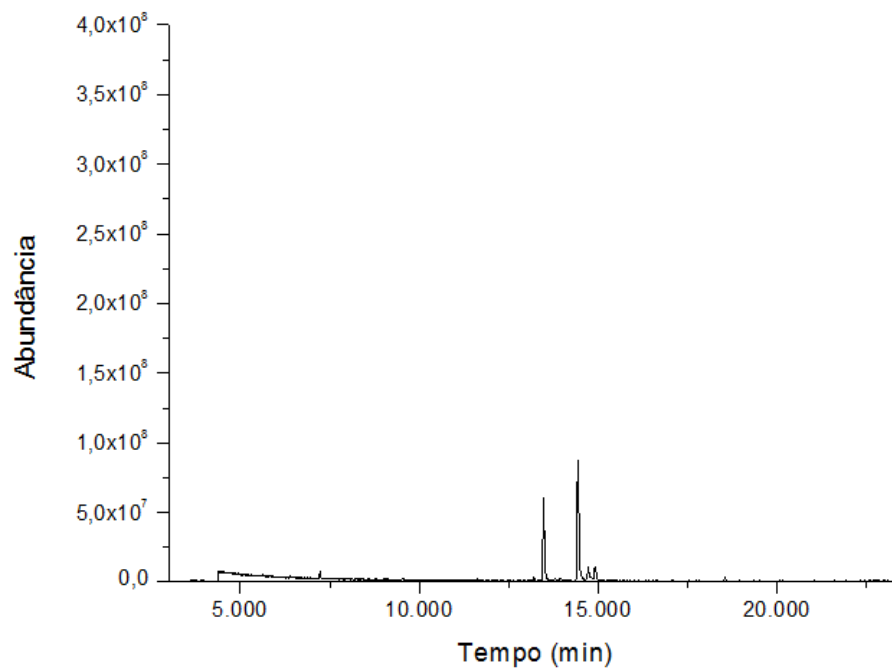
Fonte: Data Analyse – Agilent Technologie. Software: OriginPro 8, 2010.

Anexo Y – Cromatograma do extrato das folhas secas em infusão com ultrassonificação por 5 minutos



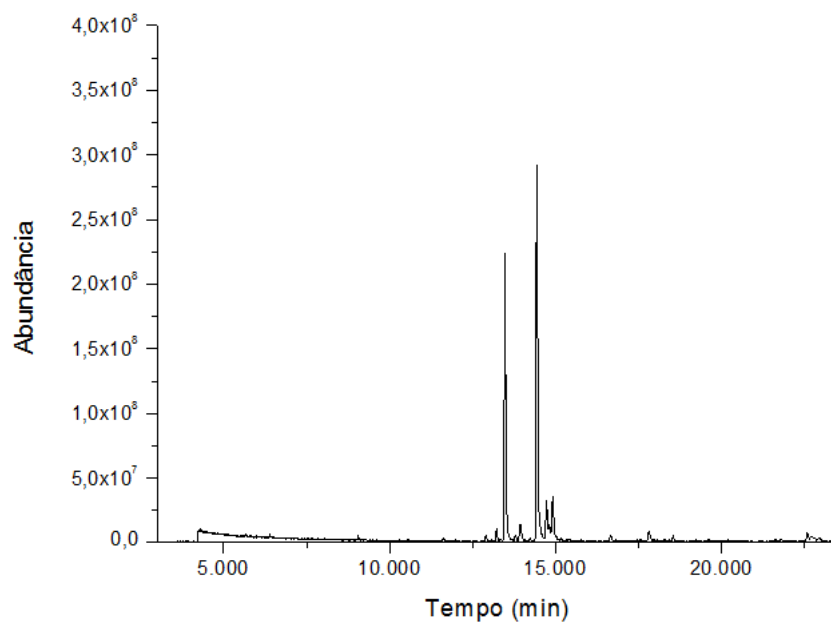
Fonte: Data Analyse – Agilent Technologie. Software: OriginPro 8, 2010.

Anexo Z – Cromatograma do extrato das folhas secas em infusão com ultrassonificação por 5 minutos



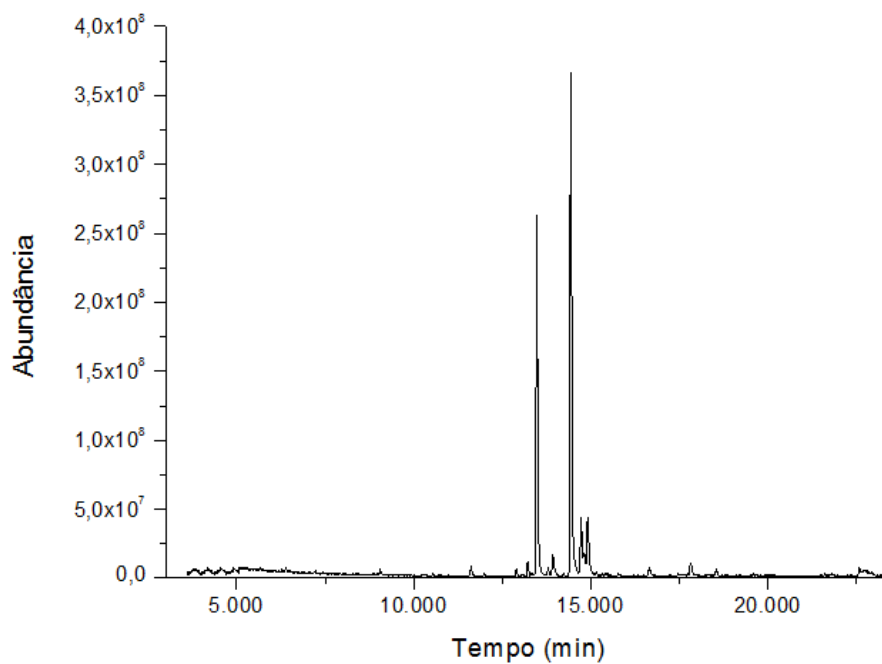
Fonte: Data Analyse – Agilent Technologie. Software: OriginPro 8, 2010.

Anexo AA – Cromatograma do extrato das folhas secas em infusão com ultrassonificação por 25 minutos



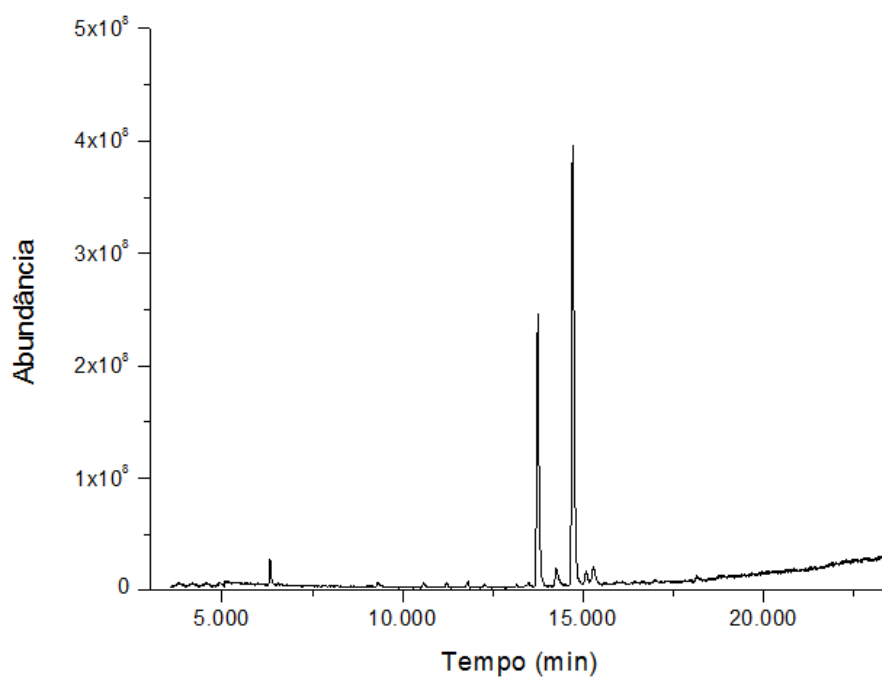
Fonte: Data Analyse – Agilent Technologie. Software: OriginPro 8, 2010.

Anexo AB – Cromatograma do extrato das folhas secas em infusão com ultrassonificação por 25 minutos



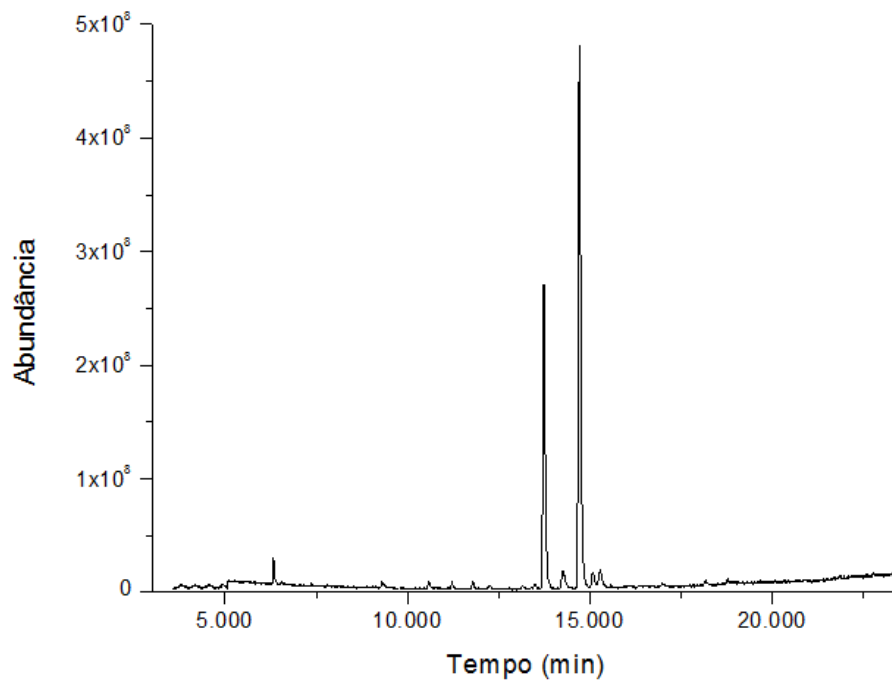
Fonte: Data Analyse – Agilent Technologie. Software: OriginPro 8, 2010.

Anexo AC – Cromatograma do extrato das folhas secas em infusão com ultrassonificação por 35 minutos.



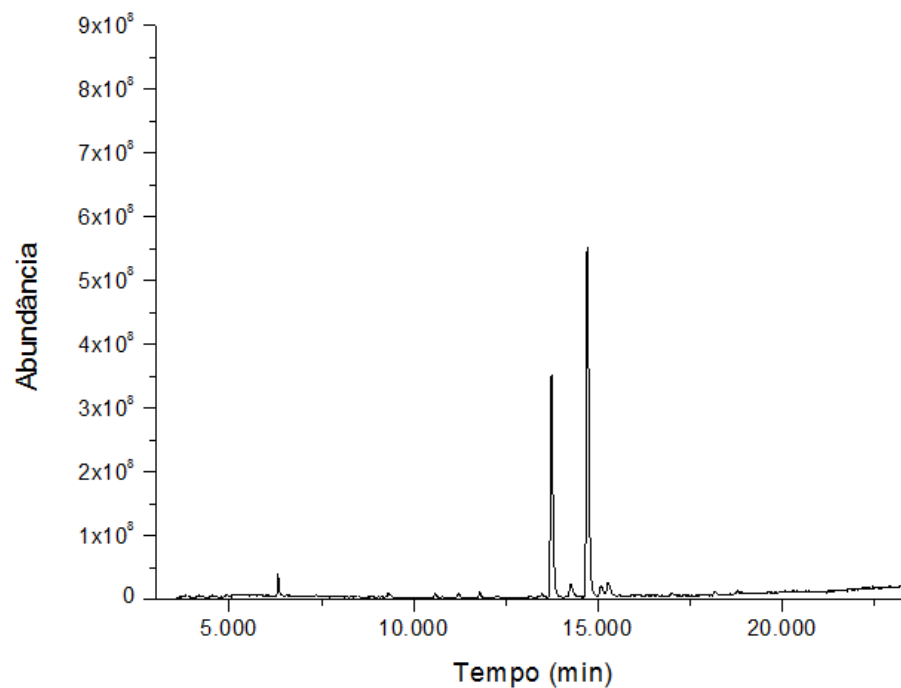
Fonte: Data Analyse – Agilent Technologie. Software: OriginPro 8, 2010.

Anexo AD – Cromatograma do extrato das folhas secas em infusão com ultrassonificação por 35 minutos.



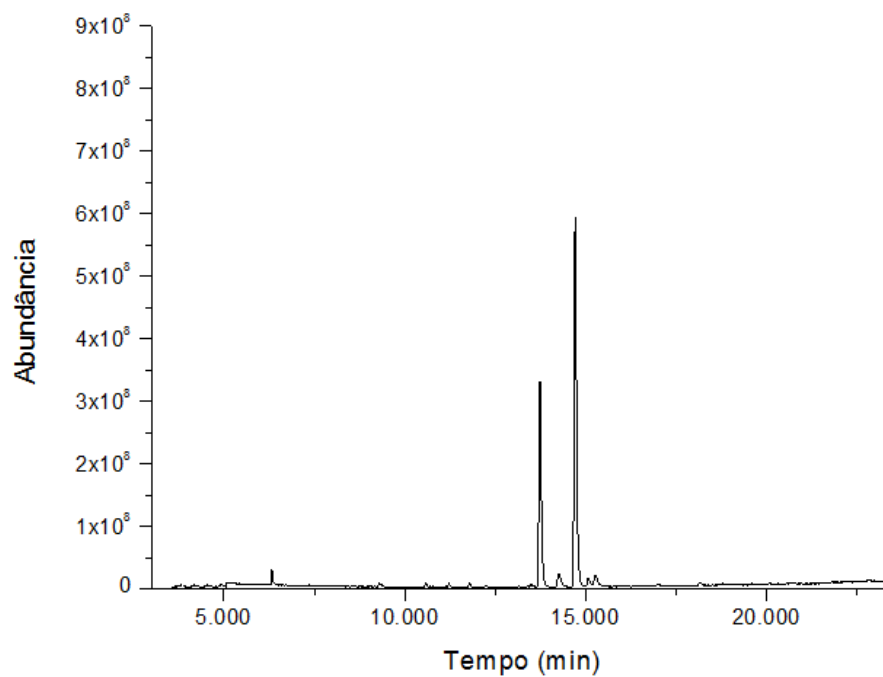
Fonte: Data Analyse – Agilent Technologie. Software: OriginPro 8, 2010.

Anexo AE – Cromatograma do extrato das folhas secas em infusão com ultrassonificação por 45 minutos.



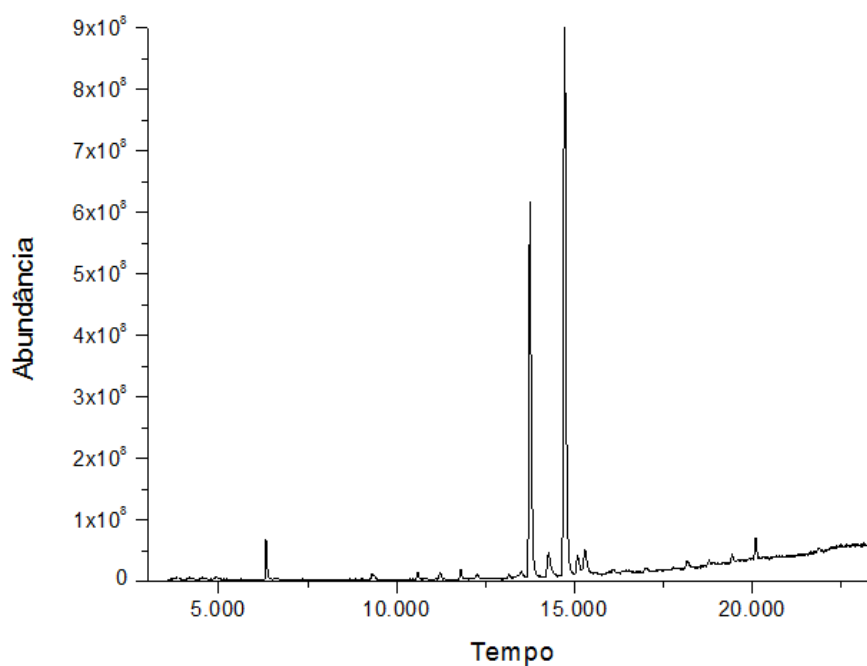
Fonte: Data Analyse – Agilent Technologie. Software: OriginPro 8, 2010.

Anexo AF – Cromatograma do extrato das folhas secas em infusão com ultrassonificação por 45 minutos.



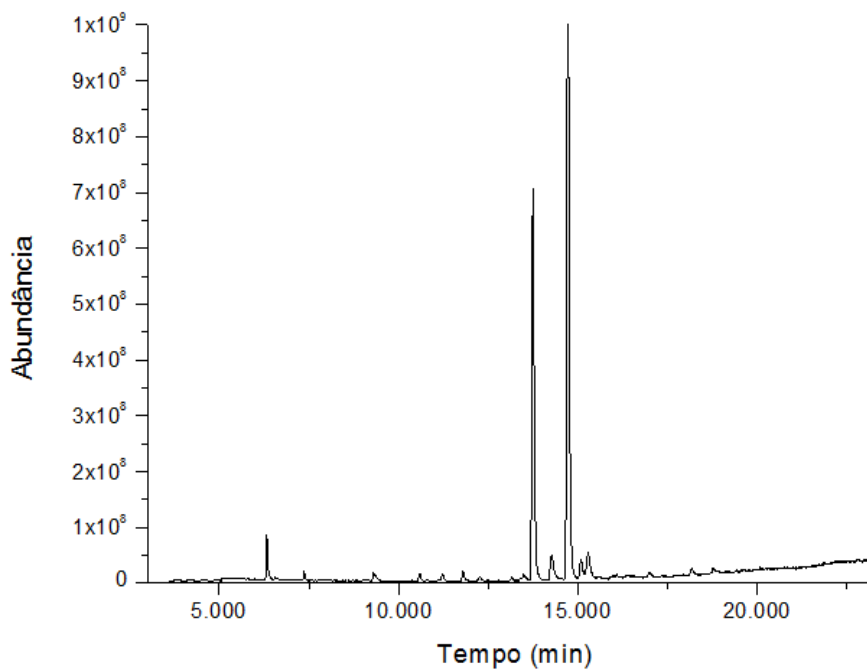
Fonte: Data Analyse – Agilent Technologie. Software: OriginPro 8, 2010.

Anexo AG – Cromatograma do extrato das folhas secas em infusão com ultrassonificação por 65 minutos.



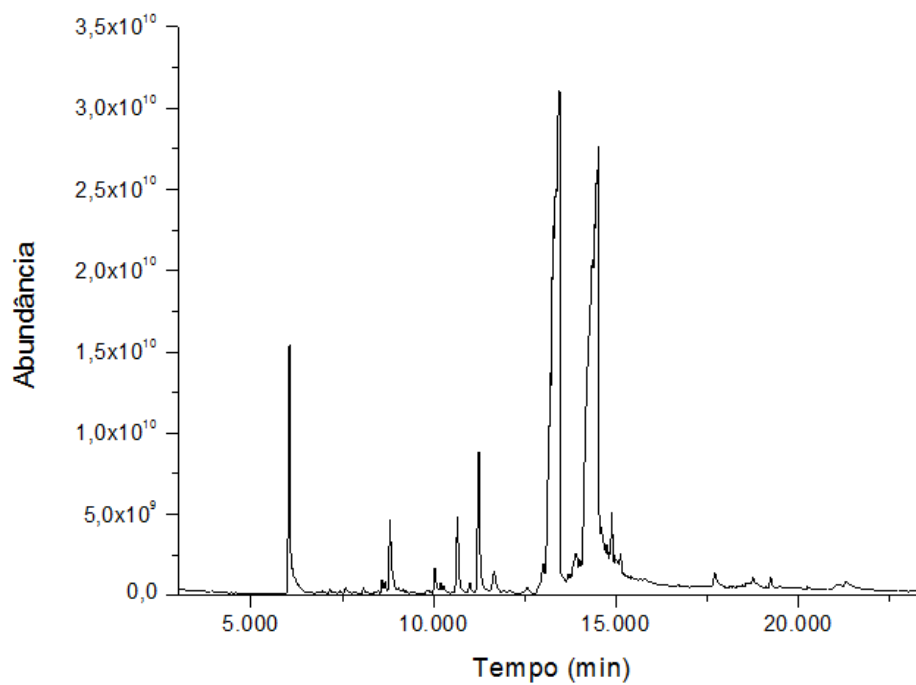
Fonte: Data Analyse – Agilent Technologie. Software: OriginPro 8, 2010.

Anexo AH – Cromatograma do extrato das folhas secas em infusão com ultrassonificação por 65 minutos.



Fonte: Data Analyse – Agilent Technologie. Software: OriginPro 8, 2010.

Anexo AI - Cromatograma do óleo essencial de capim-limão utilizado para definição do método no GC-MS.



Fonte: Data Analyse – Agilent Technologie. Software: OriginPro 8, 2010.