

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CARLOS EDUARDO BORTOLAN TOAZZA

OTIMIZAÇÃO, CINÉTICA DE EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DA ESPÉCIE NATIVA CAPIM-CARONA (*Elyonurus muticus*), E ESPÉCIES CULTIVADAS *Cymbopogon citratus* E *Cymbopogon flexuosus*.

CURITIBA

2020

CARLOS EDUARDO BORTOLAN TOAZZA

OTIMIZAÇÃO, CINÉTICA DE EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO
ÓLEO ESSENCIAL DA ESPÉCIE NATIVA CAPIM-CARONA (*Elyonurus muticus*), E
ESPÉCIES CULTIVADAS *Cymbopogon citratus* E *Cymbopogon flexuosus*.

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Setor de Tecnologia, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Lucia Masson

Co orientador: Dr. Wanderlei do Amaral

CURITIBA

2020

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

T627o Toazza, Carlos Eduardo Bortolan
Otimização, cinética de extração e caracterização química do óleo essencial da espécie nativa capim-carona (*Elyonurus muticus*), e espécies cultivadas *Cymbopogon citratus* e *Cymbopogon flexuosus*. [recurso eletrônico] / Carlos Eduardo Bortolan Toazza. – Curitiba, 2020.

Dissertação - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, 2020.

Orientadora: Maria Lucia Masson.
Coorientador: Wanderlei do Amaral.

1. Essências e óleos essenciais. 2. Antioxidantes. 3. Extração por solventes. I. Universidade Federal do Paraná. II. Masson, Maria Lucia. III. Amaral, Wanderlei do. IV. Título.

CDD: 664.07

Bibliotecária: Vanusa Maciel CRB- 9/1928



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ENGENHARIA DE
ALIMENTOS - 40001016018P6

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ENGENHARIA DE ALIMENTOS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **CARLOS EDUARDO BORTOLAN TOAZZA** intitulada: **OTIMIZAÇÃO, CINÉTICA DE EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DA ESPÉCIE NATIVA CAPIM-CARONA (*Elyonurus matileus*), E ESPÉCIES CULTIVADAS *Cymbopogon citratus* E *Cymbopogon flexuosus***, sob orientação da Profa. Dra. MARIA LUCIA MASSON, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa. A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 10 de Setembro de 2020.

Assinatura Eletrônica

16/09/2020 20:35:11.0

MARIA LUCIA MASSON

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

16/09/2020 15:12:21.0

MARCOS ROGÉRIO MAFRA

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

17/09/2020 16:03:09.0

CAMILA AUGUSTO PERUSSELLO

Avaliador Externo (TECHNOLOGICAL UNIVERSITY DUBLIN)

Francisco Heráclito dos Santos, 100 - Centro Politécnico - CURITIBA - Paraná - Brasil
CEP 81531-980 - Tel: (41) 3361-3232 - E-mail: posalim@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.
Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 52938

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prgp.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaosshaturas.jsp>
e insira o código 52938

Je ne constate pas simplement le phénomène.

Je le comprends, et je l'explique.

Rhinocéros, E. Ionesco (1959)

AGRADECIMENTOS

À minha família, por todo apoio em todas as situações durante toda a minha vida.

Aos meus orientadores, pela orientação, dedicação e ensinamentos que contribuíram para minha formação e para a execução desse trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos (PPGEAL) da Universidade Federal do Paraná (UFPR), pela oportunidade de cursar o mestrado, e aos professores do PPGEAL pelos importantes ensinamentos acadêmicos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo apoio financeiro.

Aos membros das bancas examinadoras, pelas contribuições e sugestões com intuito de aperfeiçoar esse estudo.

Aos colegas do meu laboratório do LABTECAL, LATOS e do PPGEAL, pelos bons momentos e amizades.

E a todos que me ajudaram ou contribuíram de alguma forma para a conclusão desse trabalho.

RESUMO

O *Elyonurus muticus*, também conhecido como capim-carona, é uma gramínea nativa da América do Sul, descartada pelos pecuaristas, por conferir sabor amargo ao leite se consumido pelo gado. Apesar disso, o óleo essencial (OE) de *E. muticus* tem demonstrado uma alta quantidade de citral em sua composição, comparável a algumas espécies de capim-limão. No presente estudo foram investigados os óleos essenciais de capim-limão (*Cymbopogon flexuosus* e *Cymbopogon citratus*) e *E. muticus*, obtidos por hidrodestilação, quanto à composição química (GC/MS), propriedades antioxidantes e quelantes (DPPH, ABTS, FRAP e quelante de Fe^{2+}), compostos fenólicos totais e atividade antimicrobiana, aplicação dos óleos na superfície de morangos, otimização do processo extrativo aplicando diferentes métodos (agitação eletromagnética, Ultra-Turrax® e Ultrassom), solventes (convencionais e eutéticos profundos) e temperaturas (45 e 60°C). Modelos matemáticos foram ajustados aos melhores resultados. O principal constituinte dos três óleos essenciais de capim-limão foi o citral (geranial + neral). Os óleos demonstraram resultados semelhantes para o ABTS e conteúdo fenólico. Quanto à atividade quelante dos íons de Fe^{2+} , os resultados foram estatisticamente diferentes, com maior destaque para o OE de *E. muticus*. O teste antimicrobiano exibiu inibição substancial da *L. monocytogenes* e *Salmonella sp.* pelo óleo de *E. muticus*, com 54 e 55% de inibição respectivamente. Os revestimentos dos morangos feitos com 750 μ L/L de OE de *E. muticus* e *C. flexuosus*, apresentaram os melhores resultados de conservação durante 15 dias de refrigeração. Os dados adicionalmente destacaram a similaridade no cluster (HCA) entre os OEs de *E. muticus* e *C. flexuosus*. Assim, o OE de *E. muticus* demonstrou potencial tecnológico e econômico para as indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica, já que seu OE pode ser aplicado como antioxidante, quelante de Fe^{2+} , antimicrobiano e revestimento de frutas. Com a otimização do processo extrativo para essas espécies, os extratos vegetais, obtidos com os solventes eutéticos profundos (*Deep Eutectic Solvents*, DES) e convencionais, mostraram excelentes valores para compostos antioxidantes e fenólicos, sendo o solvente de cloreto de colina e ácido acético o que apresentou melhor desempenho para as três espécies avaliadas. A otimização encontrou as condições ótimas de extração em: agitação eletromagnética em célula de vidro encamisada, na temperatura de 60°C, por 150 (*E. muticus*) e 180 (*C. flexuosus* e *C. citratus*) min. Com a modelagem matemática foi visto que o modelo de segunda ordem da lei de potência melhor se adequou aos dados com valores de $R^2 > 0,93$ e erros absolutos menores que 0,27. Este trabalho demonstra que a espécie *E. muticus* se assemelha as demais, tem óleo essencial aplicável e como revestimento de frutas, além de sua capacidade antioxidante, antimicrobiano e quelante de ferro e obtendo os melhores resultados de extração com solvente o [Ch]Cl:AA, a 60°C por 150 minutos.

Palavras chaves: Óleo essencial. Capim limão. Quelante de ferro. Potencial antimicrobiano. Antioxidante. Solventes eutéticos profundos.

ABSTRACT

Elyonurus muticus is a grass native to South America, which is discarded by farmers for yielding milk with a bitter note if consumed by cattle. Nevertheless, *E. muticus* essential oil (EO) has shown a high amount of citral in its composition, comparable to some species of lemongrass. In the present study, the essential oils of lemongrass (*Cymbopogon flexuosus* and *Cymbopogon citratus*) and *E. muticus*, obtained by hydrodistillation, were investigated in terms of chemical composition (GC / MS), antioxidant and chelating properties (DPPH, ABTS, FRAP and chelator of Fe²⁺), total phenolic compounds and antimicrobial activity. The extraction variables were optimized, including extraction method (electromagnetic stirring, Ultra-Turrax®, and Ultrasound), solvent (conventional and deep eutectic), and temperature (45 and 60°C). Mathematical models were fitted to the best results. In addition, the oils were used as edible coatings on strawberries. The main constituent of the three essential oils of lemongrass was citral (geranial + neral). The oils showed similar results for ABTS and phenolic content. As for the chelating activity of Fe²⁺ ions, the results were statistically different, with emphasis on the EO of *E. muticus*. The antimicrobial test showed substantial inhibition of *L. monocytogenes* and *Salmonella sp.* to *E. muticus* oil, with 54 and 55% inhibition respectively. The strawberry coatings made with 750 µL/L of EO from *E. muticus* and *C. flexuosus* showed the best conservation results during 15 days of refrigeration. The data additionally highlighted the similarity in the cluster (HCA) between the EOs of *E. muticus* and *C. flexuosus*. The EO of *E. muticus* exhibited remarkable market potential in the food, cosmetic and pharmaceutical industries, as it can be used as antioxidant, Fe²⁺ chelator, antimicrobial agent and edible coating for fruit. The plant extracts obtained with Deep Eutectic Solvents (DES) and conventional solvents showed excellent values for antioxidant and phenolic compounds, with choline chloride and acetic acid performing best for all three species evaluated. The optimal extraction conditions were: electromagnetic stirring in a jacketed glass cell, at a temperature of 60 ° C, for 150 (*E. muticus*) and 180 (*C. flexuosus* and *C. citratus*) min. The second-order power-law model fitted best to the experimental data, with R² > 0.93 and absolute errors < 0.27. Therefore, this work demonstrated that *E. muticus* has a chemical composition and antioxidant, antimicrobial and iron-chelating capacities equivalent to those of lemongrass, rendering it a valuable raw material for edible and non-edible purposes. The best extraction conditions included the solvent [Ch] Cl: AA in a process conducted at 60 ° C for 150 minutes.

Keywords Essential oils. Lemongrass. Iron chelation. Antimicrobial potential. Antioxidants. Deep eutectic solvents.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Folhas de <i>Elyonurus muticus</i>	18
Figura 2 - Isômeros do citral: geranial e neral	19
Figura 3 - Fluxograma esquemático do desenvolvimento do trabalho.	27
Figura 4 - Porcentagem de atividade antioxidante (métodos quelante de ferro, DPPH, ABTS e FRAP) de <i>Cymbopogon flexuosus</i> (a), <i>Cymbopogon citratus</i> (b) e <i>Elyonurus muticus</i> (c) em cinco concentrações diferentes de óleos essenciais.	44
Figura 5 - Morango (amostra Controle) no primeiro dia de armazenamento.....	47
Figura 6 - Testes de qualidade global e comportamentos frente à decomposição fúngica de morangos durante 15 dias sob refrigeração. Siglas: Controle com o morango sem revestimento; Cc1 = morango em 250 µL/L de óleo de <i>C. citratus</i> ; Cc2 = 750 µL/L de óleo de <i>C. citratus</i> ; Cf1 = 250 µL/L de óleo de <i>C. flexuosus</i> ; Cf2 = 750 µL/L de óleo de <i>C. flexuosus</i> ; Em1 = 250 µL/L de óleo de <i>E. muticus</i> and Em2 = 750 µL/L de óleo de <i>E. muticus</i> . * teste de LSD Fisher (p<0.05); Controle e no decaimento fúngico representado pela letra: g (dia 6/9/12), e (dia 3) e f (dia 15).	48
Figura 7 – Evolução dos parâmetros visuais do morango e desenvolvimento de fungos durante armazenamento refrigerado no período de 15 dias. Siglas: Controle com o morango sem revestimento; Cc1 = morango em 250 µL/L de óleo de <i>C. citratus</i> ; Cc2 = 750 µL/L de óleo de <i>C. citratus</i> ; Cf1 = 250 µL/L de óleo de <i>C. flexuosus</i> ; Cf2 = 750 µL/L de óleo de <i>C. flexuosus</i> ; Em1 = 250 µL/L de óleo de <i>E. muticus</i> and Em2 = 750 µL/L de óleo de <i>E. muticus</i>	49
Figura 8 - Análise hierárquica de cluster (HCA) dos óleos essenciais de <i>Cymbopogon flexuosus</i> (Cf), <i>Cymbopogon citratus</i> (Cc) e <i>Elyonurus muticus</i> (Em), de acordo com a composição química, atividade antioxidante e teste de atributos. .	51
Figura 9 - Conteúdo fenólico total e atividades antioxidantes (DPPH e FRAP) na avaliação de solventes (Design exp. 1) do capim-limão a) <i>C. citratus</i> ; b) <i>C. flexuosus</i> e c) <i>E. muticus</i> . Os testes ANOVA e LSD Fisher (p <0,05) não evidenciaram diferença significativa se a mesma letra apareceu nas colunas de mesma cor.	52
Figura 10 - Conteúdo fenólico total e atividades antioxidantes (DPPH e FRAP) na avaliação de solventes/temperatura (Design exp. 2) do capim-limão a) <i>C. citratus</i> ; b) <i>C. flexuosus</i> e c) <i>E. muticus</i> . O teste ANOVA e LSD Fisher (p <0,05) não evidenciaram diferença significativa se a mesma letra apareceu nas colunas de mesma cor.....	54

Figura 11 - Conteúdo fenólico total e atividades antioxidantes (DPPH e FRAP) na cinética de extração com solvente água (Design exp. 3) do capim-limão <i>E. muticus</i> para os métodos a) <i>Célula encamisada</i> b) <i>Ultra-Turrax®</i> e c) <i>UA-SLE</i> . O teste ANOVA e LSD Fisher ($p < 0,05$) não evidenciou diferença significativa se a mesma letra apareceu em colunas de mesma cor.....	55
Figura 12 - Conteúdo fenólico total e atividades antioxidantes (DPPH e FRAP) na cinética de extração com solvente DES-[Ch]Cl:AA (Design exp. 3) do capim-limão <i>C. citratus</i> a) <i>Célula encamisada</i> b) <i>Ultra-Turrax®</i> e c) <i>UA-SLE</i> . O teste ANOVA e LSD Fisher ($p < 0,05$) não evidenciou diferença significativa se a mesma letra apareceu em colunas de mesma cor.	56
Figura 13 - Concentração de fenólicos totais na cinética de extração com solvente DES-[Ch]Cl:AA do capim-limão <i>C. citratus</i> ((●) verde), <i>E. muticus</i> ((■) azul) e <i>C. flexuosus</i> ((▲) laranja). As linhas sólidas correspondem ao modelo de lei da potência de segunda ordem.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Vantagens e desvantagens de solventes convencionais e dos solventes eutéticos profundos	25
Tabela 2. DES: receptor da ligação de hidrogênio, doador da ligação de hidrogênio, logaritmo da partição octanol-água, fração molar do DES e abreviação utilizada no trabalho	35
Tabela 3. Composição química, rendimento de OE e, conteúdo citral das plantas <i>Cymbopogon flexuosus</i> , <i>Cymbopogon citratus</i> e <i>Elyonurus muticus</i>	39
Tabela 4. Composição química por GC/MS do OE obtido da hidrodestilação das folhas de <i>Cymbopogon flexuosus</i> , <i>Cymbopogon citratus</i> e <i>Elyonurus muticus</i>	40
Tabela 5. DPPH, ABTS, FRAP, atividade quelante de Fe ²⁺ e teor de compostos fenólicos dos óleos essenciais de <i>Cymbopogon flexuosus</i> , <i>Cymbopogon citratus</i> e <i>Elyonurus muticus</i>	42
Tabela 6. Potencial antibacteriano dos óleos essenciais para diferentes microrganismos representados em diâmetro e porcentagem da zona de inibição.	45
Tabela 7. Atividade antioxidante e teor de compostos fenólicos dos morangos no período de 15 dias de estocagem (comparativo inicial, dia 3 e dia 15).	49
Tabela 8. Parâmetros do modelo cinético de primeira e segunda ordem para a extração de teor de compostos fenólicos	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	– Ácido 3-ethylbenzthiazoline-6-sulfônico
Cc	– <i>Cymbopogon citratus</i>
Cf	– <i>Cymbopogon flexuosus</i>
ChCl	– Cloreto de colina
[Ch]Cl:AA	– Cloreto de colina e ácido acético
[Ch]Cl:1,2-PDL	– Cloreto de colina e 1,2-propanodiol
[Ch]Cl:Xyl	– Cloreto de colina e xilose
[Ch]Cl:Urea	– Cloreto de colina e ureia
CSLI	– Clinical and Laboratory Standards Institute
DES	– Solventes Eutéticos Profundos (<i>Deep eutetic solvent</i>)
DPPH	– 1,1-difenil-2-picril-hidrazil DNAEE
Em	– <i>Elyonurus muticus</i>
FDA	– <i>Food and Drug Administration</i>
FRAP	– Capacidade Antioxidante de Redução do Ferro (<i>Ferric Reduction Antioxidant Power</i>)
HFIE	– Herbário das Faculdades Integradas Espírita
OE	– Óleo essencial
PCA	– Projetos completamente aleatórios
SISGEN	– Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético
SLE	– Extração sólido-líquido (<i>solid-liquid extraction</i>)
TPTZ	– Tripiridil-s-triazina
UV	– Ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

© - *copyright*

@ - arroba

® - marca registrada

Σ - somatório de números

% - porcentagem ($\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$)

● - radical

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	OBJETIVOS	15
1.1.1	Objetivo geral	15
1.1.2	Objetivos específicos.....	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	PLANTA AROMÁTICA: CAPIM LIMÃO	17
2.1.1	Elyonurus muticus	18
2.1.2	Cymbopogon citratus.....	21
2.1.3	Cymbopogon flexuosus	22
2.2	EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DAS ESPÉCIES DE CAPIM-LIMÃO POR DIFERENTES MÉTODOS E SOLVENTES	23
2.2.1	Solventes eutéticos profundos.....	24
3	MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1.1	Obtenção do material vegetal.....	27
3.1.2	Reagentes	28
3.2	MÉTODOS	29
3.2.1	Secagem	29
3.2.2	Composição físico química.....	29
3.2.3	Extração do OE	29
3.3	CROMATOGRAFIA DO OE	30
3.4	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	30
3.4.1	Método DPPH.....	30
3.4.2	Método ABTS	31
3.4.3	Método FRAP	31
3.4.4	Quelante de ferro.....	32
3.5	COMPOSTOS FENÓLICOS.....	32
3.6	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	33
3.7	EFEITO PRESERVATIVO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS COMO REVESTIMENTO DE SUPERFÍCIE EM MORANGOS	33
3.7.1	Teste de atributos e decaimento fúngico	34
3.8	OBTENÇÃO DOS SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS (DES)	34
3.9	DESIGN EXPERIMENTAL	35

3.10	MODELAGEM MATEMÁTICA DA CINÉTICA DE EXTRAÇÃO.....	36
3.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS	37
4	RESULTADOS.....	39
4.1	CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS	39
4.1.1	Obtenção do óleo essencial	39
4.1.2	Cromatografia gasosa / espectrometria de massa	40
4.1.3	Bioatividade dos óleos essenciais	42
4.1.4	Efeito preservativo dos óleos essenciais em morangos	47
4.1.5	Análise hierárquica de cluster (HCA).....	51
4.2	OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DAS TRÊS ESPÉCIES DE CAPIM-LIMÃO.....	52
4.2.1	Escolha dos melhores solventes	52
4.2.2	Escolha da temperatura ótima de extração	53
4.2.3	Escolha do melhor método extrativo e tempo.....	54
4.2.4	Cinética de extração dos compostos fenólicos.....	57
5	CONCLUSÕES.....	59
5.1	RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	60
	REFERÊNCIAS.....	61
	ANEXO A – CURVA PADRÃO: COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS	72
	ANEXO B – FICHA TESTE MORANGO.....	73
	ANEXO C – FICHA TESTE MORANGO DECAIMENTO FÚNGICO	74
	ANEXO D – CROMATOGRAMAS DAS TRÊS ESPÉCIES VEGETAIS.....	75

1 INTRODUÇÃO

As espécies de capim-limão mais conhecidas e difundidas comercialmente são: *Cymbopogon flexuosus* e *Cymbopogon citratus*, ambas nativas do subcontinente indiano e encontradas em áreas tropicais e subtropicais. O gênero *Cymbopogon* é composto por mais de 55 espécies e pode ser encontrado em diversos países, apresenta aroma cítrico e coloração esverdeada, além de inúmeras denominações informais.

A família *Elyonurus*, composta por gramíneas nativas do Brasil e da América do Sul e apresenta inúmeras denominações informais. A espécie *Elyonurus muticus* (conhecidas como “capim-carona”) é encontrada em regiões de campos abertos onde agricultores costumam criar gado. Esta espécie é descartada, uma vez que confere sabor amargo ao leite quando consumido pelos animais. Assim, os pecuaristas realizam queimas periódicas, considerando esta planta um problema para a criação de gado.

No Brasil o capim-limão é uma das ervas aromáticas mais cultivadas, com o plantio muito disseminado nas regiões sul e sudeste. O Paraná é o maior produtor de plantas aromáticas do país, com uma produção anual de capim-limão superior a 100 toneladas. Quando desidratado é geralmente utilizado para a produção de infusões e *in natura* é utilizado em pratos gastronômicos. Seu óleo essencial tem sido utilizado como aditivo e ingrediente nas indústrias de bebidas e de alimentos, medicamento na indústria farmacêutica e ingrediente na indústria cosmética.

Comparando estudos de óleos essenciais de capim-limão com a espécie *Elyonurus muticus* são observados compostos de interesse similares. Sendo o principal composto de interesse econômico o citral (geranial e neral), constituinte químico visto como aditivo alimentar seguro segundo a *Food and Drug Administration*, demonstrando assim o potencial comercial e de cultivo da espécie até agora considerada como praga e descarte. *E. muticus* conta com alguns estudos desenvolvidos em áreas distintas, porém poucos resultados sobre a sua atividade antimicrobiana, aplicações e capacidade antioxidante, capacidade quelante do seu OE, assim como sobre a otimização do processo extrativo.

Adicionalmente, a hidrodestilação é tradicional e altamente utilizada para extração de OE do capim-limão, porém solventes mais modernos, como os Solventes Eutéticos Profundos (*Deep Eutetic Solvents* - DES) ainda não foram avaliados para

esse fim, sendo essa uma tecnologia inovadora e que apresenta muito espaço para estudo. Os DES são solventes verdes, que começaram a ser estudados na literatura, apresentando baixo custo e toxicidade, alta capacidade de solubilização e simples síntese.

Considerando todo o exposto, este trabalho teve como objetivo comparar as espécies *Cymbopogon flexuosus*, *Cymbopogon citratus* e *Elyonurus muticus* quanto à composição química dos óleos essenciais e às, atividades antioxidante, quelante de ferro e antibacteriana. Objetivos adicionais incluem discutir o potencial de aplicação do OE de *Elyonurus muticus* em relação aos outros dois óleos essenciais de capim-limão cultivados, aplicando-os como revestimento de superfície de morangos, com o intuito de prolongar a vida útil dos mesmos. Como complementação do estudo, otimizou-se a extração destes óleos essenciais, comparando-se a performance dos solventes tradicionais com os DES e a eficiência de diferentes métodos de extração. Por fim, foram determinadas as condições ótimas de extração dos compostos fenólicos das espécies de capim-limão.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Comparar os óleos essenciais obtidos por diferentes métodos de extração das espécies *Elyonurus muticus* (nativa), *Cymbopogon citratus* e *Cymbopogon flexuosus* (cultivadas), suas atividades biológicas *in vitro*, potencial de aplicação em alimentos, além de otimizar a extração com solventes verdes e tradicionais por diferentes métodos.

1.1.2 Objetivos específicos

- Extração dos óleos essenciais por hidrodestilação, agitação eletromagnética, Ultra-Turrax® e ultrassom das três espécies de capim-limão (*Elyonurus muticus*, *Cymbopogon citratus* e *Cymbopogon flexuosus*);
- Identificação dos componentes químicos dos OE por cromatografia gasosa (GC-MS) para comparação das composições dos óleos da espécie nativa e cultivadas de capim-limão;
- Determinação das atividades biológicas *in vitro*, antioxidante e quelante do íon ferro dos OE das espécies *Elyonurus muticus*, *Cymbopogon citratus* e *Cymbopogon flexuosus*;
- Determinação da atividade antimicrobiana das amostras de OE frente aos microrganismos: *Clostridium perfringens* (ATCC® 13124™), *Escherichia coli* (ATCC® 25922™), *Listeria Monocytogenes* (ATCC® 7644™), *Salmonella* sp. (ATCC® 13076™) e *Staphylococcus aureus* (ATCC® 25923™);
- Análise do potencial de aplicação *in vivo* dos OE aplicados sobre a superfície de morangos, avaliando atributos de qualidade global e características fúngicas dos frutos, comparando tempo (dias de armazenamento refrigerado) e concentração de OE aplicado (controle, 250 e 750 µl/L);
- Otimizar a extração sólido-líquido (SLE) dos compostos fenólicos das folhas das espécies *Elyonurus muticus*, *Cymbopogon citratus* e *Cymbopogon flexuosus*. Comparar a hidrodestilação com outras metodologias (agitação eletromagnética, Ultrassom e Ultra-Turrax®), solventes (solventes tradicionais e eutéticos profundos – DES) e condições (temperaturas e tempo).

- Realizar a cinética de extração e modelagem matemática nas melhores condições encontradas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PLANTA AROMÁTICA: CAPIM LIMÃO

Chás e infusões de ervas são algumas das mais tradicionais preparações em alimentos a partir de flores, folhas, sementes e tubérculos frescos ou desidratados, geralmente preparados imersos em água à temperatura de fervura por três a quatro minutos (RORIZ et al., 2015). Na Ásia, plantas são utilizadas na medicina popular desde as primeiras civilizações, pois sabe-se que as plantas contêm diversos constituintes químicos que podem ser usados para o tratamento de inúmeras doenças (SASIDHRAN et al., 2011).

O capim-limão possui compostos voláteis responsáveis por sua fragrância característica, utilizados na indústria de alimentos como flavorizantes de bebidas e confeitaria. Os compostos presentes no capim-limão em quantidades significativas são: geranial, neral, nerol, geraniol, citronelol e outros, os quais apresentam características antioxidantes e antimicrobianas (MACHADO et al., 2015; HAQUE et al., 2018). No capim-limão são encontrados monoterpenos (α -pineno, 3-careno, campheno), monoterpenos oxigenados (geranial, neral, α -ciclocitral) e sesquiterpenos (β -cariofileno) (TONGNUACHAN; BENJAKUL, 2014). A planta tem altura média de um a um e meio metros, podendo chegar a três metros na época de floração, e apresenta folhas lineares, de formato lanceolado, com um a um e meio centímetros de largura (LONKAR et al., 2013).

O estado do Paraná é o maior produtor de plantas aromáticas do Brasil, com destaque para a produção de capim-limão. Na safra de 2017 a colheita totalizou aproximadamente 128 toneladas, ocupando aproximadamente onze acres, distribuídos em oito municípios. O valor bruto da produção agrícola dessa planta totalizou R\$ 240.166,24. Assim, pode-se dizer que o produto é relativamente bem valorizado no estado, mas ainda tem espaço para um aumento da produção (PINTO et al., 2014; SEAB/Paraná, 2017).

Ao redor do mundo o capim-limão é geralmente cultivado em solos inférteis, por oferecer uma fonte lucrativa de ganhos para os produtores, podendo chegar a 300 dólares de lucro por ano em uma plantação de um hectare. As espécies *Cymbopogon flexuosus* e *Cymbopogon citratus* são mais cultivadas nas diferentes localidades do

planeta por apresentarem alto teor do composto citral, 70 a 80%, em seu óleo essencial (HAQUE et al., 2018).

Os óleos essenciais (OE) podem ser obtidos pela técnica de arraste de vapor ou hidrodestilação; Na maior parte das vezes, são compostos de mono, sesquiterpenos e de fenilpropanoides, metabólitos secundários que proporcionam características organolépticas como odor pungente e densidade menor que a da água (BIZZO et al., 2009; STEFANAZZI et al., 2011). Já os extratos vegetais são obtidos através da utilização de solventes, tempos, temperaturas e processos extrativos distintos. O objetivo desses processos, na extração sólido-líquido, é retirar compostos bioativos da célula vegetal para obter elevadas concentrações dos mesmos, os quais anteriormente estavam presentes em pequenas quantidades no interior da célula vegetal (FRAZEN et al., 2018).

2.1.1 *Elyonurus muticus*

O *Elyonurus muticus* (*E. muticus*) popularmente conhecido como capim-carona ou cidreirinha (Figura 1), é encontrado no Brasil e em outras regiões tropicais e subtropicais da América do Sul. A planta tem tamanho aproximado de um metro de altura e cresce em solos pobres e arenosos. Normalmente, é vista como praga pelos produtores de gado, pois tem OE de sabor amargo que acaba sendo transmitido para o leite, desta. Por esta razão, fazendeiros acabam queimando as plantas ainda verdes (HESS et al., 2007; DESCHAMPS et al., 2013).



Figura 1 - Folhas de *Elyonurus muticus*
Fonte: O autor, 2019.

O *E. muticus* tem grande potencial na produção de OE por ser rico no composto citral ($C_6H_{16}O$), possuindo seus dois isômeros, geranial ou *trans* citral ($C_6H_{16}O$), neral ou *cis* citral ($C_6H_{16}O$), além de outros constituintes como: acorenona ($C_{15}H_{24}O$), iso-acronenona ($C_{15}H_{24}O$) e eucalyptol ($C_{10}H_{18}O$), que lhe conferem características antimicrobianas e antioxidantes. O citral é formado por uma mistura de isômeros geométricos (geranial e neral) (Figura 2) responsáveis pelo forte odor cítrico, o que desperta grande interesse industrial no *E. muticus*, por despertar grande interesse de indústrias (FULLER et al., 2010).

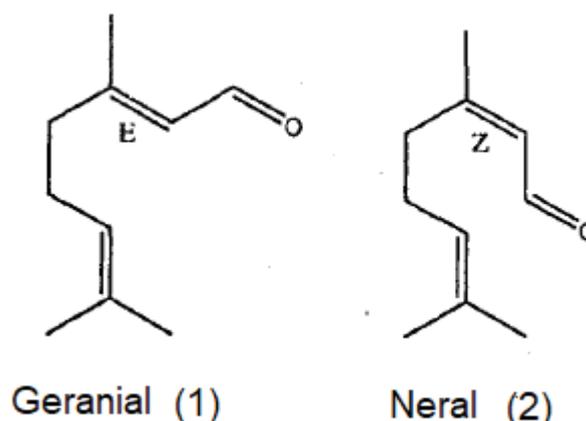


Figura 2 - Isômeros do citral: geranial e neral
 Fonte: Adaptado de Adams, 2007.

Alguns estudos sobre essa espécie são encontrados na bibliografia. Os primeiros estudos iniciaram com Cardoso et al. (2000) e sua equipe avaliando a espécie *E. muticus* no bioma pantanal, segundo o efeito da queima anual dessa espécie na biomassa aérea acumulada de plantas. Os autores concluíram que a queima aumenta a quantidade de biomassa viva e diminui a cobertura do solo, levando de quatro a seis meses para a área queimada se reestabelecer. Scramin et al. (2000) também estudaram a espécie *E. muticus* no bioma pantanal, mas sua pesquisa foca na composição química do óleo através da análise de cromatografia gasosa. Foram encontrados, 52,6% de compostos sesquiterpenos e 17,7% de monoterpenos, mas teve 26,8% de seus compostos não foram identificados.

Hess et al. (2007) realizou o primeiro teste de atividade antimicrobiana com o OE do capim-carona, a partir de material vegetal coletado no pantanal brasileiro. As amostras foram testadas para os microrganismos, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, em diferentes estações do ano. Os resultados indicaram maior inativação microbiana para *B. cereus* e *S. aureus*, com

os OE extraídos de plantas colhidas na primavera. Não houveram diferença entre os óleos essenciais extraídos de diferentes partes da planta, aérea ou subterrânea, para *E. coli* e *S. aureus*. Em sua composição, o óleo apresentou compostos de (E)-cariofileno, 2-ciclogermacreno, espathulenol, óxido cariofileno e outros, além de aproximadamente 30% de outros compostos não identificados. Adicionalmente, Silva et al. (2009) realizaram um estudo parecido sobre composição química e atividade antimicrobiana do OE de *E. muticus*, obtendo como principais componentes geranial e neral. Os autores encontraram uma alta atividade antimicrobiana contra *Candida albicans*, *Micrococcus luteus* e *Rhodococcus equi*, moderada atividade antimicrobiana para *Bacillus subtilis*, e baixa atividade contra *Staphylococcus aureus*.

Füller et al. (2010), grupo de pesquisa que mais publicou sobre essa espécie até o momento, relataram que existe variação de compostos fenólicos entre as amostras analisadas de *E. muticus* coletados de diferentes locais, podendo variar pelo ambiente onde são coletados e genótipo da planta. Os pesquisadores confirmaram, a presença do componente citral e seus isômeros em plantas estudadas no estado do Rio Grande do Sul, devido ao clima frio da região. Posteriormente, Füller et al. (2015), constataram que a espécie apresenta variação genética. Portanto, a variação de compostos químicos entre as plantas dos estudos realizados no Brasil, Argentina e África, pode ser atribuída, ao ecossistema em que a planta está localizada, possibilitando a seleção de plantas com características específicas. Em um estudo mais recente, Füller et al. (2017) estudaram diferentes populações dessa espécie, relatando diferença na composição do OE coletado em diferentes locais.

O estudo realizado por Stefanazzi et al. (2011) na Argentina revelou que o OE de *E. muticus* é constituído majoritariamente por geranial (41,83%) e neral (29%), mas também apresenta quantidades significativas de cariofileno (11,03%), óxido de carofileno (10,6%) e acetato de nerilo (7,6%). Também foi reportada a comparação com o OE de *C. citratus*, que é composto por geranial (45,4%), neral (31,3%), acetato de nerilo (13,6%) e óxido carofileno (9,7%). Ainda na Argentina, Sabini et al. (2006), demonstraram a atividade antifúngica do OE de *E. muticus* contra *Candida* spp., atribuída ao composto geranial presente em concentração de 0,87 mg/mL, que inibiu o crescimento do fungo.

No Zimbábue, estudos têm sido realizados com *E. muticus*, com o intuito de avaliar a concentração de composto fenólicos e da peroxidação de fosfolipídeos em cérebros de ratos (DZINGIRAI et al., 2007). Chagonda et al. (2000) estudaram a

composição do OE de *E. muticus* extraído por hidrodestilação, encontrando os compostos geranial (44,6%) e neral (35,2%) em amostras frescas; geranial (40,1%), neral (26%) e acetado geranil (8,6%) em folhas secas; geranial (29,6%), neral (20,2%) e acetado geranil (18,8%) na parte inferior das folhas secas e geranial (41,9%), neral (28,4%); e acetado geranil (4,6%), na parte superior das folhas secas. A última pesquisa encontrada sobre o estudo do OE dessa espécie foi realizada pelos autores Höfling et al. (2019), que reportaram a ação antifúngica do óleo contra cepas de *Candida spp.* e contra a formação de biofilmes microbianos, em aplicação odontológica.

2.1.2 *Cymbopogon citratus*

O capim-limão *Cymbopogon citratus* (*C. citratus*) pertencente à família Poaceae, é uma planta originária da Índia e encontrada em regiões tropicais e de savana. Assim, é muito cultivada em países como Taiwan, Indonésia, Índia e China (TRAN; NGUYEN, 2018).

No Brasil, é denominado como capim-limão, erva-cidreira e capim-santo, dentre outros nomes. É um produto com grande número de compostos voláteis que são responsáveis pelo odor característico da planta. Além disso, apresenta características antioxidantes e antimicrobiana para alguns microrganismos devido aos componentes geranial (α -citral) e neral (β -citral) que são isômeros do composto citral (MACHADO et al., 2015).

Essa planta faz parte da família das gramíneas, contendo de 1 a 2% de OE em matéria seca, e possui forte odor de limão pelo seu alto teor de citral. Além do mais, o citral é reconhecido como um aditivo alimentar seguro e aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*). Seu uso como flavorizante em alimentos é reconhecido pela Comissão Europeia por não apresentar riscos à saúde (AJAYI et al., 2016).

Essa é a espécie com maior número de publicações encontrada por ser globalmente disseminada, encontrando-se estudos de diferentes tipos de extração: hidrodestilação (BASSOLE et al., 2011; LERMEN et al., 2015; STOICA et al., 2019), micro-ondas (AJAYI et al., 2016), e CO₂ supercrítico (MARONGIU et al., 2006). Também são encontrados muitos estudos sobre a composição química (BASSOLE et al., 2011; LERMEN et al., 2015; HADJILOUKA et al., 2017; AL NAQQASH et al., 2019),

atividade antioxidante (BALAKRISHNAN et al., 2014; COSTA et al., 2016; STOICA et al., 2019), atividade antimicrobiana (GUIMARÃES et al., 2011; MACHADO et al., 2015; HADJILOUKA et al., 2017), atividade fitoquímica e farmacológica (OLADEJI et al., 2019) e aplicações domésticas ou industriais em alimentos e bebidas, produtos cárneos, embalagens, flavorizantes e outros (EKPENYONG; AKPAN, 2017; FAROOQ; SEHGAL, 2019; DE LIMA et al., 2019).

2.1.3 *Cymbopogon flexuosus*

A espécie *Cymbopogon flexuosus* é um capim perene pertencente à família *Graminaceae*, utilizado na medicina não convencional na Índia, para a cura de enfermidades. A planta é encontrada no leste da Índia e contém quantidade significativa de OE (LONKAR et al., 2013), o qual é composto de monoterpenos, citral (geranial e neral), geraniol, citronelol, linalol, acetato de geranil e outros (GUPTA et al., 2016).

Por se assemelhar muito à espécie *C. citratus*, o capim *C. flexuosus* vem sendo estudados por diversos pesquisadores em relação: à extração do OE com utilização ou não de pré tratamentos das folhas (PARIKH; DESAI, 2011; IDREES et al., 2015; BALTI et al., 2018), composição química da espécie (SILVEIRA et al., 2012; AVOSEH et al., 2015; WIFEK et al., 2016; VERMA et al., 2019), atividade antioxidante (FAROOQ; SEHGAL, 2019), atividade antimicrobiana (DE CORATO et al., 2010; SILVEIRA et al., 2012; GANJEWALA; GUPTA, 2013; AHMAD; VILJOEN, 2015; ADUKWU et al., 2016) e aplicação em alimentos, cosméticos, uso terapêutico e agricultura (HAQUE et al., 2018).

O citral, o principal e mais estudado composto dos óleos essenciais dessa espécie de capim-limão, é um monoterpeno formado pela mistura isomérica dos aldeídos, geranial e neral. Essa junção de compostos pode ser parcialmente hidrogenada para formar compostos alcoólicos usados nas indústrias de fragrâncias e aromas (BAILO-GARCIA et al., 2013). Uma aplicação é a encapsulação do citral com um agente encapsulante (MASWAL; DAR, 2013). O citral também pode ser convertido para o composto β -ionona, que é base para a produção de todas as sínteses industriais de vitamina A (PARKER et al., 2016). E já foi visto em estudo o efeito anticâncer do citral contra tumores de próstata em ratos e *in vitro* pode induzir

a apoptose de células de câncer de mama e leucemia (CHHIKARA et al., 2018), indicando fins farmacêuticos e médicos.

2.2 EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DAS ESPÉCIES DE CAPIM-LIMÃO POR DIFERENTES MÉTODOS E SOLVENTES

Existem alguns métodos tradicionais para a extração de óleos essenciais, como a extração por arraste de vapor e hidrodestilação, as quais podem ser assistidas por outros métodos. Boeira et al. (2018) realizaram o estudo da extração de compostos bioativos do capim-limão (*C. citratus*), atividade antioxidante e atividade antimicrobiana em linguiça frescal de frango, e concluíram que o extrato hidroalcolólico de capim-limão, possui altos níveis de antioxidantes se extraído a 60°C com etanol 70% na proporção 1:10 (w/v). Adicionalmente, uma porcentagem de 1% do extrato conseguiu manter o caldo de frango estável por até 21 dias de armazenamento.

Alguns processos extrativos e diferentes tipos de solventes já foram empregados e avaliados em estudos e são relatados nos parágrafos a seguir. Marongiu et al. (2006) realizaram um estudo comparativo da obtenção de OE de *C. citratus*, utilizando métodos convencionais (hidrodestilação e por arraste de vapor) e por CO₂ supercrítico. Os produtos obtidos pelo processo de hidrodestilação (teor de citral 73%) e do extrato com CO₂ supercrítico (teor de citral 68,7%) com melhor desempenho (90 bar e 50°C) apresentaram valores similares para composição e teor de citral.

Nur Ain et al. (2013) investigaram a extração de óleo resina da espécie *C. citratus* por extração com líquido pressurizado e solvente n-hexano. Os autores obtiveram máxima de extração do composto citral na temperatura de 167°C, pressão de 1203 psi e tempo estático de 20,43 minutos. Desai et al. (2013) otimizaram e modelaram o processo de extração de OE de *C. flexuosus*. O grupo encontrou a taxa de extração constante do processo, com o auxílio do método Taguchi e encontraram uma condição ótima de extração de 1:14 (material/solvente). Constataram também que a grande maioria dos compostos encontrados no OE são compostos oxigenados, incluindo o citral.

Balti et al. (2018) estudaram a influência da temperatura de secagem do capim-limão (*C. flexuosus*) e a utilização de um pré-tratamento ultrassônico para o

processo de hidrodestilação, para a maximização do processo. Constataram que a temperatura ideal de secagem foi de 50°C, com uma velocidade do ar de 1 m/s, e que o pré-tratamento ultrassônico apresenta melhores resultados na quantidade e qualidade do citral presente no OE que se comparado a extração convencional sem a utilização desse pré tratamento.

A hidrodestilação é um método muito empregado para a extração de óleos essenciais, em que o processo extrativo ocorre pelo aquecimento do material vegetal utilizando água como solvente, fazendo com que o OE contido no vegetal evapore junto com o solvente e posteriormente seja condensado (GAVAHIAN; FARAHNAKY, 2018). O grande número de espécies de capim limão do gênero *Cymbopogon* (aproximadamente 55) e a variação atribuída à genética, local e solo do cultivo, resulta em uma vasta quantidade de compostos químicos nos seus OEs. Com rendimento de óleo de 1 a 2%, foram observados maiores rendimentos utilizando secagem das folhas em estufa, em comparação à secagem solar ou na sombra (HAQUE et al., 2018). No entanto, existem diversos métodos e solventes que ainda podem ser estudados para extração de compostos bioativos das inúmeras espécies de capim-limão, como por exemplo os solventes eutéticos profundos (*deep eutectic solvents*, DES), a extração por agitação magnética em célula, ultrassom e Ultra-Turrax®. Estas variáveis, ainda não foram avaliadas em capim-limão.

2.2.1 Solventes eutéticos profundos

Com a crescente procura dos consumidores por produtos naturais e mais sustentáveis, os solventes eutéticos profundos (DES), estão sendo cada vez mais estudados como alternativa aos solventes convencionais. São assim denominados devido ao abaixamento do ponto de fusão da mistura em relação ao ponto de fusão da solução ao serem formados (MARTINS et al., 2018).

As principais vantagens da utilização dos DES como solventes, são: baixo custo e baixa toxicidade, alta capacidade de solubilização e síntese simples. Estes solventes são produzidos por pelo menos dois compostos químicos, sendo um deles doador de hidrogênio (HBD) e o outro receptor de hidrogênio (HBA) (DAI et al., 2013). Geralmente os sais quaternários de amônio são utilizados como receptores de hidrogênio e como doadores de hidrogênio são usualmente empregados amidas, aminas, álcoois e ácidos carboxílicos (RUEDAS-RAMÓN et al., 2017).

Para este trabalho foi realizado um estudo comparativo entre solventes: quatro tradicionais (metanol, etanol, acetona e água) e quatro DES (1:2 cloreto de colina / 1,2-Propanodiol, 1:2 cloreto de colina / ureia, 1:2 cloreto de colina / ácido acético e 2:1 cloreto de colina / xilitol), métodos extrativos diferentes (célula de duas fases, Ultra-Turrax® e ultrassom) e duas temperaturas (45 e 60°C).

2.2.1.1 Vantagens e desvantagens dos solventes comparados

Na Tabela 1 são apresentadas vantagens e desvantagens dos quatro solventes convencionais (água, acetona, metanol e etanol) e dos quatro solventes eutéticos profundos (ChCl:1,2 propanodiol, ChCl:Uréia, ChCl: Ác. Acético, ChCl:Xilose) testados.

Tabela 1. Vantagens e desvantagens de solventes convencionais e dos solventes eutéticos profundos

Solvente	Vantagem	Desvantagem	Referências
Água	Sem impacto ambiental, polar, preço, não apresenta periculosidade e toxicidade.	Incompatibilidade ou insolubilidade, temperatura de reação relativamente alta.	Da Silva; Jones (2001)
Acetona	Doadores de ligação de hidrogênio.	Inflamável, forte odor e sabor, tóxica.	Reichardt (2003); Vellasco Júnior (2011)
Metanol	Odor suave, proveniente de fonte renovável, baixa temperatura de ebulição.	Alta toxicidade, geralmente importado.	Galvão et al. (2013); Nogueira et al. (2018)
Etanol	Baixa toxicidade, proveniente de fonte renovável, biodegradável.	Temperatura de reação relativamente alta, preço elevado.	Galvão et al. (2013); Nogueira et al. (2018)
ChCl:1,2 propanodiol	Baixo custo e impacto ambiental, alta condutividade em 30°C, baixa toxicidade.	Alta viscosidade.	Abbott et al. (2003); Dai et al. (2013); Longo; Craveiro (2018)
ChCl:Uréia	Baixo custo e impacto ambiental, Alta solubilidade para sais inorgânicos, alta condutividade em 30°C, baixa toxicidade.	Alta viscosidade a baixas temperaturas, Temperatura de congelamento de 12°C.	Abbott et al. (2003); Abbott et al. (2004); Dai et al. (2013); Longo; Craveiro (2018)
ChCl: Ác. acético	Baixo custo e impacto ambiental,	Alta viscosidade.	Abbott et al. (2003); Dai et al. (2013);

Solvente	Vantagem	Desvantagem	Referências
ChCl:Xilose	alta condutividade em 30°C, baixa toxicidade.		Longo; Craveiro (2018)
	Baixo custo e impacto ambiental, alta condutividade em 30°C, baixa toxicidade.	Alta viscosidade.	Abbott et al. (2003); Dai et al. (2013); Longo; Craveiro (2018)

2.2.1.2 Agitação eletro magnética em célula, ultrassom e Ultra-Turrax® como métodos extrativos

A agitação eletro magnética é um processo muito utilizado na extração sólido-líquido (SLE) (FARIAS et al., 2018), embora outros processos extrativos também podem ser empregados, como o Ultra-Turrax® e a extração sólido-líquido assistido por ultrassom (UA-SLE). Essas duas estratégias são empregadas geralmente em SLE, para aumentar a eficiência de extração.

O Ultra-Turrax® é um equipamento que realiza homogeneização de alta velocidade ao promover elevadas forças de cisalhamento e impulso. Com a agitação em alta velocidade aumenta o processo de transferência de massa, pode ser adequada para extrair biocompostos em matrizes alimentares, apresentando maior eficiência na obtenção de compostos bioativos, conforme relatado em bibliografia (XU et al., 2016).

O UA-SLE é baseado em cavitações acústicas produzidas pelo equipamento que causam forças de cisalhamento nos metabólitos da matriz, promovendo modificações mecânicas e físicas na amostra (CHEMAT et al., 2017). Como o emprego do ultrassom diminui o tempo de extração e o consumo de solvente com maior recuperação de compostos bioativos, este método tem sido utilizado em diferentes matrizes alimentares (GOLTZ et al., 2018; MENG et al., 2018; ALI et al., 2019). Devido às suas características individuais, vale estudar e comparar os métodos, que podem garantir extrações mais eficientes dependendo da matriz alimentícia investigada.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi realizado nos laboratórios do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos (PPGEAL) da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Centro Politécnico, em específico o Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LABTECAL) e o Laboratório de Termodinâmica e Operações de Separação (LATOS), Usina B, na cidade de Curitiba - Paraná. A obtenção dos óleos essenciais ocorreu no Laboratório de Ecofisiologia, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitaríssimo, no setor de Ciências Agrárias da UFPR, e nos laboratórios do programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento Territorial Sustentável, na UFPR litoral em Matinhos. A Figura 3 demonstra o fluxograma esquemático do desenvolvimento do projeto.

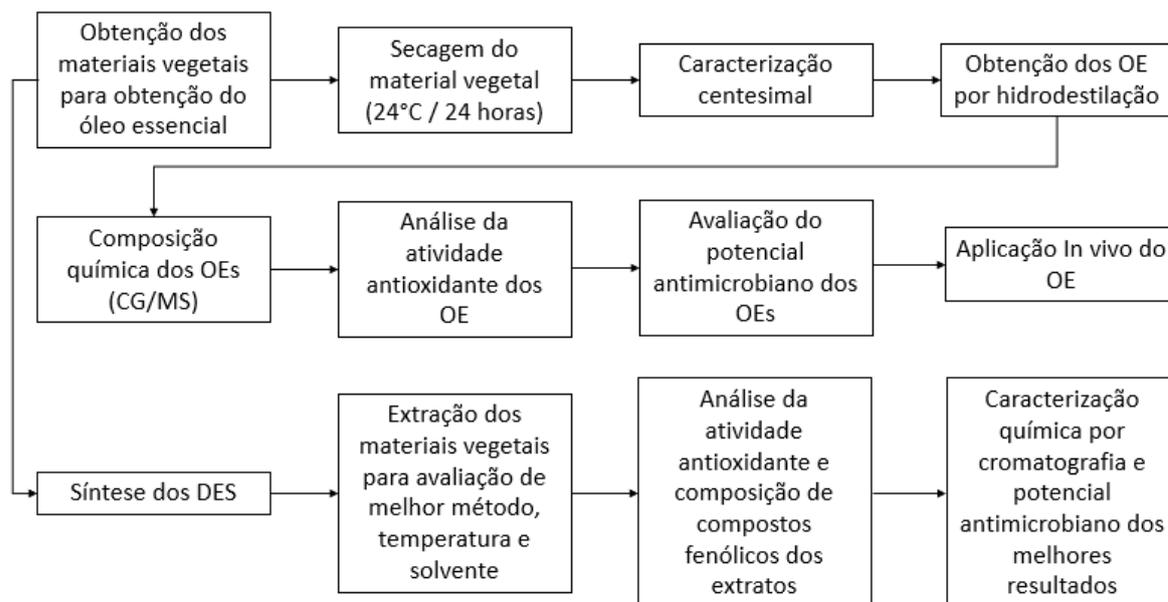


Figura 3 - Fluxograma esquemático do desenvolvimento do trabalho.

Fonte: O autor, 2020

3.1.1 Obtenção do material vegetal

A espécie nativa *Elyonurus muticus*, foi coletada em uma área natural dos Campos Gerais no município de Palmeiras – PR, no dia 08 de março de 2019, com a seguinte localização 25° 20.735' S; 049° 49.422' W. As espécies exóticas cultivadas *Cymbopogon citratus*, *Elyonurus muticus* e *Cymbopogon flexuosus*, foram coletadas na bio estação Gaia em Piraquara – PR no dia 13 de março de 2019, com a localização 25° 50' 705" S, 49° 003' 681" W, todas as espécies foram coletadas no fim do verão.

As espécies foram fotografadas e exsiccadas para herborização e identificação (IBGE, 1992; LAWRENCE, 1951). Também foram encaminhadas aos herbários e tombadas. A espécie *Elyonurus muticus* foi tombada no Herbário HFIE em Curitiba sob o número (HFIE 8.558), a espécie *Cymbopogon citratus* foi tombada no Herbário do Museu Botânico de Curitiba, sob o número MBM 389414 e a espécie *Cymbopogon flexuosus* tombada no Herbário Royal Botanic Gardens, Kew sob o número H2014/02284. O projeto foi cadastrado no SISGEN sob referência AA8CDD9.

Os morangos orgânicos (*Fragaria spp.*) foram adquiridos na região rural do município de São José dos Pinhais, Paraná, Brasil (25 ° 60.539 " S; 49 ° 24.805 'W). Os frutos foram colhidos com mesmas características de maturação, cor, forma e tamanho. No estudo, foram utilizados 60 gramas de frutos para cada experimento, armazenados sob refrigeração (5 ± 2°C) até o momento da análise.

3.1.2 Reagentes

Os reagentes que foram utilizados nas etapas posteriores do projeto são de alto grau de pureza, com o objetivo de alcançar resultados precisos e confiáveis. Os solventes, reagentes e padrões utilizados foram: Metanol, Etanol grau HPLC, Ácido 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) ABTS 98% (C₁₈H₁₈N₄O₆S₄) Sigma-Aldrich®, 2,2-difenil-1-picril-hidrazil DPPH C₁₈H₁₂N₅O₆ Sigma-Aldrich®, etanol absoluto (C₂H₆O) BIOTEC®, Persulfato de potássio (K₂S₂O₈) Synth®, Trolox Acros Organics®, Carbonato de sódio (Na₂CO₃) Vetec®, Reagente Folin-Ciocalteu Sigma-Aldrich®, ácido gálico 99,98% Neon®, Ágar Mueller-Hinton KASVI®, Caldo Mueller-Hinton Biobrás®, Cloranfenicol Colgate®, Cloreto de cálcio Alphatec®, Ácido etilenodiamina tetra acético EDTA (C₁₀H₁₆N₂O₈) Biotec®, Ferrozina (C₂₀H₁₂N₄Na₂O₆S₂) Sigma-Aldrich®, Tween 80, TPTZ 98% Sigma-Aldrich®, 1,2-Propanodiol 99,5% Sigma-Aldrich®, Ureia 99% Panreac, Xilose 99% Dinâmica, Ácido acético glacial 99,8% Neon®, Áloreto de colina 98% Inlab.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 *Secagem*

Após a coleta o material vegetal foi transportado até o Laboratório de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Paraná (UFPR), onde foi realizada a secagem das folhas em secador com circulação de ar forçada (FABBE®) a uma temperatura de 45° C por 24 h. Após a secagem o material foi embalado a vácuo e armazenado em temperatura ambiente abrigado da luz para análises posteriores (BABU et al., 2018).

3.2.2 *Composição físico química*

A caracterização química das três plantas foi acessada através da análise fundamental, segundo a Association of Official Analysis Chemists International (AOAC) (2000), para umidade (AOAC 930.15), cinzas (AOAC 930.05), proteínas (AOAC 977.02), fibras (AOAC 991.42) e lipídios (Soxlet - 1879), todas com cinco repetições (n = 5). O teor de carboidratos foi obtido por diferença (sem contar as fibras já determinadas).

3.2.3 *Extração do OE*

As folhas das espécies foram transportadas até o Laboratório de Ecofisiologia, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo da UFPR, Curitiba, PR, para a extração do OE por meio de hidrodestilação. O processo foi realizado durante 2,5 h em aparelho graduado tipo Clevenger utilizando-se 50 gramas de folhas secas, em 1L de água destilada, com três repetições (WASICKY, 1963). Para determinação do teor de umidade das folhas no momento da extração foram coletadas amostras de cinco gramas em triplicata, submetidas à secagem em secador elétrico modelo FANEM - Mod. 320 SE com circulação de ar, a 65°C até massa constante.

Após a extração, as amostras foram coletadas com pipeta de precisão, acondicionadas em micro tubos de 2 mL, centrifugadas a 5.000 rpm por 2 minutos, para separar o resíduo de água das amostras. Também se determinou em balança analítica de precisão ($\pm 0,0001$ g) a massa total do OE para o cálculo do rendimento (Eq. 1).

$$\text{Rendimento do óleo essencial (\%)} = \left(\frac{\text{massa de óleo essencial (g)}}{\text{massa de folhas secas (g)}} \right) \times 100 \quad \text{Eq. (1)}$$

3.3 CROMATOGRAFIA DO OE

A identificação dos constituintes químicos do OE foi realizada por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/MS). Os óleos essenciais foram diluídos em diclorometano na proporção de 1 % e 1,0 µL da solução que será injetada, com divisão de fluxo de 1:20 em um cromatógrafo Agilent® 6890 (Palo Alto, CA) acoplado a detector seletivo de massas Agilent 5973N. O injetor foi mantido a 250 °C. A separação dos constituintes foi obtida em coluna capilar HP-5MS (5%-fenil-95%-dimetilpolissiloxano, 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) utilizando hélio como gás carreador (1,0 mL/min). A temperatura do forno foi programada de 60 a 240 °C a uma taxa de 3 °C/min. O detector de massas foi operado no modo ionização eletrônica (70 eV), a uma taxa de 3,15 varreduras/s e faixa de massas de 40 a 450 u. A linha de transferência foi mantida a 260 °C, a fonte de íons a 230 °C e o analisador (quádrupolo) a 150 °C.

Para a quantificação, as amostras diluídas foram injetadas em cromatógrafo Agilent® 7890A equipado com detector de ionização por chama (DIC), operado a 280 °C. Foram empregadas as mesmas colunas e condições analíticas descritas acima, exceto pelo gás carreador usado, hidrogênio, a uma vazão de 1,5 mL/min. A composição percentual foi obtida pela integração eletrônica do sinal do DIC pela divisão da área de cada componente pela área total (área %).

A identificação dos constituintes químicos foi obtida por comparação de seus espectros de massas com aqueles das espectrotecas (MCLAFFERTY et al. ,1994; LINSTROM; MALLARD, 2019) e por seus índices de retenção linear, calculados a partir da injeção de uma série homóloga de hidrocarbonetos (C₇-C₂₆) e comparados com dados da literatura (ADAMS, 2007).

3.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

3.4.1 Método DPPH

A análise de atividade antioxidante foi baseada na captura do radical 1,1-difenil-2-picril hidrazil (DPPH) em 515 nm segundo Cansian et al. (2010). A técnica

consiste em incubar 500 µL de uma solução etanoica de DPPH 0,1 mM com 500 µL de soluções contendo concentrações crescentes da amostra (1:25; 1:50; 1:75; 1:100; 1:125) em etanol por 10 minutos. A solução controle foi preparada da mesma forma, mas substituindo 500 µL da amostra em 500 µL de solvente etanol. Para a solução “branco” foi utilizado somente etanol. No espectrofotômetro (Shimadzu® 1800) as amostras foram analisadas em triplicata e em comprimento de onda 515 nm, determinando a absorbância das amostras e a faixa de concentração ideal. Com os dados das concentrações foi construída uma curva de calibração para determinação da concentração inicial do radical DPPH por meio da equação da reta. A atividade oxidante DPPH foi definida pela concentração de antioxidante necessária para que ocorra inibição de 50% na concentração do radical DPPH. As porcentagens de inibição para as atividades antioxidantes foram calculadas pela Equação 2.

$$\% \text{ inibição} = 100x \left(\frac{\text{Abs. da amostra}}{\text{Abs. do branco}} \right) \quad \text{Eq. (2)}$$

3.4.2 Método ABTS

Outra análise antioxidante realizada é a captura do radical 2,2-azinobis 3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS), descrito por Okoh et al. (2014). Iniciou-se com a preparação da solução com ABTS 7mM e persulfato de potássio (ABTS⁺) a 2,45 mM, reservando a solução em local protegido da luz e em repouso por 12 a 16 h. Posteriormente essa solução agora denominada de ABTS^{•+} foi diluída em etanol a 80% até obter-se uma absorbância de 0,70 (± 0,02) a 734 nm. Desta maneira, a solução ABTS^{•+} foi adicionada a cada amostra sob diferentes concentrações (1:25; 1:50; 1:75; 1:100; 1:125). As misturas foram deixadas em repouso por 6 minutos, sendo realizado a leitura em espectrofotômetro na absorbância de 734 nm, utilizando etanol como branco. As amostras de Trolox foram usadas como padrões. A porcentagem de inibição de 50% do radical foi calculada como na Eq. 2.

3.4.3 Método FRAP

O ensaio FRAP foi baseado na reação com a solução FeCl₃.6H₂O em água destilada (a concentração final de Fe (III) foi 20 mM), TPTZ em 40 mM HCl (concentração final de TPTZ foi 10 mM) e 0,3 M CH₃COOH / Solução tampão

CH₃COONa a pH = 3,6 (OLSZOWY; DAWIDOWICZ, 2016). O reagente FRAP foi preparado com a mistura (razão de volume 10:1:1) de um tampão de ácido acético, solução de TPTZ e solução de teste de FRAP.

Para a análise, 2,9 cm³ de reagente FRAP foram misturados com 100 mm³ de amostra diluída em concentração específica (1:25; 1:50; 1:75; 1:100; 1:125). A mistura foi homogeneizada e deixada no escuro a 37 °C por 30 minutos. Em seguida, absorvância das amostras a 593 nm foram lidas em um espectrofotômetro. A amostra de controle foi lida com a mistura de reagente FRAP e MeOH. A porcentagem de inibição de 50% do radical foi calculada conforme Eq. 2.

3.4.4 Quelante de ferro

A atividade quelante dos íons Fe²⁺ foi determinada de acordo com Singh et al. (2014) com pequenas modificações. As amostras foram diluídas em etanol absoluto (2 mL total) e adicionadas de 0,2 mL de sulfato de amônio ferroso Fe(NH₄)₂SO₄ (2 mmol), 0,4 mL de ferrozina (5 mmol) e etanol completando 10 mL. A solução foi incubada por 30 minutos após o sulfato e a leitura foi realizada 10 minutos após a adição de ferrozina, em um espectrofotômetro com comprimento de onda de 562 nm. A atividade quelante de Fe²⁺ em porcentagem foi calculada pela Equação 3:

$$\text{Capacidade quelante de Fe}^{2+}(\%) = \left[\left(\frac{\text{Abs}_{\text{Control}} - \text{Abs}_{\text{sample}}}{\text{Abs}_{\text{Control}}} \right) \right] \times 100 \quad \text{Eq. (3)}$$

Para traçar a curva padrão, foram utilizadas diferentes concentrações de EDTA (0,1 - 0,0125 mg/mL).

3.5 COMPOSTOS FENÓLICOS

A análise do teor de compostos fenólicos totais foi baseada na metodologia de Folin-Ciocalteu (SINEIRO et al., 1996; ABRAMOVIC et al., 2017). A curva padrão do ácido gálico foi preparada com uma solução estoque de 0,005 µM/mL de ácido gálico em água destilada. Foram diluídas alíquotas da solução estoque para frações de 0, 50, 100, 150, 200, 250, 350 e 500 µM/mL em balões volumétricos de 100 mL. A reação de oxidação ocorreu em balões volumétricos de 10 mL, transferidos para 100 µL para cada uma das concentrações, 2 mL de água destilada e 0,5 mL do reativo de

Folin-Ciocalteu. Entre o intervalo de 30 segundos e 8 minutos, da adição do reativo, foi adicionado 1,5 mL da solução aquosa de carbonato de sódio a 20% (m/v).

Os balões de 10 mL foram completados com água destilada, homogeneizados e mantidos ao abrigo da luz por 2 h. A medição da absorbância foi medida em espectrofotômetro a 765 nm. O branco foi medido com água destilada. A curva padrão (anexo A) do ácido gálico foi gerada a partir de um gráfico de absorbância versus concentração de ácido gálico ($\mu\text{M/mL}$).

3.6 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A atividade antibacteriana foi realizada usando a técnica tradicional de disco de difusão, de acordo com a metodologia M02-A12 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (The Clinical and Laboratory Standards Institute, 2016). As cepas de bactérias utilizadas para análise foram: *Clostridium perfringens* (ATCC® 13124™), *Escherichia coli* (ATCC® 25922™), *Listeria monocytogenes* (ATCC® 7644™), *Salmonella sp.* (ATCC® 13076™) e *Staphylococcus aureus* (ATCC® 25923™). As bactérias foram reativadas em caldo Mueller-Hinton (Kasvi ©) e semeadas em ágar Mueller-Hinton (Kasvi ©). Posteriormente, foram transferidos para solução salina (0,85%) até a concentração de 10^8 UFC/mL, equivalente à turbidez da solução padrão McFarland (bioMérieux ©) de 0,5 (transmitância de 80%). Amostras diluídas dos óleos essenciais (1:2 para *Listeria monocytogenes* e 1:1 para os demais microrganismos) foram incorporadas (10 μL) nos discos brancos estéreis (Laborclin ©) e depositadas em ágar Mueller-Hinton (25 mL) solidificadas e inoculadas com os microrganismos (10^8 UFC/mL). Como controle positivo, foram utilizados discos de cloranfenicol de 30 μg (Laborclin ©) e como controle negativo, etanol absoluto. As placas foram incubadas invertidas a 37 °C por 24 h. A determinação da inibição do crescimento microbiano foi feita medindo os halos inibitórios, em milímetros, com um paquímetro digital.

3.7 EFEITO PRESERVATIVO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS COMO REVESTIMENTO DE SUPERFÍCIE EM MORANGOS

Um delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC) variando com o tempo foi aplicado para verificar o efeito conservante dos três óleos essenciais no armazenamento de morangos. Foram aplicados dois tratamentos para cada amostra

de 60 gramas de morangos variando OE (*C. flexuosus*, *C. citratus* e *E. muticus*) e concentração (0,250 e 0,750 $\mu\text{L/L}$).

As soluções de imersão foram preparadas com água destilada e *Tween 80* (0,5% v/v), posteriormente homogeneizadas até completa solubilização. Sessenta gramas de frutos foram imersos nas respectivas soluções por 3 min. Em seguida, as amostras foram armazenadas em recipientes esterilizados, cobertas com filme plástico, e mantidas sob refrigeração ($5 \pm 2^\circ\text{C}$) e umidade relativa de 90-95% (ISHKEH et al., 2019).

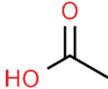
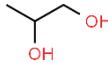
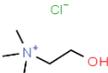
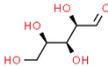
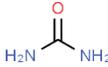
3.7.1 Teste de atributos e decaimento fúngico

Baseado em Ishkeh et al., (2019) dez avaliadores treinados realizaram a avaliação dos testes. Os participantes deram notas para a qualidade global, considerando atributos: odor, cor/aparência e potencial de compra. Os morangos foram avaliados nos dias 0, 3, 6, 9, 12 e 15 de armazenamento. A escala utilizada na avaliação foi 1-2 = excelente, 3-4 = boa (até 5% de superfície afetada), 5-6 = aceitável (5-20% de superfície afetada), 7-8 = ruim (20-50 % de superfície afetada) e 9-10 = inaceitável (> 50% de superfície afetada), segundo o anexo B. Os mesmos avaliadores acessaram visualmente os frutos quanto à deterioração por fungos, aplicando notas de 1 a 10 do ponto de vista da deterioração: 1-2 = excelente (sem deterioração), 3-4 = bom (até 5% de deterioração), 5-6 = aceitável (5-20 % de deterioração), 7-8 = ruim (20-50% de deterioração) e 9-10 = inaceitável (até 50% da deterioração), segundo o anexo C.

3.8 OBTENÇÃO DOS SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS (DES)

Os DES foram obtidos pelo método de aquecimento suave com agitação (DAI et al., 2014). Para isso, o receptor de hidrogênio (HBA) e o doador de ligação de hidrogênio (HBD) de cada DES avaliado foram devidamente pesados em balança analítica (AUX320, Shimadzu). Na sequência, as misturas foram adicionadas a um banho de temperatura controlada (Dubnoff 304-TPA, Única Científica), com agitação, a 60°C , até a obtenção de soluções límpidas. Todos os DES avaliados estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. DES: receptor da ligação de hidrogênio, doador da ligação de hidrogênio, logaritmo da partição octanol-água, fração molar do DES e abreviação utilizada no trabalho

Receptor da ligação de hidrogênio (HBA)	Doador da ligação de hidrogênio (HBD)	Fração molar (HBA:HBD)	Abreviação
	Ácido acético		
		1:2	[Ch]Cl:AA
	1,2-Propanodiol		
Cloreto de colina		1:2	[Ch]Cl:1,2-PDL
 (Log K _{ow} : -5,16)	Xilose		
		2:1	[Ch]Cl:Xyl
	Ureia		
		1:2	[Ch]Cl:Urea

3.9 DESIGN EXPERIMENTAL

O design experimental dividiu a otimização das condições de extração das três espécies em três designs completamente aleatórios. O primeiro design teve como objetivo a seleção de solventes, com uma temperatura e processo extrativo para oito níveis (solventes: acetona, metanol, etanol, água, [Ch]Cl:1,2-PDL (1:2), [Ch]Cl:Urea (1:2), [Ch]Cl:AA (1:2) e [Ch]Cl:Xyl (1:2)). Nesta primeira etapa, as extrações foram realizadas em o método de agitação magnética, com uma célula de vidro revestida, a 45 °C / 2 h. O processo foi aplicado às três espécies de capim-limão, em triplicata, totalizando 72 amostras. A análise de antioxidantes (DPPH e FRAP) e o conteúdo fenólico total foram utilizados para selecionar os solventes ideais.

Devido à alta viscosidade dos solventes, uma temperatura superior foi testada. Posteriormente, um segundo design foi aplicado com dois tratamentos, solvente em três níveis e temperatura em dois níveis (45 e 60 °C). Nesta etapa, as extrações também foram realizadas mediante agitação magnética, com uma célula de vidro

revestida, por 2 h. As três variedades de capim-limão foram submetidas às mesmas análises acima mencionadas, gerando 52 amostras. A temperatura ideal de extração foi estabelecida a partir do resultado das análises.

Para a realização da cinética de extração de fenólicos, um terceiro e final design experimental foi aplicado com dois solventes em dois níveis e método em três níveis (agitação magnética, Ultra-Turrax® e Ultrassom), variando com o tempo. As condições foram 60 °C e tempos de retirada da amostra: 3 h na célula encamisada com agitação magnética (intervalo de amostragem de 30 min), 15 min no Ultra-Turrax® (intervalo de amostragem de 3 min; velocidade de 13.000 rpm) e 3 h no ultrassom (intervalo de amostragem de 30 min). As mesmas análises acima mencionadas juntamente com a análise estatística dos resultados, foram utilizadas como base para a determinação das condições ideais de tempo e solvente para cada capim-limão estudado, reunindo mais 102 amostras para as três espécies.

3.10 MODELAGEM MATEMÁTICA DA CINÉTICA DE EXTRAÇÃO

Com os resultados de teor de compostos fenólicos obtidos nas análises do design experimental para o melhor solvente, temperatura e método extrativo foram empregados modelos matemáticos para se descrever a cinética de extração do teor de compostos fenólicos. Os modelos escolhidos foram da Lei da potência que são utilizados tanto para processos de adsorção quanto de extração (MAN et al., 2012). Os cálculos foram realizados no software Microsoft® Excel.

A lei da potência é representada pela relação do tipo $Y = k X^n$, sendo X e Y as variáveis, k a constante e n o expoente da lei da potência, como demonstrado na Equação 4.

$$\frac{dC}{dt} = k(\Delta C)^n = k(C_{inf} - C)^n \quad \text{Eq. (4)}$$

sendo k a constante da taxa de extração (g/g.min), C_{inf} a concentração de soluto no equilíbrio (g/g), C a concentração de soluto na solução em dado tempo e n a ordem da equação.

Foi empregado o modelo de primeira ordem, onde foi considerado inicialmente ($t=0$) uma concentração de compostos fenólicos $C=0$, e uma concentração $C=C$ para $t > 0$, conforme a Equação 5.

$$C = C_{inf} (1 - \exp^{-kt}) \quad \text{Eq. (5)}$$

O modelo de segunda ordem também foi empregado para a avaliação, utilizando as condições de contorno em $t = 0$ com $C = 0$, e em $t > 0$ com $C = C$, gerando a Equação 6.

$$C = \frac{t}{\frac{1}{kC_{inf}^2} + \frac{t}{C_{inf}}} \quad \text{Eq. (6)}$$

Outro modelo de cinética de segunda ordem também foi empregado, sendo geralmente utilizado na quantificação de taxa de extração de antioxidantes (QU et al., 2010), utilizando as condições de contorno em $t = 0$ com t e $C = 0$ a C , como na Equação 7.

$$C = \frac{((C_e)^2 * kt)}{(1 + (C_e * kt))} \quad \text{Eq. (7)}$$

sendo k a constante da taxa de extração (L/g.min), C_e a concentração de equilíbrio do teor de fenólicos totais (g/L) e C é a concentração total do teor de fenólicos totais a um determinado tempo de extração (g/L).

A validação do ajuste dos modelos cinéticos foi realizada pelo cálculo do desvio relativo médio absoluto (DA) (Equação 8) e pelo desvio quadrático médio (DQM) (Equação 9), conforme descrito a seguir.

$$DA (\%) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{(C_{exp} - C_m)}{(C_{exp})} \times 100 \quad \text{Eq. (8)}$$

$$DQM (gsit/g_s) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (C_{exp} - C_m)^2}{n}} \quad \text{Eq. (9)}$$

sendo n o número de dados experimentais avaliados, C_{exp} a concentração de compostos fenólicos experimental e C_m a concentração estimada pelo modelo; $gsit$ e g_s correspondem à unidade em massa (CABRAL et al., 2013).

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

O teste de Shapiro-Wilk ($p > 0,05$) foi aplicado para verificar a hipótese da normalidade dos resultados obtidos, além da homocedasticidade segundo o teste de

Bartlett. A análise de variância ANOVA ($p < 0,05$) foi aplicada para dados com normalidade confirmada. O teste de diferença de média foi avaliado pelo teste de Tukey e LSD Fisher quando houve amostra Controle. Os resultados foram expressos como média mais ou menos desvio padrão (número de repetições igual a 3 e 5, conforme indicado em cada figura ou tabela). Todos os testes e gráficos foram gerados pelos softwares Statistica® 12.5 e Origin® 8.0. A análise hierárquica de agrupamentos (HCA) foi realizada através do software Past® 4.01.

4 RESULTADOS

A composição química (Tabela 3) mostrou-se semelhante entre as três gramíneas estudadas. Diferenças significativas encontradas foram encontradas no teor de cinzas e lipídios, com valores mais baixos para as espécies *E. muticus* e *C. flexuosus*.

Tabela 3. Composição química, rendimento de OE e, conteúdo citral das plantas *Cymbopogon flexuosus*, *Cymbopogon citratus* e *Elyonurus muticus*.

Constituinte (%)	<i>Cymbopogon flexuosus</i>	<i>Cymbopogon citratus</i>	<i>Elyonurus muticus</i>
Lipídeos	3.89 ^a ± 0.29	6.78 ^b ± 0.25	4.26 ^a ± 0.68
Carboidratos**	15.32	7.28	12.30
Fibras	56.30 ^a ± 0.83	53.12 ^a ± 0.41	61.80 ^a ± 0.83
Proteínas	6.97 ^a ± 0.18	11.65 ^b ± 0.13	6.93 ^a ± 0.22
Cinzas	5.31 ^a ± 0.22	9.42 ^b ± 0.09	3.11 ^c ± 0.02
Umidade	12.21 ^a ± 0.23	11.75 ^a ± 0.12	11.60 ^a ± 0.43
Rendimento do OE (%)	0,65 ^b ± 0,01	1,93 ^a ± 0,06	0,34 ^b ± 0,05
Composição de citral no óleo essencial (%)	86,57	89,84	66,36

*Letras diferentes na mesma linha representam diferença significativa entre as amostras (ANOVA, $p < 0.05$, Tukey test; $n=5$).

**Carboidratos = calculados por diferença (fibras não foram consideradas).

Fonte: O autor, 2020

4.1 CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

4.1.1 Obtenção do óleo essencial

Foi obtido o OE das partes aéreas das três plantas da família Poaceae *Cymbopogon flexuosus*, *Cymbopogon citratus* e *Elyonurus muticus*, com 0,65%^b ± 0,01 (v/m), 1,93%^a ± 0,06 (v/m) e 0,34%^b ± 0,05 (v/p), respectivamente. Os óleos mostraram uma cor amarelo clara e foram armazenados em tubos *Eppendorf* de 2 mL, em congelador (-18°C). O rendimento do OE é consiste no conteúdo lipídico de cada espécie (Tabela 3). Apesar de *E. muticus* apresentar o menor rendimento em OE, não houve diferença significativa em relação a *C. flexuosus*, indicando o potencial comercial dessa planta.

A menor concentração de OE encontrada na espécie *E. muticus* em relação às demais pode ser causada pelo fato de o material vegetal ter sido coletado na natureza. Diferentemente das outras duas espécies que foram cultivadas, possivelmente o

rendimento de óleo seria superior se a planta fosse cultivada. Outro fator que pode ter influenciado foi o ambiente geográfico, as características do solo, a genética e a idade das plantas (SHARAFZADEH et al., 2011).

4.1.2 Cromatografia gasosa / espectrometria de massa

Os óleos essenciais das três espécies exibiram compostos diferentes (Tabela 4). A composição química identificada no GC/MS quantificou 14 compostos diferentes, sendo a maioria mono e sesquiterpenos, além de aldeídos e álcoois, compostos de maior interesse econômico. Os principais componentes ativos encontrados de acordo com Soltoft-Jensen; Hansen (2005) foram mirceno e citral (geranial e neral) nas espécies de gramíneas estudadas. Os cromatogramas das três espécies são apresentados no anexo D.

Tabela 4. Composição química por GC/MS do OE obtido da hidrodestilação das folhas de *Cymbopogon flexuosus*, *Cymbopogon citratus* e *Elyonurus muticus*

Composto	RI ^a	RI ^b	KI	<i>Cymbopogon flexuosus</i> (área %)	<i>Cymbopogon citratus</i> (área %)	<i>Elyonurus muticus</i> (área %)
2-metil-6-oxo-2-hepteno	982	981	985	0.87	-	-
Mirceno	988	988	990	-	6.32	11.18
cis-ocimeno	1034	1032	1037	-	-	1.21
Linalol	1098	1095	1096	-	-	1.62
exo-isocitral	1141	1140	1144	-	-	0.32
Isoneral	1159	1160	1164	2.25	1.28	0.61
Isogeranial	1178	1177	1180	3.93	-	1.07
Neral	1235	1235	1238	34.97	35.45	23.72
Geraniol	1248	1249	1252	-	0.98	0.30
Geranial	1265	1264	1267	51.60	54.39	42.64
Acetato de geranil	1376	1379	1381	-	-	1.02
Isocariofileno	1414	1408	1408	1.21	-	-
Cadineno γ	1508	1513	1513	0.97	-	-
Óxido de cariofileno	1575	1582	1583	2.94	-	0.44
Soma				98.74	98.42	84.13

RI^a = Índice de retenção calculado. RI^b = Índice de retenção da literatura. KI = Índice de Kovats
Fonte: O autor, 2020

Foram identificados oito compostos na composição química do OE de *Cymbopogon flexuosus* (Tabela 4), que representaram 98,74% de todo o resultado, com 86,57% de citral formado pelos aldeídos, geranial (51,60%) e neral (34,97%). Também foram observados alguns compostos secundários significativos como o isoneral, isogeranial e dois sesquiterpenos, o isocariofileno e o óxido de cariofileno.

Baseado em Nath et al. (1994), os principais compostos identificados nesta espécie como OE são geraniol, citronelol, citral e citronelal. Foi possível notar que os compostos apresentaram discrepância possivelmente devido às características de clima, sazonalidade e local onde a amostra de plantas foi coletada, embora essa espécie tenha apresentado citral em ambos os estudos. Tais resultados são comparáveis de Adukwu et al. (2016), que encontraram geraniol, linalol, neral e geranial, sendo totalizado 89% dos compostos como citral.

No OE de *Cymbopogon citratus* foram identificados cinco compostos (Tabela 4), totalizando 98,42%. Os principais compostos estabelecidos foram: geranial (54,39%), neral (35,45%) e mirceno (6,32%). Esta espécie apresentou a maior quantidade de citral (89,84%) das três gramíneas, e a análise também detectou duas outras moléculas em menor concentração, a isoneral (1,28%) e o geraniol (0,98%). Em Lermen et al. (2015), foram encontrados resultados semelhantes nos principais componentes com 7,6 a 30,88% de neral e 1,6 a 62,95% de geranial em suas amostras.

O OE de *Elyonurus muticus* (Tabela 2) mostrou o maior número de compostos (11 no total) em comparação com as outras duas plantas, mas os principais compostos descobertos foram quase os mesmos que o *Cymbopogon citratus*, geranial (42,64%), neral (23,72%) e mirceno (11,18%). Da mesma forma, houve alguns compostos em quantidades inferiores: linalol (1,62%), cis-ocimeno (1,21%), isogeranial (1,07%) e acetato de geranil (1,02%).

Comparando as quantidades de citral com Füller et al. (2010), no presente estudo foi obtida a maior taxa das cinco populações diferentes de óleo de *E. muticus* já investigadas. Além disso, apresentou apenas dois compostos iguais aos do estudo de Hess et al. (2007), mirceno e óxido de cariofileno. No entanto, uma média de 30% dos compostos não foi identificada, dentre os quais poderia estar o citral. Os resultados aqui apresentados encontraram alguns compostos que ainda não foram mencionados na literatura (LEWIS et al., 1990; SCRAMIN et al., 2000; CHAGONDA et al., 2000; HESS et al., 2007; STEFANAZZI et al., 2011): exo-isocitral, isoneral, isogeranial e geraniol. Estes compostos são encontrados devido a rearranjos dos compostos neral e geranial, que apresentam características similares quanto à coloração e odor.

O OE de *E. muticus* apresentou linalol, um monoterpeneo que fornece um perfume floral, usado como um potencial ingrediente perfumado nas indústrias de

perfumaria e cosmética, usado ainda mais para sintetizar vitamina A e E, e aplicado como agente fixante, de fragrância e sabor na indústria de alimentos (APROTOSOAIE et al., 2014). O OE também contém mirceno, um composto químico usado em alimentos, bebidas, detergentes e cosméticos, geralmente como agente de sabor (MOG; ZANG, 2019). Os autores Chagonda et al. (2000) identificaram 0,5 a 3,3% de mirceno nas espécies de *E. muticus* (valores pelo menos três vezes menores que os encontrados nesta dissertação), enquanto que Bassolé et al. (2011) detectaram 11% de mirceno no OE de *C. citratus*.

4.1.3 Bioatividade dos óleos essenciais

Os compostos antioxidantes são alvo de grande interesse por parte dos consumidores de alimentos (CIZ et al., 2010) e cosméticos. A Tabela 5 indica os resultados das atividades antioxidantes e quelante dos três óleos essenciais, reduzindo os radicais DPPH, ABTS e FRAP, além de sua capacidade quelante de íon Fe^{2+} e o teor de compostos fenólicos.

Tabela 5. DPPH, ABTS, FRAP, atividade quelante de Fe^{2+} e teor de compostos fenólicos dos óleos essenciais de *Cymbopogon flexuosus*, *Cymbopogon citratus* e *Elyonurus muticus*

	<i>Cymbopogon flexuosus</i> OE	<i>Cymbopogon citratus</i> OE	<i>Elyonurus muticus</i> OE
DPPH Trolox μ M/mL	31,17 ^a \pm 4.04	32,51 ^a \pm 2.38	23,66 ^b \pm 2.05
DPPH (IC ₅₀) mg/mL de óleo	0,051	0,045	0,062
% inibição do OE 1:25	41%	45%	34%
ABTS Trolox μ M/mL	62,54 ^a \pm 7.86	54,92 ^a \pm 3.27	45,66 ^a \pm 6.10
IC ₅₀ mg/mL de óleo	< 0,001	0,012	0,013
% inibição do OE 1:25	99%	97%	86%
FRAP Trolox μ M/mL	193,11 ^a \pm 5.33	137,23 ^b \pm 2.63	127,98 ^c \pm 1.43
IC ₅₀ mg/mL de óleo	0,008	0,010	0,009
% inibição do OE 1:25	84%	82%	77%
Quelante de Fe^{2+} EDTA mg/mL	5.28 ^b \pm 0.18	3.47 ^c \pm 0.33	8.81 ^a \pm 0.74
IC 50 mg/mL de óleo	0,015	0,029	0,005
% inibição do OE 1:25	65%	56%	79%
Teor de compostos fenólicos totais GAE μ M/mL	196,74 ^a \pm 3.84	155,98 ^a \pm 0.76	183,15 ^a \pm 7.69

*Diferença significativa pela ANOVA (p <0,05) e teste de Tukey foram representados em letras minúsculas para cada método entre os óleos essenciais

Comparando os valores do ensaio de DPPH, os OEs das espécies cultivadas apresentaram atividade antioxidante estatisticamente superior OE de *E. muticus*. Para a análise ABTS, as espécies não diferiram estatisticamente, embora o menor valor tenha sido obtido para o OE de *E. muticus*. De acordo com a análise FRAP, a atividade antioxidante foi estatisticamente maior para o OE de *C. flexuosus* e menor para o OE de *E. muticus*.

Considerando todos os resultados da Tabela 5, os óleos essenciais de *C. flexuosus* apresentaram os maiores resultados, o que é corroborado pelo maior teor fenólico. No entanto, vale ressaltar que, o conteúdo fenólico total não diferiu significativamente entre óleos. Além disso, a atividade quelante de Fe^{2+} foi estatisticamente maior no OE de *E. muticus* com 79% (Fig. 4) de inibição na concentração 1:25. Sendo o resultado dessa concentração esperado, pois é que uma concentração maior apresente maior capacidade quelante e um potencial positivo para essa espécie vegetal, devido a indústrias farmacêuticas e de alimentos buscarem essa característica para manutenção dos ions ferro em medicamentos ou alimentos.

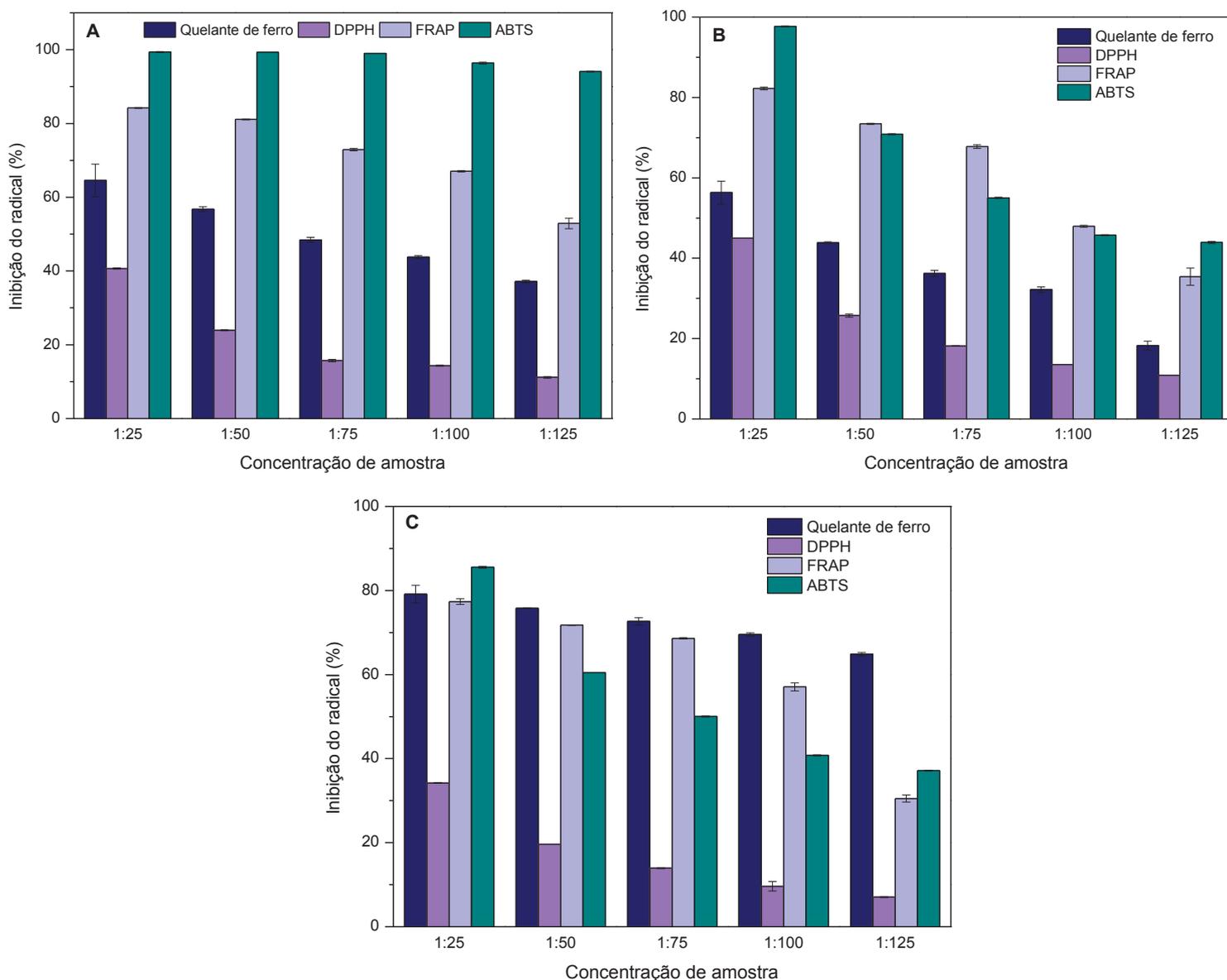


Figura 4 - Porcentagem de atividade antioxidante (métodos quelante de ferro, DPPH, ABTS e FRAP) de *Cymbopogon flexuosus* (a), *Cymbopogon citratus* (b) e *Elyonurus muticus* (c) em cinco concentrações diferentes de óleos essenciais.

Com a diluição do óleo, observou-se uma redução nas atividades antioxidantes (Fig. 4), conforme esperado. O método ABTS demonstrou maiores valores percentuais de inibição de radicais livres e IC₅₀ sob concentração de 1:25 (Tabela 5), *C. flexuosus* com 99% de inibição, *C. citratus* com 97% e *E. muticus* com 85%.

Os resultados indicam que diferentes métodos podem apresentar resultados diversos, uma vez que cada método possui um reagente específico, que apresenta maior afinidade com alguns compostos detectados nas amostras, gerando assim valores diferentes. Isto confirma a exigência de revistas internacionais para a

utilização de mais de um método antioxidante, na avaliação desta característica do óleo.

O potencial quelante de Fe^{2+} foi identificado pela transformação da complexação ferrozina com Fe^{2+} . Os resultados superiores para o OE de *E. muticus* podem ter ocorrido devido ao maior número de compostos químicos encontrados no óleo e suas possíveis afinidades com íons de ferro, não esclarecidos em estudos até o momento. Como agente antioxidante ou pró-oxidante, o OE de *E. muticus* possui capacidades valiosas, comparáveis ou superiores às outras duas variedades de capim-limão, e poderá ser aplicado em muitas indústrias como composto antioxidante natural e quelante de ferro (VIUDA-MARTOS et al., 2010).

A atividade antibacteriana dos três OEs é apresentada na Tabela 6. Foram utilizados 5 microrganismos, três Gram-positivos e dois Gram-negativos. As bactérias empregadas são de interesse na indústria de alimentos, sobre a deterioração e contaminação destes.

Tabela 6. Potencial antibacteriano dos óleos essenciais para diferentes microrganismos representados em diâmetro e porcentagem da zona de inibição.

	Antibiótico** (mm)	OE de <i>Cymbopogon flexuosus</i> (mm)	(%)***	OE de <i>Cymbopogon citratus</i> (mm)	(%)***	OE de <i>Elyonurus muticus</i> (mm)	(%)***
<i>Staphylococcus aureus</i>	29.86 ^a ± 0.84	9.60 ^c ± 0.84	32.15	12.20 ^b ± 1.13	40.86	13.47 ^b ± 0.41	45.11
<i>Clostridium perfringens</i>	28.37 ^a ± 1.66	16.41 ^b ± 0.78	57.84	14.81 ^{bc} ± 0.95	52.20	13.50 ^c ± 1.35	47.59
<i>Listeria monocytogenes</i>	28.37 ^a ± 0.95	14.98 ^b ± 0.78	52.80	15.24 ^b ± 0.53	53.72	15.38 ^b ± 1.35	54.21
<i>Salmonella sp.</i>	28.94 ^a ± 1.28	15.44 ^b ± 1.32	53.35	15.59 ^b ± 0.77	53.87	16.10 ^b ± 0.65	55.63
<i>Escherichia coli</i>	28.88 ^a ± 0.48	14.05 ^{bc} ± 2.37	48.65	15.52 ^b ± 1.92	53.74	11.86 ^c ± 0.96	41.07

* Diferença significativa pela ANOVA ($p < 0,05$) e teste de Tukey foram representados em letras minúsculas para cada método entre os óleos essenciais

Antibiótico** = Cloranfenicol de 30 μ g

(%)***= Porcentagem da zona de inibição quando comparada ao antibiótico.

Os resultados do teste antimicrobiano foram representados pelo diâmetro da zona de inibição e porcentagem de inibição em relação ao resultado do antibiótico. Os óleos foram diluídos em solvente DMSO na concentração 1:2 para *Listeria monocytogenes* e 1:1 para os outros microrganismos, pois eles inibiram completamente os microrganismos nas placas testes quando aplicados puros. Portanto, os melhores resultados de inibição dos OEs foram para o microrganismo *Listeria monocytogenes* e todos os óleos apresentaram poder de inibição semelhantes

estatisticamente. Em geral, os óleos inibiram os microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos com 40-50% do poder do antibiótico.

Baseado no The Clinical and Laboratory Standards Institute (2016), o OE de *E. muticus* obteve resultado intermediário (zonas de inibição de 12-17 mm) para *Staphylococcus aureus*, enquanto que os OEs de *C. flexuosus* e *C. citratus* exibiram comportamento resistente (< 12 mm). Quanto ao *Clostridium perfringens*, *L. monocytogenes* e *Salmonella sp.* todos os três OEs apresentaram resultados intermediários. Para *Escherichia coli*, os OEs de *C. flexuosus* e *C. citratus* proporcionaram resultados intermediários, enquanto que o óleo de *E. muticus* exibiu resistência. Estes resultados são substanciais e podem ser explicados pela porcentagem encontrada de citral, um agente antimicrobiano (ADUKWU et al., 2016; SHI et al., 2016). Os resultados podem ser otimizados se o óleo for utilizado sem diluição. Assim, como foi observado na cromatografia, foram encontradas moléculas de geraniol, geranial e neral no óleo desta espécie, que também exibem, capacidade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (AHMAD; VILJOEN, 2015).

Existem alguns outros estudos sobre a atividade antimicrobiana dos OEs de capim-limão. Adukwu et al. (2016) demonstraram o potencial de *C. flexuosus* inibindo *A. baumannii* e a eficácia em baixas concentrações, contra o crescimento de cinco cepas de *S. aureus* (ADUKWU et al., 2012). Para o óleo de *C. citratus*, foi descoberta alta atividade contra *L. monocytogenes* e forte atividade contra *S. aureus* e *E. coli* (AHMAD; VILJOEN, 2015; BASSOLÉ et al., 2011).

O mirceno isolado demonstrou baixa inibição contra bactérias, mas misturado com outros OEs têm resultados significativos de acordo com a bibliografia (OLADEJI et al., 2019). Além disso, o OE de *E. muticus* com material vegetal coletado na primavera, testado contra *S. aureus* e *E. coli*, foi mais eficaz contra *S. aureus* em comparação com as demais amostras da estação do ano (HESS et al., 2007), com grande crescimento de inibição para os fungos *Botrytis allii*, *B. cinerea* e *Penicillium expansum* (FULLER et al., 2014). Estes OEs são interessantes no contexto do crescimento fúngico em morangos, conforme discutido a seguir.

A variedade brasileira *E. muticus* mostrou um OE com composição e propriedades valiosas, o que justifica seu cultivo futuramente. Juntamente com os outros dois óleos, eles podem ser aplicados em alimentos, cosméticos e produtos fármacos/médicos como agentes antioxidantes, quelantes e antimicrobianos, puros ou

em pequenas quantidades, devido ao forte odor conferido. Também é possível utilizá-los como ingredientes ativos, puros ou encapsulados, nas mesmas áreas acima mencionadas, fazendo uso das propriedades combinadas dos óleos.

4.1.4 Efeito preservativo dos óleos essenciais em morangos

As Figura 5, Figuras 6 e Tabela 7 mostram a avaliação por atributos, atividade antioxidante e teor de fenólicos totais dos morangos, comparando os tempos inicial e final (15 dias). Além disso, a Figura 7 mostra a evolução dos parâmetros visuais do morango e o desenvolvimento de fungos durante o armazenamento refrigerado de 15 dias. A amostra de Controle do tempo inicial é demonstrada na Figura 5. As amostras foram nomeadas segundo a variedade e a concentração do OE, de acordo com: Em para *E. muticus*, Cf para *C. flexuosus*, Cc para *C. citratus*, seguidos do número 1 para concentrações de óleo na solução de 250 $\mu\text{L/L}$ e o número 2 para soluções a 750 $\mu\text{L/L}$.



Figura 5 - Morango (amostra Controle) no primeiro dia de armazenamento

Tendo em vista que a nota 1 expressada pelos avaliadores significava excelente e 10 inaceitável, a solução de óleo comestível de *E. muticus* 750 $\mu\text{L/L}$ (Em2) apresentou escores de qualidade global significativamente mais baixos no dia 15, quando comparados ao Controle (morango sem tratamento no tempo 15 dias) e Cc1 (solução de 250 $\mu\text{L/L}$ de OE de *C. citratus*), que obtiveram ambas os maiores escores

no teste (Figura 6). Assim, as amostras Controle e Cc1 dos morangos com revestimento foram as menos desejáveis após 15 dias de armazenamento e Em2 a mais aceitável.

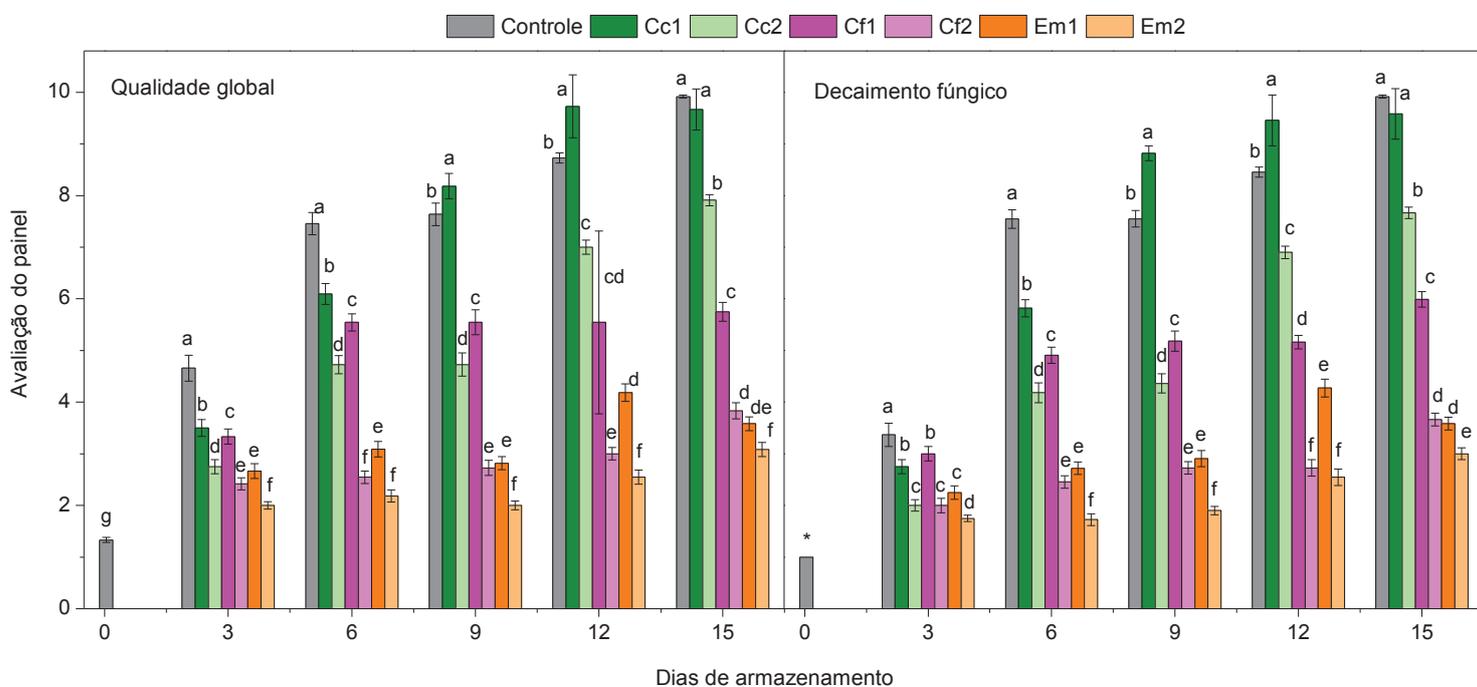


Figura 6 - Testes de qualidade global e comportamentos frente à decomposição fúngica de morangos durante 15 dias sob refrigeração. Siglas: Controle com o morango sem revestimento; Cc1 = morango em 250 μ L/L de óleo de *C. citratus*; Cc2 = 750 μ L/L de óleo de *C. citratus*; Cf1 = 250 μ L/L de óleo de *C. flexuosus*; Cf2 = 750 μ L/L de óleo de *C. flexuosus*; Em1 = 250 μ L/L de óleo de *E. muticus* and Em2 = 750 μ L/L de óleo de *E. muticus*. * teste de LSD Fisher ($p < 0.05$); Controle e no decaimento fúngico representado pela letra: g (dia 6/9/12), e (dia 3) e f (dia 15).

Morangos são frutos altamente perecíveis devido ao seu alto teor de água e comportamento metabólico climatérico, o que os torna vulneráveis a microrganismos, normalmente manifestado visualmente pela presença de bolores. Houve diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos e o Controle ($p < 0,05$) em termos de decomposição fúngica e qualidade global durante o armazenamento refrigerado (Fig. 6 e 7).

Vale ressaltar que a decomposição fúngica no dia 12 não apresentou diferença significativa entre Cf2 e Em2. Apesar da diferença significativa das avaliações dos testes do painel, a Figura 7 mostra claramente que as amostras Cf1, Cf2, Em1 e Em2 têm morangos com melhor aparência do que as amostras Controle e Cc. Além disso, as amostras Cf e Em receberam escores até 5 (bom/aceitável) até o dia 15 de armazenamento refrigerado.

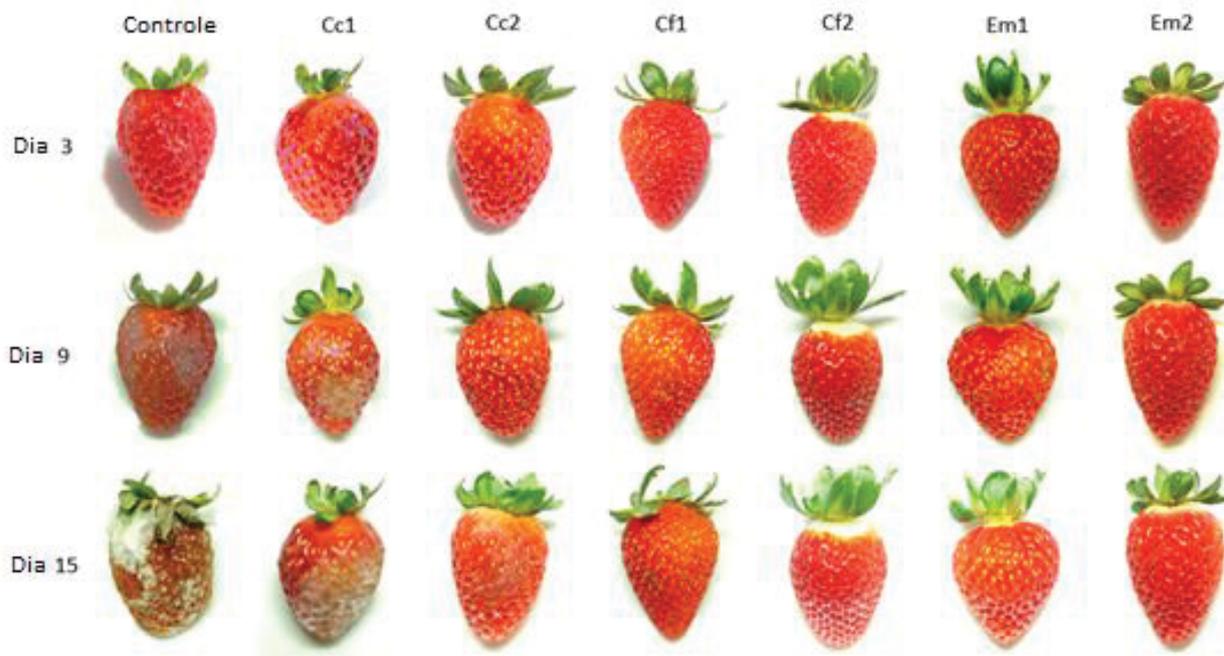


Figura 7 – Evolução dos parâmetros visuais do morango e desenvolvimento de fungos durante armazenamento refrigerado no período de 15 dias. Siglas: Controle com o morango sem revestimento; Cc1 = morango em 250 $\mu\text{L/L}$ de óleo de *C. citratus*; Cc2 = 750 $\mu\text{L/L}$ de óleo de *C. citratus*; Cf1 = 250 $\mu\text{L/L}$ de óleo de *C. flexuosus*; Cf2 = 750 $\mu\text{L/L}$ de óleo de *C. flexuosus*; Em1 = 250 $\mu\text{L/L}$ de óleo de *E. muticus* and Em2 = 750 $\mu\text{L/L}$ de óleo de *E. muticus*.

A atividade antioxidante e o teor de compostos fenólicos (Tabela 7) dos morangos revestidos com OE corroboram os resultados sensoriais dos frutos. Os dados evidenciaram que as soluções Cf e Em foram capazes de aumentar significativamente a atividade antioxidante da fruta e o conteúdo fenólico.

Tabela 7. Atividade antioxidante e teor de compostos fenólicos dos morangos no período de 15 dias de estocagem (comparativo inicial, dia 3 e dia 15).

	Amostra	DPPH Trolox $\mu\text{M/mL}$	FRAP Trolox $\mu\text{M/mL}$	Fenólicos totais Ácido gálico $\mu\text{M/mL}$
Inicial	Controle	41.441 ^d \pm 0.009	271.331 ^c \pm 0.005	2.502 ^{cde} \pm 0.013
Dia 3	Controle	41.135 ^g \pm 0.017	271.359 ^b \pm 0.005	2.306 ^{ef} \pm 0.088
	Cc1	41.538 ^b \pm 0.029	271.291 ^{ef} \pm 0.003	2.877 ^b \pm 0.063
	Cc2	41.462 ^{cd} \pm 0.015	271.319 ^{cd} \pm 0.002	2.939 ^b \pm 0.126
	Cf1	41.493 ^{bc} \pm 0.012	271.277 ^f \pm 0.011	2.571 ^c \pm 0.164
	Cf2	41.556^b \pm 0.020	271.472^a \pm 0.002	3.528^a \pm 0.050
	Em1	41.523 ^b \pm 0.023	271.375 ^b \pm 0.017	2.636 ^c \pm 0.025
	Em2	41.730^a \pm 0.009	271.376^b \pm 0.002	2.942^b \pm 0.114
Dia 15	Controle	41.022 ^g \pm 0.032	271.255 ^g \pm 0.005	2.249 ^f \pm 0.038
	Cc1	41.287 ^{ef} \pm 0.052	271.290 ^{ef} \pm 0.015	2.306 ^{ef} \pm 0.013
	Cc2	41.522 ^b \pm 0.017	271.309 ^d \pm 0.016	2.556 ^{cd} \pm 0.088

Amostra	DPPH Trolox $\mu\text{M/mL}$	FRAP Trolox $\mu\text{M/mL}$	Fenólicos totais Ácido gálico $\mu\text{M/mL}$
Cf1	41.528 ^b \pm 0.020	271.312 ^d \pm 0.010	2.618 ^c \pm 0.101
Cf2	41.515^b \pm 0.020	271.303^{de} \pm 0.001	2.547^{cd} \pm 0.025
Em1	41.416 ^{de} \pm 0.056	271.322 ^{cd} \pm 0.014	2.378 ^{def} \pm 0.140
Em2	41.417^{de} \pm 0.017	271.313^d \pm 0.002	2.315^{def} \pm 0.126

*LSD teste Fisher ($p < 0.05$) descreve a diferença significativa para amostras em uma mesma coluna com letras diferentes. Valores em negrito foram destacados na discussão.

As amostras Controle tiveram redução significativa e pronunciada no teor fenólico e atividades antioxidantes ao longo dos 15 dias. As amostras Cf2 e Em2 exibiram maior atividade antioxidante do que as outras amostras em todos os tempos de análise. Além disso, estas amostras mantiveram o teor fenólico total durante 15 dias de armazenamento refrigerado, pois seus valores no dia 15 não diferiram significativamente da amostra Controle no tempo inicial.

Os resultados mais satisfatórios foram encontrados nas amostras de frutos tratadas com 750 $\mu\text{L/L}$ de óleos essenciais (Cf e Em), no terceiro dia de armazenamento. Por outro lado, os frutos Controle e Cc apresentaram resultados desfavoráveis após 15 dias de armazenamento. Os tratamentos Cf2 e Em2 foram capazes de aumentar a atividade antioxidante por até três dias de armazenamento. Vale ressaltar o aumento da atividade antioxidante, embora os maiores efeitos conservantes em geral tenham sido observados nos frutos tratados com 750 $\mu\text{L/L}$ de óleos essenciais. Ishkeh et al. (2019) encontraram maior efeito conservador em OE de limão verbena (*Lippia citrodora*) ao utilizar concentrações de 750 $\mu\text{L/L}$ versus 250 $\mu\text{L/L}$ como revestimento em amoras durante 9 dias de armazenamento refrigerado.

O óleo de limão verbena também apresenta compostos neral e linalol (ISHKEH et al, 2019). Devido à ocorrência de compostos fenólicos como o neral e o linalol, esses óleos essenciais possuem propriedades fungicidas (DE CORATO et al., 2010). É importante citar que no presente trabalho o linalol foi encontrado somente no óleo de *E. muticus*. Estes são compostos chave na resistência das plantas contra ataques de patógenos que levam ao estresse e à podridão das plantas. Além disso, os revestimentos de superfície podem ser considerados comestíveis e agem como barreiras a gases, resultando na manutenção da umidade. Além disso, diminuem os níveis de oxigênio nas frutas, pois o OE forma uma fina camada na superfície da mesma. Conseqüentemente, a respiração e a produção de etileno diminuí, reduzindo

a velocidade de degradação (ISHKEH et al., 2019; SIVAKUMAR; BAUTISTA-BAÑOS, 2014), o que é intensificado pelas baixas temperaturas de armazenamento.

4.1.5 Análise hierárquica de cluster (HCA)

O HCA estruturado com composição química, atividades antioxidantes dos óleos essenciais e teste de atributos, mostrou a proximidade das características dos óleos (Fig. 8). Usando o método do algoritmo de Ward, nota-se que os óleos das espécies *C. flexuosus* e *E. muticus* obtiveram similaridade superior, pois estão agrupados em um cluster, e ambos mostraram distância do OE de *C. citratus*. O coeficiente de correlação confirmou a qualidade do agrupamento, com um valor de 0,9957 (quanto mais próximo de 1,0, melhor). Assim, os resultados destacaram o potencial do OE de *E. muticus* a ser estabelecido nos mesmos mercados de óleos essenciais de capim-limão cultivados, e em diversas outras áreas industriais.

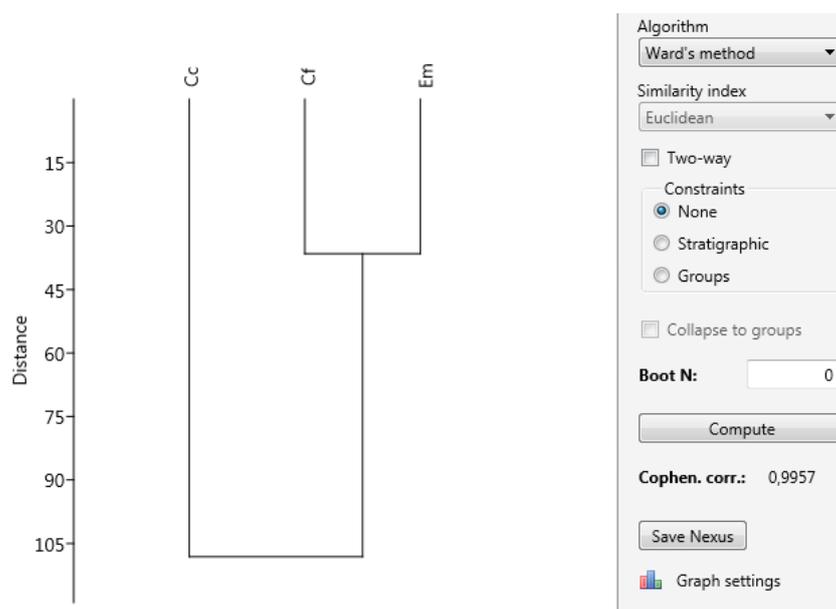


Figura 8 - Análise hierárquica de cluster (HCA) dos óleos essenciais de *Cymbopogon flexuosus* (Cf), *Cymbopogon citratus* (Cc) e *Elyonurus muticus* (Em), de acordo com a composição química, atividade antioxidante e teste de atributos.

4.2 OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DAS TRÊS ESPÉCIES DE CAPIM-LIMÃO

4.2.1 Escolha dos melhores solventes

Primeiramente, para a determinação das condições ótimas de extração de compostos fenólicos das espécies de capim-limão estudadas, foram avaliados oito solventes diferentes, quatro deles considerando solventes convencionais (acetona, metanol, etanol e água) e quatro DES (descritos na Tabela 2 item 3.8). Nesta etapa, as extrações foram realizadas pelo método de agitação magnética, com uma célula de vidro encamisada, a 45 °C / 2 h (fixado). A capacidade de extração de solventes foi avaliada em termos de conteúdo fenólico total (TPC) e capacidade antioxidante (ensaios de DPPH e FRAP), cujos resultados são mostrados na Figura 9 (a-c).

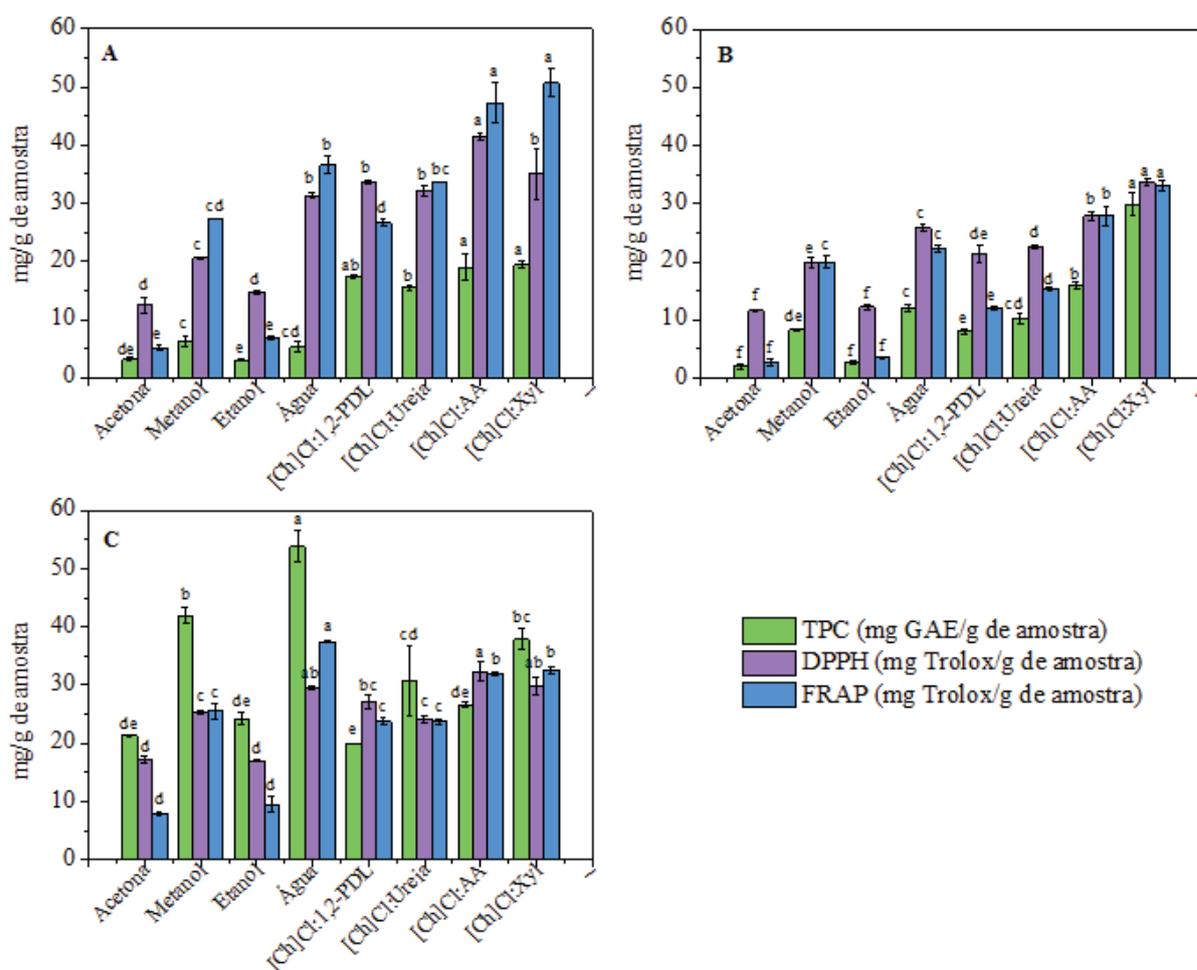


Figura 9 - Conteúdo fenólico total e atividades antioxidantes (DPPH e FRAP) na avaliação de solventes (Design exp. 1) do capim-limão a) *C. citratus*; b) *C. flexuosus* e c) *E. muticus*. Os testes ANOVA e LSD Fisher ($p < 0,05$) não evidenciaram diferença significativa se a mesma letra apareceu nas colunas de mesma cor.

Considerando os melhores resultados e o interesse em avaliar um solvente verde em relação a um solvente convencional, três solventes tiveram o melhor desempenho, e portanto foram selecionados para as próximas etapas deste trabalho: água e os DES de [Ch]Cl:Xyl e de [Ch]Cl:AA.

4.2.2 Escolha da temperatura ótima de extração

O efeito da temperatura foi avaliado para os solventes selecionados anteriormente. As extrações foram realizadas também no método de agitação magnética durante 2 h (condições fixas). Duas temperaturas foram avaliadas, 45 °C e 60 °C (Fig. 10 a-c). Considerando que maiores temperaturas reduzem a viscosidade dos DES avaliados, optou-se por não fazer a extração em temperaturas inferiores à inicial, de 45 °C.

Para o *C. citratus* (Fig. 10a), as mudanças de temperatura não apresentaram efeito no teor de fenólicos (TPC) extraído (com exceção do extrato à base de água). No entanto, considerando os ensaios de DPPH e FRAP, o aumento da temperatura promove um aumento significativo na atividade antioxidante de todos os extratos, indicando a extração de maior quantidade de compostos antioxidantes em temperaturas mais altas.

Para a espécie *C. flexuosus*, tanto o TPC quanto a atividade antioxidante foram afetadas pelo aumento da temperatura. Para extratos à base de [Ch]Cl:AA, ambas as propriedades avaliadas apresentaram maiores valores a 60°C. Para o extrato à base de [Ch]Cl:Xyl foi observado um comportamento oposto, ou seja, a temperatura de 60°C promove uma redução do índice TPC e DPPH. No entanto, foi obtido um índice FRAP significativamente mais alto.

Por fim, para o *E. muticus*, o aumento da temperatura promoveu redução do TPC nos extratos à base de água. Porém, foram obtidos altos índices de atividade antioxidante, indicando a extração de compostos não fenólicos, porém antioxidantes, a exemplo do citral. Isto foi demonstrado pelos autores Schaneberg; Khan (2002), que caracterizaram os compostos de diferentes extratos de *C. citratus* e *C. flexuosus*. Conforme observado no *C. flexuosus*, o extrato à base de [Ch]Cl:Xyl também apresentou comportamento oposto. O OE de *E. muticus* apresentou um índice FRAP significativamente mais alto a 60 °C do que a 45 °C, mesmo com a redução de TPC e DPPH.

Para todas as espécies, [Ch]Cl:AA obteve destaque principalmente pelos índices de atividade antioxidante obtidos. Assim, após uma análise cuidadosa dos resultados obtidos (Fig. 10 a-c), dois solventes foram selecionados para as próximas etapas: água e o DES [Ch]Cl:AA. Considerando os excelentes resultados, principalmente na atividade antioxidante, foi fixada a temperatura de 60°C.

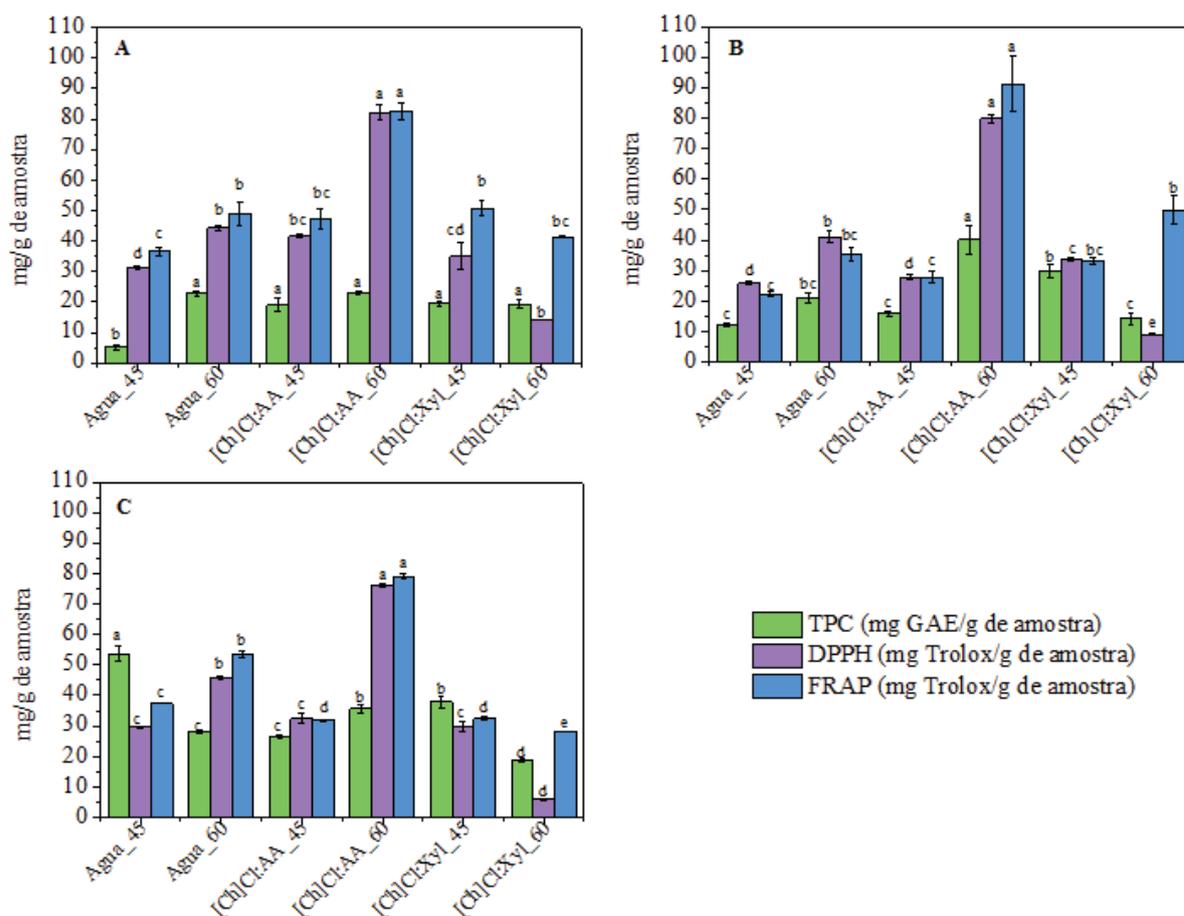


Figura 10 - Conteúdo fenólico total e atividades antioxidantes (DPPH e FRAP) na avaliação de solventes/temperatura (Design exp. 2) do capim-limão a) *C. citratus*; b) *C. flexuosus* e c) *E. muticus*. O teste ANOVA e LSD Fisher ($p < 0,05$) não evidenciaram diferença significativa se a mesma letra apareceu nas colunas de mesma cor.

4.2.3 Escolha do melhor método extrativo e tempo

Determinados os melhores solventes (água e [Ch]Cl:AA) e fixado o processo de temperatura em 60 °C, determinou-se a cinética de extração. Além disso, o desempenho da agitação magnética, aplicada nas etapas anteriores, foi avaliado em relação a duas outras estratégias de extração sólido líquido: Ultra-Turrax® e extração de sólido-líquido assistido por ultrassom (UA-SLE). Essas duas estratégias foram escolhidas considerando o potencial de promover processos de extração de alta eficiência. O Ultra-Turrax® é uma máquina de homogeneização de alta velocidade,

que fornece altas forças de cisalhamento e impulso (XU et al., 2016). A agitação em alta velocidade aumenta o processo de transferência de massa e pode ser adequada para extrair compostos em várias matrizes alimentares, apresentando maior eficiência na obtenção de compostos bioativos, conforme relatado.

Aa Figura 11 mostra que quando a água é o solvente, o tempo do processo quase não exerce influência, independentemente do método avaliado. Em relação à extração baseada em DES (Fig. 12), por sua vez, foi observado um aumento significativo até 150 minutos de processo, que permanece quase constante após esse ponto, para todas as variáveis avaliadas.

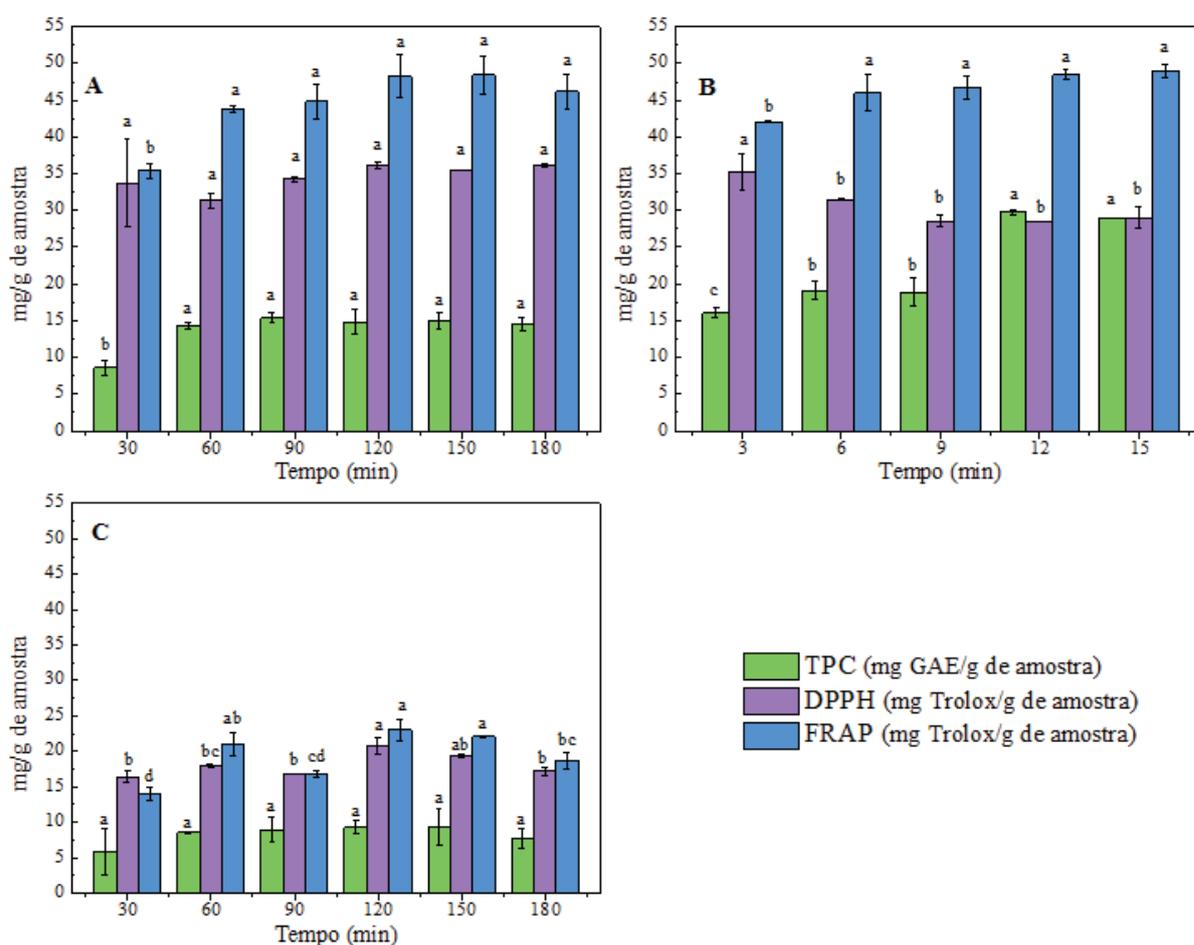


Figura 11 - Conteúdo fenólico total e atividades antioxidantes (DPPH e FRAP) na cinética de extração com solvente água (Design exp. 3) do capim-limão *E. muticus* para os métodos a) *Célula encamisada* b) *Ultra-Turrax®* e c) *UA-SLE*. O teste ANOVA e LSD Fisher ($p < 0,05$) não evidenciou diferença significativa se a mesma letra apareceu em colunas de mesma cor.

Como discutido anteriormente, a viscosidade do DES promove uma transferência de massa mais baixa, portanto, o efeito no tempo é mais significativo para esses solventes. A espécie com os resultados mais expressivos para o solvente água foi o *E. muticus* nos três métodos e para o DES, foi o *C. citratus*. Este fato é

interessante, pois os resultados da hidrodestilação indicam que a espécie *C. flexuosus* apresentou um óleo essencial de destaque em diversos parâmetros, incluindo TPC e atividade antioxidante por DPPH. Portanto, os extratos das mesmas espécies provavelmente contêm compostos diferentes quando obtidos por métodos distintos.

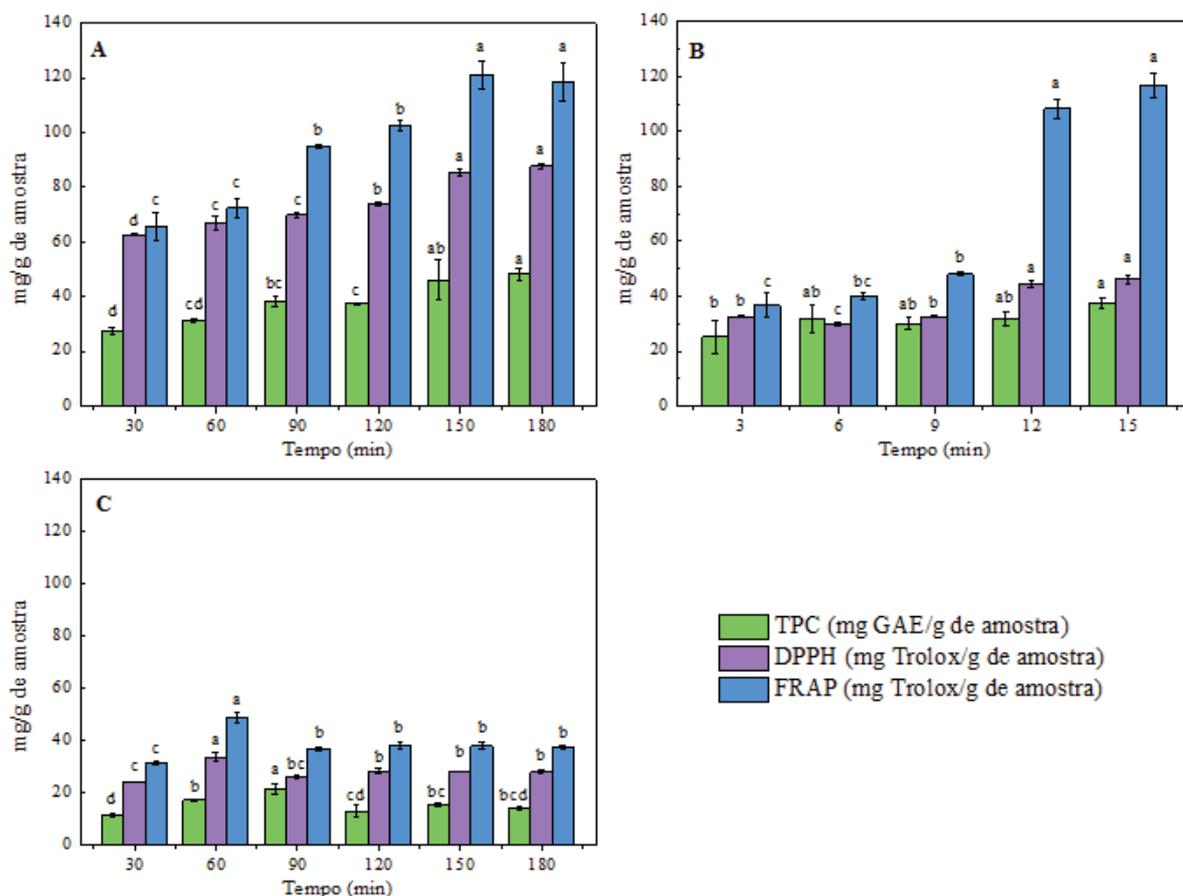


Figura 12 - Conteúdo fenólico total e atividades antioxidantes (DPPH e FRAP) na cinética de extração com solvente DES-[Ch]Cl:AA (Design exp. 3) do capim-limão *C. citratus* a) *Célula encamisada* b) *Ultra-Turrax®* e c) *UA-SLE*. O teste ANOVA e LSD Fisher ($p < 0,05$) não evidenciou diferença significativa se a mesma letra apareceu em colunas de mesma cor.

Analisando as cinéticas de extração dos três métodos propostos, percebe-se que o método de extração por agitação eletromagnética em célula encamisada gera os melhores resultados de análise antioxidante e compostos fenólicos totais. O ultrassom apresentou resultados inferiores aos demais métodos. O perfil cinético também indicou que na célula, a extração aumenta com um maior tempo de contato solvente/amostra, assim como no Ultra-Turrax®.

O UA-SLE é baseado em cavitações acústicas produzidas pelo equipamento que causam a expulsão dos compostos metabólicos da matriz, gerando modificações mecânicas e físicas na amostra (CHEMAT et al., 2017). Nos resultados apresentados, o pico de extração por ultrassom não atingiu os valores a de TPC e atividades

antioxidantes dos outros dois métodos. Sendo assim, não é uma metodologia de extração indicada para as espécies de capim-limão.

Portanto as condições ótimas encontradas foram: célula com agitação magnética, para o solvente DES [Ch]Cl:AA, na temperatura de 60°C e tempo de extração de 180 min para as espécies *C. citratus* e *C. flexuosus* avaliadas, e 150 min para a espécie *E. muticus*. Não houve diferença significativa para o tempo de 180 min.

4.2.4 Cinética de extração dos compostos fenólicos

Assim foram utilizados resultados dos ensaios experimentais para a aplicação de três modelos matemáticos, avaliando se seria possível ajustar os modelos ou não, aos dados obtidos do teor de compostos fenólicos das três espécies de capim-limão, representados pelas siglas Cc, Cf e Em. Os dados avaliados foram da cinética com solvente DES [Ch]Cl:AA, na temperatura de 60°C, com agitação eletromagnética. As constantes obtidas para cada modelo estão apresentadas na Tabela 8.

Tabela 8. Parâmetros do modelo cinético de primeira e segunda ordem para a extração de teor de compostos fenólicos

	Concentração ^a (%)	K(g.min ⁻¹) ^b	R ^{2c}	DA (%) ^d	DQM ^e
Modelo cinético de primeira ordem (Lei da potência)					
Cc	0,03147 ± 0,0002	1	0,9238	10,4	0,35
Cf	0,02490 ± 0,0002	1	0,4751	23,7	0,58
Em	0,02581 ± 0,0001	1	0,6982	14,6	0,45
Modelo cinético de segunda ordem (Lei da potência)					
Cc	0,03140 ± 0,0002	1,7833	0,9446	4,7	0,15
Cf	0,02478 ± 0,0002	0,3834	0,9370	9,3	0,22
Em	0,02579 ± 0,0002	1,4215	0,9468	8,3	0,27
Modelo cinético de segunda ordem (taxa de extração de antioxidantes)					
Cc	0,03167 ± 0,0001	1,5545	0,9144	4,5	0,16
Cf	0,02416 ± 0,0003	0,6475	0,9249	9,9	0,25
Em	0,02621 ± 0,0002	1,7417	0,6871	11,8	0,38

^a Concentração calculada em porcentagem; ^b Constante da taxa de extração; ^c Coeficiente de determinação; ^d Desvio relativo médio absoluto; ^e Desvio quadrático médio.

Quanto mais baixos os valores de *DA* e *DQM* e maiores os de *R*² (coeficiente de correlação), melhor o modelo representa os dados experimentais. Nesse caso o melhor modelo foi o modelo de segunda ordem, que prediz bem os dados para os três

capins apresentando valores de erros e de ajuste aceitáveis (<10%). Para o capim *C. citratus* também pode ser utilizado o modelo cinético de primeira ordem, por apresentar valores de R^2 de 0,9238 e valores de DQM baixos, de 0,35. Além disso, o modelo cinético de segunda ordem, utilizado para a extração de antioxidantes, pode também ser utilizado para os capins Cc e Cf.

A figura 13 mostra o resultado da cinética de extração, aplicando o modelo de lei da potência de segunda ordem, o qual melhor se ajustou aos dados. O modelo mostra, como a concentração aumenta com o decorrer do processo e tende a estabilizar depois de certo ponto.

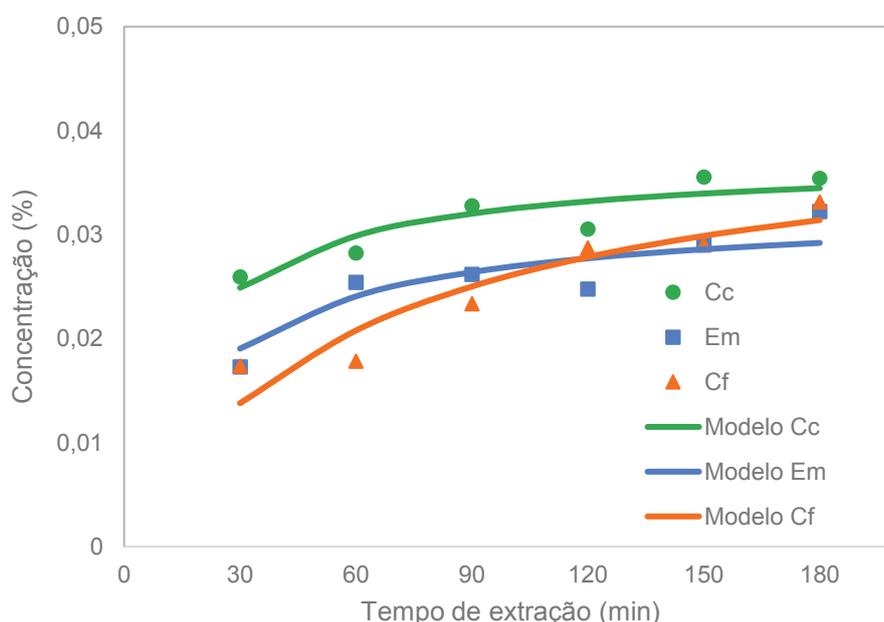


Figura 13 - Concentração de fenólicos totais na cinética de extração com solvente DES-[Ch]Cl:AA do capim-limão *C. citratus* ((●) verde), *E. muticus* ((■) azul) e *C. flexuosus* ((▲) laranja). As linhas sólidas correspondem ao modelo de lei da potência de segunda ordem.

Este fato concorda com as análises de antioxidante apresentadas anteriormente, em que a atividade antioxidante das amostras obtidas por agitação magnética cresceu até perto do final do tempo de análise, tornando-se constante. Em outras palavras, utilizando agitação magnética, os compostos fenólicos dos capins-limão avaliados foram extraídos em uma cinética de segunda ordem. Os melhores resultados obtidos foram para o capim limão *C. citratus*, quando comparado às demais espécies, aplicando-se as mesmas condições e variáveis de processo. Portanto, o *C. citratus* foi o capim-limão com melhor desempenho em extração de fenólicos para DES-[Ch]Cl:AA, temperatura ótima e método extrativo ótimo.

5 CONCLUSÕES

Até onde sabemos, este foi o primeiro estudo que apresentou exo-isocitral, isoneral, isogeranial e geraniol na composição química do óleo essencial de *Elyonurus muticus* por hidrodestilação. Além disso, esta foi a primeira avaliação da capacidade do OE de *E. muticus* de capturar os radicais livres ABTS e FRAP, de sua atividade quelante de Fe^{2+} e sua atividade antimicrobiana contra *C. perfringes*, *L. monocytogenes* e *Salmonella sp.* A planta brasileira *Elyonurus muticus* exibiu um OE com três vezes mais mirceno do que o relatado na literatura, e quantidade de citral comparável às espécies cultivadas de capim-limão.

O presente trabalho aprofundou o conhecimento científico sobre a planta *Elyonurus muticus* e as possíveis aplicações de seu OE nas indústrias cosmética e farmacêutica/médica como agentes antioxidantes, quelantes e antimicrobianos, mas principalmente na indústria de alimentos, pelas mesmas propriedades e a sua performance como revestimento de superfície de morangos, conferindo propriedades conservantes e antifúngicas. Os revestimentos de morango sob concentração de 750 μ L/L de OE de *E. muticus* ou de *C. flexuosus* apresentaram os melhores resultados de conservação de morangos durante 15 dias de refrigeração.

Os dados adicionalmente destacaram a atividade quelante de íons Fe^{2+} do OE da espécie *E. muticus* e a similaridade no cluster (HCA) entre os OEs de *E. muticus* e *C. flexuosus*. Assim, o OE de *E. muticus* possui grande potencial para ser economicamente viável e cultivado, enquanto quehoje é um material vegetal subutilizado. Embora o *E. muticus* configure-se como uma planta nova ou alternativa com potenciais usos industriais, não foi possível realizar uma análise econômica, uma vez que ainda não foi adequadamente cultivada. Ao invés de queimar esta vegetação, os agricultores podem lucrar com o seu cultivo e extração do seu OE.

Sobre os extratos vegetais, foi observado que os solventes DES obtiveram excelentes valores para a extração de compostos antioxidantes e fenólicos dos capins, sendo o solvente de cloreto de colina e ácido acético o que obteve melhor desempenho para as três espécies avaliadas. As condições ótimas de extração determinadas foram: agitação eletromagnética em célula de vidro encamisada, temperatura de 60°C e tempo de extração de 150 min para o Em e 180 min para Cc e Cf. Por fim, o modelo matemático que mais se ajustou aos três processos extrativos

das três espécies vegetais afoi o modelo da lei da potência de segunda ordem, que apresentou valores baixos de erro ($< 0,27$) e valores de $R^2 > 0,93$.

5.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Maior aplicação do OE em aprodutos alimentícios, como por exemplo a aplicação em bebidas (chás, sucos, carbonatadas), já que o citral presente no capim limão é muito relacionado a bebidas, avaliando a aceitabilidade desse aditivo a partir de uma análise sensorial com avaliadores não treinados. Também poderiam passar por outros processos, sendo encapsulados ou adicionados a biofilmes.

Já os extratos de capim-limão, poderiam ser purificados ou utilizados em sua totalidade para uma aplicação *in vivo* como inseticida contra parasitas, antimicrobiano como foi realizado no OE ou mesmo utilizando em formulações de alimentos como um conservante/antioxidante dependendo do solvente empregado para a obtenção do DES.

Seria possível também explorar outros métodos extrativos, como micro-ondas para a obtenção de OEs sem a utilização de solventes e CO₂ supercrítico para obtenção de óleos essenciais e extratos a partir das plantas estudadas e dos resíduos gerados após o uso dos métodos de extração convencionais (hidrodestilação e/ou arraste de vapor).

REFERÊNCIAS

ABBOTT, A. P.; BOOTHBY, D.; CAPPER, G.; DAVIES, D. L.; RASHEED, R. K. Deep Eutectic Solvents Formed between Choline Chloride and Carboxylic Acids : Versatile Alternatives to Ionic Liquids. **JACS articles**, v. 126, n. 9, p. 9142–9147, 2004.

ABBOTT, A. P.; CAPPER, G.; DAVIES, D. L.; RASHEED, R. K.; TAMBYRAJAH, V. Novel solvent properties of choline chloride / urea mixtures. **ChemComm**, , n. November 2002, p. 70–71, 2003.

ABRAMOVIČ, H.; GROBIN, B.; POKLAR ULRIH, N.; CIGIĆ, B. The Methodology Applied in DPPH, ABTS and Folin-Ciocalteu Assays Has a Large Influence on the Determined Antioxidant Potential. **Acta Chimica Slovenica**, v. 64, n. 2, p. 491–499, 2017.

ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. **Allured Publishing Corporation: Carol Stream**, 2007.

ADUKWU, E. C.; ALLEN, S. C. H.; PHILLIPS, C. A. The anti-biofilm activity of lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*) and grapefruit (*Citrus paradisi*) essential oils against five strains of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 113, n. 5, p. 1217–1227, 2012.

ADUKWU, E. C.; BOWLES, M.; EDWARDS-JONES, V.; BONE, H. Antimicrobial activity, cytotoxicity and chemical analysis of lemongrass essential oil (*Cymbopogon flexuosus*) and pure citral. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2016.

AHMAD, A.; VILJOEN, A. The in vitro antimicrobial activity of *Cymbopogon* essential oil (lemon grass) and its interaction with silver ions. **Phytomedicine**, v. 22, n. 6, p. 657–665, 2015. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2015.04.002>>.

AJAYI, E. O.; SADIMENKO, A. P.; AFOLAYAN, A. J. GC-MS evaluation of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf oil obtained using modified hydrodistillation and microwave extraction methods. **Food Chemistry**, v. 209, p. 262–266, 2016. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.071>>.

ALI, M. C.; CHEN, J.; ZHANG, H.; et al. Effective extraction of flavonoids from *Lycium barbarum* L. fruits by deep eutectic solvents-based ultrasound-assisted extraction. **Talanta**, v. 203, n. May, p. 16–22, 2019. Elsevier B.V. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.05.012>>.

APROTOSOAIE, A. C.; HANCIANU, M.; COSTACHE, I.; MIRON, A. Linalool : a review on a key odorant molecule with valuable biological properties. **Flavours and Fragrance Journal**, v. 29, n. 4, p. 193–219, 2014.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYSIS CHEMISTS INTERNATIONAL (AOAC). **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 2000.

AVOSEH, O.; OYEDEJI, O.; RUNGQU, P.; NKEH-CHUNGAG, B.; OYEDEJI, A. Cymbopogon Species; Ethnopharmacology, Phytochemistry and the Pharmacological Importance. **Molecules**, v. 20, p. 7438–7453, 2015.

BABU, A. K.; KUMARESAN, G.; AROUL, V. A.; VELRAJ, R. Review of leaf drying : Mechanism and influencing parameters , drying methods , nutrient preservation , and mathematical models. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 90, n. December 2016, p. 536–556, 2018. Elsevier Ltd. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.04.002>>.

BAILÓ-GARCÍA, E.; MALDONADO-HÓDAR, F.; PÉREZ-CADENAS, A.; CARRASCO-MARÍN, F. Catalysts Supported on Carbon Materials for the Selective Hydrogenation of Citral. **Catalysts**, v. 3, p. 853–877, 2013.

BALAKRISHNAN, B.; PARAMASIVAM, S.; ARULKUMAR, A. Evaluation of the lemongrass plant (Cymbopogon citratus) extracted in different solvents for antioxidant and antibacterial activity against human pathogens. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 4, n. S1, p. 134–139, 2014.

BALTI, M. A. .; HARDRICH, B. .; KRIAA, K. .; KECHAOU, N. . Chemical Engineering & Processing: Process Intensification Lab-scale extraction of essential oils from Tunisian lemongrass (Cymbopogon flexuosus). **Chemical Engineering & Processing: Process Intensification**, v. 124, n. November 2017, p. 164–173, 2018. Elsevier. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cep.2017.12.012>>.

BASSOLÉ, I. H. N. N.; LAMIEN-MEDA, A.; BAYALA, B.; et al. Chemical composition and antimicrobial activity of Cymbopogon citratus and Cymbopogon giganteus essential oils alone and in combination. **Phytomedicine**, v. 18, n. 12, p. 1070–1074, 2011.

BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Brazilian essential oils: General view, developments and perspectives. **Quimica Nova**, v. 32, n. 3, p. 588–594, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0033-45452009000300011>> .

BOEIRA, C. P.; PIOVESAN, N.; SOQUETTA, M. B.; et al. Extraction of bioactive compounds of lemongrass, antioxidant activity and evaluation of antimicrobial activity in fresh chicken sausage. **Ciência Rural**, v. 48, n. 11, 2018.

CABRAL, F. C. F.; COSTA, A. B.; CESÁRIO, R.; SANTOS, E. Teoria de erros. 2013.

CANSIAN, R. L.; MOSSI, A. J.; OLIVEIRA, D. DE; et al. Atividade antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial de ho-sho (Cinnamomum camphora Ness e Eberm Var.

Linaloolifera fujita). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 2, p. 378–384, 2010.

CARDOSO, E. L.; ARAÚJO CRISPIM, S. M.; RODRIGUES, C. A. G.; BARIONI, W. Biomassa aérea e produção primária do estrato herbáceo em campo de *Elyonurus muticus* submetido à queima anual, no Pantanal. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 8, p. 1501–1507, 2000.

CHAGONDA, L. S.; MAKANDA, C.; CHALCHAT, J. The essential oils of wild and cultivated *Cymbopogon validus* (Stapf) Stapf ex Burttt Davy and *Elionurus muticus* (Spreng .) Kunth from Zimbabwe. **Flavour and fragrance journal**, v. 15, p. 100–104, 2000.

CHEMAT, F.; ROMBAUT, N.; SICAIRE, A. G.; et al. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 34, p. 540–560, 2017. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.06.035>>.

CHHIKARA, N.; KOUR, R.; JAGLAN, S.; et al. Citrus medica: nutritional, phytochemical composition and health benefits – a review. **Food and Function**, v. 9, n. 4, p. 1978–1992, 2018.

CIZ, M.; DENEV, P.; SLAVOV, A.; LOJEK, A. Different methods for control and comparison of antioxidant properties of vegetables Different methods for control and comparison of the antioxidant properties of vegetables ~ íz. **Food control**, v. 21, n. 4, p. 518–523, 2010.

DE CORATO, U.; MACCIONI, O.; TRUPO, M.; DI SANZO, G. Use of essential oil of *Laurus nobilis* obtained by means of a supercritical carbon dioxide technique against post harvest spoilage fungi. **Crop Protection**, v. 29, n. 2, p. 142–147, 2010. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2009.10.012>>.

COSTA, G.; GRANGEIA, H.; FIGUEIRINHA, A.; FIGUEIREDO, I. V.; BATISTA, M. T. Influence of harvest date and material quality on polyphenolic content and antioxidant activity of *Cymbopogon citratus* infusion. **Industrial Crops and Products**, v. 83, p. 738–745, 2016. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.12.008>>.

DAI, Y.; VERPOORTE, R.; CHOI, Y. H. Natural deep eutectic solvents providing enhanced stability of natural colorants from safflower (*Carthamus tinctorius*). **Food Chemistry**, v. 159, p. 116–121, 2014. Elsevier Ltd.

DAI, Y.; WITKAMP, G.; VERPOORTE, R.; CHOI, Y. H. Natural Deep Eutectic Solvents as a New Extraction Media for Phenolic Metabolites in *Carthamus tinctorius* L. **Analytical chemistry**, v. 85, p. 6272–6278, 2013.

DESAI, M. A.; PARIKH, J.; DE, A. K. Modelling and optimization studies on extraction of lemongrass oil from *Cymbopogon flexuosus* (Steud .) Wats. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 92, n. 5, p. 793–803, 2013. Institution of Chemical Engineers. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cherd.2013.08.011>>.

DESCHAMPS, C.; AMARAL, W.; BIZZO, H. R.; et al. TEOR E COMPOSIÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Elyonurus muticus* Sprengel (POACEAE) NOS CAMPOS GERAIS DA FLORESTA ATLANTICA DO ESTADO DO PARANÁ. VII SBOE - Simpósio Brasileiro de óleos essenciais. **Anais...** . p.1–2, 2013.

DZINGIRAI, B.; MUCHUWETI, M.; MURENJE, T.; et al. Phenolic content and phospholipids peroxidation inhibition by methanolic extracts of two medicinal plants : *Elionurus muticus* and *Hypoxis hemerocallidea*. **Journal of Biochemistry**, v. 1, n. 7, p. 137–141, 2007.

EKPENYONG, C. E.; AKPAN, E. E. Use of *Cymbopogon citratus* essential oil in food preservation: Recent advances and future perspectives. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 12, p. 2541–2559, 2017.

FARIAS, F. O.; PASSOS, H.; SANGLARD, M. G.; et al. Designer solvent ability of alcohols in aqueous biphasic systems composed of deep eutectic solvents and potassium phosphate. **Separation and Purification Technology**, v. 200, n. December 2017, p. 84–93, 2018. Elsevier. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.seppur.2018.02.029>>.

FAROOQ, S.; SEHGAL, A. Scrutinizing antioxidant interactions between green tea and some medicinal plants commonly used as herbal teas. , , n. June, p. 1–12, 2019.

FRANZEN, F. D. L.; LUCY, L.; FRIES, M.; et al. Teor e rendimento de extratos de flores obtidos por diferentes métodos e períodos de extração. **Acta Iguazu**, v. 7, n. 1, p. 9–21, 2018.

FÜLLER, T. N.; BERTRAND, C.; ANTONELLO, B.; et al. Chemical diversity of wild populations of *Elionurus muticus* (Spreng.) and the allelopathic effect of its essential oil. **Journal of Essential Oil Research**, v. 29, n. 6, p. 499–506, 2017. Taylor & Francis. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/10412905.2017.1313786>>.

FÜLLER, T. N.; BERTRAND, C.; BARROS, I. B. I.; NETO, J. F. B. *Elionurus muticus* as an Alternative Source of Citral from Pampa biome , Brazil. **Journal of Oleo Science**, v. 1116, n. 11, p. 1109–1116, 2014.

FÜLLER, T. N.; GUERRA, D.; WITTMANN, M. T. S.; et al. Genetic and cytogenetic structure of wild lemon grass (*Elionurus muticus*) populations. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 15, n. 4, p. 272–277, 2015. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84955562087&partnerID=40&md5=676a5540746a7d5408caa956637eb11e>>.

FÜLLER, T. N.; TESSELE, C.; BARROS, I. B. I.; BARBOSA NETO, J. F. Phenotypical, phytochemical and molecular characterization of “capim-carona” [*Elionurus muticus* (Spreng.) Kuntze] populations. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 3, p. 261–268, 2010.

GALVÃO, A. C.; COPETTI, M.; MAGRO, C. D.; ILTCHENCO, S.; ROBAZZA, S. Extração do óleo da polpa do abacate com Metanol e Etanol a diferentes temperaturas Oil extraction from the avocado pulp with methanol and ethanol at different temperatures. **Ciência e natureza**, v. 35, n. 2, p. 304–310, 2013.

GANJEWALA, D.; GUPTA, A. K. Lemongrass (*Cymbopogon flexuosus* Steud .) Wats Essential Oil : Overview and Biological Activities. **Essential Oils-II**, v. 37, n. September 2016, p. 234–262, 2013.

GAVAHIAN, M.; FARAHNAKY, A. Ohmic-assisted hydrodistillation technology: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 72, n. December 2017, p. 153–161, 2018.

GOLTZ, C.; ÁVILA, S.; BARBIERI, J. B.; IGARASHI-MAFRA, L.; MAFRA, M. R. Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from Macela (*Achyrocline satureioides*) extracts. **Industrial Crops and Products**, v. 115, n. February, p. 227–234, 2018. Elsevier. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.02.013>>.

GUIMARÃES, L. G. D. L.; CARDOSO, M. DAS G.; SOUSA, P. E. DE; ANDRADE, J. DE; VIEIRA, S. S. Atividades antioxidante e fungitóxica do óleo essencial de capim-limão Introdução Material e métodos. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, p. 464–472, 2011.

GUPTA, A. K.; MUHURY, R.; GANJEWALA, D. A Study on Antimicrobial Activities of Essential Oils of Different Cultivars of Lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*). **Pharmaceutical Sciences**, v. 22, n. 3, p. 164–169, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.15171/PS.2016.26>>.

HADJILOUKA, A.; MAVROGIANNIS, G.; MALLOUCHOS, A.; et al. Effect of lemongrass essential oil on *Listeria monocytogenes* gene expression. **LWT - Food Science and Technology**, v. 77, p. 510–516, 2017. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2016.11.080>>.

HAQUE, A. N. M. A.; REMADEVI, R.; NAEBE, M. Lemongrass (*Cymbopogon*): a review on its structure, properties, applications and recent developments. **Cellulose**, v. 25, n. 10, p. 5455–5477, 2018. Springer Netherlands. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10570-018-1965-2>>.

HESS, S. C.; PERES, M. T. L. P.; BATISTA, A. L.; et al. Evaluation of seasonal changes in chemical composition and antibacterial activity. **Quim. Nova**, v. 30, n. 2, p.

370–373, 2007.

HÖFLING, J. F.; GODOY, D. DE; BRAGADO, P.; ANIBAL, P. C.; BUSATO, S. N. Susceptibility Profile of the Essential Oil from *E. muticus* against *C. albicans* Biofilm. **EC Dental Science**, v. 8, p. 1844–1857, 2019.

IBGE, F. I. B. DE G. E E. Manual técnico da vegetação brasileira. **Manuais técnicos em Geociências**, v. 1, p. 92, 1992.

IDREES, M.; DAR, T. A.; NAEEM, M.; et al. Effects of gamma-irradiated sodium alginate on lemongrass: Field trials monitoring production of essential oil. **Industrial Crops and Products**, v. 63, p. 269–275, 2015. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.09.037>>.

ISHKEH, S. R.; ASGHARI, M.; SHIRZAD, H.; ALIREZALU, A. Scientia Horticulturae Lemon verbena (*Lippia citrodora*) essential oil effects on antioxidant capacity and phytochemical content of raspberry (*Rubus ulmifolius* subsp . *sanctus*). **Scientia Horticulturae**, v. 248, p. 297–304, 2019. Elsevier. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.12.040>>.

LAWRENCE, G. Taxonomia das plantas Vasculares. **Lisboa: Fundação Galouste Gulbenkian**, p. 1–296, 1951.

LERMEN, C.; MORELLI, F.; GAZIM, Z. C.; et al. Essential oil content and chemical composition of *Cymbopogon citratus* inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi under different levels of lead. **Industrial Crops and Products**, v. 76, p. 734–738, 2015.

LEWIS, J. P.; PIRE, E. F.; PRADO, D. E.; et al. Plant communities and phytogeographical position of a large depression in the Great Chaco , Argentina. **Kluwer Academic Publisher**, p. 25–38, 1990.

DE LIMA, A. B. S.; QUEIROGA, I. M. B. N.; SILVA, G. M. DE S.; et al. Characterization and application of lippia alba (Mill) and cymbopogon citratus d.c. stapf. essential oils as natural sanitizers in coriander. **Food Science and Technology**, v. 39, n. 4, p. 993–998, 2019.

LINSTROM, P. J.; MALLARD, W. G. NIST Chemistry Webbook. .

LONGO, L. S.; CRAVEIRO, M. V. Deep Eutectic Solvents as Unconventional Media for Multicomponent Reactions. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 29, n. 10, p. 1999–2025, 2018.

LONKAR, P. B.; CHAVAN, U. D.; PAWAR, V. D.; BANSODE, V. V.; AMAROWICZ, R. Studies on preparation and preservation of lemongrass (*cymbopogon flexuosus* (steud) wats) powder for tea. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v. 25, n. 8,

p. 585–592, 2013.

MACHADO, T. F. .; PEREIRA, R. C. A. .; SOUZA, C. T. .; BATISTA, V. C. V. . . ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DO CAPIM LIMÃO (*Cymbopogon citratus*) E SUA INTERAÇÃO COM OS COMPONENTES DOS ALIMENTOS. **B.CEPPA**, v. 33, n. n. 1, p. 30–38, 2015.

MAN, H. C.; HAMZAH, M. H.; JAMULUDIN, H.; ABIDIN, Z. Z. Preliminary Study : Kinetics of Oil Extraction from Citronella Grass by Ohmi Heated Hydro Distillation. **APCBEE Procedia**, v. 3, n. 2012, p. 124–128, 2012.

MARONGIU, B.; PIRAS, A.; PORCEDDA, S.; TUVERI, E. Comparative analysis of the oil and supercritical CO₂ extract of *Cymbopogon citratus* Stapf. **Natural Product Research**, v. 20, n. 5, p. 455–459, 2006.

MARTINS, M. A. R.; PINHO, S. P.; COUTINHO, J. A. P. Insights into the Nature of Eutectic and Deep Eutectic Mixtures. **Journal of Solution Chemistry**, , n. 0123456789, 2018. Springer US. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10953-018-0793-1>>. .

MASWAL, M.; DAR, A. A. Formulation challenges in encapsulation and delivery of citral for improved food quality. **Food Hydrocolloids**, v. 37, p. 182–195, 2013. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.10.035>>. .

MCLAFFERTY, F. .; STENHAGEN, E. .; ABRAHAMSSON, S. **Wiley Registry of Mass Spectral Data**. 6th edn. ed. New York: Wiley Interscience, 1994.

MENG, Z.; ZHAO, J.; DUAN, H.; GUAN, Y.; ZHAO, L. Green and efficient extraction of four bioactive flavonoids from Pollen Typhae by ultrasound-assisted deep eutectic solvents extraction. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 161, p. 246–253, 2018. Elsevier B.V. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.08.048>>. .

MOG, S. R.; ZANG, Y. J. Safety Assessment of Food Additives : Case Example With Myrcene , a Synthetic Flavoring Agent. **Toxicologic Pathology**, v. 47, n. 8, p. 1035–1037, 2019.

AL NAQQASH, Z. A.; AL-BAZAZ, H. K.; SALH, F. M.; IBRAHEEM, S. Q. GC-Mass and phytochemical investigation of *Cymbopogon citratus*. **Research Journal of Pharmacy and Technology**, v. 12, n. 1, p. 67–73, 2019.

NATH, S. C.; SAHA, B. N.; BORDOLOI, D. N.; MATHUR, R. K.; LECLERCQ, P. A. The chemical composition of the essential oil of *Cymbopogon flexuosus* (Steud) Wats. growing in Northeast India. **Journal of Essential Oil Research**, v. 6, n. 1, p. 85–87, 1994.

NOGUEIRA, A. S. L.; PINHEIRO, F. D. P.; REIS, N. P.; LUCENA, K. O. C. **ETANOL E METANOL: VANTAGENS E DESVANTAGENS QUANTO AO USO NA PRODUÇÃO DE BIODIESEL NO BRASIL**. 2018.

NUR AIN, A. H.; ZAIBUNNISA, A. H.; HALIMAHTON ZAHRAH, M. S.; NORASHIKIN, S. An experimental design approach for the extraction of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oleoresin using pressurised liquid extraction (PLE). **International Food Research Journal**, v. 20, n. 1, p. 451–455, 2013.

OKOH, S.; ASEKUN, O.; FAMILONI, O.; AFOLAYAN, A. Antioxidant and Free Radical Scavenging Capacity of Seed and Shell Essential Oils Extracted from *Abrus precatorius* (L). **Antioxidants**, v. 3, n. 2, p. 278–287, 2014.

OLADEJI, O. S.; ADELOWO, F. E.; AYODELE, D. T.; ODELADE, K. A. Phytochemistry and pharmacological activities of *Cymbopogon citratus* fenolicos.pdf. **Scientific African**, v. 6, n. e00137, 2019.

OLSZOWY, M.; DAWIDOWICZ, A. L. Essential oils as antioxidants: their evaluation by DPPH, ABTS, FRAP, CUPRAC, and β -carotene bleaching methods. **Monatshefte fur Chemie**, v. 147, n. 12, p. 2083–2091, 2016.

PARIKH, J. K.; DESAI, M. A. Hydrodistillation of essential oil from *Cymbopogon flexuosus*. **International Journal of Food Engineering**, v. 7, n. 1, 2011.

PARKER, G. L.; SMITH, L. K.; BAXENDALE, I. R. Development of the industrial synthesis of vitamin A. **Tetrahedron**, v. 72, n. 13, p. 1645–1652, 2016. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tet.2016.02.029>>. .

PINTO, D. A.; MANTOVANI, E. C.; MELO, DE C.; SEDIYAMA, G. C.; VIEIRA, G. H. S. Produtividade e qualidade do óleo essencial de capim-limão, *Cymbopogon citratus*, DC., submetido a diferentes lâminas de irrigação. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 1, p. 54–61, 2014.

QU, W.; PAN, Z.; MA, H. Extraction modeling and activities of antioxidants from pomegranate marc. **Journal of Food Engineering**, v. 99, n. 1, p. 16–23, 2010. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.01.020>>. .

REICHARDT, C. **Solvents and solvent effects in organic chemistry**. 2003.

RORIZ, C. L.; BARROS, L.; CARVALHO, A. M.; SANTOS-BUELGA, C.; FERREIRA, I. C. F. R. Scientific validation of synergistic antioxidant effects in commercialised mixtures of *Cymbopogon citratus* and *Pterospartum tridentatum* or *Gomphrena globosa* for infusions preparation. **Food Chemistry**, v. 185, p. 16–24, 2015.

RUEAS-RAMÓN, M.; FIGUEROA-ESPINOZA, M. C.; DURAND, E. Application of

Deep Eutectic Solvents (DES) for Phenolic Compounds Extraction: Overview, Challenges, and Opportunities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, p. 3591–3601, 2017.

SABINI, L. I.; GABRIELLI, P. C.; TORRES, C. V; et al. Study of the cytotoxic and antifungal activity of the essential oil of *Elyonurus muticus* against *Candida* spp . , v. 11, n. December, p. 31–33, 2006.

SASIDHARAN, S. .; CHEN, Y. .; SARAVANAN, D. .; SUNDRAM, K. M. .; LATHA, L. Y. . EXTRACTION, ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM PLANTS' EXTRACTS. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines: AJTCAM**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2011.

SCHANEBERG, B. T.; KHAN, I. A. Comparison of Extraction Methods for Marker Compounds in the Essential Oil Lemon Grass by GC. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 6, p. 1345–1349, 2002.

SCRAMIN, S.; SAITO, M. L.; POTT, A.; MARQUES, M. O. M. Essential Oil of *Elyonurus muticus* (Sprengel) Essential Oil of *Hyonurus muficus* (Sprengel) 0 . Kuntze (Gram i neae). **J. Essent. Oil Res.**, v. 12, p. 298–300, 2000.

SEAB/PARANÁ. **Levantamento do valor bruto da produção agropecuária: produtos especiais**; 2017.

SHARAFZADEH, S.; KHOSH-KHUI, M.; JAVIDNIA, K. Aroma Profile of Leaf and Stem of Lemon Balm (*Melissa Officinalis* L .) Grown under Greenhousr Conditions. **Advances in Environmental Biology**, v. 5, n. 4, p. 547–550, 2011.

SHI, C.; SONG, K.; ZHANG, X.; et al. Antimicrobial activity and possible mechanism of action of citral against *cronobacter sakazakii*. **PLoS ONE**, v. 11, n. 7, p. 1–12, 2016.

SILVA, C. M. S. .; BEGNAMI, A. F. .; OLIVEIRA, A. S. S. .; et al. Estudo da composição química e da atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Elyonurus muticus* (Sprengel) Kuntze. **Sociedade Brasileira de Química**, 2009.

DA SILVA, F. M.; JONES, J. Reações orgânicas em meio aquoso. **Química Nova**, v. 24, n. 5, p. 646–657, 2001.

SILVEIRA, S. M.; JÚNIOR, A. C.; SCHEUERMANN, G. N.; SECCHI, F. L.; VIEIRA, C. R. W. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from selected herbs cultivated in the South of Brazil against food spoilage and foodborne pathogens. **Ciência Rural**, v. 42, n. 7, p. 1300–1306, 2012.

SINEIRO, J.; DOMÍNGUEZ, H.; NÚÑEZ, M. J.; LEMA, J. M. Ethanol extraction of polyphenols in an immersion extractor. Effect of pulsing flow. **JAOCs, Journal of the**

American Oil Chemists' Society, v. 73, n. 9, p. 1121–1125, 1996.

SINGH, S.; DAS, S. S.; SINGH, G.; et al. Composition, in vitro antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and oleoresins obtained from black cumin seeds (*Nigella sativa* L.). **BioMed Research International**, 2014.

SIVAKUMAR, D.; BAUTISTA-BAÑOS, S. A review on the use of essential oils for postharvest decay control and maintenance of fruit quality during storage. **Crop Protection**, v. 64, p. 27–37, 2014.

SOLTOFT-JENSEN, J.; HANSEN, F. **New Chemical and Biochemical Hurdles**. 2005.

STEFANAZZI, N.; STADLER, T.; FERRERO, A. Composition and toxic, repellent and feeding deterrent activity of essential oils against the stored-grain pests *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) and *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae). **Pest Management Science**, v. 67, n. 6, p. 639–646, 2011.

STOICA, M.; DIMA, C.; COMAN, G.; ALEXE, P.; NEAGOIE, A. Antioxidant and antibacterial activity of *Cymbopogon citratus* and *Syzygium aromaticum* essential oils alone and in combination. **Journal of Science and Arts**, v. 3, n. 3, p. 715–722, 2019.

THE CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing CLSI supplement M100S**. 2016.

TONGNUANCHAN, P.; BENJAKUL, S. Essential Oils: Extraction, Bioactivities, and Their Uses for Food Preservation. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 7, p. 1231–1249, 2014.

TRAN, T. T. A.; NGUYEN, H. V. H. Effects of Spray-Drying Temperatures and Carriers on Physical and Antioxidant Properties of Lemongrass Leaf Extract Powder. **Beverages**, v. 4, n. 4, p. 84, 2018.

VELLASCO JÚNIOR, W. T. Acetona (CAS No. 67-64-1). **Revista Virtual de Química**, v. 3, n. 4, p. 1–5, 2011.

VERMA, R. S.; SINGH, S.; PADALIA, R. C.; et al. Essential oil composition of the sub-aerial parts of eight species of *Cymbopogon* (Poaceae). **Industrial Crops and Products**, v. 142, n. October, p. 111839, 2019. Elsevier. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111839>>.

VIUDA-MARTOS, M.; GENDY, A.; SENDRA, E.; et al. Chemical Composition and Antioxidant and Anti-*Listeria* Activities of Essential Oils Obtained from Some Egyptian Plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 16, p. 9063–9070,

2010.

WASICKY, R. Uma modificação do aparelho de clewenger para extração de óleos essenciais. **Revista Faculdade de farmácia e Bioquímica**, v. 1, n. 1, p. 77–81, 1963.

WIFEK, M.; SAEED, A.; REHMAN, R.; NISAR, S. Lemongrass : a review on its botany , properties , applications and active components. **International Journal of Chemical and Biochemical Sciences**, v. 9, p. 79–84, 2016.

XU, W. J.; ZHAI, J. W.; CUI, Q.; et al. Ultra-Turrax® based ultrasound-assisted extraction of five organic acids from honeysuckle (*Lonicera japonica* Thunb.) and optimization of extraction process. **Separation and Purification Technology**, v. 166, p. 73–82, 2016. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.seppur.2016.04.003>>.

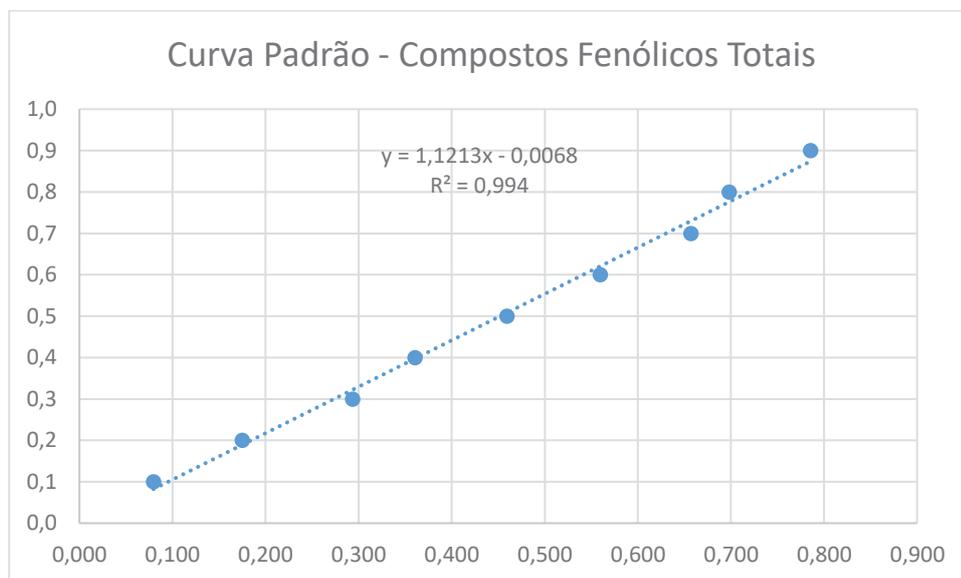
ANEXO A – Curva padrão: compostos fenólicos totais

Fig. 1 – Curva padrão do teor de compostos fenólicos totais.

ANEXO B – Ficha teste morango

Nome: _____ Idade: _____ Sexo: _____ data: _____

Você está recebendo amostras de morango. Analise cada amostra da esquerda para a direita para: Cor/Aparência, Odor e Potencial de compra.

Utilizando a escala abaixo responda o quanto você gostou ou desgostou de cada amostra:

1	Excelente
2	Muito bom
3	Bom
4	Gostei
5	Aceitável
6	Indiferente
7	Desgostei
8	Ruim
9	Desgostei muito
10	Inaceitável

Amostra	Cor/Aparência	Odor	Potencial de compra
P1			
Cc1			
Cc2			
Cf1			
Cf2			
Em1			
Em2			

Obrigado!

ANEXO C – Ficha teste morango decaimento fúngico

Nome: _____ Idade: _____ Sexo: _____ data: _____

Você está recebendo amostras de morango. Analise cada amostra da esquerda para a direita para: Características fúngicas

Utilizando a escala abaixo responda o quanto você gostou ou desgostou de cada amostra:

1	Excelente (sem alteração do inicial)
2	Muito bom (alteração mínima)
3	Bom (alteração)
4	Gostei (alteração até 5%)
5	Aceitável (alteração de 6-12%)
6	Indiferente (alteração de 13-20%)
7	Desgostei ligeiramente (alteração de 21-35%)
8	Desgostei (alteração de 36-50%)
9	Desgostei muito (alteração de 51-75%)
10	Desgostei muitíssimo (alteração de 76-100%)

Amostra	Características fúngicas
P1	
Cc1	
Cc2	
Cf1	
Cf2	
Em1	
Em2	

Obrigado!

ANEXO D – Cromatogramas das três espécies vegetais

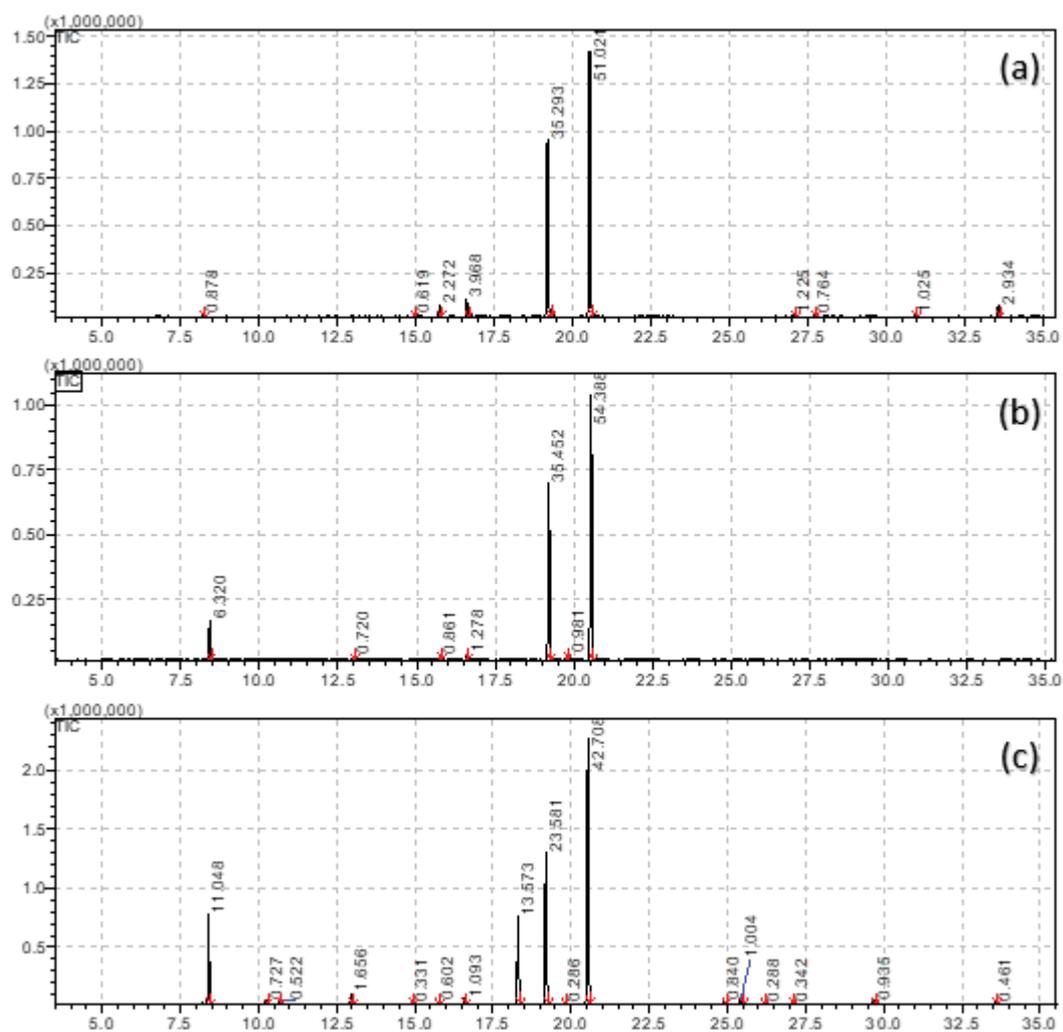


Fig. 2 – Cromatogramas dos OE das espécies: (a) *C. flexuosus*, (b) *C. citratus* e (c) *E. muticus*.