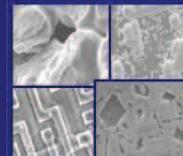




PUCRS

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E  
TECNOLOGIA DE MATERIAIS**

Faculdade de Engenharia  
Faculdade de Física  
Faculdade de Química



PGETEMA

## **ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE CAPIM LIMÃO E SUAS FRAÇÕES PARA PRODUTOS DE HIGIENE CORPORAL**

**Manuel Alves Falcão**

FARMACÊUTICO

ORIENTADOR: PROF. DR. Eduardo Cassel

Dissertação de Mestrado realizada no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais (PGETEMA) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia e Tecnologia de Materiais.

**Porto Alegre  
Janeiro, 2012**

*“Está demonstrado que o que existe não pode ser diferente; porque, tendo tudo sido criado para um fim é para o melhor dos fins.”*

*Dr. Pangloss, em Cândido de Voltaire*

## **DEDICATÓRIA**

Dedico esta dissertação a minha família.

## **AGRADECIMENTOS**

A todos colaboradores e amigos do Laboratório de Operações Unitárias da PUCRS pelas amizades realizadas, pelas conversas do dia a dia, pelas ajudas e por propiciarem um ambiente de trabalho/estudo tão saudável. Em especial gostaria de agradecer ao professor Dr. Eduardo Cassel pelas oportunidades que recebi nestes dois anos (e espero continuar as recebendo), ao professor Dr. Rubem M. F. Vargas pelos auxílios e ao Cícero Bedinot por sempre estar disposto a auxiliar independente do problema.

A todos meus amigos, colegas e familiares, pelas conversas e apoio.

Aos três principais pilares de minha personalidade a vó Zilah, ao vô Ary e a mãe Fátima Alves.

A minha família Fátima J. Alves, Laura A. Falcão, Alessandro M. Rizzo, Guilherme F. Rizzo e a minha namorada Natasha Kuniechick.

## SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>DEDICATÓRIA</b> .....                               | <b>4</b>  |
| <b>AGRADECIMENTOS</b> .....                            | <b>5</b>  |
| <b>SUMÁRIO</b> .....                                   | <b>6</b>  |
| <b>LISTA DE FIGURAS</b> .....                          | <b>9</b>  |
| <b>LISTA DE TABELAS</b> .....                          | <b>11</b> |
| <b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....                     | <b>12</b> |
| <b>RESUMO</b> .....                                    | <b>13</b> |
| <b>ABSTRACT</b> .....                                  | <b>14</b> |
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....                             | <b>15</b> |
| <b>2. OBJETIVOS</b> .....                              | <b>17</b> |
| 2.1. Objetivos Específicos .....                       | 17        |
| <b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....                  | <b>18</b> |
| 3.1. Óleos Essenciais.....                             | 18        |
| 3.1.1. Terpenos.....                                   | 19        |
| 3.1.1. Óleo essencial de <i>C. citratus</i> .....      | 20        |
| 3.2. Extração de Óleos Essenciais.....                 | 21        |
| 3.2.1. Extração por Arraste a Vapor.....               | 21        |
| 3.3. Fracionamento de Óleos Essenciais .....           | 23        |
| 3.3.1. Destilação Fracionada a vácuo.....              | 23        |
| 3.3.2. Pré-fracionamento.....                          | 24        |
| 3.4. Caracterização de Óleos Essenciais .....          | 24        |
| 3.4.1. Cromatografia Gasosa.....                       | 24        |
| 3.4.2. Espectrometria de massas.....                   | 25        |
| 3.4.3. Detector de Ionização em Chama.....             | 25        |
| 3.5. Análise Estatística.....                          | 26        |
| 3.6. Atividade Antimicrobiana de Óleos Essenciais..... | 26        |
| 3.6.1. Bioautografia .....                             | 27        |
| 3.6.2. Concentração Inibitória Mínima .....            | 28        |
| <b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....                    | <b>29</b> |
| 4.1. Amostras.....                                     | 29        |

|  |           |
|--|-----------|
| 4.1.1. Destilação Fracionada a Vácuo .....   | 29        |
| 4.1.2. Pré-Fracionamento .....   | 30        |
| <b>4.2. Caracterização do Óleo Essencial e Suas Frações .....</b>  | <b>31</b> |
| <b>4.3. Análise Estatística.....</b>   | <b>31</b> |
| <b>4.4. Determinação da Atividade Antimicrobiana .....</b>   | <b>32</b> |
| 4.4.1. Bioautografia .....   | 32        |
| 4.4.1.1. Cromatografia em Camada Delgada.....  | 32        |
| 4.4.1.2. Preparação dos Inóculos e Meios de Cultura .....  | 33        |
| 4.4.1.3. Bioautografia.....  | 33        |
| 4.4.2. Concentração Inibitória Mínima .....  | 34        |
| <b>4.5. Formulação de Sabonetes para Higiene Corporal.....</b>   | <b>34</b> |
| <b>4.6. Determinação da Atividade Antimicrobiana dos Sabonetes Formulados com o Óleo Essencial de Capim Limão e suas Frações .....</b> | <b>35</b> |
| 4.6.1. Avaliação de Eficácia Antimicrobiana de Sabonetes Formulados Utilizando Frações do Óleo Essencial de Capim Limão.....           | 35        |
| 4.6.1.1. Contagem do Número Total de Microrganismos Mesofílicos.....   | 35        |
| 4.6.1.2. Teste de Eficácia Antimicrobiana.....   | 36        |
| 4.6.2. Diferenciação da Atividade Antimicrobiana das Amostras de Sabonetes.  | 36        |
| <b>5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>   | <b>37</b> |
| <b>5.1. Amostras Obtidas por Destilação Fracionada a Vácuo .....</b>   | <b>37</b> |
| 5.1.1. Fracionamento do Óleo Essencial de <i>C. citratus</i> por Destilação Fracionada a Vácuo .....                                   | 37        |
| 5.1.1. Análise Estatística.....  | 40        |
| 5.1.2. Avaliação da Atividade Antimicrobiana pelo Método de Bioautografia Indireta .....   | 41        |
| 5.1.3. Determinação da Concentração Inibitória Mínima .....  | 42        |
| <b>5.2. Resultados das Frações Obtidas pelo Pré-Fracionamento .....</b>  | <b>43</b> |
| 5.2.1. Pré-Fracionamento .....   | 43        |
| 5.2.1. Análise Estatística.....  | 46        |
| 5.2.2. Avaliação da Atividade Antimicrobiana pelo Método de Bioautografia Indireta .....   | 47        |
| 5.2.3. Determinação da Concentração Inibitória Mínima .....  | 50        |
| <b>5.3. Determinação da Atividade Antimicrobiana dos Sabonetes Formulados...</b>   | <b>51</b> |
| 5.3.1. Contagem do Número Total de Microrganismos Mesofílicos.....   | 51        |

|  |           |
|--|-----------|
| 5.3.2. Teste de Eficácia Antimicrobiana.....                                 | 51        |
| 5.3.3. Diferenciação da Atividade Antimicrobiana das Amostras de Sabonetes . | 51        |
| <b>6. CONCLUSÕES .....</b>   | <b>54</b> |
| <b>7. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS .....</b>                             | <b>56</b> |
| <b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>                                    | <b>57</b> |

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 3.1: A imagem 1 representa a molécula do isopreno, a 2a a molécula do mentol, a 3a a molécula de geraniol e as 2b e 3b uma representação para melhor visualização da constituição das moléculas (2a e 3a) por duas de isopreno (adaptado de Teisseire, 1994). ..... 19
- Figura 3.2: Cortes histológicos: nas imagens 1 e 2 cortes histológicos de folhas de *C. citratus*, as setas indicam as células de armazenamento de óleo essencial (Lewinsohn *et al.*, 1997). ..... 20
- Figura 4.1: Esquema do aparelho de destilação fracionada a vácuo, com o aquecedor (1), balão de três bocas (2), entrada de tubo capilar (3), transmissor de temperatura (TT1), coluna recheada (4), controlador de temperatura (CT1), transmissor de temperatura (TT2), condensadores (5, 6), balão (7), bomba de vácuo (BV) e banho termostático (BT). ..... 30
- Figura 5.1: [1] Destilação fracionada a vácuo do óleo essencial de *C. citratus*, obtendo-se 03 frações (F1, F2 e F3); [2] Fracionamento da fração residual (F3), obtendo-se 02 frações (F3a e F3b); [3] Redestilação da fração residual (F3a), obtendo-se duas novas frações (F3a1 e F3a2)... 38
- Figura 5.2.: Comportamento de variação dos compostos para as frações obtidas por destilação fracionada a vácuo. .... 40
- Figura 5.3.: Comportamento de variação das frações obtidas por destilação fracionada a vácuo ..... 41
- Figura 5.4.: Dendograma de similaridade entre as frações obtidas por destilação fracionada a vácuo. .... 41
- Figura 5.6.: Comportamento da variação dos compostos para as frações obtidas pelo pré-fracionamento associado à destilação por arraste a vapor. .... 46
- Figura 5.7.: Comportamento da variação entre as frações obtidas pelo pré-fracionamento associado à destilação por arraste a vapor. .... 46
- Figura 5.8.: Dendograma de similaridade entre as frações obtidas por destilação fracionada a vácuo. .... 47
- Figura 5.9: Gráfico de colunas das amostras que geraram halo de inibição frente a *S. aureus* com os respectivos desvios padrões. .... 49
- Figura 5.10: Gráfico de colunas das amostras que geraram halo de inibição frente a *S. Choleraesuis* com os respectivos desvios padrões. .... 49

- Figura 5.11: Gráfico de colunas das amostras que geraram halo de inibição frente a *P. aeruginosa* com os respectivos desvios padrões.....49
- Figura 5.12: Diâmetro dos halos de inibição frente a *S. aureus*, gerados pelas amostras de sabonetes. ....52
- Figura 5.13: Diâmetro dos halos de inibição frente a *S. Choleraesuis*, gerados pelas amostras de sabonetes. ....53

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| Tabela 3.1: Processos mais utilizados para obtenção de óleos essenciais. ....   | 22 |
| Tabela 5.1: Condições de fracionamento do óleo essencial de <i>C. citratus</i> através de destilação fracionada a vácuo. ....   | 37 |
| Tabela 5.2: Composição química do óleo essencial de <i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf. Os valores são apresentados em porcentagem de área conforme a identificação dos compostos do óleo essencial e suas frações por cromatografia gasosa e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa. ....   | 39 |
| Tabela 5.3: Resultados da determinação da atividade antimicrobiana obtidos por bioautografia indireta. ....   | 42 |
| Tabela 5.4: Concentração inibitória mínima do óleo essencial de <i>C. citratus</i> e suas frações obtidas por destilação fracionada a vácuo. ....   | 43 |
| Tabela 5.5: Dados obtidos durante a extração do óleo essencial de <i>C. citratus</i> por arraste a vapor realizado na usina da empresa Tekton Óleos Essenciais Ltda. ....   | 44 |
| Tabela 5.6 – Composição química do óleo essencial de <i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf. Os valores são apresentados em porcentagem de área conforme a identificação dos compostos do óleo essencial e suas frações. As análises foram feitas por CG e CG/EM. NI = O composto não pode ser identificado. OE = óleo essencial. IR = Índice de retenção. .... | 45 |
| Tabela 5.7: Média dos diâmetros de halo de inibição gerado pelas amostras e os respectivos desvios padrões (DP) frente aos microrganismos testados. ....  | 48 |
| Tabela 5.8: Concentração inibitória mínima do óleo essencial de <i>C. citratus</i> e suas frações obtidas pelo pré-fracionamento. ....  | 50 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|       |  |
|-------|--|
| ATCC  | <i>American Type Culture Collection</i>                    |
| CCD   | Cromatografia em Camada Delgada                            |
| CIM   | Concentração Inibitória Mínima                             |
| CG    | Cromatografia Gasosa                                       |
| CLSI  | <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>         |
| DMSO  | Dimetilsulfoxido   |
| eV    | Eletron-Volt   |
| EM    | Espectrometria de Massas                                   |
| INT   | <i>Iodonitrotetrazolium Violet</i>                         |
| IR    | Índice de Retenção   |
| LOPE  | Laboratório de Operações Unitárias                         |
| NCCLS | <i>National Commitee for Clinical Laboratory Standards</i> |
| OE    | Óleo Essencial   |
| PCA   | <i>Principal Component Analysis</i>                        |
| pH    | Potencial Hidrogeniônico                                   |
| PUCRS | Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul      |
| UFC   | Unidade Formadora de Colônia                               |

## RESUMO

FALCÃO, Manuel Alves. **Estudo da atividade antimicrobiana do óleo essencial de capim limão e suas frações para produtos de higiene corporal.** Porto Alegre-RS. 2012. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais, PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL.

Os óleos essenciais são substâncias naturais compostas por moléculas terpenóides e fenilpropânicas, as quais têm variadas ações biológicas como antifúngica, antibacteriana, anti-helmíntica, carrapaticida, antineoplásica, entre outras. Baseados na ação antimicrobiana de óleos essenciais e no apelo para produtos de origem natural, este trabalho tem por objetivo desenvolver agentes antimicrobianos tanto para conservação quanto para exercer ação antimicrobiana em produtos de higiene corporal utilizando o óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (capim-limão) extraído por arraste a vapor e suas frações. As frações do óleo essencial de capim limão foram obtidas por duas metodologias de fracionamento: a destilação fracionada a vácuo e um pré-fracionamento associado ao processo de extração por arraste a vapor. As amostras foram analisadas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa, resultando na composição em função das condições de fracionamento para cada amostra. Após as análises, foram realizados ensaios de atividade antimicrobiana das frações frente aos seguintes microrganismos: *Salmonella Choleraesuis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. A partir de uma seleção de amostras de frações, foram formulados diferentes sabonetes e, testada sua atividade antimicrobiana. Nestes testes foi possível observar a viabilidade da troca de agentes antimicrobianos sintéticos por conservantes originários de produtos naturais, assim como ficou evidente a necessidade da maior utilização de processos para a valorização de produtos de origem natural.

Palavras-Chaves: Óleos Essenciais, Atividade Antimicrobiana, Destilação Fracionada a Vácuo, *Cymbopogon citratus*, Destilação por Arraste a Vapor.

## ABSTRACT

FALCÃO, Manuel Alves. **Study of antimicrobial activity of essential oil of lemongrass and its fractions for body care products.** Porto Alegre. 2012. Master Thesis. Pos-Graduation Program in Materials Engineering and Technology, PONTIFICAL CATHOLIC UNIVERSITY OF RIO GRANDE DO SUL.

Essential oils are natural substances composed of terpenoids and phenylpropanoids molecules, which have various biological actions such as antifungal, antibacterial, anthelmintic, antineoplastic, among others. Based on the strong antimicrobial activity of essential oils and strong appeal for products without artificial preservatives, this work aims to develop antimicrobial agents of natural origin for both conservation and to exert antimicrobial activity in body care products using *Cymbopogon citratus* essential oil (EO) extracted by steam distillation. To increase the antimicrobial activity of the EO against microorganisms two different methods of fractionation were used the vacuum distillation and a step of pre-fractionation. All samples were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS). After analysis, antimicrobial activity experiments of the against: *Salmonella Choleraesuis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. Different samples of fractions were selected and different soaps have been formulated, and after, tested for determination of antimicrobial activity. In these tests it was possible to observe the viability of change synthetic preservatives by preservatives from natural products origin, was also evident the need for greater use of procedures for the enrichment of natural products.

Key-words: Essential oils, Antimicrobial Activity, Vacuum Distillation, *Cymbopogon citratus*, Steam Distillation.

## 1. INTRODUÇÃO

Desde o início da civilização, as pessoas já eram atraídas pelas substâncias voláteis das especiarias, caracterizadas pelos fortes odores ou sabores, as quais são uma grande variedade de metabólitos secundários das plantas. A comida era aromatizada com fragrâncias de ervas; personalidades, as quais se queriam honrar, eram unguidas com óleos; o ar em locais de atos de culto era saturado com incenso, mirra, benjoim e outras substâncias perfumadas; e até mesmo os mortos eram perfumados com plantas e outros produtos aromáticos antes do enterro (Teisseire, 1994 e Bruneton, 2001).

Inicialmente, as próprias plantas eram utilizadas e, com o passar do tempo, os óleos essenciais começaram a ser extraídos. Porém, só durante a idade média a destilação foi utilizada para a preparação de água aromatizada e, quando o óleo aparecia na superfície da água, era tido como uma impureza. Com o passar dos séculos o produto de interesse das destilações virou o óleo, assim os processos extrativos de óleos essenciais começaram a se aprimorar (Teisseire, 1994).

Os óleos essenciais são originários do metabolismo secundário das plantas e possuem composição química complexa, destacando-se a presença de terpenos e fenilpropanóides. Estes estão relacionados com diversas funções necessárias à sobrevivência vegetal, exercendo papel fundamental na defesa da planta. Apresenta, entre outras, atividades antimicrobianas (Bakkali *et al.*, 2008; Rossi *et al.*, 2007; Sabulal *et al.*, 2007; Santoyo *et al.*, 2005 e Tan *et al.*, 2007).

Devido a esta grande quantidade de atividades biológicas, os óleos essenciais atualmente são uma alternativa para a indústria farmacêutica na busca de novos produtos e alternativas para os componentes sintéticos de suas formulações.

Neste estudo, é avaliada a atividade antimicrobiana do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.) e de suas frações, obtidas por dois métodos distintos, frente a três microrganismos: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* subespécie *enterica* Sorovar Choleraesuis e *Pseudomonas aeruginosa*, para posterior aplicação do óleo ou de suas frações em produtos de higiene corporal.

## 2. OBJETIVOS

Avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *C. citratus* e suas respectivas frações obtidas por dois métodos: pré-fracionamento associado ao processo de destilação por arraste a vapor e destilação fracionada a vácuo frente às seguintes bactérias: *S. aureus*, *S. Choleraesuis* e *P. aeruginosa*, visando à incorporação dos mesmos na formulação de agentes de higiene pessoal.

### 2.1. Objetivos Específicos

- Extrair o óleo essencial de *C. citratus* por arraste a vapor.
- Realizar o pré-fracionamento do óleo essencial de capim limão durante o processo de extração por arraste a vapor.
- Obter frações do óleo essencial de capim limão por destilação fracionada a vácuo.
- Identificar e quantificar os compostos químicos no óleo essencial e suas frações por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa e cromatografia gasosa com detector de ionização de chama.
- Avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial e suas frações qualitativamente pelo método de bioautografia indireta.
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) do óleo essencial e suas frações.
- Desenvolver e implantar uma metodologia para diferenciação da atividade antimicrobiana das amostras de sabonetes.
- Avaliação da eficácia antimicrobiana de sabonetes formulados utilizando frações do óleo essencial de capim limão

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Óleos Essenciais

Os óleos essenciais (OE) são metabólitos secundários produzidos por plantas, sendo misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas. Seus principais componentes são terpenóides (preponderantes) e fenilpropanóides (Simões *et al.*, 1999).

A biossíntese de terpenos ocorre em diferentes órgãos da planta como pelos glandulares, dutos e cavidades secretoras ou células oleosas encontradas no tecido da planta (Samuelsson, 1999). As estruturas onde se encontram os óleos essenciais podem estar localizadas em alguma parte específica da planta ou em toda ela. Assim, os óleos essenciais podem ser encontrados em diversas partes, tais como: na parte aérea, como ocorre, por exemplo, na menta; nas flores, como é o caso da rosa e do jasmim; nas folhas como ocorre nos eucaliptos e no capim-limão; nos frutos como na laranja e no limão; na madeira como no sândalo e no pau rosa; nas raízes como se observa no vetiver; e nos rizomas, como no gengibre (Bruneton, 2001).

Existem diferentes rotas de biossíntese de terpenos, uma das mais estudadas sugere que a partir de adições repetitivas de isopentenil difosfato (IPP) se forma o predinildifosfato, precursor das diferentes classes de terpenos. A modificação do predinildifosfato por enzimas sintetases específicas formam o esqueleto terpênico e, por uma modificação enzimática secundária (reação redox) do esqueleto terpênico são atribuídas às diferentes propriedades funcionais (Bakkali *et al.*, 2008; Bruneton, 2001 e Simões *et al.*, 1999).

Na natureza, os óleos essenciais são importantes para a proteção das plantas atuando como agentes antimicrobianos, inseticidas e contra herbívoros. Eles também atraem insetos para dispersar o pólen e sementes, mas, por outro lado, repele os insetos indesejáveis. Os óleos essenciais também são compostos importantes na constituição da própolis de abelhas (Bakkali *et al.*, 2008 e Bruneton, 2001).

Pela conhecida ação antimicrobiana (antibacteriana, antifúngica e antiviral) e capacidade de conservação, os óleos essenciais são utilizados nas indústrias de alimentos, de perfumaria e cosméticos, na agricultura e para limpeza sanitária (Bakkali *et al.*, 2008).

### 3.1.1. Terpenos

Os terpenos podem apresentar diversos grupos funcionais e tem uma grande variedade estrutural, tendo em comum a característica de poderem ser reduzidos a unidades de isopreno (Figura 3.1), ou seja, é como se fossem o acoplamento sucessivo de moléculas de isopreno (Teisseire, 1994).

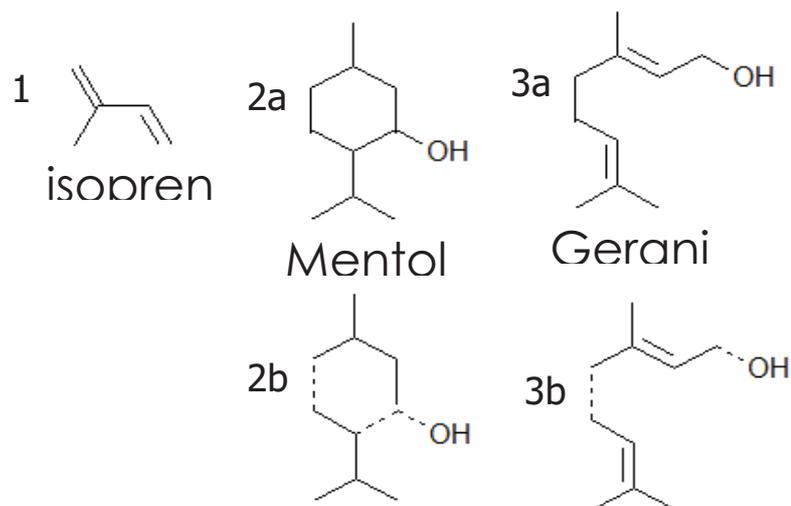


Figura 3.1: A imagem 1 representa a molécula do isopreno, a 2a a molécula do mentol, a 3a a molécula de geraniol e as 2b e 3b uma representação para melhor visualização da constituição das moléculas (2a e 3a) por duas de isopreno (adaptado de Teisseire, 1994).

Os principais grupos terpênicos são monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), triterpenos (C30) e tetraterpenos (C40) (Bakkali *et al.*, 2008). Os compostos terpênicos mais frequentes nos óleos essenciais extraídos por arraste a vapor são os monoterpenos e os sesquiterpenos (Simões *et al.*, 1999).

### 3.1.1. Óleo essencial de *C. citratus*

O *C. citratus* é uma planta originária de países tropicais e subtropicais, sendo amplamente cultivado nas Américas do Sul e Central, na Ásia e na África (Lewinsohn *et al.*, 1997).

Foi descrito por Lewinsohn *et al.* (1997) que a superfície das folhas de *C. citratus* não possuem tricomas glandulares, presentes na maioria das plantas aromáticas. O óleo essencial, então, é armazenado em células específicas presentes no tecido parenquimal das folhas (Figura 3.2).

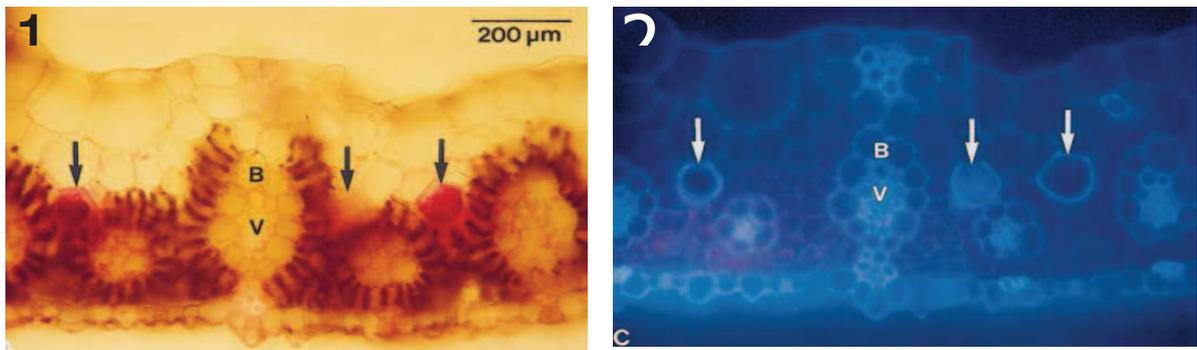


Figura 3.2: Cortes histológicos: nas imagens 1 e 2 cortes histológicos de folhas de *C. citratus*, as setas indicam as células de armazenamento de óleo essencial (Lewinsohn *et al.*, 1997).

Apesar do OE de *C. citratus* não estar armazenado na superfície da folha, este é facilmente transportado para a superfície, sem o rompimento das células armazenadoras, possivelmente por difusão pelas membranas lipídicas. Podendo,

deste modo, ser extraído por destilação por arraste a vapor de água sem que as folhas sejam trituradas previamente (Lewinsohn *et al.*, 1997).

O óleo essencial de *C. citratus* extraído por arraste a vapor é caracterizado pela grande presença de citral, mistura dos isômeros geranial (*trans*-citral) e neral (*cis*-citral), responsável por aproximadamente 70% de sua composição (Bakkali *et al.*, 2008). Muitos estudos têm sido realizados sobre o uso do mesmo, entre estes se citam a ação como repelentes contra insetos (Trongtokit *et al.*, 2005), larvicidas (Sosan *et al.*, 2001), as atividades antimicrobianas e antioxidantes na conservação de alimentos (Burt, 2004).

### 3.2. Extração de Óleos Essenciais

Existem diversos processos para a extração de óleos essenciais (Tabela 3.1). O método de extração é definido a partir dos compostos que se deseja obter, de onde se localiza o óleo na planta e da quantidade de óleo presente na mesma. Entre os processos utilizados na extração de óleos essenciais, a extração por arraste a vapor é o mais utilizado (Serafini e Cassel, 2001), porém outros processos como a hidrodestilação, a extração com dióxido de carbono supercrítico, a extração com micro-ondas e a prensagem também são utilizados.

#### 3.2.1. Extração por Arraste a Vapor

A destilação de óleo essencial por arraste a vapor de água consiste em passar vapor de água, com temperatura próxima aos 100°C, por um vaso extrator, o qual contém um leito fixo de plantas aromáticas. Os constituintes voláteis, que possuem uma pressão de vapor mais elevada que a da água e com o fluxo ascendente de vapor, são arrastados em direção ao topo do vaso, seguindo em direção ao condensador. O condensado, água e óleo essencial emulsionados, são conduzidos ao vaso separador, também conhecido como vaso florentino, onde são separados em duas fases: fase oleosa e fase aquosa (Cassel e Vargas, 2008 e Cassel *et al.*, 2009).

Tabela 3.1: Processos mais utilizados para obtenção de óleos essenciais.

| Processo                               | Características da amostra  | Exemplos  | Princípio   | Produto   |
|--|---|---|---|---|
| Destilação por arraste a vapor de água | Amostras com grande quantidade de óleo, localizado, preferencialmente na superfície da amostra (Cassel e Vargas 2008).  | Capim-limão, citronela.                             | Passa-se vapor de água por uma massa de planta e se coleta o produto (água e óleo) após a condensação. Então se separa o óleo da água (Cassel e Vargas, 2008).  | São óleos voláteis, constituídos de monoterpenos e sesquiterpenos (Cassel e Vargas, 2008).  |
| Prensagem                              | Amostras em que o óleo se encontra no epicarpo de frutos (Bruneton, 2001).  | Frutos cítricos (laranja, bergamota, entre outros). | Prensa-se o epicarpo do fruto, com uma força mecânica, coleta-se o líquido resultante. Em seguida, se separa o produto lipofílico do hidrofílico (Bruneton, 2001).  | Óleos voláteis, constituídos de monoterpenos, sesquiterpenos diterpenos e moléculas com peso molecular maiores como flavonóides, furocumarinas e taninos (Bruneton, 2001).  |
| Enfleurage                             | Amostras com pouco óleo e de grande valor comercial. Geralmente utilizado para extrair óleo das pétalas das flores (Simões <i>et al.</i> , 1999).                                     | Rosas e jasmim.                                     | No processo se utiliza gordura sem odor, onde são imersas as pétalas. Após a saturação da gordura com o óleo, a gordura é tratada com etanol (para solubilização do óleo essencial no etanol). Quando o etanol está saturado, é destilado para separação do óleo do etanol (Simões <i>et al.</i> , 1999). | São óleos voláteis, constituídos majoritariamente de monoterpenos e sesquiterpenos (Simões <i>et al.</i> , 1999).   |
| Fluidos em estado supercrítico         | Utilizam-se amostras secas de plantas que contenham produtos de interesse de grande valor comercial e com peso molecular maiores que os sesquiterpenos (Cassel <i>et al.</i> , 2010). | Café e erva-mate.                                   | Consiste em passar fluidos em estado supercrítico por uma massa de planta, arrastando compostos até um local de coleta (Cassel <i>et al.</i> , 2010).   | Em sua maioria, são oleoresinas, podendo apresentar monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, flavonóides, taninos, alcalóides, entre outros (Bruneton, 2001). |

### 3.3. Fracionamento de Óleos Essenciais

Neste estudo, são utilizados dois processos distintos de fracionamento, a destilação fracionada a vácuo e um pré-fracionamento associado ao processo de extração por arraste de vapor. O primeiro processo é efetuado após a obtenção do óleo essencial por arraste a vapor. O segundo consiste no recolhimento de frações durante a extração do óleo essencial por arraste a vapor, deste modo reduzindo o número de operações para a obtenção de frações do óleo essencial de capim limão e, conseqüentemente, a redução de custo de processamento.

#### 3.3.1. Destilação Fracionada a vácuo

A destilação fracionada a vácuo é um processo de fracionamento apropriado para separar misturas com compostos termolábeis, pois o mesmo opera a baixas temperaturas, evitando, assim, a degradação dos compostos presentes no extrato. O processo consiste no aquecimento de uma mistura e a conseqüente vaporização dos componentes, definida em função da volatilidade dos mesmos. Inicialmente, são vaporizados os compostos mais voláteis, seguido de componentes de volatilidade intermediária e permanece no frasco a fração menos volátil. A separação ocorre por faixa de temperatura e a mesma é definida em função do aquecimento fornecido à mistura. A eficiência da separação é aumentada na coluna de destilação recheada, visto que na mesma promove-se a transferência de massa e energia entre o vapor ascendente e o líquido descendente, criando vários estágios de condensação e evaporação (Torres, 2010; Wankat, 2007).

Este processo tem sido utilizado também para a produção de óleos essenciais sem compostos indesejados como, por exemplo, no óleo essencial de bergamota (*Citrus bergamia*), no qual é indesejada a presença de bergapteno (um composto fototóxico) e, utilizando um processo adaptado de destilação fracionada a vácuo é possível produzir um óleo essencial de bergamota sem bergapteno e com as mesmas características do OE produzido por prensagem a frio (Belsito *et al.*, 2007).

### 3.3.2. Pré-fracionamento

O pré-fracionamento associado à extração por arraste de vapor se baseia na obtenção de frações de óleo essencial de capim limão em função do tempo de extração, levando-se em consideração que os extratos voláteis são constituídos por um grande número de compostos de volatilidade variável. Logo, a composição das frações varia com o tempo de extração (Steffens, 2010). As primeiras frações obtidas (curto tempo de extração) são ricas em constituintes mais voláteis, porém destituídas das melhores características olfativas. Quando o tempo de extração for muito longo, a fração obtida será rica em compostos de baixa volatilidade e o custo de processamento será muito elevado (Serafini e Cassel, 2001; Steffens, 2010). Com o pré-fracionamento, é possível retirar uma fração de uma determinada faixa de tempo de extração, conforme a composição mais desejada, e continuar com a extração, assim resultando em dois produtos: a fração e o óleo essencial.

## 3.4. Caracterização de Óleos Essenciais

Existem diversas técnicas para a caracterização de óleos essenciais como cromatografias líquida, gasosa e em camada delgada, acopladas a espectrometria ultravioleta, de massas e infravermelho. Cada uma com suas características específicas.

Quando se estudam óleos essenciais geralmente se trabalha com a técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa, análise qualitativa, e a um detector de ionização de chama, análise quantitativa. A identificação pode ser feita através da utilização de uma biblioteca de compostos ou através de índices específicos como o índice de retenção (Czepak e Bandoni, 2008 e Bruneton, 2001).

### 3.4.1. Cromatografia Gasosa

A cromatografia gasosa é uma das técnicas mais empregadas em análises quantitativas e qualitativas. Nela, os componentes da amostra são vaporizados no injetor e, então, é injetada na cabeça da coluna cromatográfica. A

eluição é feita por um fluxo constante da fase móvel gasosa. No trajeto da amostra pela coluna, a amostra é separada em consequência de sua partição e interação das moléculas entre uma fase móvel gasosa e uma fase estacionária líquida ou sólida (Skoog, 2008).

#### 3.4.2. Espectrometria de massas

A combinação da cromatografia a gás e a espectrometria de massas é conhecida como CG/EM. A espectrometria de massas mede a razão massa por carga ( $m/z$ ) de íons que são produzidos pela amostra. Como a maioria dos íons produzidos pelo espectrômetro apresenta uma carga unitária ( $z = 1$ ), faz com que o equipamento apresente apenas o valor das massas de cada composto e suas frações (Skoog, 2008).

O gráfico resultante da espectrometria de massas é em forma de um diagrama de blocos. Quando acoplado a um cromatógrafo gasoso, a amostra na forma de vapor é interfaceada entre a pressão atmosférica do sistema de CG e a baixa pressão do sistema do espectrômetro de massas por um sistema complexo de vácuo. Já no espectrômetro de massas, as moléculas da amostra entram em uma fonte de ionização, energética o suficiente para quebrar as ligações químicas das moléculas da amostra (formando fragmentos também ionizáveis). Então os íons das moléculas, dos fragmentos e moléculas não ionizadas são transportados até o analisador, o qual seleciona os íons de acordo com seus valores  $m/z$ . Os íons são detectados e plotados em um gráfico contendo a intensidade do sinal do íon *versus*  $m/z$  (Skoog, 2008). A partir da massa molecular, os fragmentos gerados a partir da quebra da molécula e o tempo de retenção é possível identificar os compostos de uma mistura.

#### 3.4.3. Detector de Ionização em Chama

O detector de ionização em chama é o mais empregado em aplicações de cromatografia gasosa em geral. Nele, o efluente da coluna é dirigido para um local entre o queimador (com uma pequena chama de ar/hidrogênio) e um eletrodo

(localizado acima da chama, que serve para coletar íons e elétrons) então é aplicada uma corrente elétrica. A corrente resultante é medida com um picoamperímetro e os sinais de detecção são plotados em um gráfico onde a área abaixo da curva corresponde à concentração do composto na amostra. O detector de ionização exibe uma alta sensibilidade, uma alta linearidade de resposta e um baixo ruído, sendo ideal para a quantificação de substâncias (Collins, 2007).

### 3.5. Análise Estatística

Para melhor entender as relações entre os compostos encontrados na análise química, utiliza-se uma análise fatorial, na qual se insere todas variáveis (concentração de cada substância por amostra) para formar diferentes fatores, assim as diferenças entre as amostras ficam evidentes, tendo uma menor perda de informações. Para análise fatorial que inclui a análise de componentes principais e análise componentes comuns é dado o nome de PCA, do inglês *principal component analysis* (Hair *et al.*, 2009).

Já que esta metodologia permite comparar inúmeras variáveis entre diferentes amostras, ela se torna ideal para análise estatística de óleos essenciais, uma mistura complexa de diferentes moléculas (Lucas, 2011; Steffens, 2010).

### 3.6. Atividade Antimicrobiana de Óleos Essenciais

Os extratos vegetais começaram a ter investigada a sua atividade antimicrobiana após a descoberta da penicilina. Nesta mesma época, começaram estudos em relação à ecologia bioquímica, revelando os mecanismos de defesa das plantas contra seus predadores, como fungos, bactérias, vírus, parasitas, insetos e outros animais (Yunes e Calixto, 2001).

Considerando que os óleos essenciais são misturas complexas de diferentes grupos químicos não é atribuído a eles um único alvo ou mecanismo de ação, mas sim diversos alvos e mecanismos de ação na célula. Como prováveis mecanismos de ação já foram descritos a redução de metabólitos e íons do citoplasma, devido à partição dos lipídeos de membrana, a coagulação do citoplasma e o rompimento da parede celular (Burt, 2004).

A grande quantidade e diversidade de moléculas em extratos de produtos naturais promove, frequentemente, o sinergismo entre as mesmas, mecanismo que pode aumentar, reduzir ou até mesmo anular a atividade do extrato. Estudos indicam que os componentes minoritários podem exercer uma atividade de sinergismo importante nos compostos ativos. Em experimentos, comparando a atividade de terpenos ativos puros e óleos essenciais, observou-se a atividade antimicrobiana maior do óleo essencial (Burt, 2004). Por esta razão, mostra-se interessante o uso de frações para o aumento da atividade antimicrobiana do óleo essencial, não utilizando apenas os terpenos puros.

Existem diferentes métodos qualitativos e semi-quantitativos para a avaliação da atividade antimicrobiana como: a difusão do extrato a partir de discos de papel impregnados em ágar com cultivo microbiano, difusão por cilindros em que o extrato é solubilizado e inserido dentro de um cilindro de metal sobre uma placa inoculada e a bioautografia, a qual se aplica o extrato sobre uma placa cromatográfica e a cobre com uma camada de cultivo microbiano (Yunes e Calixto, 2001).

### 3.6.1. Bioautografia

A bioautografia é um método de avaliação da atividade antimicrobiana que se destaca para estudos com óleos essenciais por permitir uma separação do óleo pela cromatografia em camada delgada (CCD) e por impedir a volatilização do óleo, uma vez que uma camada de ágar cobre a placa de CCD (Wang *et al.*, 2011 e Horváth *et al.*, 2010).

Para os testes de atividade antimicrobiana utilizando a técnica de bioautografia indireta se aplica a amostra em uma placa de CCD a qual é

desenvolvida com uma fase móvel adequada (Franco, 2005 e Valgas, 2002). Os compostos da amostra ficam adsorvidos na fase estacionária em posições relativas à sua polaridade em relação ao eluente e à sílica da placa cromatográfica. Então, é aplicada uma camada de meio de cultura inoculado com o microrganismo a ser testado. Já na bioautografia direta, o inóculo é pulverizado diretamente sobre a camada de ágar sobre a placa (Valgas *et al.*, 2007). Após o período de crescimento do microrganismo, verifica-se a formação de halos de inibição. A visualização dos halos pode ser otimizada utilizando um revelador de sais de tetrazólio, que proporciona uma coloração avermelhada em função da desidrogenase enzimática (Hostettmann *et al.*, 2003).

A bioautografia tem sido utilizada como uma metodologia eficiente para o *screening* de compostos antimicrobianos em produtos naturais por proporcionar a separação destas misturas complexas (Yunes e Calixto, 2001).

### 3.6.2. Concentração Inibitória Mínima

Para a quantificação da concentração mínima necessária de uma amostra para a inibição do crescimento de um microrganismo se utiliza uma metodologia que consiste na diluição seriada da amostra frente a uma concentração constante de microrganismo. Podendo este experimento ser feito em tubos de ensaio, em ágar ou em microplacas, geralmente, para a preservação da amostra se utiliza uma microplaca.

Como os meios de cultura utilizados são hidrofílicos, logo, para os testes utilizando óleos essenciais (lipofílicos), faz-se necessária a utilização de um emulsionante. Os emulsionantes mais utilizados na solubilização de óleos essenciais em água são: etanol, metanol, tween 80, tween 20, acetona com tween 80, DMSO e propilenoglicol (Burt, 2004). Cada emulsionante apresenta uma característica diferente, sendo necessários testes de solubilidade do óleo no emulsionante e testes de inibição do emulsionante frente aos microrganismos testados.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Amostras

#### 4.1.1. Destilação Fracionada a Vácuo

O óleo essencial de *C. citratus*, fornecido pela empresa Tekton Óleos Essenciais LTDA, foi fracionado em um equipamento laboratorial de destilação fracionada a vácuo desenvolvido no Laboratório de Operações Unitárias da Faculdade de Engenharia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (LOPE-PUCRS) por Torres (2010).

O fracionamento em uma coluna de destilação a vácuo (Figura 4.1) consiste em aquecer a amostra em um balão de entrada, que volatilizada percorre uma coluna recheada com limalha de titânio que fornece a área necessária para a transferência de massa e energia entre as fases líquida e vapor, resultante de sucessivas vaporizações e liquefações. A destilação é controlada por faixas de destilação (no topo desta coluna é medida a temperatura de saída). A amostra vaporizada que alcança o topo da coluna de fracionamento é liquefeita em dois condensadores, seguindo em direção a uma válvula de separação, onde a mistura é direcionada a um balão coletor. Segundo Torres (2010), a temperatura dos intervalos de destilação é determinada experimentalmente, observando a diminuição do fluxo da fração em questão. Sucessivamente, altera-se a faixa de temperatura para obtenção de novas frações.

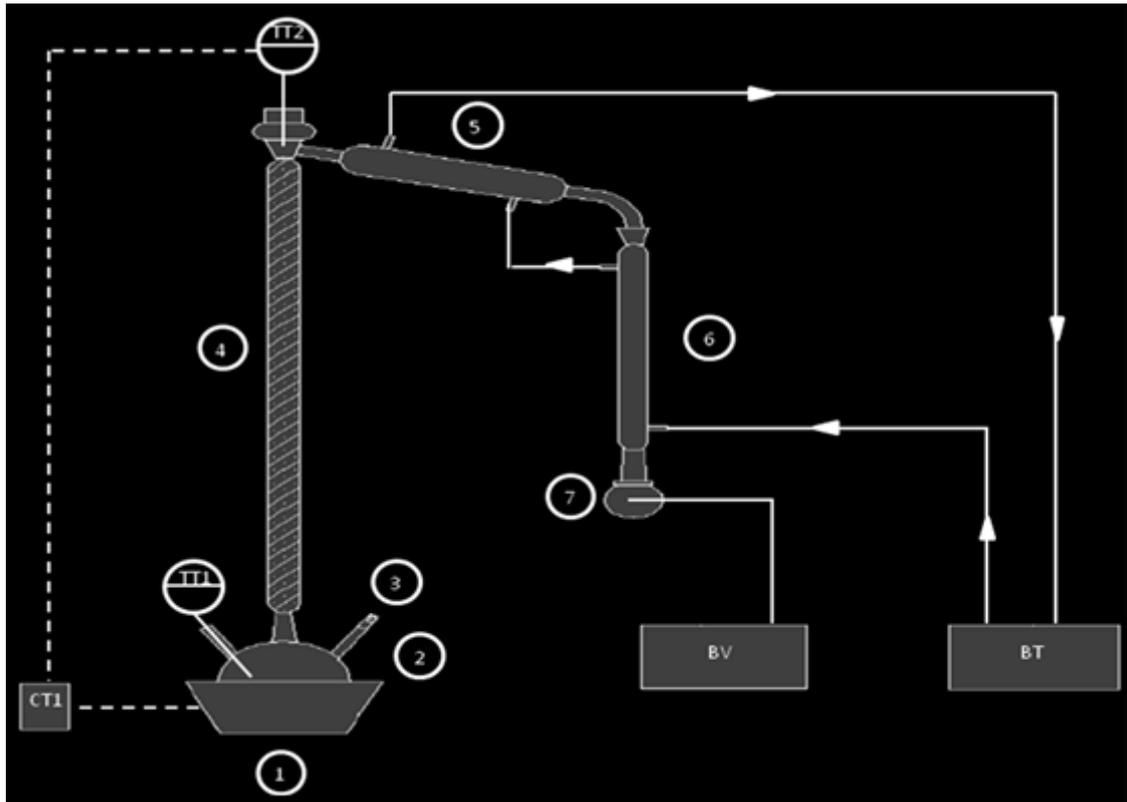


Figura 4.1: Esquema do aparelho de destilação fracionada a vácuo, com o aquecedor (1), balão de três bocas (2), entrada de tubo capilar (3), transmissor de temperatura (TT1), coluna recheada (4), controlador de temperatura (CT1), transmissor de temperatura (TT2), condensadores (5, 6), balão (7), bomba de vácuo (BV) e banho termostático (BT).

#### 4.1.2. Pré-Fracionamento

Foram obtidas frações do óleo essencial de *C. citratus* através de destilação por arraste a vapor na empresa Tekton Óleos Essenciais LTDA, localizada na cidade de Viamão – Rio Grande do Sul, região metropolitana de Porto Alegre. Para a extração, foram utilizados 524 kg de folhas de *C. citratus*, *in natura*, compactadas em um vaso extrator (1,4m de diâmetro e 2,5m de altura). O vaso extrator foi alimentado, a partir de sua base, com vapor a 2,5 kgf/cm<sup>2</sup>. Conforme o vapor entra em contato com a massa de planta, e esta era aquecida, os compostos são vaporizados e o óleo vai sendo solubilizado e arrastado pelo vapor, com temperatura de saída média de 105,5°C. Quando estes chegam ao topo do vaso extrator, são direcionados para um condensador. Após o condensador foi colocada uma proveta graduada de 1L. Conforme a proveta coletava 1L de água e óleo a quantidade de óleo era medida. As amostras eram retiradas a cada 4 minutos (para as frações B1,

B2, B3, B4, B5, B6, B7 e B8) e a cada 11 minutos (para B9, B10, B11 e B12) em, aproximadamente, 1 hora e 16 minutos de extração.

#### 4.2. Caracterização do Óleo Essencial e Suas Frações

Todas as frações e óleos essenciais de *C. citratus* foram analisados por cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massas (CG/EM), sendo o equipamento utilizado da marca Agilent Technologies, modelo 7890A CG system, equipado com uma coluna capilar HP-5MS. Foi utilizado como gás de arraste o gás hélio. As análises no espectrômetro de massas foram feitas em um equipamento Agilent Technologies, modelo 5975C VL MSD, operando em 70 eV, e a temperatura da fonte de íons mantida em 150°C. Os compostos são identificados conforme a biblioteca Adams (2007). A quantificação foi realizada através de um detector de ionização de chama (FID) a 280°C.

#### 4.3. Análise Estatística

Para a análise comparativa da composição química foi utilizado o *software* estatístico STATISTICA 7.1., nele os dados foram inseridos em forma de matriz, sendo as linhas os compostos identificados e as colunas as amostras. A partir do percentual em área, o *software* calcula a matriz de covariância e em seguida calcula as novas variáveis, chamadas de componentes principais, que representam a similaridade das amostras entre elas em percentual (Lucas, 2011).

#### 4.4. Determinação da Atividade Antimicrobiana

##### 4.4.1. Bioautografia

A metodologia da bioautografia pode ser separada em três partes, duas preparativas (cromatografia em camada delgada e a preparação dos meios de cultura e microrganismos) e a própria bioautografia, descritas a seguir.

##### 4.4.1.1. *Cromatografia em Camada Delgada*

Para os experimentos utilizando as frações obtidas pela destilação fracionada a vácuo foram efetuados cromatogramas conforme descrito na Farmacopéia Brasileira (2010). Em placas de sílica gel GF<sub>254</sub>, foram aplicados o OE e as respectivas frações, empregando como fase móvel tolueno e acetato de etila na proporção de 93:7. Em uma área da placa onde não existia amostra, foi aplicado pontualmente 1,2µL do OE e das frações, a fim de verificar a atividade do óleo e das frações sem a separação pela cromatografia.

As bioautografias das frações obtidas pelo pré-fracionamento foram procedidas apenas com aplicações pontuais de 1,2µL, sem efetuar a eluição da placa. Nestes experimentos também foram testados padrões comerciais de terpenos: citral (Sigma-Aldrich C1645 - 95%), citronelal (Sigma-Aldrich C2513 - 85%) e linalol (Sigma-Aldrich L5255 - 97%), para comparação do tamanho dos halos de inibição, uma análise semi-quantitativa.

#### 4.4.1.2. *Preparação dos Inóculos e Meios de Cultura*

O inóculo dos microrganismos *S. aureus* (ATCC 25923) e *P. aeruginosa* (ATCC 27853) foram padronizados pelo tubo 1 da escala de McFarland<sup>1</sup>. Para cada 100mL de ágar Mueller-Hinton foram inoculados 1mL da solução padronizada de cada microrganismo. A *Salmonella enterica* subespécie *enterica* Sorovar Choleraesuis (ATCC 10708) foi padronizada segundo o tubo 1 da escala de McFarland, sendo inoculados 2mL de inóculo para cada 100mL de meio de cultura (Pereira, 2010).

#### 4.4.1.3. *Bioautografia*

Em placas de petri foi adicionada uma camada base do cultivo microbiano em ágar Mueller-Hinton, e então introduzidas as placas cromatográficas e, posteriormente, acrescentada uma segunda camada do cultivo microbiano. Após 24 horas a 37°C, foi adicionado um sal de tetrazólio, INT “*p*-iodonitrotetrazolium violet” para visualização dos halos de inibição (Pereira, 2010; Valgas *et al.*, 2007).

As zonas em que não apareceram a coloração avermelhada foram as faixas de inibição. Quando aparecem inibições no cromatograma, é possível fazer uma placa irmã e raspar a sílica da faixa responsável pela inibição e analisar no cromatógrafo gasoso acoplado à espectrometria de massa para identificar os compostos responsáveis pela ação (Pereira, 2010).

---

<sup>1</sup> Escala óptica para quantificação de unidades formadoras de colônia por mL de solução, frente a soluções padronizadas. A partir da inoculação de colônias em solução salina 0,85%. O tubo 1 da escala equivale a  $1,0 \times 10^8$  UFC/mL (NCCLS).

Em paralelo aos testes, foram feitos testes brancos que consistem na utilização de placas de CCD sem amostra e em placas eluídas com os solventes utilizados na preparação das CCD. Também são utilizados padrões positivos (Amoxicilina 0,1mg/mL para *S. aureus* e *S. Choleraesuis* e Cefepime 0,3mg/mL para *P. aeruginosa*).

#### 4.4.2. Concentração Inibitória Mínima

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada utilizando a metodologia de diluição em microplaca (microdiluição). Em cada poço da microplaca foram adicionados 100µL do inóculo de microrganismo (resultando em uma concentração final de  $1,0 \times 10^4$  UFC/mL) em caldo Mueller-Hinton, e, então, foram adicionados 100µL do OE e suas frações solubilizadas em Tween 20 e água (nas concentrações finais de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12 e 24mg/mL). As microplacas foram incubadas por 24 horas a 37°C e, após o tempo de crescimento foi possível visualizar se houve crescimento nos poços. Os poços que não apresentam crescimento visualmente foram semeados em ágar Mueller-Hinton, para confirmação da inibição. A CIM é a menor concentração de amostra que inibe o crescimento do microrganismo teste (Pereira, 2010 e Stavri *et al.*, 2009).

Em paralelo foram realizados experimentos utilizando compostos usualmente adotados pela indústria farmacêutica como conservantes, o Liquid Germall® Plus, Phenonip®, metilparabeno e propilparabeno.

#### 4.5. Formulação de Sabonetes para Higiene Corporal

Após a obtenção, caracterização e determinação da concentração inibitória mínima das frações obtidas a partir do óleo essencial de capim limão foram selecionadas amostras de frações, obtidas por destilação fracionada a vácuo, e o óleo essencial (não fracionado) e enviadas a Memphis S.A. para a formulação dos sabonetes.

As matérias-primas utilizadas nos sabonetes formulados foram: seboato de sódio, água, cocoato de sódio, amido de milho, óleo essencial de capim limão ou

uma de suas frações, dimeticona, glicerina, CI 77891, ácido etidrônico, EDTA tetrassódico, Distirilbifenil dissulfonato dissódico e CI 74160. Sendo enviadas para análise as amostras com as frações a 1,5%, amostras com o óleo de capim limão (não fracionado) a 1,00%, 0,50%, 0,25%, 0,15% e 0,10% e ainda uma amostra formulada sem o óleo essencial ou suas frações.

#### **4.6. Determinação da Atividade Antimicrobiana dos Sabonetes Formulados com o Óleo Essencial de Capim Limão e suas Frações**

##### **4.6.1. Avaliação de Eficácia Antimicrobiana de Sabonetes Formulados Utilizando Frações do Óleo Essencial de Capim Limão**

A avaliação da eficácia antimicrobiana dos sabonetes foi determinada por dois experimentos distintos. Inicialmente foi efetuada a contagem do número total de microrganismos mesofílicos e em seguida foi realizado o teste de eficácia antimicrobiana, metodologias 5.5.3.1.2 e 5.5.3.4, respectivamente, descritas na Farmacopeia Brasileira (2010).

##### **4.6.1.1. Contagem do Número Total de Microrganismos Mesofílicos**

Foi preparada uma suspensão (1:10) de amostra em solução tampão cloreto de sódio-peptona (pH 7,0). Após 24 horas, 1 mL da mistura foi adicionado a uma placa de petri e em seguida foram vertidos, separadamente, de 15 a 20 mL de ágar Mueller-Hinton e ágar Sabourad (de 45 – 50°C). As placas contendo o ágar Mueller-Hinton foram incubadas de 3 a 5 dias a 35°C e as placas contendo o ágar Sabourad de 5 a 7 dias a 25°C. Após a incubação, foram feitas as contagens de microrganismos. Foram realizados 04 experimentos em triplicata (Farmacopeia Brasileira, 2010).

#### 4.6.1.2. Teste de Eficácia Antimicrobiana

As amostras de sabonetes foram trituradas e diluídas (1:1) em solução salina (0,85% p/p). Em seguida foram adicionados, separadamente, inóculos dos microrganismos *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *S. Choleraeuisis* a uma concentração final de  $1 \times 10^6$  e  $1 \times 10^8$  UFC/mL. As amostras foram incubadas em estufa a 36°C. Pelo método de semeadura por esgotamento foram semeadas amostras nos intervalos de 7, 14 e 28 dias. Os experimentos foram realizados em duas triplicatas (Farmacopeia Brasileira, 2010).

#### 4.6.2. Diferenciação da Atividade Antimicrobiana das Amostras de Sabonetes

Na impossibilidade de diferenciar as amostras pelas metodologias anteriores (itens 4.6.1.1.e 4.6.1.2), verificou-se na literatura a falta de uma metodologia adequada para sabonetes sólidos. Então para diferenciação das amostras foram realizados experimentos utilizando-se uma metodologia de difusão em ágar.

Em experimentos simples cego, as amostras de sabonetes formulados com o óleo essencial de capim limão e suas frações além de duas amostras de sabonetes Bioprotect® (laranjeira e própolis), formulados com conservantes sintéticos, foram trituradas e compactadas em um anel de polipropileno autoclavado de 5,0mm de altura e 4,8mm de diâmetro. Em seguida os anéis foram depositados em placas de petri e submersos em ágar Mueller-Hinton inoculados (separadamente) a  $1,0 \times 10^6$  UFC/mL *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *S. Choleraeuisis* e incubados em estufa a 35°C por 24 horas. Após o crescimento microbiano foi possível visualizar os halos de inibição com o sal de tetrazólio, INT “*p*-iodonitrotetrazolium violet”. Estes halos foram medidos com o auxílio de um paquímetro. Os experimentos foram realizados em duas triplicatas.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1. Amostras Obtidas por Destilação Fracionada a Vácuo

#### 5.1.1. Fracionamento do Óleo Essencial de *C. citratus* por Destilação Fracionada a Vácuo

As condições de fracionamento (Tabela 5.1) foram determinadas experimentalmente, com base em estudos realizados anteriormente no LOPE-PUCRS por Torres (2010), utilizando inicialmente 500mL de óleo essencial.

Tabela 5.1: Condições de fracionamento do óleo essencial de *C. citratus* através de destilação fracionada a vácuo.

| Frações | Pressão (mmHg) | Faixa de destilação | Tamanho da coluna | Rendimento (mL) | Rendimento (%) |
|---------|----------------|---------------------|-------------------|-----------------|----------------|
| F1      | 60 a 160       | Até 25°C            | 150cm             | 8               | 2,66           |
| F2      | 60 a 160       | 25 – 35°C           | 150cm             | 33              | 11,00          |
| F3      | 60 a 160       | Acima de 35°C       | 150cm             | 220             | 66,66          |
| F3a     | 60 a 160       | Acima de 35°C       | 150cm             | 125             | 83,33          |
| F3b     | 60 a 160       | Até 35°C            | 150cm             | 11              | 7,33           |
| F3a1    | 60 a 160       | Até 35°C            | 30cm              | 18              | 18,00          |
| F3a2    | 60 a 160       | Acima de 35°C       | 30cm              | 75              | 75,00          |

Foram obtidas três frações com diferentes concentrações dos compostos majoritários: a primeira fração (F1) era constituída principalmente dos compostos mais voláteis, a segunda fração (F2) era predominantemente constituída dos intermediários e a fração residual (F3) continha majoritariamente os compostos menos voláteis.

Em função do valor obtido para a concentração de citral na fração F3, 86,17%, foi decidido redestilar esta fração para se obter uma maior concentração de citral. Assim, para as novas frações redestiladas se obteve 85,84% e 77,59% de citral para F3a e F3b, respectivamente. A fração residual (F3a) foi novamente destilada, visando aumentar a concentração de citral, obtendo-se as frações F3a1 (85,44% de citral) e a F3a2 (89,43% de citral). As diferentes destilações e redestilações podem ser visualizadas no esquema apresentado na Figura 5.1.

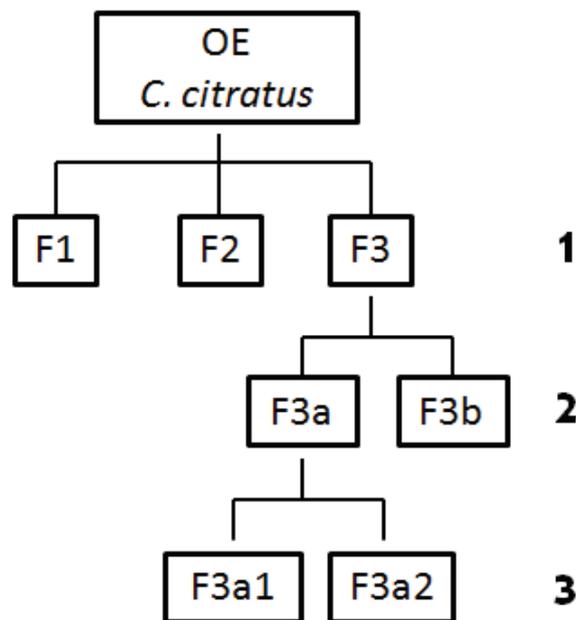


Figura 5.1: [1] Destilação fracionada a vácuo do óleo essencial de *C. citratus*, obtendo-se 03 frações (F1, F2 e F3); [2] Fracionamento da fração residual (F3), obtendo-se 02 frações (F3a e F3b); [3] Redestilação da fração residual (F3a), obtendo-se duas novas frações (F3a1 e F3a2).

É possível observar que no primeiro fracionamento foi obtida uma grande variação na composição de citral nas três frações: 16,38% em F1, 32,91% em F2 e 86,17% em F3. Em relação ao mirceno, os resultados foram os seguintes: 78,62% em F1, 52,44% em F2 e 0,18% em F3 (Tabela 5.2).

Tabela 5.2: Composição química do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. Os valores são apresentados em porcentagem de área conforme a identificação dos compostos do óleo essencial e suas frações por cromatografia gasosa e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa.

| Composto                             | IR          | OE           | F1           | F2           | F3           | F3a          | F3b          | F3a1         | F3a2         |
|--------------------------------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| 6-metil-5-hepten-2-ona               | 985         | 1,071        | NI           | NI           | 0,33         | NI           | 1,89         | 0,55         | 0,26         |
| Mirceno                              | 989         | 13,89        | 78,62        | 52,44        | 0,18         | NI           | 0,93         | 1,26         | 0,38         |
| Z- $\beta$ -Ocimeno                  | 1038        | 0,52         | 1,33         | 2,56         | NI           | NI           | 0,32         | 0,37         | NI           |
| E- $\beta$ -Ocimeno                  | 1048        | 0,36         | 0,75         | 1,78         | NI           | NI           | 0,45         | 0,67         | 0,33         |
| Linalol                              | 1099        | 1,42         | 0,87         | 2,88         | 1,21         | 0,86         | 3,55         | 1,92         | 1,69         |
| <i>Trans</i> -Tujone                 | 1115        | 0,21         | NI           |
| Citronelal                           | 1152        | 0,34         | NI           | NI           | 0,37         | NI           | 0,72         | 0,42         | 0,40         |
| $\beta$ -Ciclocitral                 | 1164        | 2,37         | 1,12         | 0,19         | 1,98         | 1,59         | 2,56         | 1,09         | NI           |
| <i>Cis</i> -Crisantenol              | 1220        | 1,48         | NI           | NI           | NI           | NI           | NI           | NI           | 1,05         |
| Citronelol                           | 1237        | 0,30         | NI           | NI           | 0,37         | 0,39         | 0,28         | NI           | NI           |
| <b>Neral</b>                         | <b>1246</b> | <b>32,11</b> | <b>7,92</b>  | <b>16,41</b> | <b>37,74</b> | <b>36,25</b> | <b>36,68</b> | <b>37,70</b> | <b>39,56</b> |
| Geraniol                             | 1258        | 3,27         | 0,45         | 0,90         | 3,79         | 1,36         | NI           | 0,91         | 0,89         |
| <b>Geranial</b>                      | <b>1277</b> | <b>39,53</b> | <b>8,46</b>  | <b>16,50</b> | <b>48,43</b> | <b>49,59</b> | <b>40,91</b> | <b>47,74</b> | <b>49,87</b> |
| Undecanona                           | 1293        | 0,41         | NI           | 0,19         | 0,52         | 0,55         | 0,53         | 0,45         | 0,44         |
| Geranil acetato                      | 1383        | 0,58         | NI           | 0,17         | 0,77         | NI           | 0,55         | 0,44         | 0,43         |
| E-Cariofileno                        | 1413        | 0,28         | NI           | NI           | 0,33         | 0,24         | 0,22         | 0,15         | NI           |
| $\alpha$ - <i>Trans</i> -Bergamoteno | 1431        | 0,23         | NI           | NI           | 0,29         | 0,34         | 0,23         | 0,17         | NI           |
| Tridecanona                          | 1494        | 0,40         | NI           | NI           | 0,50         | 0,55         | 0,19         | 0,15         | NI           |
| Total identificado (%)               | -           | 98,77        | 99,52        | 93,83        | 94,83        | 90,13        | 90,01        | 92,91        | 95,34        |
| <b>Total de Citral (%)</b>           | <b>-</b>    | <b>71,64</b> | <b>16,38</b> | <b>32,91</b> | <b>86,17</b> | <b>85,84</b> | <b>77,59</b> | <b>85,44</b> | <b>89,43</b> |

NI = O composto não pode ser identificado. OE = óleo essencial. IR = Índice de retenção.

### 5.1.1. Análise Estatística

Pode-se observar que pela análise por PCA, o citral (neral e geranial) foi o composto que apresentou uma maior variação de concentração entre as amostras, sendo que o mirceno também merece destaque nesta avaliação (figura 5.2). Em relação à uma análise estatística das amostras (PCA), observa-se que as frações F1 e F2 se diferenciam das demais devido à variação da concentração dos compostos majoritários (figura 5.3). As amostras F3a, F3a2, F3a1, F3b não possuem uma grande variação entre seus componentes, ou seja, possuem uma mesma média de porcentagem de área, incluindo a amostra do óleo essencial.

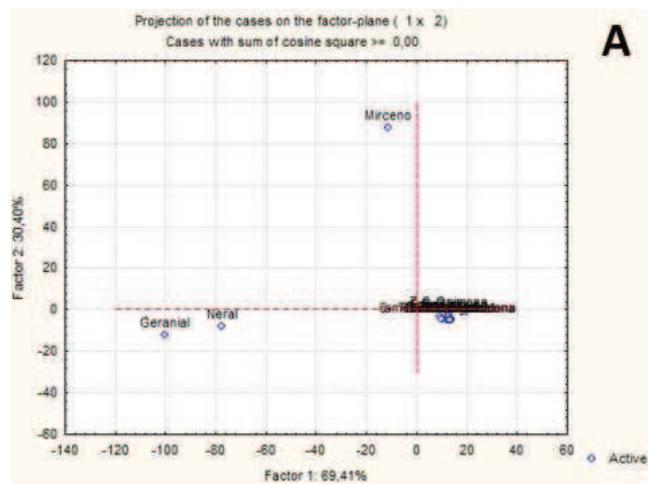


Figura 5.2.: Comportamento de variação dos compostos para as frações obtidas por destilação fracionada a vácuo.

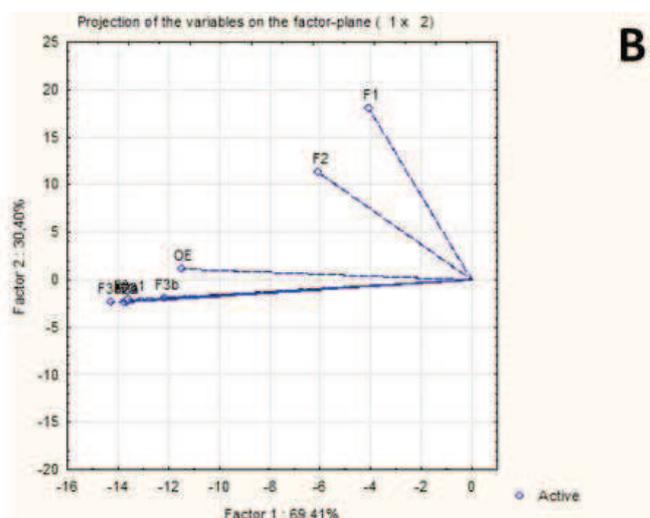


Figura 5.3.: Comportamento de variação das frações obtidas por destilação fracionada a vácuo

A figura 5.4. apresenta um gráfico em forma de dendograma, agrupando as frações mais similares e as correlacionando com as demais. Este gráfico mostra, pelo cálculo da distância euclidiana, as diferenças e semelhanças entre as amostras obtidas por destilação fracionada a vácuo, assim como o óleo essencial de *C. citratus*..

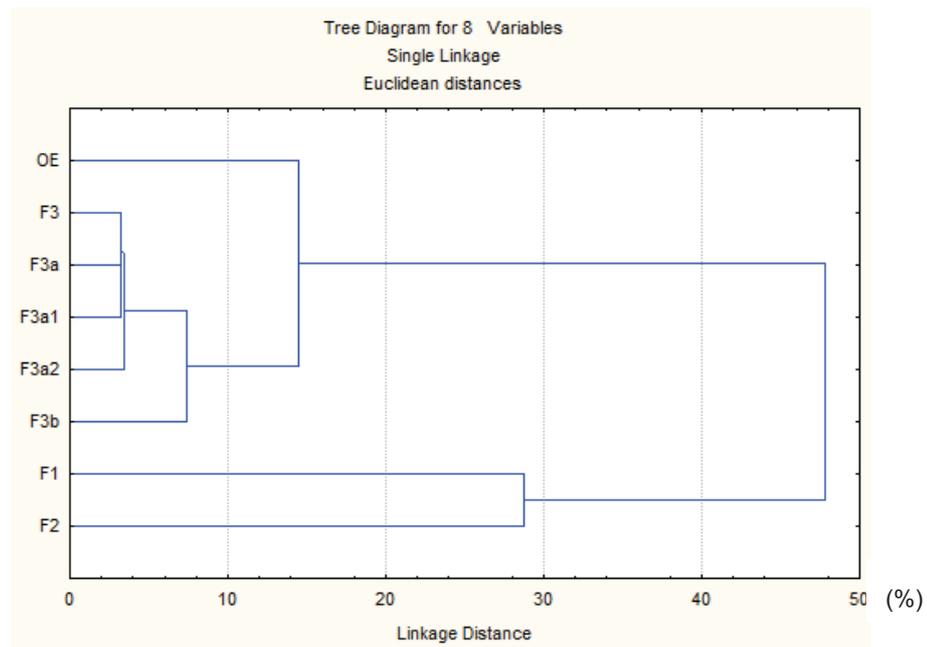


Figura 5.4.: Dendograma de similaridade entre as frações obtidas por destilação fracionada a vácuo.

No dendograma, pode-se verificar uma similaridade entre as frações resultantes dos refrações, incluindo a F3, e o óleo essencial. Diferenciando-se as frações com menor concentração de citral e maior concentração de mirceno (F1 e F2).

### 5.1.2. Avaliação da Atividade Antimicrobiana pelo Método de Bioautografia Indireta

Utilizando o método bioautográfico, foi possível verificar a atividade antimicrobiana das frações do óleo essencial de *C. citratus* e do óleo essencial não fracionado. Em alguns casos, foram encontradas inibições na banda característica do citral e do mirceno no cromatograma feito para a bioautografia, em outros apenas

no ponto em que óleo estava concentrado na placa e em outros em ambos os pontos (Tabela 5.3). Podendo esta variação de atividade antimicrobiana do cromatograma ser resultado de sinergismo negativo, já que todas as amostras apresentaram atividade quando as amostras não foram separadas.

Tabela 5.3: Resultados da determinação da atividade antimicrobiana obtidos por bioautografia indireta.

|                        | F1         | F2         | F3         | F3a        | F3b        | F3a1       | F3a2      | EO          |
|------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----------|-------------|
| <i>S. aureus</i>       | +F;<br>+C  | +F;<br>+C  | +F;<br>+C  | +F;<br>+C  | +F;<br>+C  | +F;<br>+C  | +F;<br>+C | +EO;<br>+C  |
| <i>P. aeruginosa</i>   | + F;<br>-C | +F;<br>-C | + EO;<br>-C |
| <i>S. Choleraesuis</i> | +F;<br>-C  | +F;<br>+C  | +F;<br>+C  | +F;<br>-C  | +F;<br>+C  | +F;<br>+C  | +F;<br>-C | +EO;<br>-C  |

+F: A fração gerou inibição de crescimento. +C: Bandas do cromatograma geraram halos de inibição. – C: Não existiu a geração de halos em bandas do cromatograma. +OE: O óleo essencial gerou halo de inibição.

### 5.1.3. Determinação da Concentração Inibitória Mínima

Após a ratificação da atividade antimicrobiana das frações e do óleo essencial de *C. citratus*, foram realizados testes de concentração inibitória mínima nos quais todas as frações apresentaram atividade antimicrobiana, confirmando os resultados obtidos por bioautografia. As menores concentrações inibitórias mínimas obtidas foram para *S. aureus* de 1mg/mL (F2, F3b e F3a1), para *P. aeruginosa* de 6mg/mL (F3b e F3a1) e para *S. Choleraesuis* a menor foi de 2mg/mL (F2).

Em função de resultados publicados na literatura sobre a ação antimicrobiana do citral, era esperado que a fração com a menor concentração inibitória mínima fosse a F3a2 (89,43% de citral), mas foi possível observar (Tabela 5.4) que as frações F3b e a F3a1, que apresentaram uma maior concentração de mirceno e um pouco menor de citral, foram responsáveis pelas menores CIM (Onawunmi *et al.*, 1984).

Tabela 5.4: Concentração inibitória mínima do óleo essencial de *C. citratus* e suas frações obtidas por destilação fracionada a vácuo.

| Amostras             | <i>S. Cholearesuis</i> | <i>S. aureus</i> | <i>P. aeruginosas</i> |
|----------------------|------------------------|------------------|-----------------------|
| EO                   | 24mg/mL                | 6mg/mL           | 24mg/mL               |
| F1                   | 3mg/mL                 | 3mg/mL           | 24mg/mL               |
| F2                   | 2mg/mL                 | 1mg/mL           | 12mg/mL               |
| F3                   | 24mg/mL                | 24mg/mL          | 24mg/mL               |
| F3a                  | 24mg/mL                | 12mg/mL          | 8mg/mL                |
| F3b                  | 3mg/mL                 | 1mg/mL           | 6mg/mL                |
| F3a1                 | 3mg/mL                 | 1mg/mL           | 6mg/mL                |
| F3a2                 | 8mg/mL                 | 8mg/mL           | 12mg/mL               |
| Liquid Germall® plus | 1mg/mL                 | 1mg/mL           | 1mg/mL                |
| Metilparabeno        | 2mg/mL                 | 4mg/mL           | 6mg/mL                |
| Propilparabeno       | >24mg/mL               | 8mg/mL           | >24mg/mL              |
| Phenonip®            | 4mg/mL                 | 1mg/mL           | 4mg/mL                |

As frações que apresentaram uma melhor atividade frente aos microrganismos testados foram a F2, F3b, F3a1 e a F3a2. A fração que apresentou uma melhor relação rendimento/atividade foi a fração F3a2, visto que é uma fração residual e de maior rendimento.

É possível observar que os conservantes Liquid Germall® plus e o Phenonip® apresentaram concentrações inibitórias mínimas inferiores às das frações. Esta diferença (em massa) em uma formulação utilizando as frações F3b e F3a1 seria de em relação ao Liquid Germall® plus 0,5% e de 0,2% em relação ao Phenonip®. Para as frações F2 e F3a2 esta diferença seria de 1,1% e 0,8%, em relação ao Liquid Germall® plus e o Phenonip®, respectivamente.

## 5.2. Resultados das Frações Obtidas pelo Pré-Fracionamento

### 5.2.1. Pré-Fracionamento

O pré-fracionamento se baseia no fato que durante a extração por arraste a vapor, os primeiros compostos a serem extraídos são os mais voláteis e no decorrer da extração os compostos menos voláteis são extraídos progressivamente (Steffens,

2010). No experimento obtiveram-se 12 frações a partir da extração do óleo essencial de *C. citratus* conforme os dados da Tabela 5.5.

Tabela 5.5: Dados obtidos durante a extração do óleo essencial de *C. citratus* por arraste a vapor realizado na usina da empresa Tekton Óleos Essenciais Ltda

|   |   |
|---|---|
| <b>Data Extração</b><br>07/05/2010          | <b>Tempo de Extração (s)</b><br>5337,8                |
| <b>Data da Colheita</b><br>06/05/2010       | <b>Pressão (kgf/cm<sup>2</sup>)</b><br>2,5            |
| <b>Massa de Planta (kg)</b><br>524          | <b>Temperatura na Saída do Extrator (°C)</b><br>105,5 |
| <b>Volume de Óleo Extraído (mL)</b><br>1098 | <b>Densidade do Óleo (kg/mL)</b><br>0,000851          |

No óleo essencial de *C. citratus*, é possível visualizar a variação entre compostos mais e menos voláteis analisando a concentração de mirceno e citral, sendo o mirceno mais volátil e o citral menos volátil. Assim sendo, a fração B1 foi a fração mais leve e a B12 a mais pesada, sendo esta extraída por último.

Conforme a CG/EM, o mirceno apresentou maior variação entre os compostos das amostras. As amostras B1, B2 e B3 possuem as menores quantidades de mirceno e a B4 a maior quantidade deste composto. As amostras B1, B2 e B3 apresentam a maior concentração de citral. A amostra B1 se destaca da B2 e da B3 por apresentar maior quantidade de citronelal entre as demais amostras. As demais amostras não possuem grande variação de seus componentes entre as amostras analisadas, ou seja, possuem a mesma concentração média em porcentagem de área, incluindo a amostra final (Tabela 5.6). Observa-se que nas primeiras amostras, até que o sistema entre em estado estacionário o comportamento das concentrações dependem fortemente dos componentes minoritários, visto que os valores obtidos das concentrações são relativos às áreas dos cromatogramas.

Tabela 5.6 – Composição química do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. Os valores são apresentados em porcentagem de área conforme a identificação dos compostos do óleo essencial e suas frações. As análises foram feitas por CG e CG/EM. NI = O composto não pode ser identificado. OE = óleo essencial. IR = Índice de retenção.

| Composto                   | IR          | B1           | B2           | B3           | B4           | B5           | B6           | B7           | B8           | B9           | B10          | B11          | B12          | OE           |
|----------------------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| 6-metil-5-hepten-2-ona     | 983         | 0,60         | 0,70         | 1,00         | 1,56         | 1,62         | 1,60         | 1,62         | 1,70         | 1,82         | NI           | 2,12         | 2,29         | 1,34         |
| Mirceno                    | 989         | 17,29        | 16,68        | 22,29        | 33,24        | 28,17        | 28,01        | 28,38        | 27,63        | 25,90        | 27,28        | 26,16        | 27,35        | 24,02        |
| Z-b-ocimeno                | 1035        | 0,41         | 0,43         | 0,55         | 0,80         | 0,72         | 0,72         | 0,74         | 0,73         | 0,69         | 0,68         | 0,69         | 0,72         | 0,63         |
| E-b-ocimeno                | 1045        | 0,25         | 0,28         | 0,35         | 0,51         | 0,46         | 0,46         | 0,46         | 0,46         | 0,44         | 0,44         | 0,43         | 0,46         | 0,40         |
| Linalol                    | 1096        | 0,88         | 0,77         | 0,84         | 0,99         | 1,05         | 1,03         | 0,99         | NI           | 0,96         | 0,97         | 0,99         | 1,02         | 0,93         |
| Citronelal                 | 1150        | 2,83         | 0,68         | 0,41         | 0,38         | 0,40         | 0,40         | 0,40         | 0,40         | 0,50         | 0,45         | 0,45         | 0,45         | 1,56         |
| cis-crisantenol            | 1162        | 1,24         | 1,34         | 1,51         | 1,41         | 1,59         | 1,63         | 1,67         | 1,64         | 1,70         | 1,79         | 1,73         | 1,74         | 1,56         |
| rosefuran epoxide          | 1179        | 1,62         | 1,74         | 1,97         | 1,90         | 2,10         | 2,18         | 2,23         | 2,31         | 2,38         | 2,42         | 2,40         | 2,43         | 2,07         |
| Nerol                      | 1226        | 0,33         | NI           | 0,26         | NI           | NI           | NI           | NI           | NI           | NI           | 0,22         | NI           | NI           | 0,25         |
| Citronelol                 | 1230        | 0,69         | 0,35         | 0,29         | 0,22         | 0,23         | 0,24         | 0,24         | 0,25         | 0,31         | 0,27         | 0,31         | 0,32         | 0,52         |
| <b>Neral</b>               | <b>1242</b> | <b>29,01</b> | <b>31,28</b> | <b>28,78</b> | <b>24,43</b> | <b>26,44</b> | <b>26,56</b> | <b>26,36</b> | <b>26,59</b> | <b>26,96</b> | <b>26,60</b> | <b>26,43</b> | <b>25,66</b> | <b>26,99</b> |
| Geraniol                   | 1256        | 2,29         | 2,45         | 1,92         | 1,73         | 1,82         | 1,83         | 1,88         | 1,94         | 2,18         | 1,90         | 2,29         | 2,32         | 2,61         |
| <b>Geranial</b>            | <b>1274</b> | <b>39,56</b> | <b>42,40</b> | <b>37,95</b> | <b>31,41</b> | <b>33,88</b> | <b>33,79</b> | <b>33,45</b> | <b>33,70</b> | <b>34,23</b> | <b>33,81</b> | <b>33,73</b> | <b>32,71</b> | <b>35,28</b> |
| 2-undecanona               | 1290        | 0,22         | 0,28         | 0,29         | 0,28         | 0,32         | 0,34         | 0,34         | 0,36         | 0,38         | 0,40         | 0,42         | 0,43         | 0,31         |
| Z-a-damascona              | 1350        | 0,24         | NI           | 0,11         |
| Geranil acetato            | 1379        | 0,41         | 0,18         | 0,15         | 0,13         | 0,14         | 0,15         | 0,16         | 0,17         | 0,18         | 0,19         | 0,20         | 0,21         | 0,31         |
| E-Cariofileno              | 1409        | NI           | NI           | NI           | NI           | NI           | NI           | 0,12         | 0,14         | 0,17         | 0,20         | 0,23         | 0,26         | NI           |
| a-trans-bergamoteno        | 1428        | NI           | 0,10         | 0,14         | 0,16         | 0,18         | NI           |
| Tridecanona                | 1490        | NI           | NI           | 0,16         | 0,15         | 0,17%        | 0,20         | 0,23         | 0,27         | 0,33         | 0,39         | 0,42         | 0,46         | 0,24         |
| Total identificado (%)     | -           | 98,51        | 99,56        | 98,72        | 99,13        | 99,12        | 99,13        | 99,26        | 98,30        | 99,25        | 98,14        | 99,17        | 99,01        | 99,13        |
| <b>Total de citral (%)</b> | <b>-</b>    | <b>68,57</b> | <b>73,68</b> | <b>66,74</b> | <b>55,85</b> | <b>60,33</b> | <b>60,35</b> | <b>59,81</b> | <b>60,29</b> | <b>61,19</b> | <b>60,41</b> | <b>60,16</b> | <b>58,37</b> | <b>62,27</b> |

### 5.2.1. Análise Estatística

Pode-se observar que pela análise por PCA o mirceno foi o composto que apresentou uma maior variação de concentração entre as amostras, ao contrário do que ocorreu nas amostras obtidas por destilação fracionada a vácuo, onde o citral foi o componente que apresentou a maior variação (figura 5.6). Observa-se também que a alta concentração de citronelal na amostra B1 foi percebida pelo teste estatístico (figura 5.6). Os demais componentes, os quais se concentram na origem do gráfico, não possuem uma grande variação. Os demais compostos apresentaram uma baixa variação tendo seu comportamento próximo à origem do gráfico.

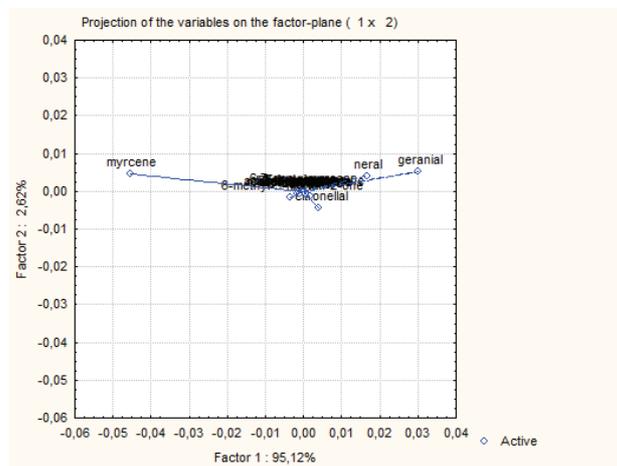


Figura 5.6.: Comportamento da variação dos compostos para as frações obtidas pelo pré-fracionamento associado à destilação por arraste a vapor.

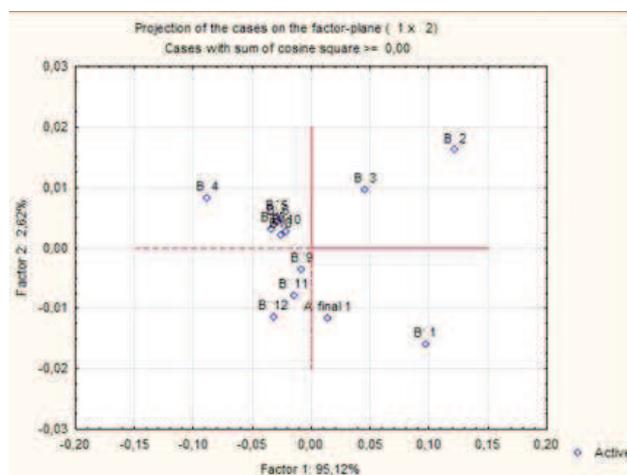


Figura 5.7.: Comportamento da variação entre as frações obtidas pelo pré-fracionamento associado à destilação por arraste a vapor.

Em relação à figura 5.7, de um modo geral o comportamento observado na distribuição das amostras nos quadrantes segue a sequência esperada, isto é, as amostras são agrupadas em função do tempo de obtenção das mesmas. Outro fator importante a ser observado é que a diferença do percentual entre as amostras, tanto em relação ao fator 1 como em relação ao fator 2 é muito menor da que foi obtida para as amostras resultantes da destilação fracionada a vácuo, significando dizer que as amostras em questão apresentam um comportamento semelhante. No dendograma (figura 5.8) pode-se verificar que o valor máximo do eixo X é de 0,06%, levando-se em consideração que o eixo possui a mesma unidade das variáveis, pode-se afirmar que este valor está abaixo do desvio padrão dos compostos de 0,02% (com exceção dos compostos mirceno, neral e geranial, mesmo assim, não interferindo na variância total das amostras).

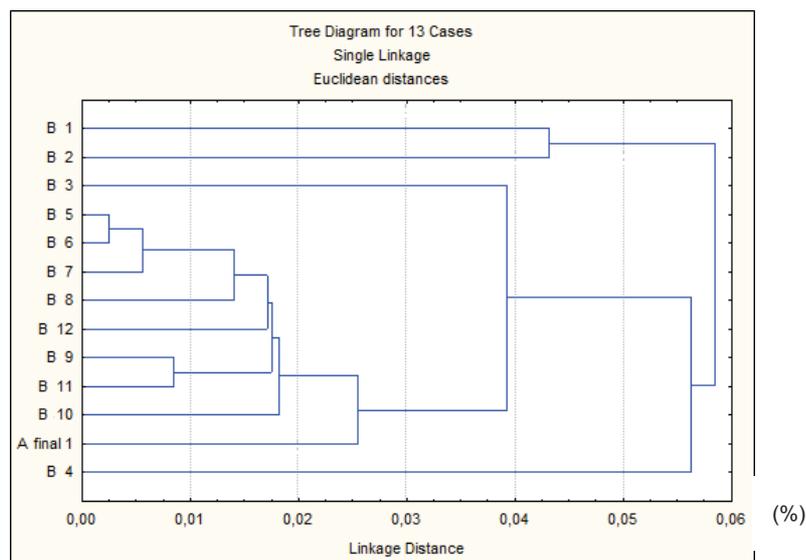


Figura 5.8.: Dendograma de similaridade entre as frações obtidas por destilação fracionada a vácuo.

### 5.2.2. Avaliação da Atividade Antimicrobiana pelo Método de Bioautografia Indireta

A bioautografia para as frações obtidas pelo pré-fracionamento foi realizada apenas pelo sistema de pontos (sem o desenvolvimento das cromatografias), porque já foi visto no fracionamento anterior que a zona de maior inibição é a zona que contém maiores concentrações de citral e mirceno. Como foi aplicada a mesma

quantidade (1,2µL) das frações, dos padrões (citral, citronelal e linalol) e do óleo essencial nas placas, podem-se comparar os resultados semi-quantitativamente (Tabela 5.7 e Figuras 5.9, 5.10 e 5.11).

Tabela 5.7: Média dos diâmetros de halo de inibição gerado pelas amostras e os respectivos desvios padrões (DP) frente aos microrganismos testados.

|            | <i>S. aureus</i> |         | <i>S. Choleraesuis</i> |         | <i>P. aeruginosa</i> |         |
|------------|------------------|---------|------------------------|---------|----------------------|---------|
|            | Média (mm)       | DP (mm) | Média (mm)             | DP (mm) | Média (mm)           | DP (mm) |
| Citral     | 9,62             | 0,6058  | 17,02                  | 0,3860  | 6,58                 | 0,3464  |
| Citronelal | 8,57             | 0,4808  | 10,51                  | 1,3676  | 0,00                 | 0,0000  |
| Linalol    | 0,00             | 0,0000  | 6,28                   | 0,7710  | 0,00                 | 0,0000  |
| OE         | 8,46             | 2,1192  | 8,35                   | 1,4919  | 6,83                 | 0,0141  |
| B1         | 12,17            | 2,7937  | 12,53                  | 0,7919  | 5,87                 | 0,2545  |
| B2         | 11,07            | 2,3390  | 14,61                  | 1,9516  | 6,73                 | 0,0000  |
| B3         | 9,81             | 2,9237  | 14,77                  | 1,8857  | 6,25                 | 0,0353  |
| B4         | 8,43             | 0,3512  | 11,13                  | 0,2276  | 7,46                 | 1,0182  |
| B5         | 8,54             | 0,5524  | 10,01                  | 2,0564  | 8,51                 | 1,2586  |
| B6         | 7,53             | 0,4646  | 9,12                   | 1,5704  | 6,81                 | 0,0212  |
| B7         | 8,73             | 0,2170  | 12,65                  | 0,2121  | 7,04                 | 0,4454  |
| B8         | 9,04             | 0,6885  | 13,62                  | 0,2757  | 7,19                 | 0,4596  |
| B9         | 8,35             | 0,7814  | 11,78                  | 0,6646  | 8,36                 | 0,2899  |
| B10        | 8,33             | 0,4313  | 10,76                  | 0,0494  | 7,74                 | 0,5868  |
| B11        | 8,73             | 0,5940  | 9,98                   | 0,0848  | 11,19                | 0,0212  |
| B12        | 8,53             | 0,9014  | 10,69                  | 0,8730  | 10,6                 | 3,2908  |

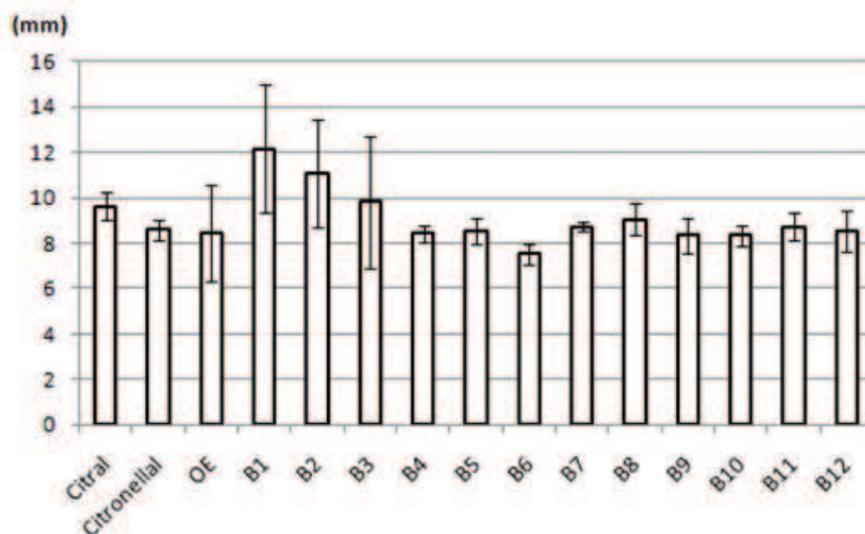


Figura 5.9: Gráfico de colunas das amostras que geraram halo de inibição frente a *S. aureus* com os respectivos desvios padrões.

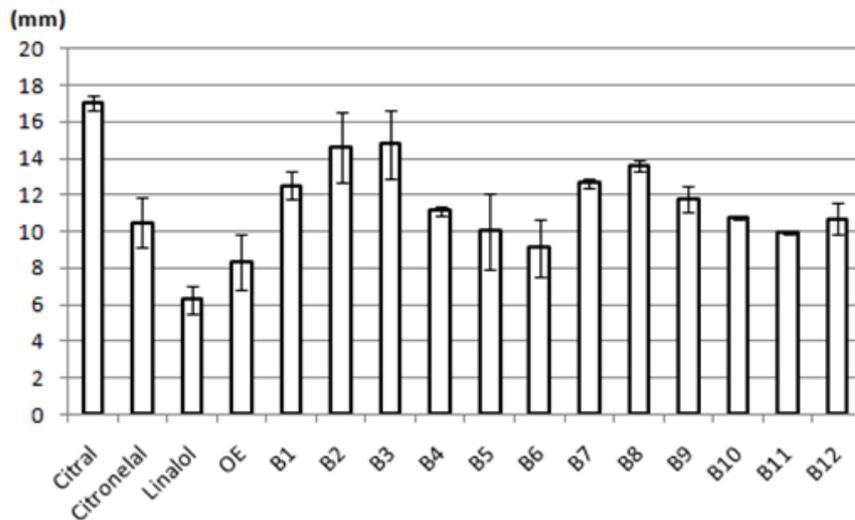


Figura 5.10: Gráfico de colunas das amostras que geraram halo de inibição frente a *S. Choleraesuis* com os respectivos desvios padrões.

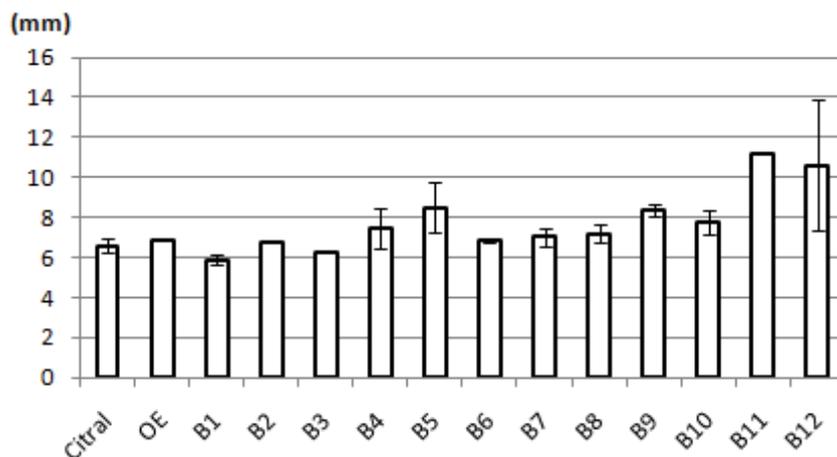


Figura 5.11: Gráfico de colunas das amostras que geraram halo de inibição frente a *P. aeruginosa* com os respectivos desvios padrões.

Devido à amplitude dos desvios padrões, os testes frente a *S. aureus* não apresentam resultados conclusivos, visto que o desvio padrão do óleo essencial abrange os resultados obtidos pelas frações. Já as frações B1, B2, B3, B4, B7, B8, B9, B10 e B12 apresentaram halos de inibição superiores ao do óleo essencial frente a *S. Choleraesuis*. Frente a *P. aeruginosa*, as frações B5, B9, B11 e B12

foram superiores. Para a confirmação e conclusão dos resultados destas frações, foi determinada a concentração inibitória mínima da fração B8. A seleção da amostra em questão não foi devido ao fato da mesma exibir os maiores halos de inibição frente aos três microrganismos, mas por sempre figurar em uma zona sem grande déficit frente às frações de maiores halos. Outro fator que justifica a determinação da CIM somente para uma amostra são os resultados do PCA (figura 5.7) que indicam uma grande semelhança entre todas as frações obtidas.

### 5.2.3. Determinação da Concentração Inibitória Mínima

Após a confirmação da atividade antimicrobiana das frações e do óleo de *C. citratus*, foram realizados testes de concentração inibitória mínima, utilizando a fração B8, fração destacada pela bioautografia. Ela apresentou concentrações inibitórias mínimas de 4mg/mL para *S. Choleraesuis* e *S. aureus* e 12mg/mL para *P. aeruginosa*, concentrações inferiores a do óleo essencial (Tabela 5.8).

Tabela 5.8: Concentração inibitória mínima do óleo essencial de *C. citratus* e suas frações obtidas pelo pré-fracionamento.

|                      | <i>S. Choleraesuis</i> | <i>S. aureus</i> | <i>P. aeruginosa</i> |
|----------------------|------------------------|------------------|----------------------|
| EO                   | 24mg/mL                | 6mg/mL           | 24mg/mL              |
| B8                   | 4mg/mL                 | 4mg/mL           | 12mg/mL              |
| Liquid Germall® plus | 1mg/mL                 | 1mg/mL           | 1mg/mL               |
| Metilparabeno        | 2mg/mL                 | 4mg/mL           | 6mg/mL               |
| Propilparabeno       | >24mg/mL               | 8mg/mL           | >24mg/mL             |
| Phenonip®            | 4mg/mL                 | 1mg/mL           | 4mg/mL               |

É possível observar que os conservantes Liquid Germall® plus, Phenonip® e o metilparabeno apresentaram concentrações inibitórias mínimas inferiores à da fração. Esta diferença (em massa) em uma formulação utilizando a fração B8 seria de 1,1% em relação ao Liquid Germall® plus e de 0,6% em relação aos metilparabeno.

### 5.3. Determinação da Atividade Antimicrobiana dos Sabonetes Formulados

#### 5.3.1. Contagem do Número Total de Microrganismos Mesofílicos

Os experimentos de contagem do número total de microrganismos mesofílicos, com o objetivo de verificar se existe contaminação das amostras, foram realizados e houve ausência de crescimento microbiano para todas as amostras, incluindo a amostra que não continha frações ou óleo essencial. Os experimentos foram repetidos por mais três vezes com o objetivo de confirmar os resultados anteriores, novamente não houve crescimento microbiano.

#### 5.3.2. Teste de Eficácia Antimicrobiana

Durante os testes de eficácia antimicrobiana a  $1,0 \times 10^6$  UFC/mL (valor recomendado pela Farmacopeia Brasileira, 2010) também não se observou crescimento microbiano. A triplicata foi repetida e, não havendo crescimento novamente, decidiu-se aumentar a concentração do inóculo, alcançando a  $1,0 \times 10^8$  UFC/mL. Mesmo com a concentração aumentada não houve crescimento microbiano nos intervalos de 7, 14 e 28 dias na amostra que não continha o óleo essencial e nas amostras com as frações do óleo essencial de *C. citratus*. Novamente foram realizadas duas duplicatas para confirmação dos resultados.

#### 5.3.3. Diferenciação da Atividade Antimicrobiana das Amostras de Sabonetes

Não sendo possível diferenciar as amostras quanto à ação antimicrobiana pelos ensaios definidos na Farmacopeia Brasileira (2010), foi proposto e executado neste trabalho experimentos de difusão em ágar de sabonetes. Deste modo foi possível observar halos de inibição bem definidos para cada amostra, mas novamente a amostra sem o óleo essencial apresentou uma inibição de crescimento microbiano.

Para as amostras testadas frente a *S. aureus* observou-se que a amostra sem o óleo essencial ou suas frações apresentou halos de menor diâmetro que as

amostras que continham o óleo essencial ou suas frações. A amostra que apresentou a maior média em relação às demais foi aquela que continha 0,15% de óleo essencial de capim limão (Tabela 5.9 e Figura 5.12).

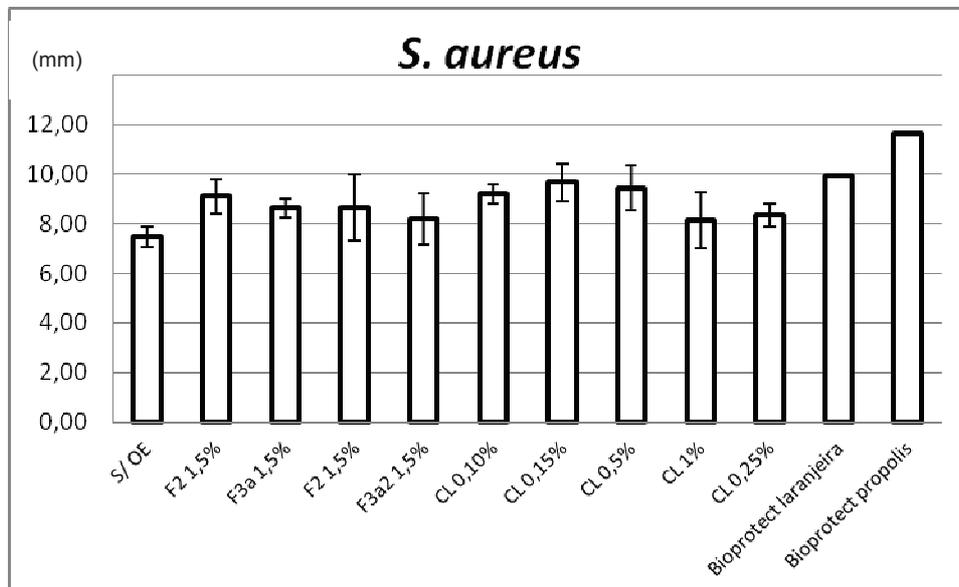


Figura 5.12: Diâmetro dos halos de inibição frente a *S. aureus*, gerados pelas amostras de sabonetes.

Tabela 5.9: Média dos diâmetros de halo de inibição gerado pelas amostras e respectivos desvios padrões (DP) frente aos microrganismos testados.

|                     | <i>S. aureus</i> |          | <i>S. Choleraesuis</i> |          |
|---------------------|------------------|----------|------------------------|----------|
|                     | Média (mm)       | DP (mm)  | Média (mm)             | DP (mm)  |
| S/ OE               | 7,48             | 0,410528 | 7,63                   | 0,370405 |
| F2 1,5%             | 9,11             | 0,693277 | 11,17                  | 0,576628 |
| F3a 1,5%            | 8,63             | 0,369369 | 9,12                   | 0,74272  |
| F2 1,5%             | 8,65             | 1,332604 | 11,31                  | 0,565066 |
| F3a2 1,5%           | 8,20             | 1,036356 | 9,55                   | 0,263881 |
| CL 0,10%            | 9,21             | 0,381576 | 10,28                  | 0,177858 |
| CL 0,15%            | 9,67             | 0,74628  | 10,13                  | 0,875233 |
| CL 0,5%             | 9,45             | 0,900463 | 10,49                  | 0,53563  |
| CL 1%               | 8,14             | 1,120669 | 10,78                  | 0,904157 |
| CL 0,25%            | 8,33             | 0,46929  | 11,56                  | 0,977667 |
| Bioprotect laranja  | 9,93             | 0,788057 | 11,52                  | 0,542433 |
| Bioprotect propolis | 11,66            | 0,348712 | 11,67                  | 0,93723  |

A amostra em que se observou a maior média de halos de inibição frente a *S. Choleraesuis* foi a amostra que continha 0,25% de óleo essencial de capim limão.

Esta amostra engloba ainda, dentro de seu desvio padrão, as amostras F2 (1,5%) e as amostras que continham o óleo essencial de capim limão (a 1,00%, 0,5% e 0,15%) (Figura 5.13 e Tabela 5.9). Frente a *P. aeruginosa* nenhuma amostra apresentou halos de inibição.

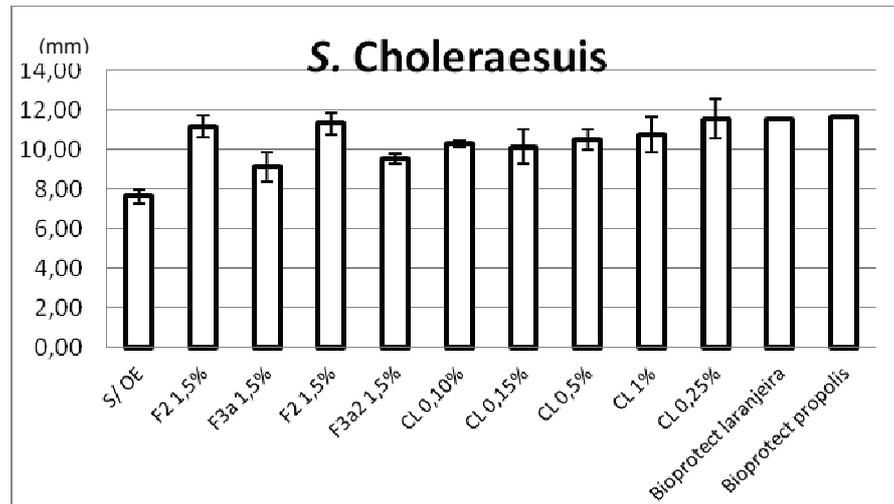


Figura 5.13: Diâmetro dos halos de inibição frente a *S. Choleraesuis*, gerados pelas amostras de sabonetes.

Durante os experimentos para diferenciação de concentração inibitória mínima se pode verificar uma maior potência de alguns conservantes sintéticos em relação às frações. Nestes experimentos, os sabonetes comerciais não apresentaram uma diferença significativa de potência (com exceção do sabonete Bioprotect® própolis frente a *S. aureus*).

As duas amostras que continham a fração F2 obtida por destilação fracionada a vácuo apresentaram resultados similares, comprovando a reprodutibilidade dos mesmos.

Apesar da diferença na concentração inibitória mínima, as amostras que apresentaram maiores médias de halos de inibição, quando inseridas em uma formulação, foram as com o óleo essencial de capim limão não fracionado. Este fato ocorre devido à alta volatilidade de algumas frações utilizadas, já que o processo de produção de sabonetes ocorre a temperaturas superiores a 30°C.

## 6. CONCLUSÕES

Após a finalização dos experimentos foi possível observar que ambas as técnicas de fracionamento do óleo essencial se mostraram eficazes, mesmo que de modos diferentes. A destilação fracionada a vácuo proporcionou a obtenção de frações mais distintas e com uma grande variação na proporção dos compostos em cada fração. O pré-fracionamento possibilitou a amostragem de frações muito semelhantes em relação aos seus compostos majoritários, mas distintas em relação aos seus compostos minoritários. Sendo a destilação fracionada a vácuo a metodologia que apresentou amostras com diferenças significativas, comprovadas pela análise de PCA.

Todas as frações obtidas apresentaram atividade antimicrobiana, mesmo que algumas necessitassem de uma quantidade relativamente alta (24mg/mL) para inibir o crescimento microbiano. É importante evidenciar que os dois métodos de obtenção de frações possibilitaram um aumento da potência em relação ao óleo essencial original.

Os métodos de determinação da atividade antimicrobiana qualitativos e semi-qualitativos foram satisfatórios em relação aos resultados conquistados. Em um primeiro momento, realizou-se a cromatografia em camada delgada para observar se existia alguma outra banda, além da característica do citral no cromatograma, que apresentava atividade antimicrobiana. A partir do resultado em que apenas esta banda apresentava atividade antimicrobiana decidiu-se aplicar sobre a placa uma quantidade conhecida do óleo essencial e de suas frações obtidas pelo pré-fracionamento para obter um resultado semi-quantitativo. Esta etapa foi um sucesso, ficando evidente uma diferença de atividade antimicrobiana de uma fração para outra e o aumento da potência das frações em relação ao óleo essencial original, posteriormente comprovados pelos experimentos de concentração inibitória mínima.

Apesar do baixo rendimento a fração F2 (11,00%) e de não ser a fração com menor concentração inibitória mínima foi a fração que apresentou a melhor resposta quando incorporada à formulação de sabonetes. Destacando-se das amostras que utilizam o óleo essencial de capim limão não fracionado pela reprodutibilidade assegurada pelo processo de destilação fracionada a vácuo, visto que o óleo pode ter sua composição alterada sazonalmente.

As amostras de sabonete recebidas após a formulação pela indústria Memphis S.A. demonstraram a viabilidade de se obter um produto antimicrobiano utilizando fontes naturais para exercer esta atividade, sem a necessidade de um antimicrobiano sintético, cumprindo assim o principal objetivo deste estudo, a incorporação das frações ou do óleo essencial de capim limão na formulação de sabonetes para higiene pessoal.

## 7. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS

- Buscar óleos essenciais com atividade antimicrobiana frente a *S. aureus*, *S. Choleraesuis* e *P. aeruginosa*;
- Buscar óleos essenciais de plantas nativas do Rio Grande do Sul com atividade antimicrobiana frente a *S. aureus*, *S. Choleraesuis* e *P. aeruginosa*;
- Realizar o fracionamento e identificação dos compostos com atividade antimicrobiana destes óleos essenciais;
- Iniciar experimentos de sinergismo e antagonismo entre terpenos;
- Projetar e implantar uma coluna de destilação fracionada a vácuo para futuro *scale up* e modelagem matemática do processo.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography / Mass Spectrometry**. 4<sup>th</sup> ed. City: Allured Publishing Corporation, 2007. 804 pág.

BAKKALI, F, AVERBECK, S; AVERBECK, D; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**., 46 (2): 446-475. 2008.

BELSITO, EL; CARBONE,C; DI GIOIA, ML; LEGGIO, A; LIGUORI, A; PERRI, F; SICILIANO, C; VISCOMI, MC. Comparison of the Volatile Constituents in Cold-Pressed Bergamot Oil and a Volatile Oil Isolated by Vacuum Distillation. **J. Agric. Food Chem.** 55(19): 7847–7851. 2007.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. **Int J Food Microbiol**. V. 94, p. 223-53, 2004.

BRUNETON, Jean. **Farmacognosia: fitoquímica: plantas medicinales**. 2. ed. Zaragoza : Acribia, 2001. 1099 p.

CASSEL, E; VARGAS, RMF. Proceso industrial de destilación por arrastre a vapor de aceite esencial de romero. **Revista de investigacion**, v. 01, p. 11-18, 2008.

CASSEL, E. VARGAS, RMF; MARTINEZ, N; LORENZO, D; DELLACASSA, E. Modeling for essential oil extraction process. **Industrial Crops and Products**, v. 29, p. 171-176, 2009.

CASSEL, E; VARGAS, RMF; BRUN, GW; ALMEIDA, DE; COGOI, L; FERRARO, G; FILIP, R. Supercritical fluid extraction of alkaloids from *Ilex paraguariensis* St. Hil.. **Journal of Food Engineering**. 100 (4). p. 656-661. 2010.

CHOMA IM, GRZELAK EM. Bioautography detection in thin-layer chromatography. **J Chromatogr A**. 1218(19): 2684-91. 2011.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Fundamentos de cromatografia**. 1º edição. São Paulo: editora da UNICAMP. 2007. 456p.

CZEPAK, M. P.; BANDONI, A. **Os Recursos Vegetais Aromáticos no Brasil: Seu Aproveitamento Para a Produção de Aromas e Sabores**. 1. ed. Vitória: EDUFES, 2008. 624 p.

**Farmacopéia Brasileira**. 5.ed. São Paulo: ANVISA, 2010.

FRANCO, J. **Prospecção fitoquímica e análise e microbiológica do óleo essencial de *Eucalyptus cinerea* F.v. Muell. Ex.Benth., myrtaceae**. Curitiba, 2005. Dissertação de mestrado. Setor de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Paraná. Brasil.

HAIR, J; BLACK, W; ANDERSON, R; BABIN, B. **Análise multivariada de dados**. 6. ed. Porto Alegre : Bookman, 2009. 688 p.

HORVÁTH, G; JÁMBOR, N; VÉGH, A; BÖSZÖRMÉNYI, A; LEMBERKOVICS, É; HÉTHELYI, É; KOVÁCS, K; KOCSIS, B. Antimicrobial activity of essential oils: the possibilities of TLC–bioautography. 25(3): 178–182. 2010.

HOSTETTMANN, K; QUEIROZ, EF; VIEIRA, P. **Princípios Ativos de Plantas Superiores**. São Carlos: Edufscar, 2003. 152p.

LEWINSOHN, E; DUDAI, N; TADMOR, Y; KATZIR, I; RAVID, U; PUTIEVSK, E; JOEL, DM. Histochemical Localization of Citral Accumulation in Lemongrass Leaves (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf., Poaceae). **Annals of Botany**. V 81, P. 35-39. 1997.

LUCAS, Aline. **Estudo comparativo de extratos voláteis de eucaliptos geneticamente modificados e não geneticamente modificados** [Dissertação de mestrado em Engenharia e Tecnologia de Materiais]. Porto Alegre (RS): Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 2011.

NCCLS- *National Committee for Clinical Laboratory Standards* – Padronização dos **Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão**: Norma Aprovada – Oitava Edição, M2-A8, EUA, 2003, Volume 23 nº1. (atual CLSI - [www.clsi.org](http://www.clsi.org))

ONAWUNMI, GO.; YISAKAND, W.; OGUNLANA, EO. Antibacterial constituents in the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. **Journal of Ethnopharmacology**. 12(3): 279-286. 1984.

PEREIRA, Marcos Aurélio Almeida. **Estudo da atividade antimicrobiana de óleos essenciais extraídos por destilação por arraste a vapor e por extração supercrítica** [Dissertação de mestrado em Engenharia e Tecnologia de Materiais]. Porto Alegre (RS): Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 2010.

ROSSI, PG; BERTI, L; PANIGHI, J; LUCIANI, A. Antibacterial Action of Essential Oils from Corsica. **Journal of Essencial Oil Research**. 19(2): 176-182. 2007.

SABULAL, B; RAJANI, K; VARUGHESE, G; Dan, M; NEDIYAPARAMBU S. Chemical Composition and Antibacterial Activity of the Rhizome and Leaf Oils of *Amomum Hypoleucum Thwaites*. **Journal of Essencial Oil Research**. 19(3): 279-281. 2007.

SAMUELSSON, Gunnar. **Drugs of Natural Origin: A Textbook of Pharmacognosy**. Stockholm, Swedish Pharmaceutical Press, 1999. 551p.

SANTOYO, S. CAVERO, S.; JAIME, L.; IBAÑEZ, E.; SEÑORÁNS, FJ.; REGLERO, G. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of *Rosmarinus officinalis* L. Essential Oil obtained via Supercritical Fluid Extration. **Journal of Food Protection**, 68(4):790-795. 2005.

SERAFINI, Luciana Atti ; CASSEL, Eduardo. Produção de Óleos Essenciais: Uma Alternativa para a Agroindústria Nacional. In: Luciana Atti Serafini; Neiva Monteiro de Barros; João Lúcio de Azevedo. (Org.). *Biotecnologia na Agricultura e na Agroindústria*. 01 ed. Guaíba - RS: Livraria e Editora Agropecuária Ltda., 2001, v. , p. 333-378.

SIMÕES, Claudia Maria Oliveira *et alli*. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 1ª Ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. Universitária/UFRGS/Ed.UFSC, 1999. 821p.

SKOOG, DA. **Fundamentos de química analítica**. 8. ed. São Paulo : Thomson, 2008. 999 p.

SOSAN, MB; ADEWOYIN, FB; ADEWUNMI, CO. Larvicidal properties of three indigenous plant oils on the mosquito *Aedes aegypti*. **Nig. J. Nat. Prod. and Med.** 5(1): 30-33. 2001.

STAVRI, M; PATON, A; SKELTON, BW; GIBBONS, S. Antibacterial Diterpenes from *Plectranthus ernstii*. **J. Nat. Prod.** 72(9): 1191–1194. 2009.

STEFFENS, Andréia Holtz. **Estudo da Composição Química dos Óleos Essenciais Obtidos por Destilação por Arraste a Vapor em Escala Laboratorial e Industrial.** [Dissertação de mestrado em Engenharia e Tecnologia de Materiais]. Porto Alegre (RS): Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 2010.

TAN, M; ZHOU, L; QIN, M; LI, D; JIANG, W; WANG, Y; HAO, X; Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Flower Oil of *Russowia sogdiana* (Bunge) B. Fedtsch. (Asteraceae) from China. **Journal of Essential Oil Research.** 19: 197-200. 2007.

TEISSEIRE, Paul Jose. **Chemistry of fragrant substances** New York, NY : VCH, 1994. 458 p.

TORRES, Fernando Cidade. **Avaliação da atividade carrapaticida de frações dos óleos essenciais de citronela (*C. winterianus*), alecrim (*R. officinalis*) e aroeira (*S. molle*)** [Dissertação de mestrado em Engenharia e Tecnologia de Materiais]. Porto Alegre (RS): Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 2010.

TRONGTOKIT, Y; RONGSRIYAM, Y; KOMALAMISRA, N; APIWATHNASORN, C. Comparative repellency of 38 essential oils against mosquito bites. **Phytotherapy Research.** 19(4): 303-309. 2005.

VALGAS, C; Souza, SM; Smânia, EFA; Smânia Jr., A. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. **Braz. J. Microbiol.** 38(2): 369 - 380. 2007.

VALGAS, C. **Avaliação de método de triagem para determinação de atividade antibacteriana de produtos naturais.** [Dissertação de mestrado em Farmácia. Faculdade de Farmácia]. Florianópolis (SC): Universidade Federal de Santa Catarina; 2002. 103p.

WANG, L; ZOU, S; YIN, S; LIU, H; YU, W; GONG, Q. Construction of an effective screening system for detection of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing inhibitors and its application in bioautographic thin-layer chromatography. **Biotechnol Lett.** 33(7):1381-7. 2011.

WANKAT, PC. **Separation process engineering.** 2. ed. Upper Saddle River : Prentice Hall, 2007. 738 p.

YUNES, RA; CALIXTO, JB. **Plantas Medicinais: sob a ótica da química medicinal moderna.** ARGOS: Editora Universitária, Chapecó; 2001