

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE QUÍMICA

THAÍS ALINE POHREN FERREIRA

**OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE ANÁLISE QUALITATIVA DE COMPONENTES  
DE ESSÊNCIAS E PRESENÇA DE AÇÚCARES ATRAVÉS DA ELIMINAÇÃO DA  
ETAPA DE MOAGEM EM CHÁS**

Porto Alegre, 2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE QUÍMICA

THAÍS ALINE POHREN FERREIRA

**OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE ANÁLISE QUALITATIVA DE COMPONENTES  
DE ESSÊNCIAS E PRESENÇA DE AÇÚCARES ATRAVÉS DA ELIMINAÇÃO DA  
ETAPA DE MOAGEM EM CHÁS**

Trabalho de Conclusão apresentado junto à atividade de ensino “Projeto Tecnológico – QUI” do curso de Química Industrial, como requisito parcial para obtenção do grau de Químico Industrial.

Prof(a). Dr(a). Tânia Mara Pizzolato

Orientadora

Porto Alegre, 2012

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes da minha vida: meu pai, minha mãe e meu grande amor.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela serenidade e paciência para me manter focada nos meus objetivos mesmo quando a vida me deu uma “rasteira”.

À minha família muito amada: minha mãe Ereni pelos incansáveis conselhos e afagos sempre lutando para que eu pudesse alcançar meus objetivos, a meu amado pai, que mesmo tendo partido neste último ano de faculdade, esteve presente o tempo todo me amando, me incentivando e fazendo questão de lembrar o quanto se sentia orgulhoso. Eu te amo e sei que estás por perto! Ao meu irmão e sobrinha pelo incentivo.

Agradeço ao amor da minha vida, Arlen, pois sei que sem ti nada disto seria possível. Obrigada pelo amor, pelo carinho, pela compreensão e por me ensinar a manter a calma e tranquilidade quando isso já não era mais possível para mim.

Agradeço a minha grande amiga e companheira Aline, que desde o primeiro semestre me acompanha nesta jornada. Obrigada por nunca me deixar desistir.

Agradeço aos demais amigos que estiveram ao meu lado sempre e que entenderam os motivos de muitas vezes eu não poder comparecer junto a eles.

Um muito obrigada especial a Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Tânia Mara Pizzolato pela atenção, esforço e paciência dedicados a mim durante o preparo deste projeto.

Por fim, agradeço a Souza Cruz pela oportunidade de me desenvolver como pessoa e como profissional.

## RESUMO

Otimização em procedimentos de análises são de extrema importância em laboratórios de grandes empresas. Como alguns ensaios possuem características semelhantes, o objeto do estudo do presente trabalho foi a redução de etapas em procedimentos para a determinação de componentes de essências e açúcares em chás. O projeto divide-se em duas etapas: a proposição da retirada da etapa de moagem de amostras de chá para efetuar estes ensaios e a unificação da etapa de extração, empregando o mesmo solvente: metanol ou dimetilformamida. Para estas avaliações utilizou-se a técnica de cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas e através de testes comparativos dos perfis cromatográficos a viabilidade das propostas foi avaliada. Na primeira etapa, o estudo foi realizado comparando as amostras de chá moído e sem moer e investigando se a matriz com granulometria maior apresentava o mesmo perfil cromatográfico da amostra moída. Estes resultados mostraram que foi possível realizar os ensaios com chá retirado diretamente do sachê, sem necessidade de redução do tamanho de partícula. Na segunda parte das otimizações, para a etapa de extração, foram avaliados dois solventes: o dimetilformamida e o metanol. Constatou-se que a dimetilformamida é capaz de extrair mais compostos do que o metanol para o ensaio de componentes de essências e que os açúcares são extraídos em maior quantidade por este solvente. Através dos resultados obtidos, a dimetilformamida foi definida como solvente de extração nos dois ensaios, unificando esta etapa. As otimizações geraram ganho em produtividade e na ergonomia do processo diminuindo o tempo gasto para realizar as análises completas, além de reduzir o custo total das análises e os resíduos gerados

**Palavras-chave:** Chá. Moagem. Extração. Cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estruturas da teobromina, cafeína e teofilina, respectivamente.

Figura 2 - Estruturas da glicose e frutose, respectivamente.

Figura 3 – Estrutura química da carvona.

Figura 4 – Atividade enzimática observada na menta espicata. As enzimas numeradas são: (1) limoneno-6-hidroxilase, (2) limoneno-3-hidroxilase, (3) terpenona- $\Delta$ -epoxidase. A reação é catalisada pelo mentofurano (4).

Figura 5 – Eugenol, Acetoeugenol e Cariofileno, respectivamente.

Figura 6 – Intermediários preparados a partir do eugenol.

Figura 7 – d-limoneno, componente principal do óleo essencial de limão

Figura 8 – Esquema de um Cromatógrafo a Gás com Espectrômetro de Massas acoplado.

Figura 9 – Fluxograma geral para análise de Componentes de Essências em chás.

Figura 10 – Reação geral para derivatização.

Figura 11 – Reação de Derivatização de sililação.

Figura 12 – Fluxograma geral para análise de Açúcares em chá.

Figura 13 – Otimização do processo de extração utilizando metanol como solvente extrator.

Figura 14 - Otimização do processo de extração utilizando DMF como solvente extrator.

Figura 15 – Cromatogramas dos três chás na análise de componentes de essências – Identificação de marcadores. Os picos numerados representam os marcadores para cada caso.

Figura 16 – Cromatograma do chá de limão moído após moagem do chá de hortelã (sinal em vermelho) sobreposto ao cromatograma do chá de limão sem moer (sinal em preto). A seta indica a presença do marcador do chá de hortelã carvona presente no chá de limão, mostrando a contaminação do processo.

Figura 17 – Cromatogramas do chá de cravo sem moer (sinal em preto) e do chá de cravo moído após moagem do chá de hortelã (sinal em vermelho). Seta identifica a presença de um composto contaminante do processo: a carvona.

Figura 18 - Cromatogramas do chá de hortelã sem moer (sinal em preto) e do chá de hortelã moído após o chá de cravo (sinal em vermelho). A seta indica o eugenol, que neste caso não foi considerado um contaminante de processo por estar presente também no chá de hortelã sem moer.

Figura 19 – Cromatogramas dos ensaios de componentes de essências no chá de cravo moído e do cromatograma chá de cravo sem moer. Os picos numerados representam os compostos mais significativos das amostras que foram tentativamente identificados e comparados

Figura 20 – Cromatogramas dos ensaios de componentes de essências no chá de limão moído e do cromatograma do chá de limão sem moer. Os picos numerados representam os compostos mais significativos das amostras que foram tentativamente identificados e comparados.

Figura 21 – Cromatogramas dos ensaios de componentes de essências no chá de limão moído e do cromatograma do chá de limão sem moer. Os picos numerados representam os compostos mais significativos das amostras que foram tentativamente identificados e comparados.

Figura 22 - Cromatogramas dos ensaios de açúcares no chá de cravo sem moer e do chá de cravo moído. Os picos numerados representam os açúcares das amostras que foram tentativamente identificados e comparados.

Figura 23 - Cromatogramas dos ensaios de açúcares no chá de limão sem moer e do chá de limão moído. Os picos numerados representam os açúcares das amostras que foram tentativamente identificados e comparados.

Figura 24 - Cromatogramas dos ensaios de açúcares no chá de hortelã sem moer e do chá de hortelã moído. Os picos numerados representam os açúcares das amostras que foram tentativamente identificados e comparados.

Figura 25 – Formas da glucopirranose (glicose) que se apresentam em análises de GC, caracterizando dois picos: Forma  $\alpha$  (1) e Forma  $\beta$  (2).

Figura 26 – Espectro de massas da  $\alpha$ -D-Glicopirranose – TMS

Figura 27 – Espectro de massas da  $\alpha$ -D-Frutofuranose – TMS

Figura 28 – Cromatogramas de componentes de essências do chá de cravo em DMF e em metanol.

Figura 29 – Cromatogramas de componentes de essências do chá de limão em DMF e em metanol.

Figura 30 – Cromatograma de análise de componentes de essências do chá de limão com extração em DMF, ampliando a imagem nos minutos iniciais do cromatograma. Os picos numerados representam os principais compostos da essência de limão e estão referenciados na Tabela 8.

Figura 31 – Cromatogramas de análise de componentes de essências do chá de limão com extração em DMF e extração em metanol, ampliando a imagem nos minutos iniciais do cromatograma para visualizar as diferenças significativas.

Figura 32 – Cromatogramas de componentes de essências do chá de hortelã em DMF e em metanol.

Figura 33 – Cromatogramas do ensaio de açúcares do chá de limão em DMF e em metanol.

Figura 34 – Cromatogramas do ensaio de açúcares do chá de limão em DMF e em metanol.



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Marcadores selecionados para cada chá, mostrando o tempo de retenção e os íons selecionados para o monitoramento de íons que avaliarão a possibilidade de contaminação através do processo de moagem das amostras.

Tabela 2 – Apresentação do resultado obtido em cada chá para a análise de contaminação através do processo de moagem. São identificados o marcador que foi buscado no cromatograma e se este estava presente ou ausente nos métodos no modo SIM e no modo SCAN. A identificação de cada símbolo pode se vista na legenda abaixo.

Tabela 3 - Comparação entre os compostos tentativamente identificados através de GC-MS no ensaio de açúcares para os chás moídos e os chás sem moer. A presença do composto é indicada pelo símbolo “x” marcado.

Tabela 4 - Comparação entre os compostos tentativamente identificados através de GC-MS no ensaio de componentes de essências para os chás moídos e os chás sem moer. A presença do composto é indicada pelo símbolo “x” marcado.

Tabela 5 - Comparação entre os compostos tentativamente identificados através de GC-MS no ensaio de componentes de essências para os chás extraídos com Metanol (MeOH) e com dimetilformamida (DMF). A presença do composto é indicada pelo símbolo “x” marcado.

Tabela 6 – Principais compostos identificados tentativamente através de GC-MS no chá de limão extraído com DMF.

Tabela 7 – Comparação ativo entre os compostos tentativamente identificados através de GC-MS no ensaio de açúcares para os chás empregando metanol e DMF. A presença do composto é indicada pelo símbolo “x” marcado.

Tabela 8 – Custos de cada recurso que será utilizado para o cálculo de custo das análises de determinação de açúcares e de umectantes.

Tabela 9 – Apresentação do tempo gasto pelo operador por atividade, reagentes e custos relacionados com cada item para cada processo efetuado: situação atual,

proposta tecnológica utilizando o metanol e o DMF como solventes extratores. Também é mostrado o custo total envolvido para cada situação.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	14
2.1 A COMPOSIÇÃO DE CHÁS DE USO TERAPÊUTICO.....	14
2.2 TÉCNICAS ANALÍTICAS MAIS UTILIZADAS PARA A DETERMINAÇÃO DOS COMPONENTES DE CHÁ .....	22
<b>2.2.1 Cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas</b> .....	22
2.3 MÉTODOS ATUALMENTE UTILIZADAS PARA A DETERMINAÇÃO DE ESSÊNCIAS E AÇÚCARES EM CHÁS.....	25
2.4 MOAGEM DE FOLHAS .....	27
<b>3 SITUAÇÃO ATUAL</b> .....	29
3.1 DETERMINAÇÃO DE COMPONENTES DE ESSÊNCIAS EM CHÁS .....	29
3.2 DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES EM CHÁ .....	30
<b>4 OBJETIVO</b> .....	33
4. 1 OBJETIVO GERAL.....	33
4. 2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
<b>5 PROPOSTA TECNOLÓGICA</b> .....	34
<b>6 METODOLOGIA</b> .....	36
<b>7 RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	41
7.1 DETERMINAÇÃO DE MARCADORES DE CADA CHÁ.....	41
7.2 RESULTADOS DA PRESENÇA DOS CONTAMINANTES DO PROCESSO DE MOAGEM .....	42
7.3 COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS EM AMOSTRAS DE CHÁ MOÍDO E DESFIADO .....	45
7.4 COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS PARA ANÁLISE DE AÇÚCARES E COMPONENTES DE ESSÊNCIAS OBTIDOS COM UNIFICAÇÃO DE SOLVENTE.....	52
<b>8 ANÁLISE DE CUSTOS</b> .....	62

<b>9 CONCLUSÃO</b> .....	64
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	65
<b>ANEXOS</b> .....	68
ANEXO A.....	68
ANEXO B.....	69

## 1 INTRODUÇÃO

Atualmente, o chá é a segunda bebida mais consumidas no mundo, perdendo apenas para água. Seu consumo apresenta-se em uma crescente devido a recentes descobertas de propriedades terapêuticas e benefícios a saúde, desde calmantes até mesmo no auxílio à cura de doenças ou como efeito paliativo a outras. O chá é comercializado na forma de folhas secas moídas em uma determinada granulometria que facilita a extração destes compostos.

Dentre os componentes que fazem parte da composição desta bebida estão os óleos essenciais que tratam-se de misturas de monoterpenos, sesquiterpenos, fenilpropanóides, ésteres e outras substâncias de baixo peso molecular. O “*bouquet*” de cada óleo é formado pela combinação destas substâncias e associam as propriedades organolépticas destes óleos essenciais.

Além dos óleos essenciais, os açúcares também estão presentes nas folhas de chá e são importantes no fornecimento de energia em seu consumo.

Diversas técnicas e ensaios, atualmente, são utilizados para extrair e identificar estes compostos na matriz do chá. Porém, a cromatografia gasosa é uma das técnicas analíticas mais utilizadas devido ao seu excelente desempenho para separação.

A granulometria do chá comercial é suficientemente pequena e homogênea para que sejam extraídos os principais compostos que trazem benefícios a saúde.

O objetivo deste trabalho é otimizar os processos de análise qualitativa de essências e presença de açúcares em chás através da eliminação da etapa de moagem e unificação do solvente utilizado para a extração destes componentes nas amostras.

As empresas buscam sempre processos que sejam mais produtivos e que atenuem o uso de recursos, principalmente os que geram impactos ambientais, como os reagentes químicos..

Através das otimizações que se realizou buscou-se diminuir o tempo do processo de preparo da amostra para análise, além de evitar contaminações cruzadas que

podem ocorrer devido ao uso de recipientes intercalados no moinho de bolas, com isso também melhorou-se a homogeneidade e integridade da amostra, modificando menos a estrutura da amostra.

A unificação da etapa de extração obtendo assim amostra para realização de dois ensaios reduz os custos das análises e diminuem os resíduos gerados.

## 2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

### 2.1 A COMPOSIÇÃO DE CHÁS DE USO TERAPÊUTICO

Chá é uma bebida preparada através da extração de folhas secas ou verdes de componentes benéficos à saúde, conforme estudos de Nishitani e Sagesaka, 2003. Atualmente, é a bebida mais consumida em todo o mundo, depois da água. O panorama de consumo tem mudado nos últimos anos, devido a diversos estudos mostrando benefícios relacionados a esta bebida. O chá tem diversos objetivos desde calmantes como uso farmacêutico no auxílio a cura de doenças ou como efeito paliativo a outras, segundo Rodriguez-Amaya e Matsubara (2005). Os chás são comercializados na forma de folhas secas, que podem ter sido fermentados, semi-fermentados ou não, divididas em sachês.

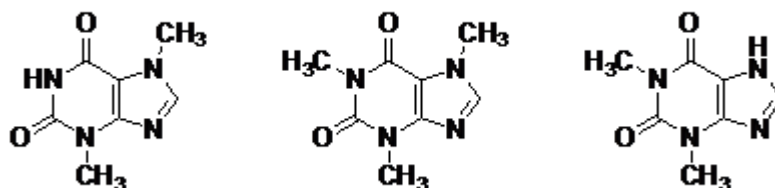
O chá pode ser preparado através de flores e raízes. Estes chás são comercializados em diversos sabores, porém os mais comuns são hortelã, limão, cravo, chá verde, chá preto e chá branco.

Os principais compostos que podem ser encontrados no chá são os polifenóis (catequinas e flavonóides), alcalóides (teobromina, cafeína, teofilina, etc), óleos voláteis, carboidratos (polissacarídeos e monossacarídeos), aminoácidos, lipídios, vitaminas (principalmente as vitaminas B e C), elementos inorgânicos (alumínio, flúor e manganês) e difere, neste caso, é a vitamina C que se apresenta em quantidades muito pequenas, de acordo com Sharangi (2009).

A teobromina (3,7-dimetilxantina), a cafeína (1,3,7-trimetilxantina) e a teofilina (1,3-dimetilxantina) fazem parte do grupo das xantinas. As estruturas químicas destas encontram-se, respectivamente, na Figura 1. As xantinas constituem uma classe de alcalóides que estão presentes, por exemplo, em achocolatados, erva mate e chá, sendo responsáveis pelo poder estimulante destes produtos. Este grupo de compostos que estão presentes no chá são conhecidas como metil-xantinas devido a estrutura molecular, pois possuem grande semelhança estrutural. Teobromina e teofilina são isômeras, enquanto que a cafeína (possui em sua

estrutura uma metila a mais como substituinte. “A quantidade de cafeína contida no chá fica entre 2 a 5%.” (SHARANGI, 2009)

Figura 2- Estruturas da teobromina, cafeína e teofilina, respectivamente.



Os polifenóis dão ao chá o gosto amargo, e é considerado um importante componente que traz efeitos benéficos à saúde. Por exemplo, os principais presentes no “chá verde são (-) Epicatequina Galato (-ECG), (-) Epicatequina (-EC), (-) Epigallocatequina Galato (EGCG-) e (-) Epigallocatequina (-EGC), conhecidos como catequinas” (Sagesaka e Nishitani, 2003). Porém, pelo fato de estas catequinas sofrerem oxidação ou polimerização pela ação do polifenoloxidase existente nas folhas do chá, o semi-fermentado contém a metade do chá verde, e no chá preto elas quase inexistem, segundo Roberts e Woods (1953).

Os chás contem, também, diversos flavonoides amarelos facilmente solúveis em água, como o kaempferol e a quercetina.

Os sais minerais, que estão presentes entre 5 a 6 % nas folhas de chá e têm como principal componente o potássio, mas também contém o cobre, o zinco, o níquel, molibdênio e iodo. Já o flúor está contido entre 40 a 1900 ppm no chá, de acordo com Sharangi (2009).

Os carboidratos são biomoléculas que contém essencialmente carbono, hidrogênio e oxigênio. Estão presentes em vegetais e animais. A principal função é fornecer energia, representando a principal forma de carbono fotossinteticamente assimilado na biosfera, como também expressam Medeiros e Simoneit (2007).

Podem ser poliidroxialdeídos ou poliidroxicetonas, ou seja, podem possuir um grupo aldeído ou cetona, respectivamente, e várias hidroxilas, geralmente uma em



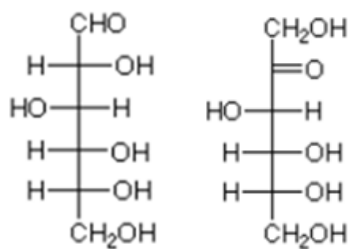
cada átomo de carbono, sendo que não faz parte do aldeído ou grupo funcional cetona. Além de carbono, hidrogênio e oxigênio, alguns carboidratos apresentam nitrogênio, fósforo ou enxofre em sua composição.

São classificados como monossacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos, dependendo de suas unidades formadoras.

Os monossacarídeos, ou açúcares simples, consistem numa só unidade cetônica. Apresentam fórmula geral ( $C_nH_{2n}O_n$ ), onde “n” pode variar de 3 a 7 (trioses, tetroses, pentoses, hexoses e heptoses), sendo os mais importantes as pentoses ( $C_5H_{10}O_5$ ) e as hexoses ( $C_6H_{12}O_6$ ). São relativamente pequenos, solúveis em água e não sofrem hidrólise, de acordo com Belitz, Grosch e Schieberle (2009).

As principais hexoses presentes nos chás são glicose, frutose e manose. O mais abundante é o açúcar de seis carbonos D-glicose sendo o principal fornecedor de energia para o trabalho celular. É, também, a base para a formação da maioria dos carboidratos mais complexos como monômero dos polissacarídeos mais abundantes, tais como amido e celulose. Produzida na fotossíntese pelos vegetais e encontrada no sangue, no mel e nos tecidos dos vegetais. A frutose também fornece energia para a célula, mas é encontrada principalmente em frutos doces.

Figura 2 - Estruturas da glicose e frutose, respectivamente.



O termo “óleo essencial” é amplamente utilizado atualmente, porém o termo mais adequado seria “óleo volátil”, devido a seu processo de obtenção por arraste de vapor. A volatilidade destes óleos constitui uma característica importante deste grupo e está associada justamente ao fato de sua extração ser realizada através do

arraste de material vegetal pelo vapor de água. Neste texto, ambos os termos serão empregados.

“As plantas sintetizam os óleos essenciais e armazenam em glândulas e dutos.[...] A síntese pode ocorrer nas folhas, flores, frutos, raízes, cascas e madeira “ como afirmou Zini (2002).

As propriedades terapêuticas e odoríferas dos óleos essenciais estão diretamente correlacionadas com sua composição qualitativa e quantitativa. Os óleos voláteis ou óleos essenciais são misturas de monoterpenos, sesquiterpenos, fenilpropanóides, ésteres e outras substâncias de baixo peso molecular em que as diferenças entre os compostos são muito pequenas.

Podem ser utilizados *in natura*, constituindo importantes matérias-primas para diversas indústrias como a farmacêutica, a perfumaria e a de cosméticos.

As propriedades organolépticas dos óleos essenciais estão associadas a diversos componentes que formam o chamado “*bouquet*” de cada óleo.

O valor comercial destes compostos vem se mantendo estável há muitos anos. “Países como Guatemala, Sri Lanka, Índia, China, Egito, Indonésia, Turquia e Brasil são tradicionais exportadores de óleos essenciais”. (Sharangi, 2009). Países mais desenvolvidos acabam importando estes óleos como matéria-prima barata e lhes agregam valor através de processos de melhoramento destes óleos como: purificação, destilação, preparação de derivados, isolamentos de constituintes e diversas modificação químicas.

Os principais óleos essenciais consumidos hoje são os óleo essenciais de menta (*Mint Oil – MO*), do cravo-da-índia e do limão.

O MO é uma mistura complexa de componentes voláteis e lábeis. Componentes estes que podem degradar-se durante o armazenamento ou processamento. Isto pode acabar mudando também as características sensoriais do MO. Apesar de sua baixa solubilidade em água, o óleo essencial de menta é um dos *flavours* mais utilizados em alimentos, fármacos e cosméticos.

A existência de diferentes tipos de *Mentha* (família *Lamiaceae*) é comum, devido as diferentes espécies (Kokkini *et al*, 1995)

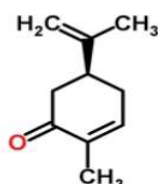
“Os monoterpenos constituintes do óleo essencial deste gênero são distinguidos pela posição da oxigenação no anel de p-mentano”, de acordo com Lawrence. (1981)

A *Peppermint* (*M. x piperita* L) produz quase que exclusivamente monoterpenos contendo uma função oxigenada no C3 como o mentol, que é responsável pelo sabor refrescante do *Peppermint*, de acordo com Berteau *et al.*, (2003). Já o tipo *Spearmint* (*M. spicata* L.) e *Scotch Spearmint* (*M. x gentilis* var *cardiaca*) produzem monoterpenos contendo uma função oxigenada no C6, tipicamente como a carvona, responsável pela nota diferenciada do *Spearmint*, ou menta espicata, também de acordo com Berteau *et al* (2003) Estas plantas são cultivadas em diversos países nos dois hemisférios para a produção comercial do óleo de menta espicata.

A carvona é considerada um marcador das mentas do tipo *Spearmint*. É uma cetona terpênica com propriedade odorífera forte. Trata-se de um líquido incolor e oleoso que possui duas formas enantioméricas: a l-carvona e a d-carvona. A l-carvona é um componente que corresponde até 70% do óleo de sementes de alcarávia (*Carum carvi*), sendo desta planta a origem de seu nome carvona. O outro enantiomero, a d-carvona é o constituinte majoritário do óleo essencial de hortelã.

Investigações biossintéticas têm demonstrado que o (-)-4S-limoneno (9) é o precursor mais comum de ambas as séries oxigenadas citadas anteriormente. O limoneno, hidrocarboneto monocíclico presente nas cascas de frutas cítricas, pode ser exclusivamente convertido em carvona utilizando cloreto de nitrosila ou através do uso da enzima limoneno-6-hidroxilase, conforme Figura 4. Boa parte do limoneno produzido, atualmente, é utilizado para a produção de carvona devido a demanda crescente por este composto, conforme Kjonaas e Croteau (1983).

Figura 3 – Estrutura química da carvona.



Além das mentas já citadas, existem também mentas híbridas como a bem conhecida hortelã-pimenta ou *Mentha piperita*, uma espécie híbrida da *Watermint* (menta aquática) e da *Spearmint* (menta espicata), segundo Kokkini *et al* (1995).

A *Mentha piperita* é nativa da Europa, mas se desenvolve também no Japão e nos Estados Unidos, que hoje constituem seus maiores produtores. Ainda assim, o melhor tipo de hortelã-pimenta é o cultivado na Inglaterra, pois a planta prefere clima úmido.

As diversas mentas se distinguem umas das outras devido aos teores dos principais componentes que apresentam, como os terpenos, carvona, mentol e etc.

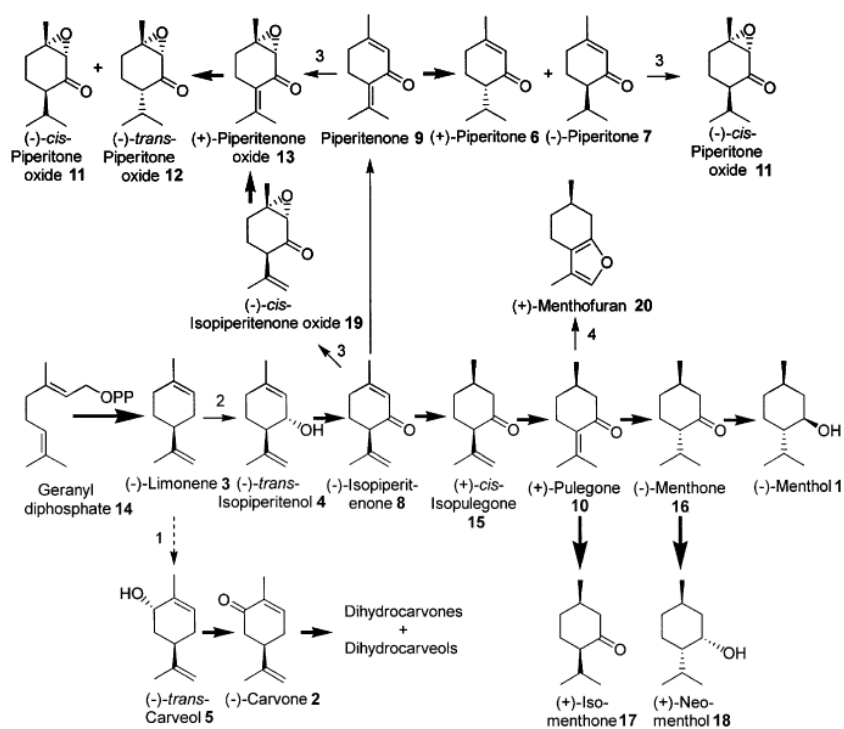
Outro óleo essencial muito importante é o do cravo-da-índia. A árvore produtora de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) é originária da Indonésia, tendo sido disseminada pelos alemães para outros países. Hoje, Zanzibar, Madagascar e Indonésia são os principais produtores de cravo-da-índia, de acordo com Wenqiang *et al* (2006).

O Cravo-da-índia é a gema floral seca utilizado principalmente como condimento na culinária devido ao seu aroma e sabor fortes. Estes são conferidos pelo eugenol, composto fenólico volátil. Nas folhas, ele chega a representar aproximadamente 95% do óleo extraído, de acordo com RAINA *et al.* (2001) No cravo também é o principal componente do óleo, podendo chegar a 85%. Outros componentes desta fração são o acetoeugenol que pode chegar a 15% e o  $\beta$ -cariofileno ficando entre 5 a 12%, de acordo com Mazzafera (2003). Juntos, estes três componentes podem somar 99% da composição do óleo.

Alguns trabalhos tem mostrado que o eugenol ou o extrato de *Syzygium aromaticum* tem efeito nematocida antiviral, inseticida), bactericida e fungicida. O eugenol é utilizado na Odontologia como componente de seladores e produtos antissépticos de higiene bucal, devido ao seu efeito bactericida, conforme Myint (1997).

A obtenção do eugenol para os diversos fins em que pode ser utilizado é feita principalmente a partir do cravo-da-índia. Além das aplicações citadas, o eugenol tem sido utilizado para a produção de outros fenólicos, como a vanilina, como afirmou Priefert *et al.* (2001)

Figura 4 – Atividade enzimática observada na menta espicata. As enzimas numeradas são: (1) limoneno-6-hidroxilase, (2) limoneno-3-hidroxilase, (3) terpenona- $\Delta$ -epoxidase. A reação é catalisada pelo mentofurano (4).



Fonte: BERTEA *et al* (2003)

Figura 5 – Eugenol, Acetoeugenol e Cariofileno, respectivamente.

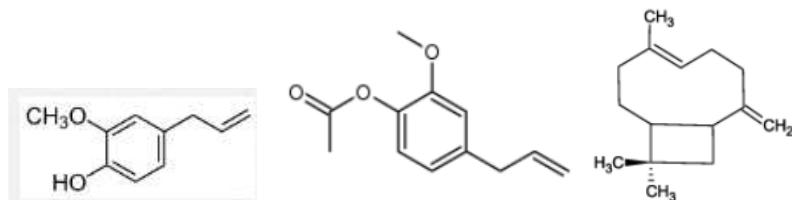
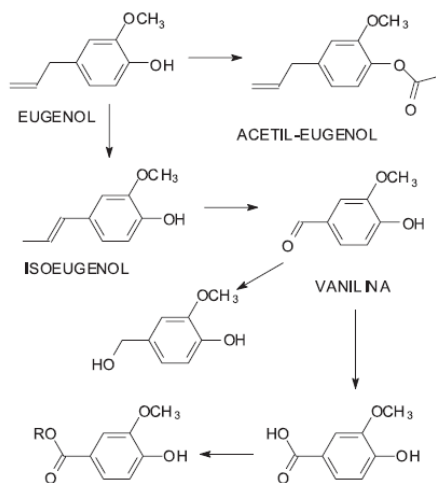


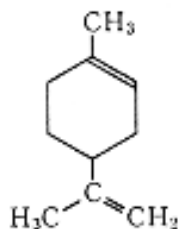
Figura 6 – Intermediários preparados a partir do eugenol.



Fonte: CUNHA *et al.* 2011.

Assim como os óleos citados anteriormente, o óleo essencial do limão é de extrema importância. Este óleo essencial tem como componente químico predominante, apresentando em torno de 65%, um aldeído chamado d-limoneno. Sua estrutura química é mostrada na Figura 7. Mas o óleo volátil de limão é, na verdade, uma mistura natural de diversos monoterpenos, entre eles, cerca de 10-20%, de pinenos e, aproximadamente, 10% de gama-terpineno. Com relação aos aldeídos também presentes há o predomínio do citral ao qual se atribui algumas propriedades aromáticas do óleo essencial. Os álcoois presentes como o linalol, geraniol e citranelol podem encontrar-se também na forma de ésteres (acéticos, cápricos, láuricos).

Figura 7 – d-limoneno, componente principal do óleo essencial de limão.



## 2.2 TÉCNICAS ANALÍTICAS MAIS UTILIZADAS PARA A DETERMINAÇÃO DOS COMPONENTES DE CHÁ

### 2.2.1 Cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas

A Cromatografia a Gás (GC- do inglês Gas Chromatography) é uma das técnicas analíticas mais utilizadas devido ao seu excelente desempenho.

Trata-se de um método de separação de componentes de uma mistura através da distribuição destes componentes em duas fases: a fase móvel (gás) e a fase estacionária (líquida ou sólida).

A fase estacionária, pode ser um filme líquido, imobilizada em um suporte sólido e inerte – tubo capilar. A fase móvel trata-se de um gás inerte, também conhecido como gás de arraste.

Na cromatografia a gás, a amostra a ser analisada é então injetada em um cromatógrafo e os componentes da mistura são arrastados para dentro da coluna, pela fase móvel.

Através de interação entre a fase estacionária da coluna e os componentes da mistura ocorre a separação destes. Assim, componentes com maior afinidade pela fase estacionária, permanecem nela retidos por um tempo maior, enquanto que componentes que possuem menor afinidade, ficam pouco tempo retidos.

O detector é o sistema responsável por identificar a presença dos componentes da amostra. Este sistema funciona através de uma diferença de sinais entre o que a fase móvel gera – passando constantemente no detector – e os componentes da amostra geram.

Cada detector funciona de distintas maneiras e podem ser universais ou específicos, ou seja, podem detectar qualquer tipo de componentes de misturas ou podem ser específicos para uma classe de compostos.

Além disso, a Cromatografia a gás é uma técnica que permite identificar e quantificar espécies químicas, sozinha ou acoplada a outras técnicas. O acoplamento de um cromatógrafo a gás com um espectrômetro de massas combina

as vantagens da cromatografia a gás de alta resolução – boa seletividade e eficiência de separação – com as vantagens da espectrometria de massas – informações estruturais, massa molar e aumento da seletividade.

Os constituintes da amostra chegam ao detector, que se encontra em alto vácuo, e são ionizadas em uma fonte de íons em um filamento incandescente. Esta ionização pode ser realizada de duas maneiras: por impacto de elétrons (EI – Electron Impact) ou por ionização química (CI – Chemical Ionization). No modo EI, as moléculas são bombardeadas em um feixe de elétrons provenientes do filamento, obtendo-se moléculas ionizadas positivamente. No modo CI, um gás ionizante é utilizado – geralmente metano – para ionizar positiva ou negativamente as moléculas, gerando assim uma ionização mais suave e fazendo com que a molécula se fragmente menos.

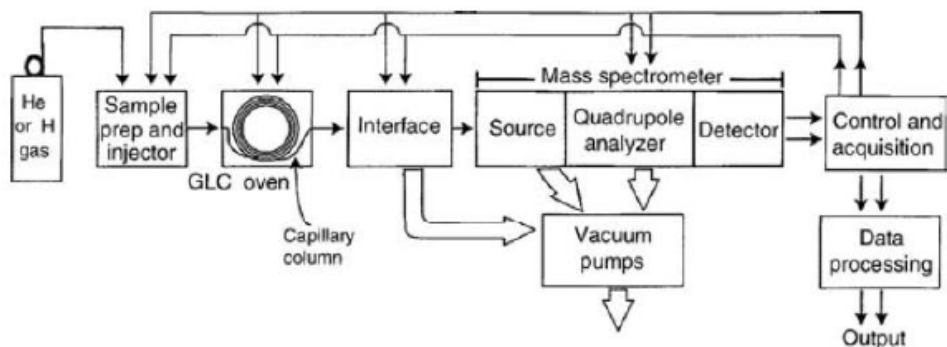
No modo EI, utilizado durante o período de estágio, as espécies ionizadas no filamento incandescente são aceleradas para dentro do corpo da fonte por uma lente repulsora que empurrará estes através ao longo desta fonte até chegar ao filtro de massas: o quadrupolo. Este quadrupolo é um conjunto de quatro barras que formam um campo eletromagnético capaz de deixar passar apenas massas que são interessantes para a análise, de acordo com as especificações selecionadas para o método. Após passar pelo quadrupolo, os íons chegam a um diodo de alta energia que transforma as moléculas ionizadas positivamente em elétrons e os desvia para o detector do sistema do espectrômetro de massas: a multiplicadora de elétrons.

Esta multiplicadora de elétrons irá aumentar o sinal gerado pelos elétrons vindos do HED (High Energy Dinode). O sinal é enviado a um transdutor de sinal que gerará o fragmentograma de cada composto que chegou ao detector. Como estamos utilizando um sistema acoplado de GC-MS, o fragmentograma estará associado ao cromatograma. Ou seja, cada pico gerará um fragmentograma distinto.

O cromatograma contendo todos os íons produzidos pelo MS será chamado de cromatograma de íons totais (TIC).



Figura 8 – Esquema geral de um Cromatógrafo a Gás com Espectrômetro de Massas acoplado.



Fonte: Amaral, 2009.

O MS, no Impacto de Elétrons, pode adquirir os dados pelo modo SCAN ou pelo modo SIM (Single Ion Monitoring).

No modo SCAN, uma varredura é realizada. As barras que formam o quadrupolo geram um campo eletromagnético tal que as massas passam em uma determinada faixa de aquisição. Por exemplo, de 40 a 300 u.m.a. Assim, as barras se posicionam de maneira que somente as massas que estão dentro desta faixa de aquisição que seguirão para o detector, as demais serão descartadas.

Já no modo SIM, através do método escolhemos determinadas massas que gostaríamos monitorar. Quando estas massas chegam ao quadrupolo, seu campo eletromagnético se posiciona de maneira que somente estas massas sigam para o detector e as demais sejam descartadas. Isso provoca um grande aumento na sensibilidade do método, pois neste momento o sistema está focado apenas em um determinado número de massas.

Para os métodos de análises de açúcares e componentes de essências utiliza-se, com frequência, a Cromatografia a Gás com Espectrometria de Massas (GC-MS do inglês, Gas Chromatography – Mass Spectrometry) acoplada utilizando-se o modo SCAN para a identificação tentativa dos componentes.

## 2.3 MÉTODOS ATUALMENTE UTILIZADAS PARA A DETERMINAÇÃO DE ESSÊNCIAS E AÇÚCARES EM CHÁS

Na bibliografia, encontram-se diversas metodologias referentes à extração dos componentes de essências e subsequente separação para identificação.

A utilização do GC-MS para estas análises é comum devido a vantagem de se poder identificar tentativamente os compostos sem a utilização de padrões. No caso dos componentes de essências, como se tratam de componentes voláteis - óleos voláteis principalmente – o uso da cromatografia a gás torna-se mais econômico e fácil frente a utilização de outras técnicas.

As principais diferenças entre as metodologias para separação dos componentes de essências encontram-se no preparo de amostra, que ora praticamente não são exigidas, como no caso do Microextração em Fase Sólida (SPME – do inglês Solid Phase Microextraction) em Headspace (HS) ou que ora exige um preparo mais trabalhoso como a extração em solventes, de acordo com Chun *et al.* (2010)

As metodologias utilizando extração em solvente também usam como auxiliar o aquecimento, a sonicação ou a agitação.

Ao utilizar a extração em solventes é necessário estudar não só a metodologia utilizada, mas também a interação solvente/ compostos extraídos. O solvente deve ter afinidade com os componentes aos quais se quer extrair. Já o como estas substâncias serão extraídas pelo solvente, dependerá da eficiência do sistema de extração. Todos estes apresentam suas vantagens e desvantagens. A utilização de temperaturas mais altas pode acabar decompondo ou volatilizando componentes que se deseja extrair, dependendo da temperatura utilizada. Já a agitação, geralmente necessita de volumes de amostra e solvente maiores devido a utilização de agitadores de bancada. O sistema de sonicação (ultrassom) é um sistema eficiente, mas que pode, assim como a agitação, não desprender componentes que necessitem de temperaturas mais altas para passarem a fase do solvente.

Já no caso dos açúcares, que são moléculas pouco voláteis e de altas massas moleculares, a utilização da cromatografia a gás já é um pouco mais dispendiosa, porém ainda mais econômica frente a cromatografia líquida de alta resolução (CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência ou HPLC – do inglês High Performance Liquid Chromatography) devido a grande utilização de solventes envolvida na CLAE. Assim, dependendo do tipo de amostra utiliza-se a GC-MS para a determinação de açúcares, porém com o uso de agentes derivatizantes a fim de aumentar o desempenho dos compostos pouco voláteis. Porém, esta derivatização apresenta diversas dificuldades. Primeiramente, existe um grande número de grupos funcionais na molécula, depois a presença de diversas formas tautoméricas na solução aumenta a complexidade dos cromatogramas. Além disso, a fragmentação em espectrometria de massas dos isômeros é muito similar e, em alguns casos, o tempo de retenção torna-se decisivo para a identificação dos compostos.

“Metil éteres, acetatos, trifluoroacetatos e trimetilsilil (TMS) éteres são os mais comuns derivados usados para a determinação de carboidratos”, conforme Knapp (1979). A volatilidade e estabilidade características dos derivados formados fazem dos TMS éteres os mais populares utilizados para análises de Cromatografia a Gás de sacarídeos e poliálcoois. Para obter os TMS éteres, uma reação de silição ocorre entre o agente derivatizante e o carboidrato. Agentes como hexametildisilazano (HMDS), o trimetilclorosilano (TMCS), trimetilsililacetamida (MSA) e o N,O- bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) são os mais utilizados para a silição em diferentes temperaturas e diferentes tempos de reação, conforme indica Knapp (1979).

A utilização destes agentes derivatizantes leva ao emprego de solventes apróticos, devido a quantidade de derivatizante que deveria ser utilizado caso empregássemos solventes próticos. O solvente prótico seria derivatizado pelo agente e, provavelmente, não haveria derivatizante para o analito, ou a quantidade a ser utilizada deste agente deveria ser muito grande. Devido á solubilidade, a piridina é o solvente mais utilizado para análises de açúcares. Ainda assim, a utilização de solventes próticos pode ocorrer para a extração, porém devem ser eliminados para a subsequente silição.

A estratégia de derivatização e a maneira como a reação é conduzida para reduzir os interferentes para análise.

## 2.4 MOAGEM DE FOLHAS

Cada etapa dentro de um processo que tem princípios fundamentais independente das substâncias envolvidas e de outras características do sistema pode ser considerada uma operação unitária.

As operações unitárias podem ser classificadas, por exemplo, de acordo com sua finalidade dentro do processo ou levando em conta o tipo de operação envolvida: operações mecânicas, operações envolvendo transferência de calor e operações envolvendo transferência de massa.

As operações mecânicas ainda podem ser subdivididas em operações contendo sólidos granulares, operações com sistemas sólido-fluídos e operações envolvendo sistemas fluídos.

“Muitos materiais sólidos encontram-se em tamanhos muito grandes para a utilização a que serão destinados e devem ser reduzidos” , de acordo com Geankoplis (1978).

Operações unitárias que envolvem a fragmentação de sólidos, a análise granulométrica é essencial para determinar o sucesso da operação. Esta análise consiste em caracterizar as partículas sólidas com relação a forma, tamanho, densidade, volume e etc.

A moagem é uma operação unitária de fragmentação ou redução de tamanho, onde a aplicação de forças de impacto, compressão e abrasão fazem com que as partículas sejam fragmentadas. Esta operação aumenta a área superficial do sólido, uniformizando tamanhos e aumentando a eficiência de etapas posteriores.

A moagem é uma operação unitária frequentemente utilizada com grãos, para reduzi-los a farinha ou pó.

A moagem pode ser considerada muito ineficaz do ponto de vista energético. Somente uma pequena parte da energia é empregada realmente para a fragmentação do sólido. A maior parte se dirige para a deformação desse sólido e a criação de novas linhas de sensibilidade que pode produzir a ruptura sucessiva dos fragmentos. O resto da energia se dissipa em forma de calor. Conforme a finalidade da moagem são usados diferentes tipos de moinhos. Entre os equipamentos utilizados para esta operação estão os moinhos de disco, de rolos, de facas e martelos, de bolas e trituradores de mandíbulas.

Após a colheita, faz-se inicialmente a limpeza e retirada de impurezas e em seguida inicia-se um processo de transformação da folha, que passa pelo murchamento, a enrolagem, a oxidação e a secagem. Depois de concluído esse processo é que se inicia a seleção.

O chá vendido em sachés já passou por um processo de separação, onde se retiram flores e talos maiores. A seguir, o chá passa por um processo de trituração, onde a granulometria do chá acaba sendo diminuída para então ser levado a embalagem. A granulometria diminuída facilita o processo de extração dos componentes da folha na utilização do chá como bebida.

### 3 SITUAÇÃO ATUAL

#### 3.1 DETERMINAÇÃO DE COMPONENTES DE ESSÊNCIAS EM CHÁS

A determinação de componentes de essências ocorre através da extração destes componentes na folha. Esta, conforme já foi abordado, pode ocorrer de diversas formas.

O método existente tem o objetivo de avaliar qualitativamente a presença de compostos que conferem o odor característico, que podem ser da própria folha ou adicionadas na forma de essências. Estes compostos, geralmente, são oriundos dos óleos essenciais.

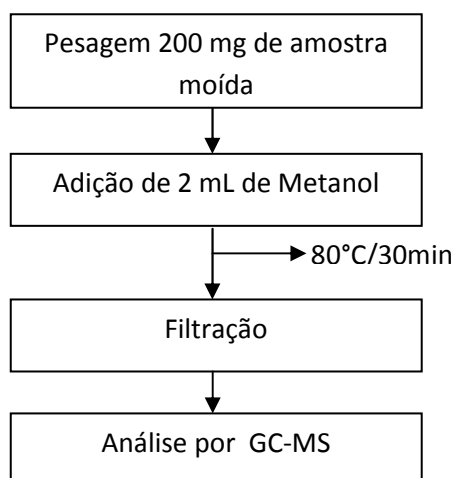
O processo de extração dos óleos essenciais das folhas para uso externo é realizado através de arraste do material vegetal por vapor de água. Estes óleos possuem componentes, em sua maioria, de características polares. Assim sendo, o uso de um solvente polar para a extração destes componentes torna-se necessário.

O chá é retirado do sachê e 200 mg  $\pm$ 20 mg pesados em balança analítica em um recipiente de 4 mL. A esta quantidade de chá adiciona-se 2 mL de metanol. O metanol é um líquido incolor e inflamável e também conhecido como álcool da madeira é um solvente polar prótico utilizado para a extração de compostos que, por exemplo, não são extraídos pelo etanol, outro solvente muito utilizado. A extração ocorre em chapa de aquecimento durante 30 minutos à 80°C.

Após, o extrato é resfriado a temperatura ambiente e filtrado com membrana de celulose regenerada. O filtrado é passado a um *vial* de 2 mL e analisado em GC-MS de acordo com o método cromatográfico que consta no anexo 1.

Na Figura 9 é possível visualizar o fluxo que a amostra de chá segue até chegar ao GC-MS.

Figura 9 – Fluxograma geral para análise de Componentes de Essências em chás.



### 3.2 DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES EM CHÁ

Este método visa avaliar qualitativamente a presença de açúcares em matrizes sólidas e complexas como o chá.

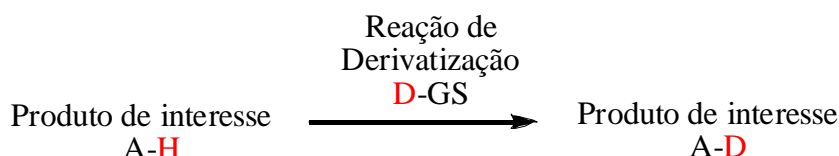
O chá é retirado do sachê e posteriormente passa por um processo de moagem desta matriz, a fim de aumentar a superfície de contato do chá com os reagentes e assim manter a uniformidade da amostra.

Após o processo de moagem, 50 mg  $\pm$  3 mg deste chá moído é pesado em balança analítica em frasco de vidro de capacidade de 4 mL. Adiciona-se 500  $\mu$ L de dimetilformamida para extração dos açúcares presentes no chá. O DMF, como é comumente conhecido, é um solvente polar aprótico sendo caracterizado como um líquido incolor e de odor característico fraco e muito utilizado como solvente em reações de moléculas com alto peso molecular, como os açúcares. A extração é realizada a quente, em chapa de aquecimento, a temperatura de 80°C durante 30 minutos.

Após resfriamento do extrato, a este adiciona-se 500  $\mu$ L de agente derivatizante, o BSTFA e leva-se mais uma vez a aquecimento em chapa à 80°C, por 30 minutos.

Na Figura 10, é possível visualizar uma reação geral de derivatização genérica.

Figura 10 – Reação geral para a derivatização.



Na maioria dos casos, a derivatização em Cromatografia a Gás é usada para converter os grupos polares -OH, -NH<sub>2</sub>, -SH, -COOH, =NH em grupos não polares e/ou com ponto de ebulição menores. Isto ocorre porque, geralmente as ligações contendo átomos de hidrogênio favorecem outras interações com o sistema cromatográfico e matriz que podem aumentar o ponto de ebulição da molécula, como as ligações de hidrogênio. Desta maneira, trocando o átomo de hidrogênio por átomo da molécula de derivatizante teremos moléculas mais voláteis e mais estáveis.

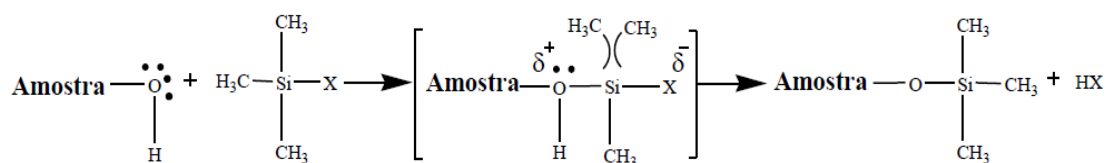
Os métodos de derivatização em GC são classificados em três grupos de acordo com os reagentes usados para as reações:

- Sililação;
- Acilação;
- Alquilação;
- Esterificação e transesterificação.

A derivatização que se faz uso na determinação de açúcares em chás, tem por objetivo a substituição do átomo de hidrogênio pelo grupo Trimetilsilil (TMS) que segue ao seguinte mecanismo de reação, conforme mostra a Figura 11.



Figura 11 – Reação de Derivatização de sililação



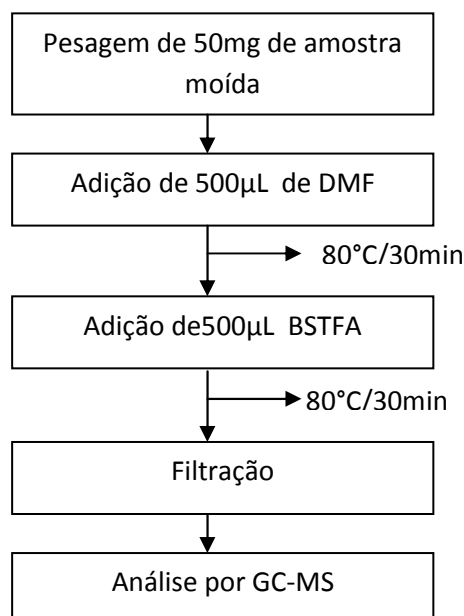
A reação de sililação ocorre através do ataque nucleófilo ao radical silil, obtendo-se um estado de transição bimolecular (SN2). O TMS, então, abandona o grupo X, ligando-se ao átomo de oxigênio da amostra que queremos derivatizar, formando-se éteres.

O grupo de saída X deve ter baixa basicidade sendo capaz de estabilizar a carga negativa no estado de transição e não deve apresentar tendências a se ligar novamente ao grupo silil.

Geralmente, ao utilizar a sililação não se requer uma etapa de purificação, podendo-se injetar o extrato derivatizado diretamente no GC-MS.

Após a reação ocorrer, a mistura é resfriada a temperatura ambiente e filtrada com membrana de celulose regenerada. O filtrado é transferido a um *vial* para análise em GC-MS de acordo com o método cromatográfico que consta no anexo 2.

Figura 12 – Fluxograma geral para análise de Açúcares em chá.



## 4 OBJETIVO

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Otimizar os processos de análise qualitativa de essências e de açúcares em chás através da retirada da etapa de moagem e unificação do solvente utilizado para a extração destes componentes nas amostras.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Através das otimizações que se pretende realizar, propõem que os seguintes objetivos sejam atingidos:

- Diminuir o tempo do processo de preparo da amostra para análise;
- Evitar contaminações cruzadas que podem ocorrer devido ao uso de recipientes intercalados no moinho de bolas;
- Melhorar a homogeneidade e integridade da amostra, modificando menos a estrutura da amostra;
- Fazer apenas uma pesagem de amostra e através de extração única, obter amostra para realização de dois ensaios;
- Reduzir os custos das análises a partir das modificações implementadas.

## 5 PROPOSTA TECNOLÓGICA

Através do estudo e conhecimento profundo das análises que se efetuam no dia-a-dia de um laboratório e buscando a otimização de processos, foi possível identificar que alguns ensaios possuem semelhança de procedimentos.

No desenvolvimento de análises, muitas vezes, não se consideram os ensaios que já existem no laboratório a fim de aproveitar os recursos já disponíveis e muitas vezes “criam-se” novos ensaios e novas análises para atender demandas ao invés de utilizar os já existentes, aprimorando-os.

Foi assim que se propôs esta otimização em dois ensaios do laboratório para análise de açúcares e essências em chás. Por se tratar de duas classes de compostos muito polares e que poderiam ser extraídas da matriz através do mesmo solvente, se propôs a unificação da extração e se estudou qual solvente proporcionaria uma melhor resposta dos componentes analisados.

Além disso, a eliminação de procedimentos desnecessários torna o processo mais produtivo e menos dispendioso. Com este objetivo analisou-se o processo como um todo e a fim de avaliar etapas que pudessem ser retiradas. O processo de moagem de uma matriz é de extrema importância a fim de manter a homogeneidade e proporcionar uma maior superfície de contato da amostra com o solvente. Porém, algumas matrizes já possuem uma granulometria adequada para a extração dos compostos de interesse, não necessitando passar por mais um processo de moagem. O processo de moagem poderá ser uma fonte de contaminação das amostras devido ao uso de recipientes que não foram bem entre as moagens, tem-se a certeza de se estar excluindo uma etapa que poderia agregar ao chá compostos que não fazem parte de sua composição, mas sim que vem de outro chá.

Este trabalho propõe a retirada do procedimento de moagem para efetuar os ensaios de açúcares e componentes de essências em chás e visa também a unificação da etapa de extração, utilizando um mesmo solvente para retirar da fase sólida (matriz) os compostos a serem analisados.

Para cada amostra que não for moída, aproximadamente 20 minutos serão economizados no preparo da amostra para análise. Além disso, a eliminação de uma etapa de pesagem e de adição de um dos solventes tornará o processo ainda mais rápido – o ganho provável, na eliminação de mais estes dois processos, é de aproximadamente mais 15 minutos por amostra.

Assim, pode-se chegar a um tempo economizado total de 35 minutos para cada amostra, aumentando a produtividade destes ensaios.

Também deve-se considerar o impacto ambiental relacionado a eliminação destas etapas no processo. A quantidade de resíduos gerados por uma análise química pode ser grande, dependendo do número de amostras a serem analisadas. Ao excluirmos a etapa de moagem estaremos também eliminando etapas de limpeza efetuadas nos recipientes utilizados, utilizando menos solvente para isto. Vale ressaltar que a unificação da etapa de extração traz o ganho de utiliza menor volume de solventes para efetuar dois ensaios, gerando assim menor quantidade de resíduos.

A inovação desta proposta encontra-se em eliminar os procedimentos desnecessários – que não acarretem mudança significativa nos resultados. Não se tem conhecimento de nenhum laboratório que utilize a metodologia unificada de extração destes compostos e nem bibliografia que faça uso desta.

Se implantada, esta metodologia tende a trazer um grande ganho principalmente em produtividade, pois o operador poderá efetuar mais amostras em menos tempo. Ou ainda liberará o operador para exercer outras atividades enquanto estaria executando dois procedimentos de extração ou o procedimento de moagem.

Além das questões de produtividade abordadas, a ergonomia e a segurança no desempenho dos processos dentro de uma organização são de suma importância e deve ser considerado no desenvolvimento de qualquer atividade. Eliminando-se as etapas de moagem e a manipulação de diferentes solventes, a proposta também visa estes valores.

## 6 METODOLOGIA

Para o desenvolvimento da proposta tecnológica, três amostras de chá foram utilizadas. Selecionaram-se chás de diferentes sabores a fim de poder utilizar compostos distintos de cada chá como seus marcadores. Ou seja, compostos que fossem característicos apenas de determinada amostras seria um marcador desta amostra. Os sabores escolhidos foram Hortelã, Cravo e Limão.

A metodologia para se obter a otimização final do processo foi dividida em três etapas.

- Determinação e avaliação de marcadores em cada chá, avaliando o processo de moagem;
- Avaliação chá moído x chá desfiado (sem moer);
- Avaliação do solvente de extração.

Após levantamento bibliográfico, foi realizada análise detalhada dos componentes presentes em cada chá através de ensaio utilizando a técnica de microextração em fase sólida (SPME – do inglês Solid Phase Microextraction) em Headspace (HS) e GC-MS.

A análise via SPME visa identificar os compostos voláteis presentes no chá, até mesmo aqueles que estão em baixas concentrações. O SPME é uma microtécnica em que os processos de extração e pré-concentração ocorrem numa escala dimensional que não é das mais usuais, de acordo com Valente e Augusto (1999). A análise é realizada através da extração dos componentes que estão no *headspace* por um dispositivo chamado fibra. A fibra é um recobrimento de material adsorvente ou polimérico, onde a interação fibra/moléculas é mandatório para que a extração ocorra. “Numa extração por SPME, as moléculas do analito tem de se deslocar da matriz e penetrar no recobrimento”, de acordo com Valente e Augusto (1999), até que se estabeleça um equilíbrio de partição ou adsorção entre o *headspace* e a fibra. O principal objetivo da técnica é concentrar analitos que estão em baixas concentrações para que possam ser identificados / quantificados via GC.

A próxima etapa do estudo realizado diz respeito a determinação de marcadores de cada chá. Assim, efetuou-se o ensaio de Componentes de Essências em cada um dos chás escolhidos moendo-se as amostras em recipientes novos (virgens), assim se teria a certeza de que as amostras não foram contaminadas por estes recipientes.

As amostras foram moídas nos recipientes e pesou-se em *vial* de 4 mL a quantidade de 200 mg  $\pm$  20 mg de chá moído, em balança analítica. A este se adicionou 2 mL de metanol e levou-se à chapa de aquecimento para extração a 80 °C durante 30 minutos. Após, o extrato foi resfriado a temperatura ambiente e posteriormente filtrado com membrana de celulose regenerada. O filtrado foi passado a um *vial* de 2 mL e analisado em GC-MS.

Para todos os chás efetuou-se o mesmo procedimento e determinou-se através de comparação dos cromatogramas obtidos os componentes marcadores de cada amostra. Para cada chá, seria necessário a obtenção de pelo menos um marcador, ou seja, uma substância que estivesse presente apenas naquele chá, que fosse uma identidade única. Para isso, os picos presentes no cromatograma de cada amostra, foram tentativamente identificados por comparação dos espectros de massas obtidos, com a biblioteca NIST do software do GC-MS.

Para estudar se realmente as amostras podem ser contaminadas umas pelas outras utilizando-se os mesmos recipientes para o processo de moagem, estes apenas passando por uma higienização, moeu-se amostras de cada chá no recipiente onde outro chá havia sido moído anteriormente.

- Chá de limão: Moído após o recipiente ter moído chá de cravo;
- Chá de limão: Moído após o recipiente ter moído chá de hortelã;
- Chá de hortelã: Moído após o recipiente ter moído chá de cravo;
- Chá de hortelã: Moído após o recipiente ter moído chá de limão;
- Chá de cravo: Moído após o recipiente ter moído chá de limão;
- Chá de cravo: Moído após o recipiente ter moído chá de hortelã.

As amostras moídas foram analisadas por GC-MS e os marcadores do chá que foi moído antes naquele recipiente foi investigado.

Por exemplo, o chá de limão que foi moído após o chá de cravo foi analisado em GC-MS e os marcadores do chá de cravo foram procurados para determinar se houve a contaminação através da moagem simultânea das amostras no mesmo recipiente. Efetuou-se esta análise em todas as amostras que foram moídas depois de algum outro chá, totalizando seis amostras, sendo duas de cada chá – uma após cada chá diferente.

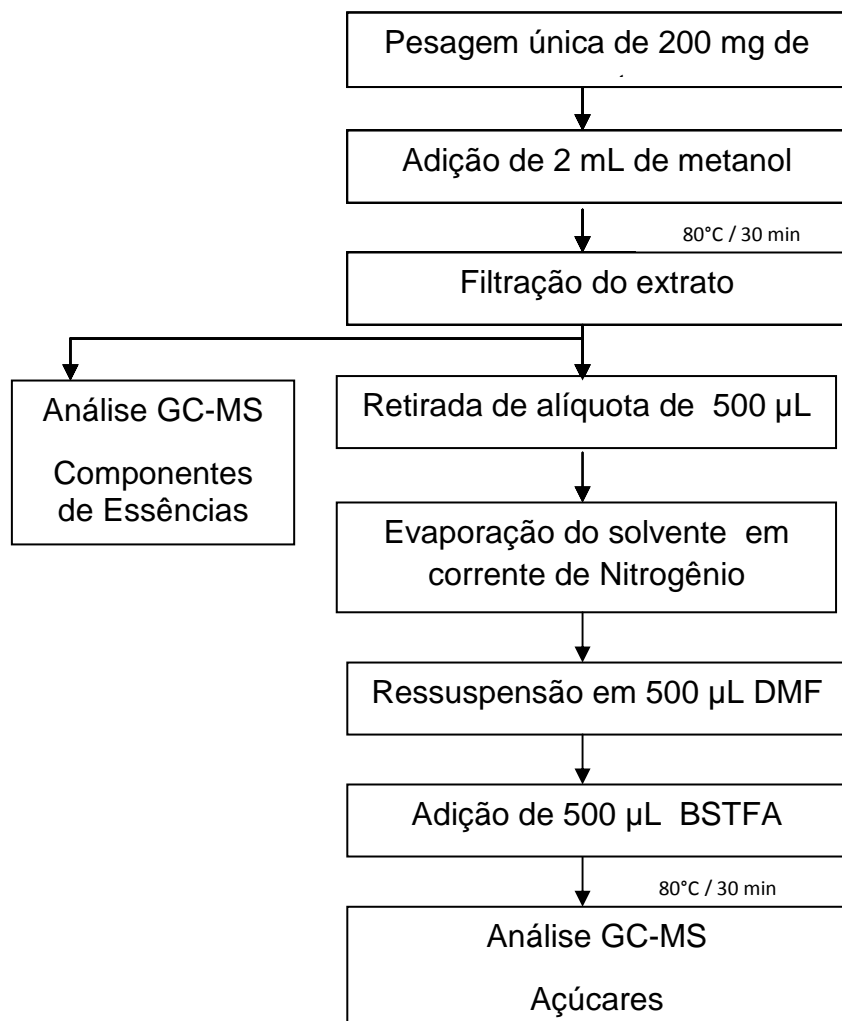
Como a proposta trata de eliminar a moagem, a próxima etapa deste estudo será comparar a análise de componentes de essências em chás e de açúcares com a matriz moída e a matriz desfiada, isto é, a matriz retirada do sachê sem passar por processo de redução da granulometria. As amostras utilizadas como chá moído foram as mesmas que foram moídas nos recipientes novos para identificação dos marcadores. Assim teria-se a certeza de que não houver contaminações atribuídas a esta etapa. Efetuaram-se os ensaios de componentes de essências e açúcares em amostras desfiadas e nas moídas.

A comparação foi realizada verificando se todos os componentes de essências que estavam na amostra de chá moído, também estavam presentes no chá desfiado. A abundância dos compostos também foi avaliada.

Por fim, a última etapa desta proposta foi a unificação da etapa de extração de açúcares e componentes de essências do chá - que desdobrou-se em mais duas etapas, para avaliar os solventes.

Como o solvente metanol já era utilizado para a extração de componentes de essências, o primeiro teste foi utilizar o metanol também para extrair os açúcares. Trata-se de um solvente polar prótico. Assim, conforme abordado no capítulo anterior, este solvente deverá ser eliminado da matriz antes do processo de derivatização dos açúcares. Isto, torna o método um pouco mais demorado, pois estaremos retirando uma etapa de extração ( unificando as duas análises), porém teremos que inserir uma etapa de eliminação deste solvente para que se faça a sililação dos açúcares. Utilizando-se o metanol para a unificação da extração destes dois ensaios, o processo seguirá o fluxograma mostrado na Figura 13.

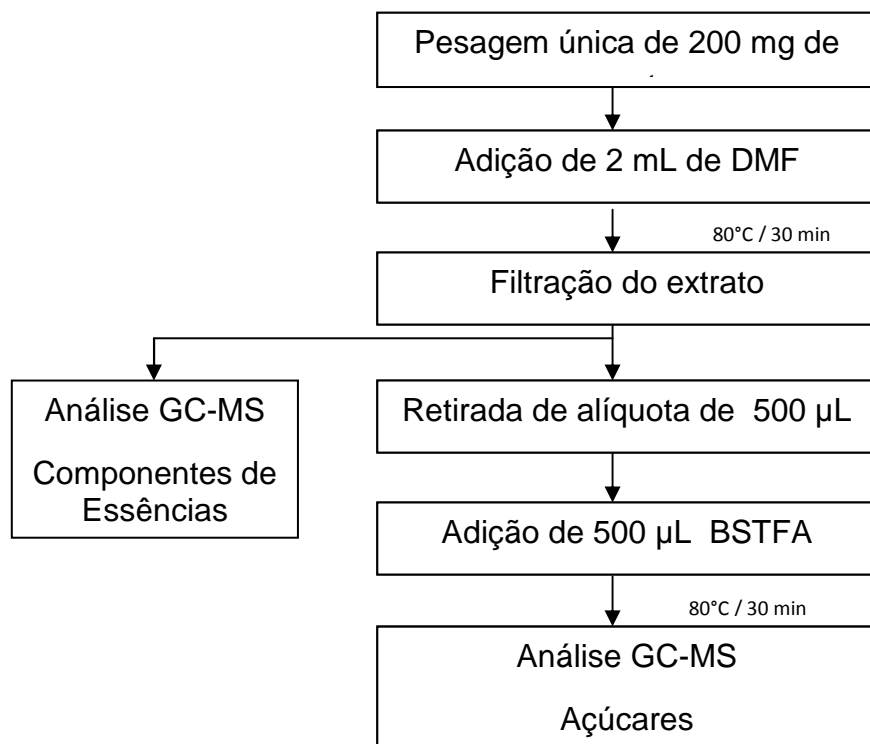
Figura 13 – Esquema para avaliação do processo de extração utilizando metanol como solvente extrator.



Como neste caso, o processo ganhará uma etapa, também avaliou-se outro solvente já utilizado no processo, com a extração dos açúcares: a dimetilformamida (DMF). Assim, a etapa de eliminação do solvente para a derivatização dos açúcares não seria necessária, pois o DMF é um solvente aprótico. Como trata-se de um solvente também bastante polar, pode ser avaliado para a extração de componentes de essências. O fluxograma da unificação da extração utilizando-se o DMF como solvente encontra-se na Figura 14.



Figura 14 - Otimização do processo de extração utilizando DMF como solvente extrator.



Neste processo é possível perceber que a etapa de eliminação de solvente foi retirada, tornando-o menos dispendioso e ainda mais produtivo. Testando os dois solventes foi possível estabelecer qual deles era analiticamente melhor e considerou-se também a produtividade e o custo envolvido.

Através destes processos foi possível estabelecer as otimizações que se pretende.

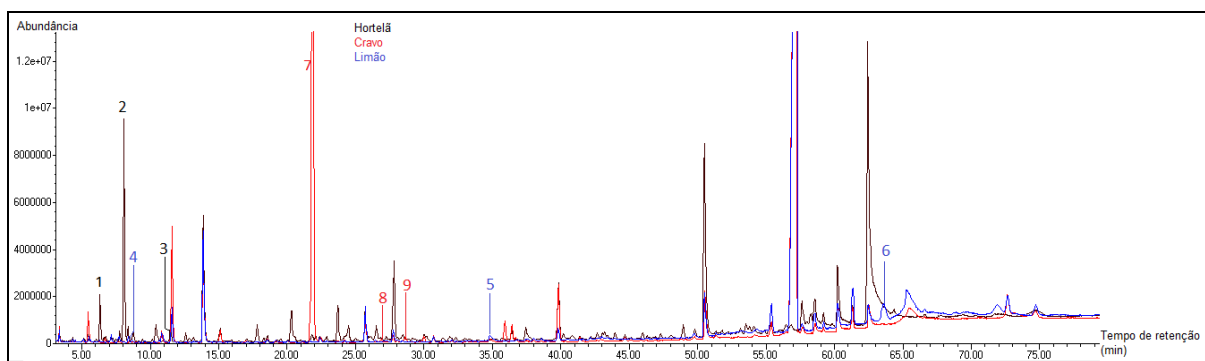
## 7 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 7.1 DETERMINAÇÃO DE MARCADORES DE CADA CHÁ

Para a análise dos resultados e determinação dos marcadores de cada amostra, sobrepôs-se os cromatogramas obtidos para o chá de limão, chá de cravo e chá de hortelã. Sobrepondo-se estes cromatogramas, identificaram-se tentativamente através do GC-MS os picos que se encontravam somente em uma das amostras, que foram considerados seus respectivos marcadores.

Na Figura 15, tem-se a sobreposição dos cromatogramas das três amostras visando a identificação dos marcadores, na análise de componentes de essências.

Figura 15 – Cromatogramas dos três chás na análise de componentes de essências – Identificação de marcadores. Os picos numerados representam os marcadores para cada caso.



Na Tabela 1, estão os marcadores encontrados, o tempo de retenção e os íons selecionados para o monitoramento de íons.

Tabela 1 – Marcadores selecionados para cada chá, mostrando o tempo de retenção e os íons selecionados para o monitoramento de íons que avaliarão a possibilidade de contaminação através do processo de moagem das amostras.

Amostra	ID	Marcador	Íons (m/z)		Tempo de retenção (min)
			Quantificador	Qualificador	
Hortelã	1	Pulegona	81	152	6,322
Hortelã	2	Carvona	82	150	8,065
Hortelã	3	trans-Carveol	84	134	11,480
Limão	4	Acetato de Geraniol	69	136	8,400
Limão	5	3-metóxi-1,2-benzenodiol	140	125	34,800
Limão	6	Escopoletina	192	164	63,594
Cravo	7	Eugenol	164	137	21,878
Cravo	8	Acetato de eugenol	164	149	25,430
Cravo	9	Chavicol	134	133	28,634

## 7.2 RESULTADOS DA PRESENÇA DOS CONTAMINANTES DO PROCESSO DE MOAGEM

Utilizando-se métodos no modo SIM, é possível maximizar a sensibilidade do sistema, pois o analisador de massas fica focado em monitorar apenas algumas razões massa/carga. Assim, compostos presentes em baixa quantidade podem ser percebidos por estes métodos.

Sempre que o cromatograma no modo SIM indicasse a presença de um composto contaminante, varredura no modo SCAN foi realizada para identificar o fragmentograma completo e identificar tentativamente o composto. Este fragmentograma foi comparada com o da biblioteca acoplada ao *software* do GC-MS.

Na Figura 16, o cromatograma do chá de limão moído após o chá de hortelã apresenta uma seta no tempo em que identificou-se a presença do marcador do chá de hortelã carvona, indicando a contaminação pelo processo de moagem.

Figura 16 – Cromatograma do chá de limão moído após moagem do chá de hortelã (sinal em vermelho) sobreposto ao cromatograma do chá de limão sem moer (sinal em preto). A seta indica a presença do marcador do chá de hortelã carvona presente no chá de limão, mostrando a contaminação do processo.

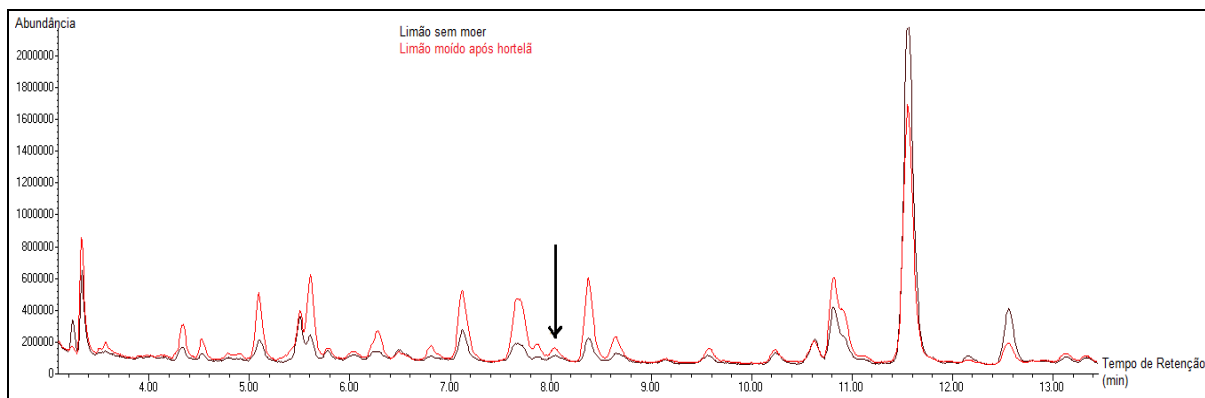


Tabela 2 – Apresentação do resultado obtido em cada chá para a análise de contaminação através do processo de moagem. São identificados o marcador que foi buscado no cromatograma e se este estava presente ou ausente nos métodos no modo SIM e no modo SCAN. A identificação de cada símbolo pode se vista na legenda abaixo.

Marcadores analisados	Chá de cravo	Chá de limão	Chá de hortelã
Eugenol	X	△	●
Chavicol	X	--	--
Acetoeugenol	X	●	●
Acetato de Geraniol	--	X	--
3-metóxi-1,2-benzenodiol	--	X	--
Escopoletina	--	X	--
Pulegona	--	●	X
Carvona	△	△	X
trans-Carveol	--	●	X

x – Marcador original do chá.

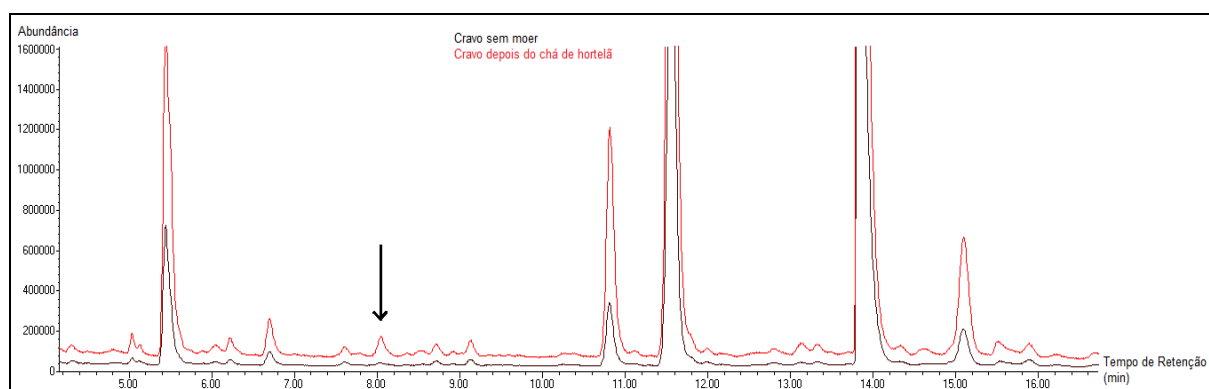
-- - Marcador ausente: não foi possível identificar o marcador no método no modo SIM.

Δ - Marcador presente através de contaminação: íons identificados em método no modo SIM e fragmentograma confirmado em método no modo SCAN.

• - Marcador identificado apenas em método no modo SIM. Fragmentograma obtido em método no modo SCAN não confirmou a presença deste.

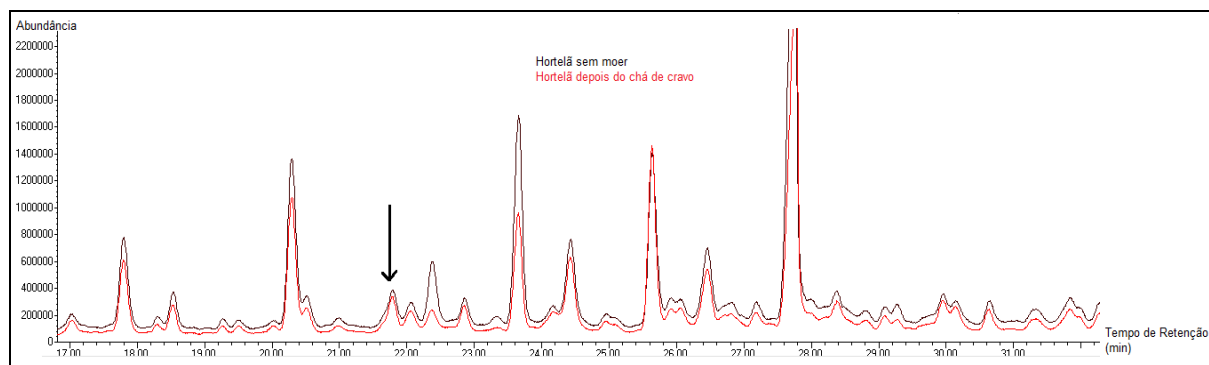
A Figura 17 apresenta os cromatogramas do chá de cravo moído depois do chá de hortelã e do chá de cravo sem moer. A identificação tentativa através de GC-MS efetuada mostrou que o pico indicado pela seta pode ser a carvona.

Figura 17 – Cromatogramas do chá de cravo sem moer (sinal em preto) e do chá de cravo moído após moagem do chá de hortelã (sinal em vermelho). Seta identifica a presença de um composto contaminante do processo: a carvona.



Na Figura 18 estão os cromatogramas do chá de hortelã moído após o chá de cravo e do chá de hortelã retirado diretamente do sachê. O pico indicado pela seta trata-se do eugenol, marcador do cravo, mas que se encontra também em baixas quantidades no chá de hortelã já que pode-se verificar que o mesmo pico encontra-se também no chá de hortelã sem moer. Assim, conclui-se que o eugenol, na verdade não é um marcador do chá de cravo. Com isto, não se pode considerar uma contaminação advinda do recipiente de moagem, já que as áreas dos picos, aparentemente, são muito parecidas.

Figura 18 - Cromatogramas do chá de hortelã sem moer (sinal em preto) e do chá de hortelã moído após o chá de cravo (sinal em vermelho). A seta indica o eugenol, que neste caso não foi considerado um contaminante de processo por estar presente também no chá de hortelã sem moer.



### 7.3 COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS EM AMOSTRAS DE CHÁ MOÍDO E DESFIADO

A fim de excluir o processo de moagem, efetuou-se análises de comparação entre amostras de chá sem moer e moídas. As amostras utilizadas como moídas foram as mesmas que foram moídas em recipientes novos (virgens) para que não houvesse contaminação. Efetuaram-se os ensaios de componentes de essências e de açúcares. Estas amostras foram extraídas da mesma forma e ao mesmo tempo, utilizando-se os mesmos equipamentos, reagentes e métodos. Após análise em GC-MS, realizou-se comparação entre as amostras.

A comparação foi realizada através de identificação dos principais componentes e picos que as amostras continham e comparação visual entre suas áreas, não quantitativamente. Como trata-se de um ensaio qualitativo, o que é relevante é a presença dos picos. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Realizou-se sobreposição dos cromatogramas com o objetivo de evidenciar a presença de todos os componentes nas duas amostras, mas principalmente assegurar que todos os componentes presentes no chá moído (situação atual) estavam também presentes na análise de uma matriz sem moer (situação proposta).

Figura 19 – Cromatogramas dos ensaios de componentes de essências no chá de cravo moído e do cromatograma chá de cravo sem moer. Os picos numerados representam os compostos mais significativos da amostras que fora tentativamente identificados e comparados.

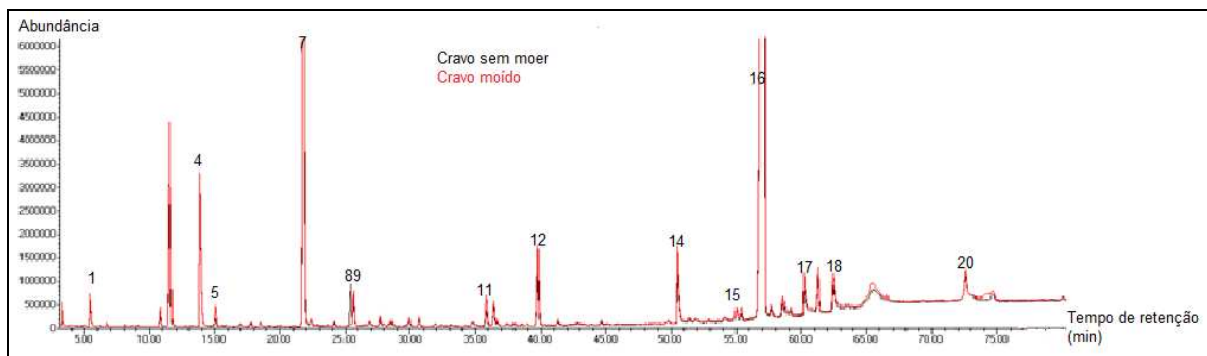
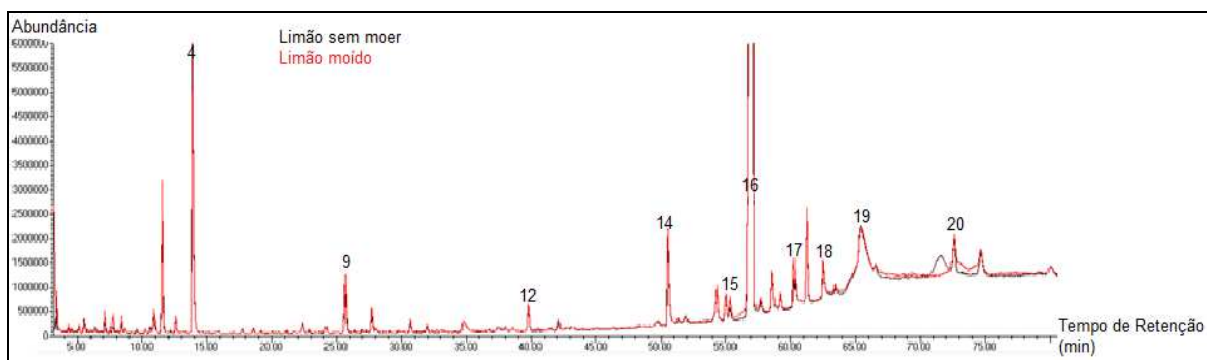


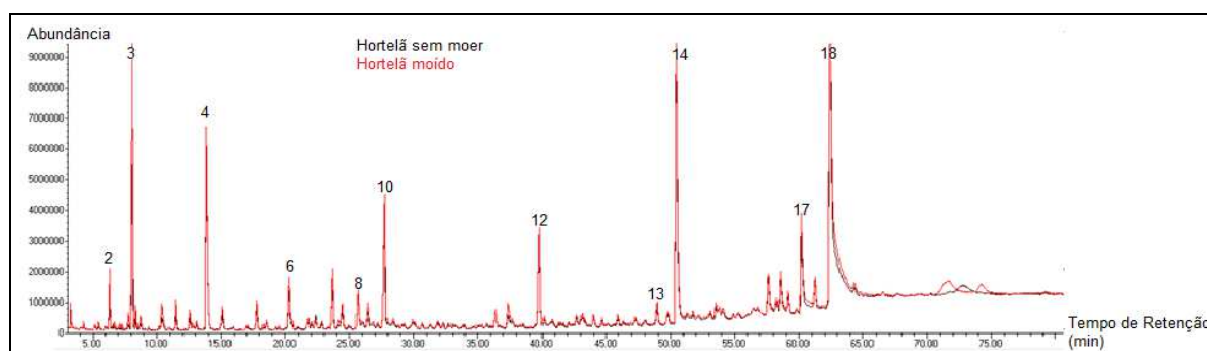
Figura 20 – Cromatogramas dos ensaios de componentes de essências no chá de limão moído e do cromatograma chá de limão sem moer. Os picos numerados representam os compostos mais significativos da amostras que foram tentativamente identificados e comparados.



Nas Tabela 4 estão os compostos que foram tentativamente identificados com auxílio da biblioteca acoplada ao software do GC-MS e o comparativo entre as duas matrizes de diferentes granulometria para as três amostras de chá. Constatou-se que todos os compostos que foram identificados no chá moído também foram no chá sem moer e em abundância satisfatória. De acordo com os cromatogramas também é visto que alguns picos de interesse estão em maior abundância no chá

sem moer do que no chá moído, como o acetoeugenol, um importante componente do óleo essencial de cravo.

Figura 21 – Cromatogramas dos ensaios de componentes de essências no chá de limão moído e do cromatograma chá de limão sem moer. Os picos numerados representam os compostos mais significativos da amostras que foram tentativamente identificados e comparados.



É possível determinar então que o ensaio de componentes de essências pode ser realizado tanto com o chá moído quanto com o chá sem moer.

Tabela 3 - Comparação entre os compostos tentativamente identificados através de GC-MS no ensaio de açúcares para os chás moídos e os chás sem moer. A presença do composto é indicada pelo símbolo “x” marcado.

Identificação		D-Frutose, 1,3,4,5,6- pentaquis-O-TMS	D-Glicose, 2,3,4,5,6-pentaquis- O-TMS- ou Glicopiranoze, pentaquis-O-TMS	d-(+)-Xilose, tetraquis TMS éter
Chá de Cravo	Moído	X	X	X
	Sem Moer	X	X	X
Chá de Limão	Moído	X	X	X
	Sem Moer	X	X	X
Chá de Hortelã	Moído	X	X	X
	Sem Moer	X	X	X



Tabela 4 - Comparação entre os compostos tentativamente identificados através de GC-MS no ensaio de componentes de essências para os chás moídos e os chás sem moer. A presença do composto é indicada pelo símbolo “x” marcado.

Identificação	Composto	Chá de Cravo		Chá de limão		Chá de Hortelã	
		Moído	Sem moer	Moído	Sem moer	Moído	Sem moer
1	Cariofileno	x	x				
2	Pulegona					x	x
3	Carvona					x	x
4	Ácido 2-propil pentanóico	x	x	x	x	x	x
5	Óxido de cariofileno	x	x				
6	(-)-Espatuleno					x	x
7	Eugenol	x	x			x	x
8	Acetileugenol	x	x			x	x
9	2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil - 4H-Piran-4-one	x	x	x	x	x	x
10	Glicerol					x	x
11	Neofitadieno	x	x				
12	Fitol	x	x	x	x	x	x
13	Terreina					x	x
14	Ácido n-hexadecanoico	x	x	x	x	x	x
15	Esqualene	x	x	x	x		
16	Cafeína	x	x	x	x		
17	Ácido Linoleico	x	x	x	x	x	x
18	Ácido Linolênico	x	x	x	x	x	x
19	1,2,3-Benzenotriol			x	x		
20	Teobromina	x	x	x	x	x	x

Chá moído e chá sem moer foram analisados concomitantemente para os ensaios de açúcares, empregando os mesmos equipamentos e reagentes para os ensaios. Na Tabela 3, estão os compostos que foram tentativamente identificados nos cromatogramas dos ensaios de açúcares. É importante lembrar que todos os compostos encontram-se em sua forma sililada, pois passam por processo de derivatização com BSTFA.

Figura 22 - Cromatogramas dos ensaios de açúcares no chá de cravo sem moer e do chá de cravo moído. Os picos numerados representam os açúcares das amostras que foram tentativamente identificados e comparados.

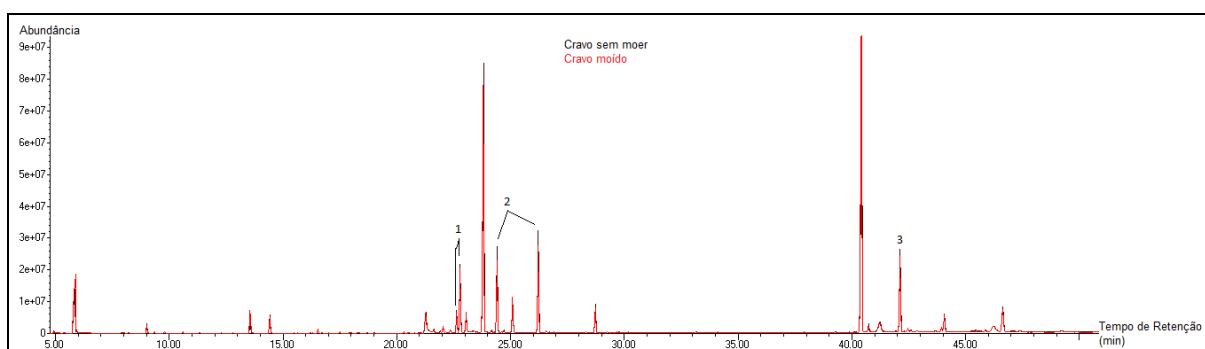


Figura 23 - Cromatogramas dos ensaios de açúcares no chá de limão sem moer e do chá de limão moído. Os picos numerados representam os açúcares das amostras que foram tentativamente identificados e comparados.

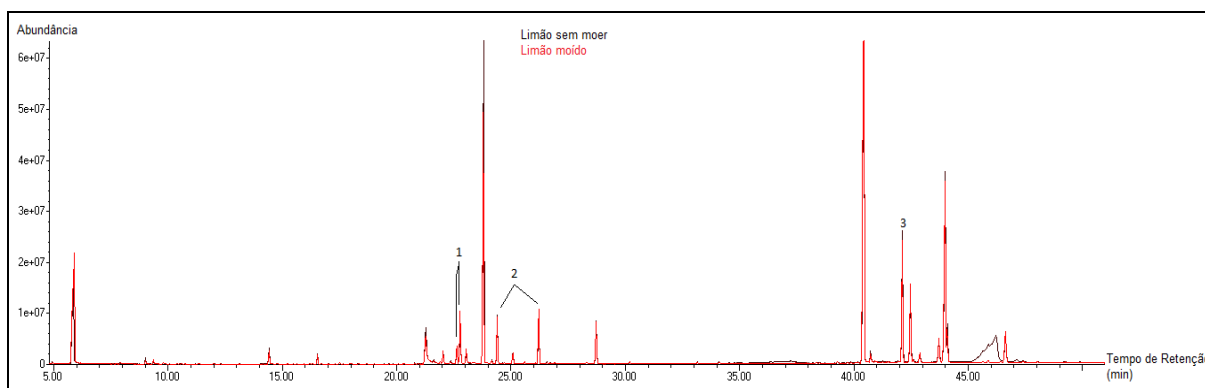
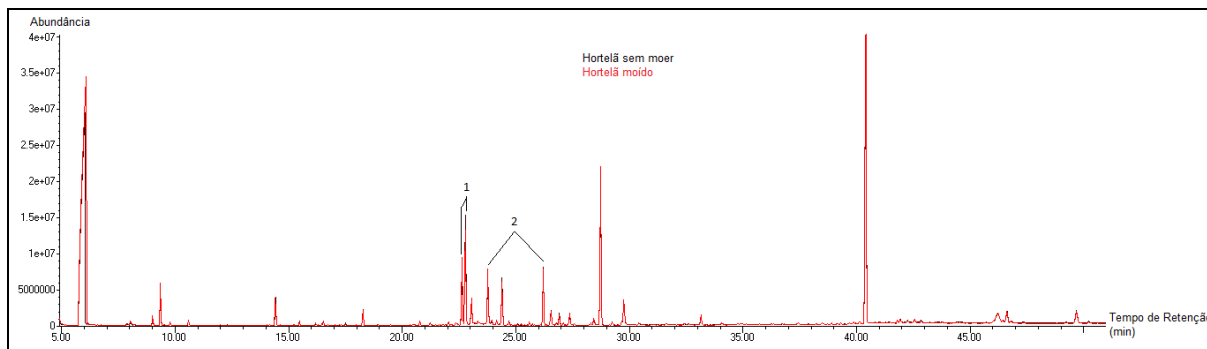


Figura 24 - Cromatogramas dos ensaios de açúcares no chá de hortelã sem moer e do chá de hortelã moído. Os picos numerados representam os açúcares das amostras que foram tentativamente identificados e comparados.



Como pode ser visto nas Figuras 22, 23 e 24, a frutose e a glicose aparecem em dois picos. Já a xilose não segue este princípio.

Segundo Medeiros e Simoneit (2007), quase todos os monossacarídeos (pentoses e hexoses) apresentam dois picos em análises de GC devido a suas configurações  $1\alpha\text{-OH}$  e  $1\beta\text{-OH}$  nos anéis pirano e furano, como apresentados nas estruturas abaixo. É comum que estes isômeros apareçam sob a forma de dois picos em GC, mas que se reporte apenas um valor de concentração através da soma de suas áreas.

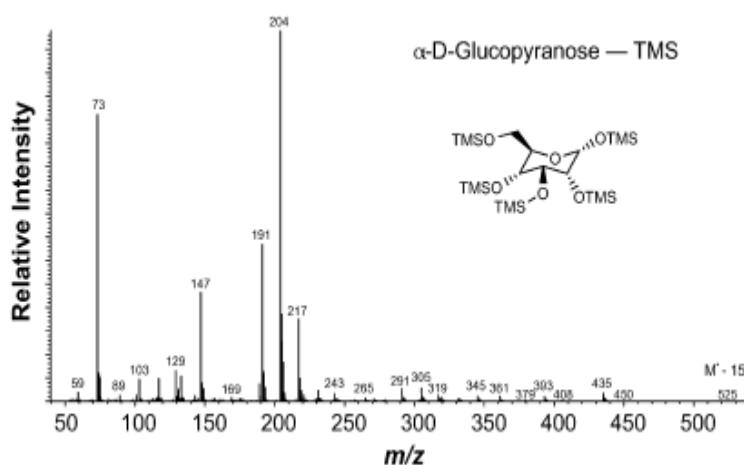
Figura 25 – Formas da glucopiranoose (glicose) que se apresentam em análises de GC, caracterizando dois picos: Forma  $\alpha$  e Forma  $\beta$ , respectivamente.



Fonte: Medeiros e Simoneit (2007)

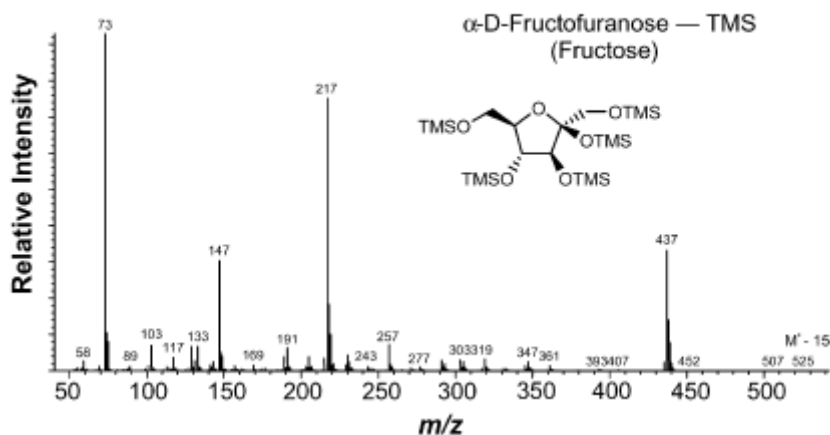
O espectro de sacarídeos que contém o anel pirano, com cinco carbonos, é caracterizado pela presença da razão massa/carga 204  $m/z$  como o da glicopiranosose apresentado na Figura 26. Enquanto que a fragmentação do anel furano produz o íon 217  $m/z$ , como pode ser visto no fragmentograma na Figura 27.

Figura 26 – Espectro de massas da  $\alpha$ -D-Glicopiranosose – TMS



. Fonte: Medeiros e Simoneit (2007).

Figura 27 – Espectro de massas da  $\alpha$ -D-Fructofuranose – TMS



. Fonte: Medeiros e Simoneit (2007).

Os fragmentos 204 m/z e 217 m/z são geralmente utilizados quando se analisa açúcares por GC-MS, especialmente quando se trata de monossacarídeos na forma sililada, de acordo com Medeiros e Simoneit (2007).

De acordo com os resultados obtidos e que estão comparados na Tabela 5, chá moído e chá sem moer apresentam todos os açúcares analisados (glicose, frutose e xilose) e em abundâncias semelhantes, corroborando a hipótese de que o chá sem moer apresenta resultados praticamente iguais aos resultados do chá moído. Além disso, o perfil de açúcares também não se altera: sendo a frutose a predominante no chá moído, esta também o será no chá sem moer.

Assim, pode-se concluir que o uso do chá moído não é necessário para efetuar o ensaio de açúcares e nem de componentes de essências. Então, a etapa de moagem pode ser eliminada do processo sem causar alterações significativas nos resultados.

#### 7.4 COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS PARA ANÁLISE DE AÇÚCARES E COMPONENTES DE ESSÊNCIAS OBTIDOS COM UNIFICAÇÃO DE SOLVENTE

O próximo passo de otimização dos processos foi a unificação da etapa de extração dos ensaios de açúcares e de componentes de essências. Como trata-se de compostos com polaridade semelhante, a ideia de utilizar o mesmo solvente surgiu e assim pesar a amostra de chá uma única vez e através de seu extrato efetuar os dois ensaios.

Dois solventes são utilizados no processo atual: metanol e dimetilformamida. O DMF é adotado para o ensaio de açúcares e foi verificado no ensaio de componentes de essências. O metanol que é o solvente empregado para a extração no ensaio de componentes de essências foi verificado no ensaio de açúcares. O chá foi extraído no solvente verificado ao mesmo tempo em que também foi extraído no seu solvente original para comparação. Os ensaios foram efetuados em triplicata, utilizando chá sem moer. Os chás que foram analisados com solvente DMF,

utilizaram o procedimento descrito no capítulo 6 Metodologia, na Figura 14 e os que foram analisados com o emprego do metanol utilizaram o da Figura 13.

Tabela 5 - Comparativo entre os compostos tentativamente identificados através de GC-MS no ensaio de componentes de essências para os chás extraídos com Metanol (MeOH) e com dimetilformamida (DMF). A presença do composto é indicada pelo símbolo “x” marcado.

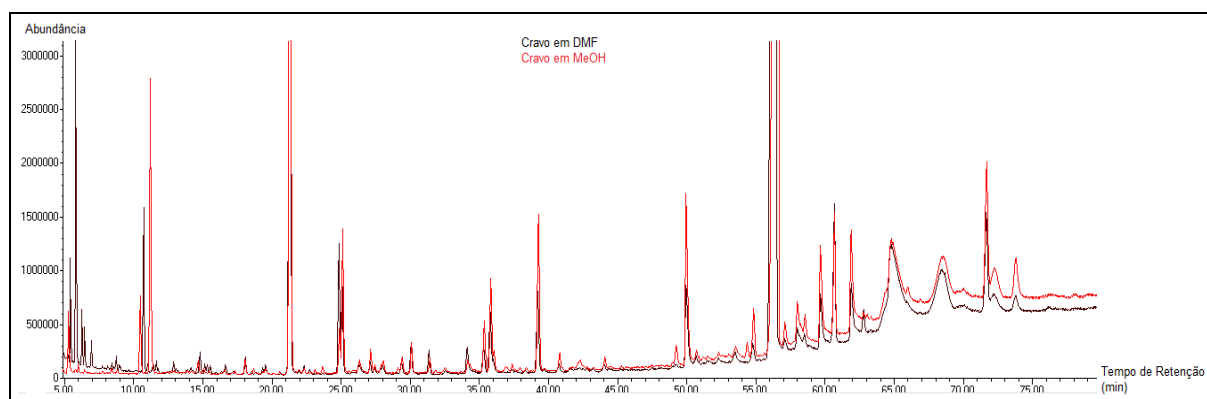
Composto	Chá de Cravo		Chá de limão		Chá de Hortelã	
	MeOH	DMF	MeOH	DMF	MeOH	DMF
$\beta$ -Linalool			x	x		
$\alpha$ -Bergamoteno			x	x		
trans-p-Menta-2,8-dienol				x		
Mentol				x		
$\beta$ -Citral			x	x		
$\alpha$ -Terpineol			x	x		
Acetato de nerol				x		
$\alpha$ -Citral			x	x		
Cariofileno	x	x				
Pulegona					x	x
Carvona					x	x
Ácido 2-propil pentanóico						
Geraniol acetate			x	x		
Óxido de cariofileno						
(-)-Espatuleno					x	x
Eugenol	x	x				
Acetileugenol	x	x				
2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil - 4H-Piran-4-one	x	x			x	x
Glicerol					x	x
Neofitadieno	x	x				
Fitol	x	x			x	x
Terreina					x	x
Ácido n-hexadecanoico	x	x	x	x	x	x
Esqualene	x	x				
Cafeina	x	x	x	x		x
Ácido Linoleico	x	x			x	x

Ácido Linolênico	x	x			x	x
1,2,3-Benzenotriol						
Teobromina	x	x	x	x	x	x

Os picos foram tentativamente identificados com auxílio da biblioteca acoplada ao *software* do GC-MS .

Para o chá de cravo não houveram alterações expressivas, ao contrário disso, é possível perceber que o DMF extrai alguns compostos em maior quantidade do que o metanol, como é o caso do acetoeugenol, em tempo de retenção próximo aos 24,800 minutos. Os picos que aparecem nos tempos iniciais da corrida de análise em DMF ( até próximo de 10,000 minutos) são apenas sujidades da amostra não sendo considerados compostos significativos para os resultados de análise de componentes de essências.

Figura 28 – Cromatogramas de componentes de essências do chá de cravo em DMF e em metanol.



Além disso, este ensaio mostra que a extração realizada com metanol ou DMF é bastante eficiente. Pode-se comparar a extração do chá utilizando-se solvente com outras extrações do óleo essencial de cravo realizadas atualmente. Weiqiang et al (2007) efetuaram a comparação de três métodos tradicionais de extração do óleo essencial do cravo com a extração em fluido supercrítico ( do inglês SFE – Supercritical Fluid Extraction). Os métodos comparados além da

extração com dióxido de carbono supercrítico foram hidrodestilação e destilação por arraste a vapor e extração por solvente utilizando-se o solvente etanol.

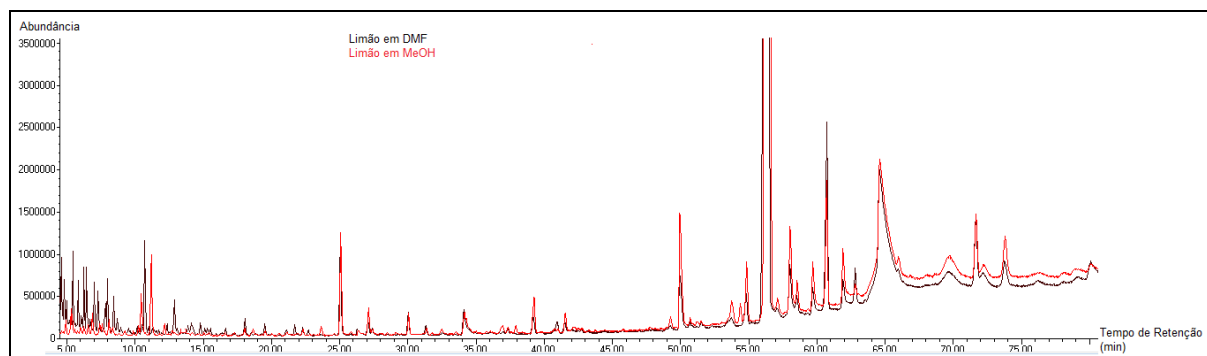
Weiqiang et al (2007) identificaram através de GC-MS ao todo 21 compostos no óleo essencial de cravo utilizando estes quatro tipos de extração. Apenas dez destes 21 compostos foram identificados pela extração em solvente etanol. Assim também executou Miynt et al (1996), utilizando o etanol como solvente de extração de componentes do cravo, porém buscando especialmente o eugenol.

Na extração realizada no chá de cravo com DMF e metanol a fim de identificar compostos, foi possível encontrar pelo menos quatro dos 21 analitos encontrados por Weiqiang et al (2007) em altas abundâncias: cariofileno, óxido de cariofileno, eugenol e acetoeugenol. Já Miynt (1996) identificou através de comparação com padrão em GC-FID (do inglês Flame Ionization Detector), quatro compostos, sendo estes exatamente, os obtidos também pelo método da proposta tecnológica.

Assim, é mostrado que para a identificação dos principais componentes de essências do chá o método que emprega a extração por solvente é bastante eficiente.

Na Figura 29, está o cromatograma de análise de componentes de essências do chá de limão em metanol sobreposto ao cromatograma do chá de limão em DMF. Pode-se verificar que grande parte dos compostos significativos eluíram no tempo inicial de corrida.

Figura 29 – Cromatogramas de componentes de essências do chá de limão em DMF e em metanol.





Como é possível verificar através da Figura 29, o DMF extrai mais compostos do que o metanol. Os compostos que são extraídos pelo metanol apresentam abundância menor do que os extraídos com DMF. O óleo essencial de limão é mistura natural de diversos monoterpenos, entre eles os pinenos e gama-terpinenos. Há o predomínio do citral, em termos de aldeídos, ao qual se atribui algumas das principais propriedades aromáticas do óleo essencial. Como álcoois, estão presentes o linalol, o geraniol e o citranelol, podendo estes também serem encontrados na forma de ésteres (acéticos, cápricos, láuricos).

Como os principais compostos estão eluídos em uma espécie de “cluster” no início da corrida, na Figura 30 efetuou-se um aumento da imagem do cromatograma para melhor visualizar os picos obtidos nesta região, já que tratam-se de compostos que fazem parte do óleo essencial de limão como pode ser visualizado na Tabela 8

Tabela 6 – Principais compostos identificados tentativamente através de GC-MS no chá de limão extraído com DMF.

Chá de Limão	
Identificação	Composto
1	$\beta$ -Linalool
2	$\alpha$ -Bergamotene
3	trans-p-Menta-2,8-dienol
4	Mentol
5	$\beta$ -Citral
6	$\alpha$ -Terpineol
7	Nerol acetate
8	$\alpha$ -Citral
9	Geraniol acetate

Figura 30 – Cromatograma de análise de componentes de essências do chá de limão com extração em DMF, ampliando a imagem nos minutos iniciais do cromatograma. Os picos numerados representam os principais compostos da essência de limão e estão referenciados na Tabela 8.

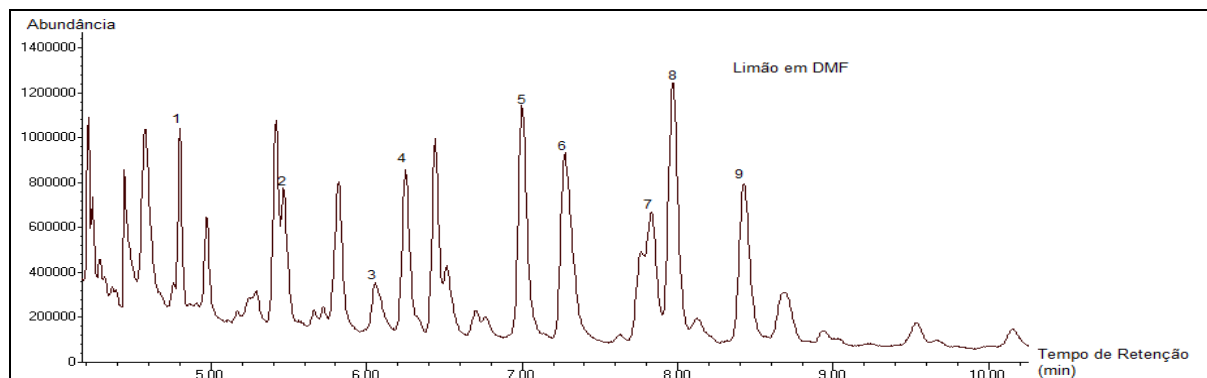
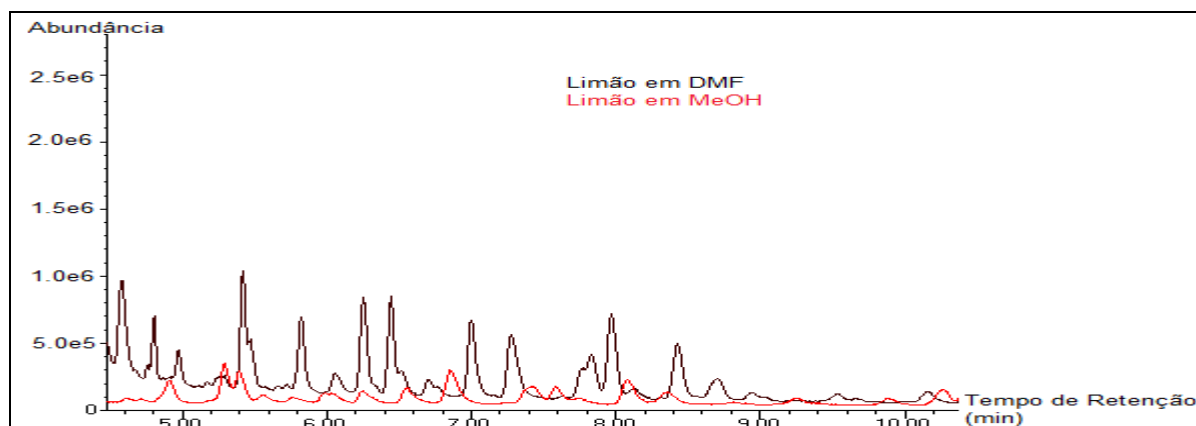


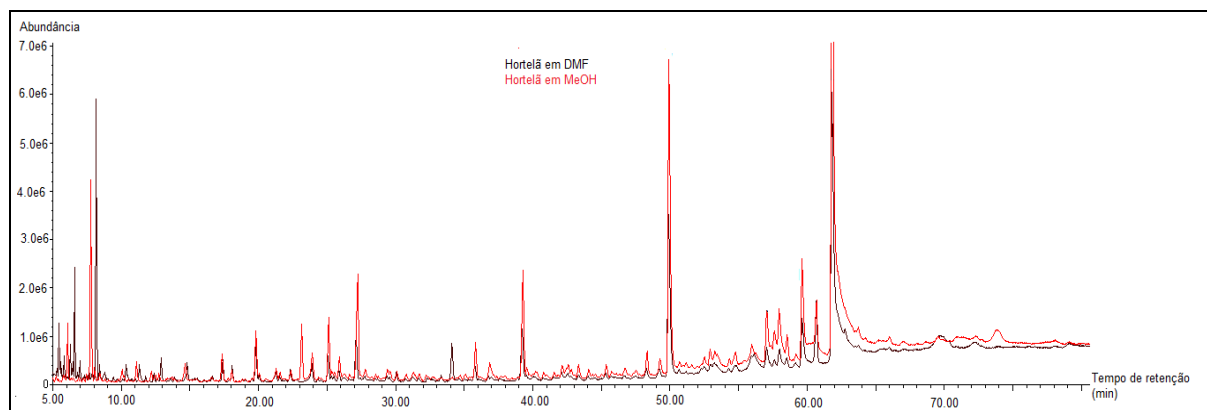
Figura 31 – Cromatogramas de análise de componentes de essências do chá de limão com extração em DMF e extração em metanol, ampliando a imagem nos minutos iniciais do cromatograma para visualizar as diferenças significativas.



Analisando a Tabela 5 em conjunto com os cromatogramas do chá de limão é possível constatar que a grande maioria dos picos são obtidos pelos dois solventes, com exceção de mentol, trans-p-Menta-2,8-dienol e acetato de nerol que são identificados apenas em DMF. No chá de limão foi onde percebeu-se a variação mais significativa em relação a presença de compostos. Deste modo, pode-se

concluir que o DMF seria um melhor solvente para extração dos componentes de essências do limão.

Figura 32 – Cromatogramas de componentes de essências do chá de hortelã em DMF e em metanol.



De acordo com a Tabela 5 e com a visualização do cromatograma na Figura 32 pode-se afirmar que todos os picos que estão presentes no cromatograma de componentes de essências empregando metanol aparecem também no cromatograma que utilizou o DMF. Alguns picos de interesse aparecem em maior abundancia na extração com DMF, porém, nos minutos iniciais da corrida, é possível perceber que há um deslocamento de picos utilizando-se este solvente. Não é possível identificar cafeína nas amostras extraídas com metanol. Porém as xantinas não são o foco deste experimento. Sendo assim, tanto o metanol quanto o DMF podem ser utilizados para este ensaio onde visa-se principalmente os componentes de essências, isto é, os componentes dos óleos essenciais.

Telci *et al* (2010) efetuou ensaios de caracterização e quantificação de compostos do óleo essencial de menta *espicata* utilizando GC-MS e GC-FID. A extração do óleo da planta foi realizada através de destilação de refluxo empregando-se água como solvente. Após isolar o óleo, este foi diluído em acetona e analisado em GC-FID para quantificação e em GC-MS para qualificação dos compostos. 31 compostos foram identificados por Telci *et al* (2010) pelo menos dois destes são muito importantes: a carvona e a pulegona, monoterpênicos oxigenados. A

carvona é o principal componente da menta espicata e a pulegona, o principal componente da *Mentha pulegium*.

Os dois compostos foram identificados empregando-se o metanol, porém em DMF estes apresentam uma abundância ainda maior, mostrando que o DMF consegue extrair maior quantidades destes compostos do que o metanol. Deste modo, pode-se afirmar que o DMF é melhor solvente para extração dos componentes de essências de hortelã do que o metanol.

Para o processo de extração de açúcares foi realizada a mesma comparação, desta vez, empregando-se o metanol como solvente verificado, já que o DMF é o solvente utilizado na metodologia atual.

Medeiros e Simoneit (2007) efetuaram análise de açúcares em amostras ambientais utilizando GC-MS, empregando uma mistura 2:1 de diclorometano e metanol e extraíndo por ultrassom. Parte do extrato foi evaporado em corrente de nitrogênio e posteriormente foram ressuspensos em piridina e sililado com BSTFA sob aquecimento. Isto mostra que diversas combinações de solventes polares podem ser utilizados para a extração e análise de açúcares em diferentes matrizes. Podendo-se utilizar apenas um solvente ou uma mistura deles como Medeiros & Simoneit (2007) fizeram.

Devido ao metanol tratar-se de um solvente prótico e como os açúcares devem passar por processo de derivatização para serem analisados por GC-MS, este solvente deve ser totalmente eliminado da amostra antes de ocorrer a sililação com BSTFA.

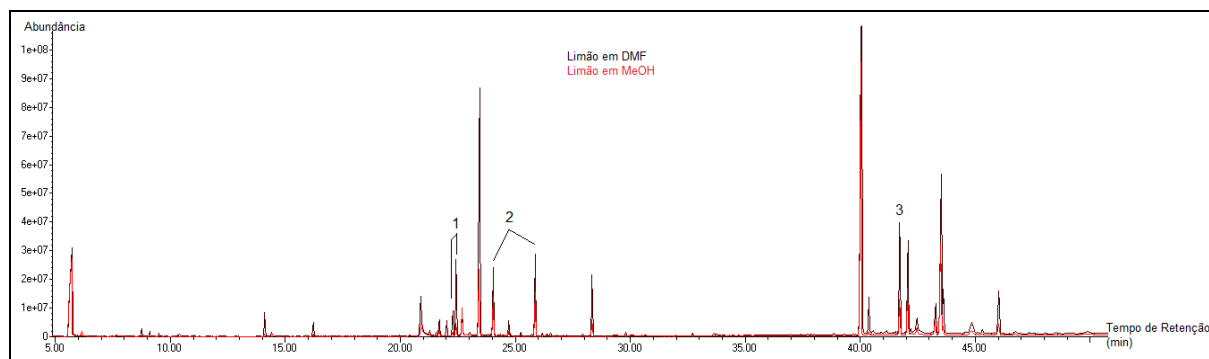
É possível verificar que todos os açúcares que se encontram no ensaio realizado com DMF também estão no ensaio realizado com metanol em todos os chás.

No chá de limão identificou-se apenas um pico de frutose-TMS utilizando o metanol como solvente. Na verdade, os dois picos de frutose-TMS estão presentes, porém um deles apresenta-se em abundância muito baixa.

Tabela 7 – Comparativo entre os compostos tentativamente identificados através de GC-MS no ensaio de açúcares para os chás empregando metanol e DMF. A presença do composto é indicada pelo símbolo “x” marcado

Identificação		D-Fructose, 1,3,4,5,6-pentaquis-O-TMS	D-Glucose, 2,3,4,5,6-pentaquis-O-TMS- ou Glucopyranose, pentaquis-O-TMS	d-(+)-Xylose, tetraquis TMS ether
Chá de Cravo	MeOH	x	x	x
	DMF	x	x	x
Chá de Limão	MeOH	x	x	x
	DMF	x	x	x
Chá de Hortelã	MeOH	x	x	x
	DMF	x	x	x

Figura 33 – Cromatogramas do ensaio de açúcares do chá de limão em DMF e em metanol.



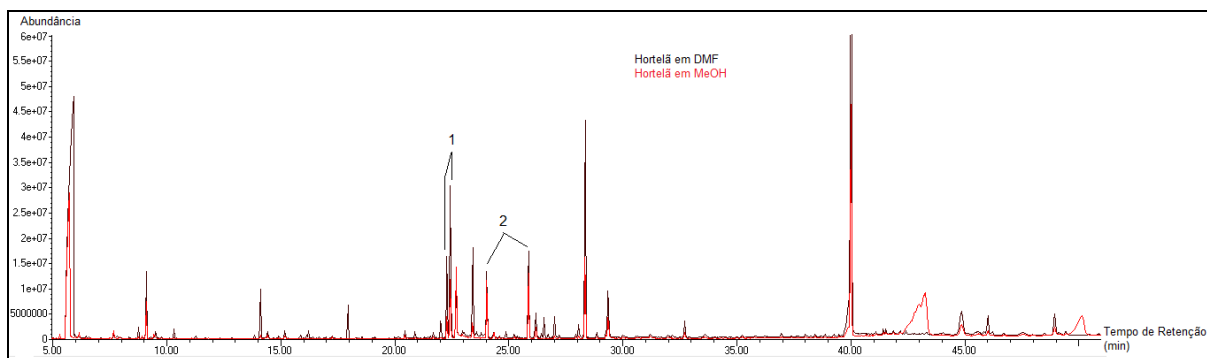
No cromatograma do chá de hortelã, na Figura 34, percebe-se que o DMF mais uma vez extrai melhor os açúcares do que o metanol, alcançando maiores abundâncias.

É de fundamental importância que a abundância dos compostos estejam suficientemente altas para que possam ser identificados pelo GC-MS. Como alguns íons gerados pela fragmentação dos compostos que chegam ao filamento são decisivos no processo de identificação que um espectro de massas gera, é

necessário que uma maior quantidade destes íons cheguem ao detector. Assim sendo, o processo de extração deve ser o mais efetivo possível para que mais analito chegue a fonte de íons para ser fragmentado e gerando um bom sinal.

Deste modo, o DMF se torna uma melhor opção para a extração de açúcares nos chás.

Figura 34 – Cromatogramas do ensaio de açúcares do chá de limão em DMF e em metanol.



## 8 ANÁLISE DE CUSTOS

Para efetuar a proposta tecnológica não foi necessário investimento inicial, já que todos os equipamentos, operador (es) e reagentes já eram utilizados para estes procedimentos.

Os seguintes custos estão envolvidos nos processos que foram otimizados, conforme Tabela 8.

Tabela 8 – Custos de cada recurso que será utilizado para o cálculo de custo das análises de determinação de açúcares e de umectantes.

<b>Custos dos recursos utilizados</b>	
Operador	R\$ 14,00 / h
Metanol	R\$ 14,75 / L
DMF	R\$ 156,25 / L
BSTFA	R\$ 1261,00 / 100 mL

Para comparar os custos entre a situação atual dos dois ensaios e das da proposta tecnológica que é dividida em duas partes, uma empregando o metanol como solvente de extração e outra o solvente DMF como extrator, utilizou-se a Tabela 9.

Os ganhos com a implementação da otimização podem chegar a mais de R\$ 4,00 por amostra, dependendo dos resultados obtidos e o solvente que foi escolhido.

Além disso, nesta tabela estão apresentados apenas os tempos em que o operador estará envolvido com o processo. Por exemplo, cada etapa de moagem além de manter o operador envolvido com o procedimento durante aproximadamente 12 minutos, a amostra também é moída durante mais 8 minutos, totalizando em um tempo economizado de processo de 20 minutos.

As etapas de pesagem e extração também tem seu tempo reduzido através da unificação.

Vale salientar que os custos com energia devido a utilização dos equipamentos não foram contemplados neste estudo devido ao valor muito baixo, não acarretando diferenças significativas nos resultados.

Tabela 9 – Apresentação do tempo gasto pelo operador por atividade, reagentes e custos relacionados com cada item para cada processo efetuado: situação atual, proposta tecnológica utilizando o metanol e o DMF como solventes extratores. Também é mostrado o custo total envolvido para cada situação.

<b>Comparativo de Custos entre a Situação Atual e a Proposta Tecnológica</b>			
<b>Custos envolvidos</b>	<b>Situação Atual</b>	<b>Proposta Tecnológica</b>	
		<b>Metanol</b>	<b>DMF</b>
<b>Custo Operador</b>			
<b>Atividade</b>	<b>Tempo (min)</b>		
Abertura de sachês e separação da amostra	1	1	1
Colocação de amostras no moinho e moagem	12	0	0
Limpeza recipientes do moinho	7	0	0
Pesagem	4	2	2
Adição de Metanol	1	1	0
Adição de DMF	1	1	1
Tempo de ambientação 1	10	10	10
Retirada de alíquota	0	0,5	0,5
Secagem em N <sub>2</sub>	0	2	0
Adição de BSTFA	1	1	1
Tempo de ambientação 2	10	10	10
Filtração	4	2	2
Preparo <i>vial</i> para injeção	2	2	2
<b>Total de tempo (min)</b>	53	32,5	29,5
<b>Total por amostra (R\$)</b>	12,36	7,59	6,89
<b>Custo Reagentes</b>			
	<b>Custo por quantidade utilizada (R\$)</b>		
DMF	0,08	0,08	0,31
BSTFA	6,31	6,31	6,31
N <sub>2</sub>	0,00	0,15	0,00
Metanol	0,03	0,03	0,00
<b>Total reagentes (R\$)</b>	6,42	6,57	6,62
<b>Total Final - reagentes e operador (R\$)</b>	18,78	14,16	13,51



## 9 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos conclui-se que é possível realizar os ensaios de determinação de componentes de essências e açúcares em chá sem que seja necessária a realização do processo de moagem das amostras. A utilização de amostras sem moer forneceu resultados muito semelhantes aos resultados obtidos nas amostras moídas. Além disso, alguns componentes de essências foram identificados em maior abundância nas amostras sem moer do que nas moídas, como o aceto-eugenol no chá de cravo.

A eliminação do processo de moagem foi de grande importância devido às contaminações que podem ocorrer com a utilização dos mesmos recipientes de moagem, apenas efetuando uma higienização.

Já para a etapa de unificação do solvente de extração dos açúcares e dos componentes de essências pode-se constatar que o dimetilformamida apresentou melhores resultados para os dois ensaios do que o metanol. O DMF extrai mais componentes de essências e em maiores quantidades do chá do que o metanol, o que pode ser constatado principalmente pelos resultados obtidos pelo chá de limão.

Além disso, a unificação da extração utilizando o DMF como solvente é o processo mais rápido e mais econômico comparado à situação atual e a proposta de utilizar o metanol como solvente extrator. Apesar de o DMF ser um solvente muito mais caro do que o metanol, o processo obtido através de seu uso é mais produtivo, pois envolve um número menor de etapas.

Este trabalho apresentou-se satisfatório na demonstração da possibilidade de utilizar um método para determinação de componentes de essências e açúcares em chás, sem redução do tamanho de partícula do chá comercial, o que evita contaminações de processo, e, empregando um mesmo solvente para a extração destes compostos a um baixo custo e alta produtividade.

## REFERÊNCIAS

1. BERTEA, C. et al. Molecular evaluation of a spearmint mutant altered in the expression of limonene hydroxylases that direct essential oil monoterpene biosynthesis. **Phytochemistry**. USA, v. 64, p. 1203 – 1211, 2003.
2. CHUN, M. H. et al. GC/MS combined with chemometrics methods for quality control of *Schizonepeta tenuifolia Briq*: Determination of essential oils. **Microchemical Journal**. Republic of Korea, v. 97, p. 274 – 281, 2011.
3. CUNHA, S. et al. Biomassa em aula prática de química orgânica verde: cravo-da-índia como fonte simultânea de óleo essencial e de furfural. **Química Nova**. Brasil, v. 35, no. 3, p. 638 – 641, 2012.
4. GEANKOPLIS, C. J. Transport Processes and Unit Operations. In: GEANKOPLIS, C. J. **Mechanical-Physical Separation Processes: Mechanical Size reduction**. USA: Prentice-Hall International, Inc., 1993. Cap. 14, p. 840 – 850.
5. GÜLÇİN, I. et al. Antioxidant activity of clove oil – A powerful antioxidant source. **Arabian Journal of Chemistry**, Arabia Saudita, v. 5, p. 489 – 499, 2012.
6. KJONAAS, R. CROTEAU, R. Demonstration that limonene is the first cyclic intermediate in the biosynthesis of oxygenated p-menthane monoterpenes in *Mentha piperita* and other *Mentha* species. **Archives of Biochemistry and biophysics**. USA, v. 220, no. 1, p. 79 – 89, 1983.
7. KOKKINI, S. et al. Essential oils of Spearmint (carvone-rich) plants from the island of Crete (Greece). **Biochemical and Systematics and Ecology**. Greece, v. 23, no. 4, p. 425 – 430, 1995.
8. MATSUBARA, S. , RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Teores de Catequinas e Teoflavinas em chás comercializados no Brasil. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v.26, p.401 – 407, 2006.

9. MAZZAFERA, P. Efeito alelopático do extrato alcoólico do cravo-da-índia e eugenol. **Revista Brasil**. Brasil, v. 26, n. 2, p. 231- 238, 2003.
10. MEDEIROS, P.M.; SIMONEIT, B.R.T.. Analysis of sugars in environmental samples by chromatography – mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**. USA, v. 1141, p. 271 – 278, 2007.
11. MYINT, S. et al. Gas chromatography determination of eugenol in ethanol extract of cloves. **Journal of Chromatography B**. Malaysia, v. 679, p. 193 – 195, 1996.
12. NISHITANI, E.; SAGESAKA, Y., Simultaneous determination of catechins, caffeine and other phenolic compounds in tea using a new HPLC method. **Journal of Food Composition and Analysis**. Japan, p. 675 – 695, 2003.
13. RIU-AUMATELL, M. et al. Characterisation of volatile composition of White salsify (*Tragopogon porrifolius* L.) by Headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) and simultaneous distillation-extraction (SDE) coupled GC-MS. **Food Chemistry**. Spain, v. 129, p. 557 – 564, 2011.
14. SCHULTZ, K. et al. Headspace solid-phase microextraction – gas chromatography – mass spectrometry for the quantitative determination of the characteristic flavouring agent eugenol in serum samples after enzymatic cleavage to validate post-offence alcohol drinking claims. **Journal of Chromatography A**. Germany, v. 1211, p. 113 – 119, 2008.
15. SHARANGI, A.B. Medicinal and therapeutic potentialities of tea (*Camellia sinensis* L.) – A review. **Food Research International**. India, v. 42, p. 529 – 535, 2009.
16. TEIXEIRA, B. et al. European Pennyroyal (*Mentha pulegium*) from Portugal: Chemical composition of essential oil and antioxidant and antimicrobial properties of extracts and essential oil. **Industrial Crops and Products**. Portugal, v. 36, p. 81 – 87, 2012.
17. VALENTE, A.L.P.; AUGUSTO, F. Microextração por fase sólida. **Química Nova**. Brasil. 1999. V. 23, p. 523 – 530.

18. WANG, Y. et al. Comparative analysis of essential oil components in *Pericarpium citri Reticulatae Viride* and *Pericarpium Citri Reticulatae* by GC-MS combined with chemometric resolution method. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**. China, v. 46, p. 66 – 74, 2008.
19. WENQIANG, G. et al. Comparison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and other three traditional extraction methods. **Food Chemistry**. China, v. 101, p. 1558 – 1564, 2007.
20. ZHAO, D. et al. Variation of essential oil of *Mentha haplocalyx* Briq. And *Mentha spicata* L. from China. **Industrial Crops and Products**. China, v. 42, p. 251 – 260, 2012.
21. ZHONG, F. et al. Formation and Characterisation of mint oil/S and CS/water microemulsions. **Food Chemistry**. China, v. 115, p. 539 – 544, 2009.
22. ZINI, C.A. **Estudo dos compostos voláteis de algumas espécies de eucalipto através do uso de microextração em fase sólida no modo headspace (HS-SPME)**. 2002. 224 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

## ANEXOS

### ANEXO A

#### **Parâmetros cromatográficos utilizados no modo SCAN de aquisição de dados para Componentes de Essências.**

(CE\_SCAN.M)

- Coluna DB – WAX – Comprimento: 30 m; Diâmetro interno: 320 µm; Espessura de filme: 0,5 µm – Fase estacionária: Polietilenoglicol (PEG) – Marca: J & W; Temperatura Máxima: 250°C;

#### **Injetor:**

- Temperatura do Injetor: 250°C;
- Pressão: 5 psi - Modo: Pressão Constante.
- Modo de Injeção: Splitless;
- Fluxo da purga: 0,5 mL/min;
- Gás Carreador: Hélio.

#### **Forno:**

- Programa de temperatura: 40°C (0min) – 120°C/min – 120°C (0min) – 2°C/min – 250°C;

#### **Informações do MS:**

- Solvent Delay: 3,00 min;
- Temperatura Quadropolo: 150°C;
- Temperatura da fonte de íons: 230°C;
- Temperatura do auxiliar: 270°C.

#### **Parâmetros do SCAN:**

- Low mass: 40.0 u.m.a.;
- High mass: 350 u.m.a.;
- Threshold; 150.
  
- Volume de Injeção: 1 µL.

## ANEXO B

### Parâmetros cromatográficos utilizados no modo SCAN de aquisição de dados para Açúcares

(DS\_SCAN.M)

- Coluna HP- PONA – Comprimento: 25 m; Diâmetro interno: 250 µm; Espessura de filme: 0,25 µm – Fase estacionária: Polidimetilsiloxano (PDMS) – Marca: J & W; Temperatura Máxima: 350°C;

#### Injetor:

- Temperatura do Injetor: 260°C;
- Pressão: 10 psi - Modo: Pressão Constante.
- Modo de Injeção: Split – Razão de split: 30:1;
- Gás Carreador: Hélio.

#### Forno:

- Programa de temperatura: 100°C (0min) – 5°C/min – 240°C (0min) – 3°C/min – 270°C - 10°C/min – 300°C ;

#### Informações do MS:

- Solvent Delay: 2,00 min;
- Temperatura Quadrupolo: 150°C;
- Temperatura da fonte de íons: 230°C;
- Temperatura do auxiliar: 270°C.

#### Parâmetros do SCAN:

- Low mass: 40.0 u.m.a.;
- High mass: 350 u.m.a.;
- Threshold; 150;
- Volume de Injeção: 1 µL.