

JÚLIO CÉSAR RODRIGUES LOPES SILVA

**PRODUÇÃO DE BIOMASSA, ANÁLISE SENSORIAL DE CHÁS,
CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL POR CROMATOGRAFIA
GASOSA UNI E BIDIMENSIONAL ABRANGENTE DE CLONES SELECIONADOS
DE *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br QUIMIOTIPO CITRAL**

Botucatu

2019

JÚLIO CÉSAR RODRIGUES LOPES SILVA

**PRODUÇÃO DE BIOMASSA, ANÁLISE SENSORIAL DE CHÁS,
CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL POR CROMATOGRAFIA
GASOSA UNI E BIDIMENSIONAL ABRANGENTE DE CLONES SELECIONADOS
DE *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br QUIMIOTIPO CITRAL**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da Unesp Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Agronomia (Horticultura).

Orientadora: Marcia Ortiz Mayo Marques

Botucatu

2019

S586p

Silva, Júlio César Rodrigues Lopes

Produção de biomassa, análise sensorial de chás, caracterização química do óleo essencial por cromatografia gasosa uni e bidimensional abrangente de clones ... / Júlio César Rodrigues Lopes Silva. -- Botucatu, 2019

84 p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu

Orientadora: Márcia Ortiz Mayo Marques

1. Erva-cidreira. 2. Metabolismo especializado. 3. Perfil sensorial. 4. Cromatografia. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: “PRODUÇÃO DE BIOMASSA, ANÁLISE SENSORIAL DE CHÁS, CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL POR CROMATOGRAFIA GASOSA UNI E BIDIMENSIONAL ABRANGENTE DE CLONES SELECIONADOS DE *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. QUIMIOTIPO CITRAL”

AUTOR: JÚLIO CÉSAR RODRIGUES LOPES SILVA

ORIENTADORA: MÁRCIA ORTIZ MAYO MARQUES

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em AGRONOMIA (HORTICULTURA), pela Comissão Examinadora:



Dr.^a MÁRCIA ORTIZ MAYO MARQUES

Centro de P&D de Recursos Genéticos Vegetais / Instituto Agrônômico de Campinas



Prof.^a Dr.^a BEATRIZ HELENA LAMEIRO DE NORONHA SALES MAIA

Química / Universidade Federal do Paraná



Prof. Dr. FILIPE PEREIRA GIARDINI BONFIM

Horticultura / Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu - UNESP

Botucatu, 21 de fevereiro de 2019.

*A minha mãe e avó,
Flávia e Inês, inspirações da minha.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me guiar e permitir chegar até aqui.

A minha mãe e avó que são as inspirações da minha vida. Duas guerreiras, que mesmo diante das dificuldades não mediram esforços para que eu pudesse chegar onde cheguei. Espero um dia poder retribuir tudo que fizeram por mim.

Aos meus irmãos Pedro Arthur e Yan que sempre me apoiaram e incentivaram.

A todos meus familiares que acreditaram em mim.

A faculdade de Ciências Agrônômicas da Unesp, pelo suporte e oportunidade de realizar o mestrado.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da bolsa.

Ao Instituto Agrônomo (IAC) por disponibilizar a área para realização do experimento.

Ao pesquisador Dr. Leandro Wang Hantao, do Instituto de Química da Unicamp, por todo suporte e colaboração nas análises cromatográficas e por suas contribuições científicas. Aprofundar nessa área foi um desafio, mas extremamente gratificante.

A Dra. Roselaine Facanali por compor a banca de qualificação e ajuda na interpretação dos dados químicos.

A pesquisadora Dra. Aline de Oliveira Garcia do Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos do Instituto de Tecnologia de Alimentos, que gentilmente nos recebeu em seu laboratório e auxiliou na condução das análises sensoriais.

A Nathália Godoy por toda ajuda e suporte na execução e interpretação dos dados da análise sensorial.

Ao Dr. Walter José Siqueira, um dos mentores desse trabalho e a quem sou extremamente grato. O amor que você tem pela pesquisa é admirável e incentivador. Obrigado por se fazer presente e contribuir para minha formação. Te admiro e me espelho em você como profissional.

Agradeço a minha orientadora, Dra. Marcia Ortiz Mayo Marques, pelos ensinamentos paciência, amizade e por sua presença e dedicação em todas as etapas do projeto. Além disso, obrigado se preocupar com meu bem-estar pessoal e profissional.

Ao professor Filipe Pereira Giardini Bonfim, por suas contribuições na banca de qualificação e de defesa, bem como por me receber em seu grupo de pesquisa no meu primeiro ano de mestrado, onde fiz amizades incríveis.

A Professora Beatriz Helena Lameira de Noronha Sales Maia por aceitar o convite de compor a banca de defesa e por suas contribuições.

Aos meus amigos de Sabará, em especial Raíssa, Aline e Carol, amigas de longa data e que tenho imenso carinho.

A “colega” Isabella pelos longos anos de amizade. Desde a graduação trilhamos os mesmos caminhos e por isso tivemos a oportunidade de acompanhar o amadurecimento profissional e pessoal um do outro. Sou grato e feliz por Deus ter te colocado na minha vida.

Aos amigos de Botucatu da pós-graduação, Hilbaty, Daniela, Nathália, Suellen, Ricardo, Luiza, Raíra, Silvia, Geane e Mirella.

Aos amigos do laboratório de Fitoquímica do IAC, Dani, Leticia Jordany, Guilherme, Dayane e Ana pelos momentos de descontração, conversas e saídas a Sergel para refrescar a mente.

Um agradecimento em especial à amiga Jordany Aparecida por suas contribuições científicas na condução desse trabalho, e principalmente por sua amizade, e posicionamento calmo e sensato perante as dificuldades da vida. Apesar de nos conhecermos a pouco tempo te tenho como uma irmã que a vida me deu. Obrigado por me revelar aspectos sobre mim que eu não sabia, e por me mostrar que existe um mundo inteiro a ser descoberto e vida além das paredes do laboratório.

As amigas Paula, Laura, Karoline, Thaíse, Amanda e Emanuelle, que mesmo à distância se fizeram presentes e que são peças fundamentais na minha vida.

Aos amigos do alojamento do IAC, Cinthia, Gabriela, Gustavo, Rafael, Fernando, pela convivência, conversas e por tornarem os dias mais leves.

Por fim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram na execução desse trabalho. Foram muitas pessoas, que se fosse listar teria que escrever outra dissertação. Mas a todos vocês o meu muito obrigado!

“Eu faço da dificuldade a minha motivação. A volta por cima vem a continuação. O que se leva dessa vida é o que vive é o que se faz”.

Charlie Brown Júnior

RESUMO

Lippia alba (Mill.) N.E.Br, pertencente à família Verbenaceae é uma planta medicinal amplamente distribuída na América do Sul. A composição química do óleo essencial da espécie, a qual derivam suas propriedades terapêuticas mostra-se variável, com divisão em quimiotipos. Entre eles, o quimiotipo citral destaca-se pelas ações calmante e ansiolítica, sendo suas folhas empregadas na medicina popular na forma de chá. Dessa forma, visando o potencial uso econômico de *Lippia alba*, este estudo teve como objetivos avaliar clones de *Lippia alba* do quimiotipo citral quanto a produtividade de biomassa e óleo essencial, perfil sensorial do chá e composição química do óleo essencial pelas técnicas de cromatografia gasosa unidimensional (CG) e bidimensional abrangente (CG×CG). Entre os clones, dois mostraram-se promissores para inserção em sistemas de produção, com foco em maior produção de biomassa e óleo essencial. Os perfis químicos dos óleos essenciais dos clones são variáveis entre si. O emprego do sistema CG×CG resultou em maior capacidade de detecção dos constituintes dos óleos essenciais. Ao todo foram identificadas 47 substâncias por CG×CG, contra 26 no CG. A maior sensibilidade e resolução fazem do sistema CG×CG uma importante ferramenta metabolômica no estudo dos constituintes voláteis de *Lippia alba*. Os clones X6M?C e X6M7 se destacaram quanto as características sensoriais de aroma e sabor, com potencial de inclusão na indústria alimentícia na forma de chá.

Palavras-chave: Erva-cidreira. Metabolismo especializado. Perfil sensorial. Cromatografia.

ABSTRACT

Lippia alba (Mill.) N.E.Br, from the Verbanaceae family is a medicinal plant widely distributed in the South America. The species's essential oil chemical composition, which derives its therapeutic properties, shows itself as variable, with division in chemotypes. Among them, the citral chemotype highlights itself for the soothing and anxiolytic actions, being its leaves used in the popular medicine in the form of tea. Thus, aiming the potential economic use of the *Lippia alba*, this work has as objectives evaluate the clones of the citral chemotype of *Lippia alba* in terms of productivity of biomass and essential oil, sensorial profile and chemical composition of the essential oil by using the one-dimensional gas Chromatography (CG) and comprehensive two-dimensional gas chromatography(CGxCG). Among the clone, two stood out as promising to insertion in production systems, with focus on a bigger production of biomass and essential oil. The chemical profiles of the clones's essential oil are variable among themselves. The use of the CGxCG system have resulted in a bigger capacity of identification of the essential oils constituents. Altogether, 47 substances have been identified by CGxCG, against 26 in CG. The better sensibility and resolution are part of the CGxCG, an important metabolomics tool of the volatile constituents of *Lippia alba*. The X6M7C e X6M7 clones stood out in terms of sensorial features of flavor, with potential of inclusion in the food industry in the form of tea.

Keywords: Erva-cidreira. Specialized metabolism. Sensory profile. Chromatography.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1

Figura 1 -	Croqui da disposição dos blocos na área experimental.....	34
Figura 2 -	Croqui da disposição das plantas dentro da parcela experimental.....	35
Figura 3 -	Gráfico tridimensional (3D) da análise de componentes principais, em função da composição química do óleo essencial de clones de <i>Lippia alba</i> do quimiotipo citral e <i>C.citratu</i> s, submetidos a dois cortes de produção.....	46
Figura 4 -	Gráfico de <i>score</i> (A) e <i>loadings</i> (B) das componentes principais 1 e 2 em função da composição química do óleo essencial de clones de <i>Lippia alba</i> do quimiotipo citral e <i>C.citratu</i> s, referentes a dois cortes de produção.....	47
Figura 5 -	Gráfico de <i>score</i> das componentes principais 1 e 3 em função da composição química do óleo essencial de clones de <i>Lippia alba</i> do quimiotipo citral e <i>C.citratu</i> s referentes a dois cortes de produção.....	48
Figura 6 -	Gráfico de <i>loadings</i> das substâncias α -bulneseno, exo-isocitral e sabineno de clones de <i>Lippia alba</i> do quimiotipo citral e <i>C.citratu</i> s, referentes a dois cortes de produção.....	49
Figura 7 -	Análise de agrupamentos hierárquicos de acordo com a distância euclidiana de clones de <i>Lippia alba</i> do quimiotipo citral e <i>C.citratu</i> s referentes a dois cortes de produção.....	50
Figura 8 -	Mapa de calor (<i>heatmap</i>) com base na composição química do óleo essencial de clones de <i>Lippia alba</i> do quimiotipo citral e <i>C.citratu</i> s referentes a dois cortes de produção.....	51
Figura 9 -	Análise de componentes principais de acordo com o aroma e sabor de amostras de chá de clones de <i>Lippia alba</i> e amostras comerciais (A e B) e cultivada de <i>C.citratu</i> s.....	53

Figura 10 - Percentual (%) referente ao posicionamento dos consumidores quanto ao questionamento: O aroma e sabor da amostra se assemelham aos dos chás de consumo?	54
---	----

CAPÍTULO 2

Figura 1 - Mapa de calor (<i>heatmap</i>) com base na composição química do óleo essencial de clones de <i>Lippia alba</i> do quimiotipo citral e <i>C.citratus</i> referentes a dois cortes de produção.....	71
---	----

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1 -	Atributos químicos e físicos do solo da área experimental.....	33
Tabela 2 -	Dados climáticos referentes ao período de avaliação do experimento.....	35
Tabela 3 -	Resumo da análise de variância dos parâmetros: matéria fresca foliar (MFF); matéria seca foliar (MSF) eficiência foliar (EF); rendimento de óleo essencial (RO) e produtividade de óleo essencial.ha ⁻¹ (POE), referentes ao 1º e 2º corte de clones de <i>Lippia alba</i> do quimiotipo citral.....	39
Tabela 4 -	Valores de matéria fresca foliar (MFF); matéria seca foliar (MSF); eficiência foliar (EF); rendimento de óleo essencial (RO) e produtividade de óleo essencial.ha ⁻¹ (POE) referentes ao 1º e 2º corte de clones selecionados do quimiotipo citral de <i>Lippia alba</i>	40
Tabela 5 -	Composição química média (%) dos óleos essenciais de clones de <i>Lippia alba</i> do quimiotipo citral e <i>C.citratus</i> referentes a dois cortes de produção.....	43
Tabela 6 -	Matriz de co-ocorrência de amostras de chá de clones do quimiotipo citral de <i>Lippia alba</i> e amostras comerciais e cultivada de <i>C.citratus</i>	52

CAPÍTULO 2

Tabela 1 -	Composição química média (%) dos óleos essenciais de clones de <i>Lippia alba</i> do quimiotipo citral, analisados por CG-EM e CGxCG –EM.....	68
------------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAH	Análise de Agrupamentos Hierárquicos
Anava	Análise de variância
ACP	Análise de Componente Principais
CG	Cromatografia gasosa
CG-DIC	Cromatografia gasosa acoplada ao detector de ionização em chamas
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada ao detector de espectrometria de massas
CG×CG	Cromatografia gasosa bidimensional
CG×CG -	Cromatografia gasosa bidimensional abrangente acoplada à
EM	espectrometria de massas
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
IAC	Instituto Agrônômico
Ital	Instituto de Tecnologia de Alimentos
Nist	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
Unicamp	Universidade Estadual de Campinas

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	23
CAPÍTULO 1 – PRODUÇÃO DE BIOMASSA, PERFIL SENSORIAL DO CHÁ E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE CLONES SELECIONADOS DE <i>Lippia alba</i> DO QUIMIOTIPO CITRAL.....	27
1.1 INTRODUÇÃO.....	31
1.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	32
1.2.1 Determinação de matéria fresca e seca.....	36
1.2.2 Eficiência foliar.....	36
1.2.3 Extração de óleo essencial.....	36
1.2.4 Composição química do óleo essencial.....	37
1.2.5 Análise sensorial.....	37
1.2.6 Análise dos dados.....	38
1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
1.3.1 Biomassa, eficiência foliar, rendimento e produtividade de óleo essencial de clones de <i>Lippia alba</i> do quimiotipo citral.....	39
1.3.2 Composição química do óleo essencial.....	42
1.3.3 Análise sensorial.....	51
1.4 CONCLUSÃO.....	55
REFERÊNCIAS.....	57
CAPÍTULO 2 - PERFIL SENSORIAL DO CHÁ E CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE CLONES SELECIONADOS DO QUIMIOTIPO CITRAL DE <i>Lippia alba</i> POR CROMATOGRÁFICA GASOSA UNIDIMENSIONAL (CG) E BIDIMENSIONAL ABRANGENTE (CG×CG)	59
2.1 INTRODUÇÃO.....	63
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	65
2.2.1 Extração do óleo essencial.....	65
2.2.2 Análise por CG-EM.....	65

2.2.3	Análise por CG-DIC.....	66
2.2.4	Análise por CG×CG –EM.....	66
2.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	67
2.4	CONCLUSÃO.....	73
	REFERÊNCIAS	75
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	77
	REFERÊNCIAS	79
	APÊNDICE A – CROMATOGRAMAS UNI (1D) E BIDMENSIONAL (2D) DO ÓLEO ESSENCIAL DE CLONES DE <i>Lippia alba</i> do QUIMIOTIPO CITRAL	81

INTRODUÇÃO GERAL

A cultura do uso de plantas medicinais e de produtos de origem natural é realidade crescente no cenário mundial. Nos países em desenvolvimento, bem como nos mais desenvolvidos, o apelo da mídia para o consumo de produtos de origem natural aumenta a cada dia (THOGERSEN, 2017; BÉNARD et al., 2018; DITLEVSEN; SANDOE; LASSEN, 2019). No Brasil, segundo dados da agência de pesquisas Euromonitor Internacional (2018), em 2016 o mercado brasileiro de alimentos e bebidas naturais chegou a registrar R\$ 93,6 bilhões em vendas. As pesquisas da agência apontam ainda um crescimento anual para o setor de 4,4% até 2021.

Apesar da crescente demanda desse mercado, a produção de espécies medicinais é relativamente pequena quando comparada a outras culturas da base alimentar. No Brasil, país detentor da maior parte de biodiversidade mundial, com vasto potencial de moléculas a serem descobertas, existe uma enorme lacuna entre a oferta e a demanda de plantas medicinais (RODRIGUES, 2016). Esse fato, decorre em grande parte devido ao processo inicial de domesticação que a maioria das plantas medicinais se encontra, com variações tanto na quantidade como na qualidade desses vegetais, em função principalmente de variações genéticas (JANNUZZI et al., 2010; JANNUZZI et al., 2011). Dessa forma são necessários estudos com foco na seleção de genótipos superiores para exploração na agricultura.

Outro ponto crítico, tratando-se de plantas medicinais no Brasil refere-se a falta de valoração por parte dos produtores, bem como de setores industriais internos, frente ao potencial de exploração de espécies medicinais de interesse. Mudanças nesse cenário foram observadas a partir 2006, com o marco legal da política de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, publicada pelo Ministério da Saúde. Desde então, ações vêm sendo desenvolvidas com foco na popularização, desenvolvimento e inovação na área de plantas medicinais, abrangendo aspectos desde o cultivo até a elaboração do produto final (OLIVEIRA et al., 2016)

Entre as plantas com potencial para aplicação na indústria farmacêutica, alimentícia e afins, destaca-se *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. da família Verbenaceae, pertencente à ordem *Lamiales* (SALIMENA et al., 2015). A espécie é muito variável e polimórfica, dessa forma observa-se várias sinonímias científicas, como *Lippia*

germinata H.B.K., *Lantana molíssima* Desf, *Lantana odorata lippioides* Hook, *Lippia citrata* Cham, *Lippia balsamae* Mart. e *Lippia asperifólia* Poepp (PASCUAL et al., 2001; SALIMENA et al., 2015)

Conhecida popularmente no Brasil como erva-cidreira, erva-cidreira-de arbusto, cidreira ou falsa-melissa, no Brasil é uma das principais plantas usadas na forma de chá, devido as suas propriedades sedativa, antiespasmódica e ansiolítica, conforme levantamentos etnobotânicos (FEIJO et al., 2013; VÁSQUEZ; MENDONÇA; NODA, 2014). No entanto, as propriedades terapêuticas atribuídas a *Lippia alba*, nem sempre são uniformes. Em alguns casos, devido a diversidade genética da espécie ocorre separação em quimiotipos. O termo comumente tem sido empregado na literatura de acordo com os constituintes majoritários encontrados no óleo essencial (BLANK et al, 2015; LINDE et al., 2015).

Os quimiotipos linalol, citral, limoneno, limoneno/carvona e mirceno/cânfora, são comumente relatados para espécie em literatura científica (BLANK et al., 2015) Entre eles, o citral, representado pela soma das formas isoméricas neral e geranial, destaca-se pela versatilidade de utilizações, com potencial de aplicação na indústria de fragrâncias, devido ao aroma cítrico e principalmente na indústria alimentícia na forma de chá (MASWA; DAR, 2014).

Diante do potencial agroindustrial de *Lippia alba*, a espécie foi objeto de melhoramento genético no Instituto Agrônomo (IAC) a partir do cruzamento de diferentes quimiotipos (linalol, mirceno/cânfora, limoneno/carvona, citral) (SCHOCKEN, 2007). Os resultados dos cruzamentos entre os quimiotipos e as autofecundações geraram 35 plantas de quimiotipos diversos de *Lippia alba*, os quais foram clonados compondo um banco de germoplasma no IAC. Os clones de citral obtidos apresentam odor de limão, similar ao *Cymbopogon citratus* e *Melissa officinalis*, destacando-se os clones IAC X6M33, IAC X6M7, IAC X6M6 e IAC X6M?C, com potencial para o uso na indústria de alimentos, na forma de chá.

Até o momento, os clones quimiotipo citral, anteriormente citados, não foram avaliados quanto à produção de biomassa, rendimento e composição química de óleo essencial. Todos esses aspectos são de fundamental importância para seleção de genótipos superiores com características favoráveis, como alta produção de biomassa e de óleo essencial.

Por se tratar de uma matriz com potencial de inclusão na indústria de alimentos na forma chá, outro aspecto importante, que deve ser avaliado refere-se a presença de substâncias responsáveis pelo seu sabor e aroma. De acordo com Yang, Baldermann e Watanabe (2013), em amostras de chá, esses fatores estão relacionados diretamente à composição química do óleo essencial, cuja a caracterização é realizada principalmente pela técnica de cromatografia gasosa unidimensional (CG). No entanto, visando o melhor entendimento das características sensoriais, técnicas de maior poder de resolução na separação de substâncias têm-se destacado na análise de alimentos, tal como os sistemas de cromatografia gasosa bidimensional (CG×CG) (CORDERO et al., 2015). A instrumentação analítica dos sistemas bidimensionais é relativamente recente, sendo os primeiros estudos realizados por Liu e Phillips em 1991. Desde então, o aperfeiçoamento da técnica levou à construção de equipamentos mais sofisticados e com alto poder de resolução.

Os sistemas de cromatografia gasosa bidimensional (CG×CG) diferem-se dos convencionais devido a utilização de duas colunas, com características distintas, normalmente com polaridades diferentes. A interface responsável pelo acoplamento entre colunas é denominada de “modulador”, cuja função é realizar o recolhimento, a reconcentração e a reinjeção da amostra proveniente da primeira coluna (D^1) na segunda coluna (D^2) (MEINERT; MEIERHENRICH, 2012; ALEXANDRINO et al., 2018). Em situações onde apenas parte do eluato é reinjetado na D^2 , tem-se o que se denomina como cromatografia gasosa bidimensional de frações parciais, diferentemente da cromatografia gasosa bidimensional abrangente, onde todo eluato recolhido da D^1 é reinjetado na D^2 (ZINI, 2009).

Diante do contexto apresentado, o estudo de plantas medicinais e aromáticas com potencial para o desenvolvimento de novos produtos, para os diferentes segmentos da indústria (farmacêutica, fragrâncias, bebidas, etc), tal como *Lippia alba* é de caráter multidisciplinar. Assim, faz-se necessário pesquisas que enfoquem aspectos do sistema de produção, associados a técnicas de controle de qualidade que apresentem maior capacidade de separação e identificação das substâncias do metabolismo especializado de plantas, também denominado de secundário. Dessa forma, esse estudo foi dividido em dois capítulos. O primeiro teve por objetivo avaliar a produtividade de biomassa e óleo essencial, bem como o perfil químico dos óleos essenciais e sensorial dos chás de clones de *Lippia alba* do quimiotipo citral. O

segundo capítulo teve por objetivo caracterizar clones de *Lippia alba* do quimiotipo citral quanto a composição química do óleo essencial, pela técnica convencional, cromatografia gasosa unidimensional (CG), com a cromatografia gasosa bidimensional abrangente (CG×CG).

CAPÍTULO 1

PRODUÇÃO DE BIOMASSA, PERFIL SENSORIAL DO CHÁ E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE CLONES DE *Lippia alba* DO QUIMIOTIPO CITRAL

RESUMO

Lippia alba é uma planta medicinal, nativa da América do Sul. No Brasil é empregada popularmente na forma de chá, devido suas propriedades calmante e ansiolítica, sendo estas atribuídas ao citral (mistura de neral e geranial), substância presente no óleo essencial do quimiotipo citral. Entretanto, espécies exóticas utilizadas para a mesma finalidade mostram-se mais abrangentes quanto ao uso e comercialização, tal como *Cymbopogon citratus*, espécie comercializada na forma de chá e óleo essencial rico em citral. Um dos principais motivos dessa situação, decorre da falta de informações sobre o estabelecimento de cadeias produtivas. Dessa forma, visando o potencial uso econômico de *Lippia alba*, o objetivo do trabalho foi avaliar a produtividade da biomassa e óleo essencial, bem como o perfil químico dos óleos essencial e sensorial dos chás de clones do quimiotipo citral. O experimento foi conduzido em delineamento de blocos casualizados, sendo avaliados dois cortes. Os tratamentos consistiram de quatro clones do quimiotipo citral de *Lippia alba*, mais um tratamento adicional referente a espécie *Cymbopogon citratus*, empregada nesse caso, apenas para efeito de comparação da composição química e perfil sensorial do chá. Os resultados encontrados quanto a produtividade de biomassa e óleo essencial apontam os clones X6M7 e X6M33 como promissores para inserção em sistemas de produção devido a maior produção de biomassa e óleo essencial. Em relação ao perfil químico do óleo essencial, verifica-se que apesar de apresentarem citral como substância majoritária, os clones, bem como o *C. citratus* diferem-se em relação às demais substâncias identificadas, sendo diferentes entre si, no entanto similares nos dois cortes realizados. As variações fenotípicas, tanto na produtividade de biomassa,

quanto na composição química do óleo essencial indicam variabilidade genética intraespecífica da espécie *Lippia alba*, dentro de um mesmo quimiotipo. Em relação às características sensoriais do chá, observa-se que o clone X6M7C, apesar dos bons resultados de aceitação por parte dos consumidores está entre os clones menos produtivos em termos de biomassa e óleo essencial, ao contrário do X6M7, que apresentou bons resultados tanto de produção quanto em relação à percepção dos avaliadores em função do aroma e sabor do chá.

Palavras-chave: Erva-cidreira. Metabolismo especializado. Aroma. Sabor.

ABSTRACT

Lippia alba is a medicinal plant, native to South America. In Brazil, it is popularly used in the form of tea, due to its soothing and anxiolytic properties, these being attribute to the citral (mixture of neral and geranial), substance present in the essential oil of the citral chemotype. However, exotic species used to the same purpose, the show Them selves more comprehensive in regards of commercialization, such as *Cymbopogon citratus*, commercialized species in the form of tea and essential oil rich in citral. One of the main reasons for this situation, runs from the lack of information about the establishment of productive chains. Thus, aiming the potential economic utilization of *Lippia alba*, the main objective of this work was to evaluate the productivity of biomass and essential oil, as well as the chemical profile of essential oils, and the sensorial profile of the tea made from the clones of the citral chemotype. The experiment was conducted in randomized block design, being two cuts evaluted. The treatments consisted of four clones of the citral chemotype of *Lippia alba*, plus one additional treatment referent to the *Cymbopogon citratus* species, used in this case only with purposes of comparison of the chemical composition and the sensory profile of the tea. The results that have been achieved with respect to the production of biomass and essential oil indicate that the X6M7 and X6M33 clones are promising for insertion in the productivity systems due to the larger production of biomass and essential oil. In the chemical profile of the essential oil, one can verify that they are citral as the major substance, the clones, as well as the *C.citratus*, differing from the other identified substances, being different among themselves, but similar in the two cut that have been performed. The phenotypes variations in both the biomass production and the essential oil chemical composition indicate genetic variability intraspecific of the *Lippia alba* species, within the same chemotype. Regarding the sensory characteristics of the tea, it is observed que the X6M?C clone , despite the good results of acceptance by the consumers, is among the less productives clones in terms of biomass and essential oil, unlike the X6M7, that presented good results both in production and perception of the evaluators due to the flavor of the tea.

Keywords: Erva-cidreira. Specialized metabolismo. Flavor.

1.1 INTRODUÇÃO

Lippia alba (Mill.) N.E.Br. pertencente à família Verbenaceae é uma planta medicinal e aromática nativa da América do Sul. No Brasil, encontra-se distribuída por todo território nacional, com destaque para as regiões onde predominam o bioma cerrado, caracterizado como o maior centro de diversidade do gênero *Lippia* (REIS et al., 2014; SALIMENA et al., 2015). A espécie é conhecida popularmente como erva-cidreira, cidreira-brasileira, falsa-melissa entre outros nomes (GILBERT et al. 2005), sendo amplamente empregada na medicina popular na forma de chá de suas folhas (TIMÓTEO et al., 2015).

As propriedades biológicas atribuídas a *Lippia alba* decorrem em grande parte do óleo essencial extraído de suas folhas e flores (NUNES et al., 2018; TEXEIRA et al., 2018). A composição química, no entanto, mostra-se variável em função de fatores ambientais e genéticos. As alterações descritas para a espécie levaram a sua classificação em tipos químicos, denominados quimiotipos (JANUZZI et al., 2010; MONTOYA et al. 2016). Devido à ausência de informações quanto a definição do termo, a maioria dos autores tem se baseado nos compostos majoritários para distinção de quimiotipos (JANUZZI et al., 2011; GOMES et al., 2019).

A quimiodiversidade tem por consequência o aumento do espectro de aplicação da espécie, no entanto, para o correto emprego dessa matriz, o controle de qualidade por meio da análise química do óleo essencial torna-se um procedimento indispensável (STASHENKO et al., 2010). Os quimiotipos comumente encontrados em *Lippia alba*, são citral, limoneno-carvona e linalol (BLANK et al., 2015; OMBITO et al., 2014). Entre eles o citral, composto pela mistura das formas isoméricas neral e geranial, destaca-se pela ampla utilização de suas folhas na forma de chá, ao qual são atribuídas as propriedades calmante e ansiolítica (TIMÓTEO et al., 2015).

O mercado de bebidas naturais, tais como chá, tem ganhado espaço no cotidiano da população mundial. A tendência por parte dos consumidores, na busca por produtos de origem natural em substituição a sintéticos, figura entre as principais causas do destaque do setor (FAO, 2018). Apesar das ações farmacológicas comprovadas somadas a tendência mundial dos consumidores, na busca de produtos de origem natural, ainda não existem produtos na indústria de bebidas oriundos de

Lippia alba (BARRIENTOS et al., 2012). No entanto, espécies exóticas com características similares, quanto às propriedades terapêuticas, devido à presença do citral, mostram-se mais abrangentes quanto ao uso e comercialização, tal como *Melissa officinalis* L. e *Cymbopogon citratus* (dc) Stapf.

A falta de representatividade de *L. alba* no setor comercial de produtos naturais, assim como de outras espécies medicinais nativas, decorre principalmente da carência de estudos de pré-melhoramento, que explorem a variabilidade genética dessas plantas com foco na seleção de vegetais com características de interesse (BLANK et al., 2015). Pesquisas com esse enfoque poderão contribuir para o desenvolvimento de cultivares superiores com alto rendimento de óleo essencial e produção de biomassa, características extremamente desejáveis em sistemas de produção de plantas medicinais.

Apesar da espécie *L. alba* estar presente em várias regiões brasileiras, ainda são poucos os bancos de germoplasma e coleções de trabalho frente a grande variabilidade genética da espécie. O Instituto Agrônomo (IAC) situado em Campinas-SP, Brasil, desde de 2007 atua no melhoramento genético da espécie, a partir do estudo pioneiro de Schocken (2007), onde foram obtidos quimiotipos híbridos de *L. alba*, entre eles o citral, que foram clonados compondo um banco de germoplasma.

Os clones de quimiotipo citral da coleção do IAC, obtidos de cruzamentos, ainda não foram avaliados quanto aos aspectos agronômicos e químicos. Dessa forma, visando o potencial uso econômico de *Lippia alba*, o objetivo do trabalho foi avaliar a produtividade da biomassa e óleo essencial, bem como o perfil químico dos óleos essenciais e sensorial dos chás de clones do quimiotipo citral, tendo em vista o potencial aproveitamento pela indústria de bebidas, em especial a de chá.

1.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi instalado em área da Fazenda Santa Elisa do Instituto Agrônomo (IAC), situada no município de Campinas-SP, Brasil. As coordenadas da área experimental são: 22° 54" de latitude S e 47° 05" longitude W, com 674 metros de altitude. O clima da região é denominado Cwa – Clima temperado úmido, com inverno seco e verão quente, segundo a classificação de Köppen-Geiger.

A caracterização química e física do solo da área experimental da camada de 0 – 20 cm foi realizada no Laboratório de Ciências do solo da Faculdade de Ciências Agrônômicas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FCA/UNESP) e seus atributos figuram na tabela 1.

Tabela 1 - Atributos químicos e físicos do solo da área experimental

pH	M.O.	Presina	H+Al	K	Ca	Mg	SB	CTC	V%	B	Cu	Fe	Mn	Zn
(CaCl ₂)	(g/dm ³)	(mg/dm ³)		(mmolc/dm ³)						-----mg/dm ³ -----				
5,7	33	43	23	2,4	40	13	56	79	71	0,32	5,1	12	9,7	2,4

M.O: matéria orgânica; H+Al: acidez potencial; K: potássio; Ca: cálcio; Mg: magnésio; SB: soma de bases; CTC: capacidade de troca catiônica. V%: saturação por bases; B: boro; Cu: Cobre; Fe: Ferro; Mn: manganês e Zn: zinco.

Devido às boas condições das características químicas do solo e ao histórico de utilização da área, com cultivo anterior de feijão (*Phaseolus vulgaris* L) não foram adotados procedimentos de adubação. Desta forma, foram realizados apenas os processos de aração e gradagem para descompactação e destorroamento do solo.

Para esse estudo, foram avaliados quatro clones de *Lippia alba*, quimiotipo citral, pertencentes ao banco de germoplasma do IAC, sendo eles relacionados a seguir: IAC X6M6; IAC X6M7; IACX6M33 e IAC X6M?C. Os clones selecionados são resultado de cruzamentos e de autofecundações de diferentes quimiotipos, em trabalho realizado por Schocken (2007). O critério de seleção baseou-se em dados ainda não divulgados, referentes às informações agrônômicas e fitoquímicas, tendo como requisito básico, a presença das formas isoméricas do citral (neral e geranial), em maior percentual relativo no óleo essencial.

Os clones selecionados foram propagados assexuadamente, via estaquia, a partir de plantas matrizes do banco de germoplasma do IAC. Foram confeccionadas estacas com aproximadamente 25 cm de comprimento, sem aérea foliar e mantidas sobre hidratação por 24 horas antes do plantio.

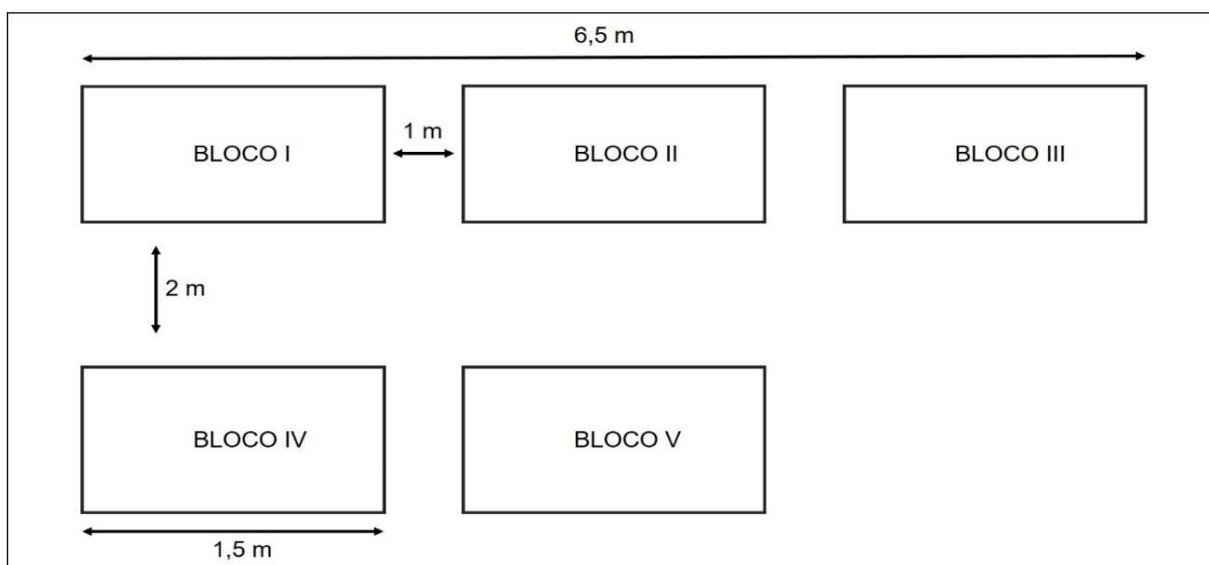
As estacas obtidas foram instaladas diretamente em campo no dia 24 de janeiro de 2018, sendo as avaliações na área experimental conduzidas até o dia 12 de setembro de 2018. O delineamento experimental empregado foi blocos casualizados com cinco repetições. Os tratamentos consistiram de quatro clones do quimiotipo citral

de *Lippia alba*, mais um tratamento adicional representado pela avaliação da espécie *Cymbopogon citratus*, utilizada apenas para comparação da composição química.

As mudas de *Cymbopogon Citratus* foram obtidas da empresa Pró-verde, situada no município de Botucatu- SP, e adicionadas ao experimento para comparação com os clones, por se tratar de uma espécie consolidada no mercado de chá, com características terapêuticas similares à *Lippia alba* em decorrência da presença do citral no seu óleo essencial.

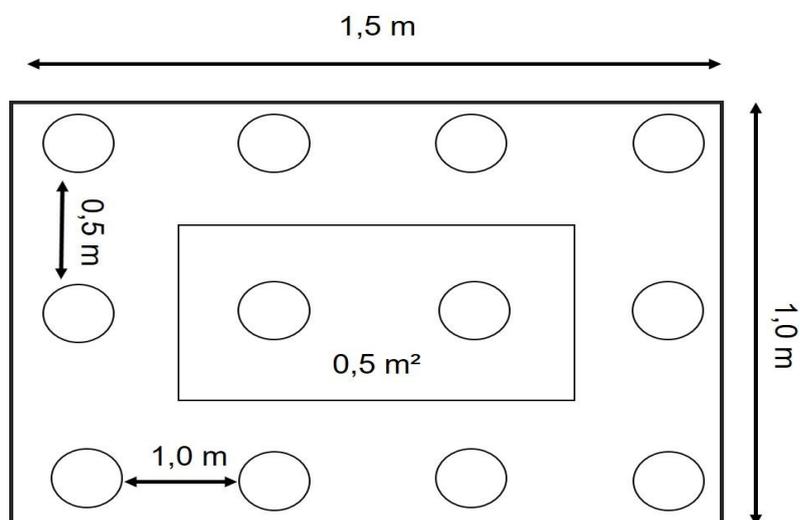
Os clones de *Lippia alba* e as mudas de *Cymbopogon citratus*, foram alocados em cinco blocos, separados entre si por 1 m de distância (FIGURA 1). Cada bloco foi composto por cinco parcelas experimentais, referentes aos quatro clones de *Lippia alba* mais a espécie *Cymbopogon citratus*.

Figura 1 - Croqui da disposição dos blocos na área experimental



As parcelas experimentais dentro dos blocos foram constituídas com 12 plantas cada, distribuídas em três linhas com quatro plantas. As duas plantas centrais foram consideradas como parcela útil, sendo as demais plantas descartadas (FIGURA 2). O tamanho de cada parcela com o espaçamento de 0,5 x 0,5 m foi de 1,5 m², com área útil de 0,5 m².

Figura 2 - Croqui da disposição das plantas dentro da parcela experimental



Os tratos culturais empregados após plantio incluíram a utilização de sistema de irrigação localizada por gotejamento, por meio de fita irrigadora com vazão de 1,7 L.h⁻¹ e capinas manuais nas linhas e entrelinhas quando necessário.

Aos 40 dias, após a implantação das estacas na área de cultivo foi avaliado a taxa de sobrevivência dos clones, com substituição de estacas que não apresentaram brotações foliares. O primeiro corte foi realizado 94 dias após o brotamento (11/06/2018), e o segundo, referente a rebrota, 93 dias após o primeiro (12/09/2018). A altura de corte adotada, tanto para as plantas de *Lippia alba* quanto as de *Cymbopogon citratus* foi de 15 cm acima do solo. Os dados meteorológicos referentes aos períodos de avaliação foram obtidos do banco de dados do Centro Integrado de Informações Agrometeorológicas (CIAGRO) (TABELA 2).

Tabela 2 – Dados climáticos referentes ao período de avaliação do experimento

Colheita	T° máxima (°C) (média ± erro padrão)	T° mínima (°C) (média ± erro padrão)	Precipitação (mm)	Dias de chuva
1º corte	30,08 ± 2,46	15,56 ± 3,40	373,2	11
2º corte	28,47 ± 2,12	12,2 ± 2,37	105,2	5

Ao final de cada colheita, os seguintes parâmetros foram avaliados: matéria fresca foliar (MFF) matéria seca foliar (MSF); eficiência foliar (EF); rendimento de óleo

essencial (RO); produção em $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ de óleo essencial (POE) e composição química do óleo essencial.

1.2.1 Determinação da matéria fresca e seca

Para determinação da matéria fresca, todo material vegetal foi pesado após a colheita. Em seguida os ramos e folhas foram separados, manualmente, pesados e secos em estufa de circulação forçada de ar a 40°C até peso constante, para a determinação da matéria seca.

1.2.2 Eficiência foliar

A eficiência foliar foi determinada por meio da seguinte expressão:

$$EF = \frac{MFF}{MFT}$$

Onde:

EF: eficiência foliar;

MFF: matéria fresca foliar;

MFT: matéria fresca total.

1.2.3 Extração de óleo essencial

A extração do óleo essencial foi realizada por hidrodestilação, em aparato clewenger, a partir de 50 g de folhas secas por 1 h e 30 min. Os óleos essenciais foram separados da fase aquosa e acondicionados em frascos de 5 mL, mantidos ao abrigo da luz sob refrigeração a 4°C .

1.2.4 Composição química do óleo essencial

A análise qualitativa da composição química do óleo essencial foi realizada em cromatografo a gás acoplado ao espectrômetro de massas (CG-EM, QP 5000 – Shimadzu) dotado de coluna capilar OV-5 MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) e hélio (99,9999% de pureza) como gás de arraste (vazão: 1 mL.min⁻¹). O sistema foi operado no modo *full scan*, com impacto de elétrons (70 eV), e faixa de 40 a 450 m/z. O injetor foi mantido a 220 °C, com divisão de vazão do gás de arraste (*split*) na razão de 1:20, seguindo a programação da temperatura de 60°C - 240°C (3 °C.min⁻¹). A temperatura da interface foi mantida em 240°C. As amostras de óleo essencial foram diluídas em acetato de etila (grau cromatográfico, 1mg.mL⁻¹) e injetado 1 µL de solução.

A análise quantitativa dos óleos essenciais foi conduzida em cromatografo a gás com detector de ionização de chama (CG-DIC, Shimadzu, CG-2010/AOC-20i), dotado de coluna capilar de sílica fundida OV - 5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm, *Ohio Valley Specialty Chemica*), hélio como gás de arraste (vazão de 1,0 mL min⁻¹), injetor a 280°C, detector a 300°C, *split* 1:20 e o mesmo programa de temperatura do sistema CG-EM.

A identificação dos constituintes químicos foi efetuada por meio da análise comparativa dos espectros de massas das substâncias com a biblioteca *National Institute of Standards and Technology (Nist 62.lib)* e os índices de retenção das substâncias (Adams, 2017). Os índices de retenção foram obtidos a partir da injeção da mistura de *n*-alcanos (C₉-C₂₄, Sigma USA) nas mesmas condições cromatográficas das amostras, aplicando-se a equação de Van den Dool e Kratz (1963).

1.2.5 Análise sensorial

A análise sensorial foi realizada no laboratório de Ciência e Qualidade de Alimentos do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), sob a supervisão da pesquisadora Dra. Aline de Oliveira Garcia. Para avaliação sensorial do chá, além das amostras de folhas secas (40° C) *Lippia alba* e *Cymbopogon citratus* foram empregadas amostras de duas marcas comerciais de *Cymbopogon citratus*. O preparo das infusões, para todas as amostras, foi realizado de acordo com a

recomendação dos fabricantes das marcas comerciais: em 1 g de material vegetal foram acrescentados 240 mL de água mineral fervente e mantida a infusão por 3 min. Para evitar alterações no sabor e aroma as infusões foram preparadas no momento da degustação pelos avaliadores.

O perfil das bebidas foi avaliado por meio da Análise Quantitativa Descritiva (AQD) (LAWLESS; HEYMANN, 2010). A análise foi conduzida com 63 indivíduos, de ambos os sexos, sem restrição de idade, através do método de rede, sendo solicitado aos avaliadores que agrupassem as bebidas de dois a quatro grupos, descrevendo suas características quanto ao aroma e sabor (STONE; SIDEL, 2004).

As amostras foram oferecidas em copos descartáveis de 80 mL, codificados com número de três dígitos. As análises foram realizadas em cabines individuais e aplicado um questionário direcionado, via computador, quanto as características de aroma e sabor dos chás avaliados. Para eliminar o sabor residual de uma amostra e outra foi oferecido água mineral.

1.2.6 Análise dos dados

Os dados obtidos para as variáveis MFF, MSF, EF, RO e POE foram submetidos a análise de variância (Anava) e as médias comparadas pelo teste Tukey a 5% de significância, por meio do *software* estatístico Sisvar (versão 5.6). Para a composição química do óleo essencial foi empregada a análise multivariada, com o auxílio da plataforma estatística *MetaboAnalystR* (Xia et al; 2015). As informações referentes às amostras foram normalizadas e os valores das variáveis autoescalados, sendo aplicado aos dados a análise de componentes principais (ACP) e de agrupamentos hierárquicos (AAH) com base na distância euclidiana. As informações referentes ao perfil sensorial dos chás foram submetidas a análise de componentes principais (ACP) por meio do *software* estatístico XLSTAT, versão 9.0 (ADDINSOFT, 2010).

1.3 RESULTADO E DISCUSSÃO

1.3.1 Biomassa, eficiência foliar, rendimento e produtividade de óleo essencial de clones de *Lippia alba* do quimiotipo citral.

O resumo da análise de variância com os quadrados médios encontra-se na tabela 3. Houve efeito significativo para todos os parâmetros analisados, exceto eficiência foliar.

Tabela 3 - Resumo da análise de variância dos parâmetros: matéria fresca foliar (MFF); matéria seca foliar (MSF) eficiência foliar (EF); rendimento de óleo essencial (RO) e produtividade de óleo essencial.ha⁻¹ (POE), referentes ao 1º e 2º corte de clones de *Lippia alba* do quimiotipo citral

Fontes de variação	GL	Quadrados médios – 1º corte				
		MFF (kg.ha ⁻¹)	MSF (kg.ha ⁻¹)	EF	RO (%)	PROD (kg.ha ⁻¹)
Bloco	4	1063,29 ^{ns}	106,16 ^{ns}	0,02 ^{ns}	0,08 ^{ns}	0,27 ^{ns}
Clones (CL)	3	8621,35 ^{**}	425,98 ^{**}	0,02 ^{ns}	0,35 ^{**}	29,11 ^{**}
Resíduo	12	667,19	97,72	0,01	0,02	2,63
Total	19					
C.V. (%)		29,06	21,15	18,55	17,39	36,13
Fontes de variação	GL	Quadrados médios - 2º corte				
		MFF (kg.ha ⁻¹)	MSF (kg.ha ⁻¹)	EF	RO (%)	PROD (kg.ha ⁻¹)
Bloco	4	362,28 ^{ns}	89,81 ^{ns}	0,0020 ^{ns}	0,01 ^{ns}	3,80 ^{ns}
Clones (CL)	3	5556,95 ^{**}	244,61 ^{**}	0,0110 ^{**}	0,44 ^{**}	28,25 ^{**}
Resíduo	12	286,32	32,54	0,0020	0,05	1,60
Total	19					
C.V. (%)		14,70	20,74	8,11	28,58	28,07

Notas: GL= grau de liberdade, **Significativo a 1% pelo teste F. C.V (%)= coeficiente de variação.

Na tabela 4 são apresentados os valores das médias dos clones referentes aos parâmetros avaliados.

Tabela 4 - Valores de matéria fresca foliar (MFF); matéria seca foliar (MSF); eficiência foliar (EF); rendimento de óleo essencial (RO) e produtividade de óleo essencial.ha⁻¹ (POE) referentes ao 1º e 2º corte de clones selecionados do quimiotipo citral de *Lippia alba*

1º corte	MFF (kg.ha ⁻¹)	MSF (kg.ha ⁻¹)	EF	RO (%)	POE (kg.ha ⁻¹)
X6M6	2116,06 b	532,4 b	0,54 a	0,42 c	1,06 c
X6M?C	2664,20 b	630,6 b	0,68 a	0,68 b	2,1 bc
X6M33	3557,70 b	1025,9 a	0,62 a	0,99 a	6,44 a
X6M7	5881,45 a	1332,40 a	0,59 a	0,95 a	4,46 ab
2º corte	MFF (kg.ha ⁻¹)	MSF (kg.ha ⁻¹)	EF	RO (%)	POE (kg.ha)
X6M6	3391,80 b	748,48 b	0,61 a	0,41 c	1,57 c
X6M?C	3554,50 b	1012,55 ab	0,54 a	0,79 b	3,85 bc
X6M33	5418,40 a	1348,2 a	0,58 a	0,78 b	5,49 ab
X6M7	6053,33 a	1261,8 a	0,55 a	1,14 a	7,13 a

Médias seguidas de mesma letra na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

A matéria fresca foliar variou de 2116,06 kg.ha⁻¹ (X6M6) a 5881,45 kg.ha⁻¹ (X6M7) no primeiro corte e de e 3391,80 kg.ha⁻¹ (X6M6) a 6053,33 kg.ha⁻¹ (X6M7) no segundo corte. Os maiores valores de produção de matéria fresca para o primeiro corte foram encontrados para o clone X6M7, sendo os demais clones similares entre si. No segundo corte, observa-se novamente superioridade do clone X6M7 (6053,33 kg.ha⁻¹) em relação aos demais, juntamente com o clone X6M33 (5418,40 kg.ha⁻¹), sendo ambos significativamente diferente dos demais.

A produção de matéria seca variou de 532,40 kg.ha⁻¹ (X6M6) a 1332,40 kg.ha⁻¹ (X6M7) no primeiro corte e de 748,48 kg.ha⁻¹ (X6M6) a 1348,20 kg.ha⁻¹ (X6M33) no segundo corte. Em ambos os cortes, os clones X6M7 e X6M33 se destacaram dos demais, sendo encontrados valores acima de uma tonelada nos dois cortes avaliados. Considerando-se o tempo de cultivo para realizar os cortes, o primeiro, quatro meses após o plantio, e o segundo três meses após o primeiro, os resultados encontrados para os clones X6M7 e XM33 são satisfatórios e promissores para inclusão em sistemas de produção. Santos e Innecco (2004), avaliando dois períodos de colheita do quimiotipo limoneno-carvona da espécie *Lippia alba* obtiveram valores inferiores aos encontrados nesse estudo, em corte realizado 60 dias após o transplante, com média de matéria seca inferior a 1t.ha⁻¹, sendo encontrados valores próximos ao obtidos nesse estudo apenas na colheita realiza aos 120 dias de cultivo.

De acordo com, Marengo et al. (2015), o acúmulo de matéria seca está relacionado diretamente à quantidade de radiação fotossintética ativa interceptada pela planta. A partir dessa afirmação é possível inferir, que as variações encontradas entre os clones, quanto a esse parâmetro estão associadas a diferentes potenciais de conversão de energia solar em matéria seca, demonstrando existência de variabilidade genética dentro da espécie. De acordo com Januzzi et al. (2010), variações dessa magnitude são comuns em espécies nativas ainda não domesticadas, sendo um fator importante para seleção de genótipos superiores em programas de melhoramento.

Apesar das diferenças encontradas em relação à produção de biomassa (MFF e MSF), os clones mostraram-se similares quanto a eficiência foliar nos dois cortes realizados. Os valores mais próximos de 1 refletem maior produção da parte de interesse comercial (folhas) em relação a todo material colhido (folhas mais caule). Todos os clones avaliados nos dois cortes apresentaram valores maiores de 0,5, índice considerado satisfatório, indicando que mais de 50% de toda matéria vegetal colhida refere-se a parte comercial de interesse.

Em relação ao rendimento de óleo essencial os valores encontrados são divergentes. Os clones X6M7 e X6M33 apresentaram maiores valores de rendimento de óleo essencial, não se diferenciando significativamente entre si e se destacando dos demais com percentuais de 0,95% e 0,99% respectivamente na primeira colheita. Na segunda colheita, apenas o clone X6M7 se destacou dos demais com percentual médio de 1,14%.

Apesar dos melhores valores observados para os clones X6M7 e X6M33 na primeira colheita e para o clone X6M7 na segunda, os obtidos para os demais clones exceto o X6M6, em ambos os cortes, ultrapassam 0,50%, valores esses superiores quando comparado com dados da literatura referentes ao quimiotipo citral. Januzzi et al. (2011) avaliando 17 acessos do quimiotipo citral de *Lippia alba* obtiveram média de 0,28%, com apenas cinco acessos com percentuais maiores que a média, dos quais três apresentam valor superior a 0,5%, no entanto menores que os encontrados no presente estudo para os clones X6M7 e X6M33 em ambos os cortes realizados. Em outro estudo, realizado por Silva et al. (2006), na avaliação do quimiotipo citral em Ilhéus – BA, foram encontrados rendimentos abaixo dos observados no presente

estudo para todos os clones, em todas as quatro estações do ano (verão, primavera, outono e inverno), com valores médios variando de 0,12% a 0,19%.

Considerando-se o acúmulo de matéria seca foliar, rendimento do óleo essencial e área (m²) ocupada por uma planta, estimou-se a produtividade de óleo essencial em Kg.ha⁻¹. De forma geral, em ambos os cortes realizados observa-se que os tratamentos com maiores rendimentos corresponderam àqueles com maiores produtividades por área, sendo eles os tratamentos X6M7 e X6M33.

A partir dos parâmetros analisados e descritos, observa-se que os clones apresentam variações fenotípicas entre si, decorrentes de fatores genéticos, uma vez que foram avaliados sob as mesmas condições de cultivo. Tal informação é importante para continuidade do programa de melhoramento genético da espécie, em relação ao quimiotipo citral, com destaque para os clones X6M7 e X6M33 que se sobressaíram dos demais, com potencial para introdução em sistemas de produção.

1.3.2 Composição química do óleo essencial

Através da análise cromatográfica foram detectadas 28 substâncias, das quais 21 foram identificadas. As principais classes encontradas foram hidrocarbonetos monoterpênicos, monoterpênicos oxigenados, hidrocarbonetos sesquiterpênicos e sesquiterpênicos oxigenados. Os percentuais relativos são apresentados na tabela 5.

Tabela 5 - Composição química média (%) dos óleos essenciais de clones de *Lippia alba* do quimiotipo citral e *C.citratus* referentes a dois cortes de produção

Nº	Substância	IRL. cal	IRL. lit.	X6M6		X6M7		X6M33		X6M?C		C. citratus	
				1º corte	2º corte								
1	α-pineno	930	939	-	-	1,66 ± 0,55	2,40 ± 0,24	2,82 ± 0,72	3,92 ± 0,41	6,68 ± 1,19	6,73 ± 1,07	-	-
2	sabineno	970	975	0,44 ± 0,01	1,09 ± 0,23	3,03 ± 0,48	3,71 ± 0,22	1,49 ± 0,23	1,56 ± 0,11	2,30 ± 0,25	1,86 ± 0,13	-	-
3	β- pineno	980	979	0,60 ± 0,01	-	-	-	0,45 ± 0,01	-	0,93 ± 0,21	-	-	0,86 ± 0,01
4	metil-heptanona	981	985	0,80 ± 0,21	1,45 ± 0,29	1,36 ± 0,83	1,19 ± 0,26	0,93 ± 0,26	1,01 ± 0,52	-	1,50 ± 0,77	-	0,58 ± 0,01
5	mirceneno	989	990	28,25 ± 6,98	32,14 ± 1,87	15,82 ± 2,51	20,32 ± 0,62	27,12 ± 3,28	33,42 ± 0,60	30,23 ± 0,37	33,24 ± 2,87	14,86 ± 2,74	16,43 ± 0,05
6	limoneno	1025	1029	-	-	0,80 ± 0,09	0,93 ± 0,03	0,55 ± 0,11	0,60 ± 0,01	1,21 ± 0,07	1,16 ± 0,09	-	-
7	eucaliptol	1028	1031	-	-	16,83 ± 1,12	15,87 ± 1,06	-	-	0,93 ± 0,10	0,86 ± 0,06	-	-
8	trans-β-ocimeno	1044	1050	0,91 ± 0,30	1,40 ± 0,10	1,01 ± 0,06	1,55 ± 0,10	1,18 ± 0,17	1,69 ± 0,01	0,79 ± 0,13	1,38 ± 0,14	-	-
9	ni	1052	-	-	-	-	-	2,05 ± 0,01	0,57 ± 0,01	-	-	0,40 ± 0,10	0,38 ± 0,01
10	γ-terpineno	1063	1059	0,38 ± 0,01	-	0,64 ± 0,09	0,52 ± 0,01	0,43 ± 0,01	0,42 ± 0,01	0,70 ± 0,13	0,60 ± 0,01	-	-
11	linalol	1100	1096	1,08 ± 0,01	1,05 ± 0,06	1,19 ± 0,13	0,96 ± 0,02	1,55 ± 0,18	1,38 ± 0,08	1,42 ± 0,20	1,19 ± 0,07	1,03 ± 0,02	1,10 ± 0,08
12	exo-isocitral	1140	1144	2,06 ± 0,01	0,70 ± 0,01	1,66 ± 0,24	1,98 ± 0,02	1,64 ± 0,19	1,99 ± 0,11	1,58 ± 0,21	2,10 ± 0,33	0,32 ± 0,01	1,08 ± 0,19
13	δ-terpineol	1161	1166	2,44 ± 0,96	1,80 ± 0,11	1,98 ± 0,01	1,60 ± 0,15	1,49 ± 0,72	1,56 ± 0,18	1,66 ± 0,11	1,57 ± 0,18	2,85 ± 0,18	2,08 ± 0,58
14	ni	1178	-	3,14 ± 0,01	3,03 ± 0,21	0,44 ± 0,01	0,35 ± 0,01	2,40 ± 1,23	2,66 ± 0,43	2,63 ± 0,14	2,64 ± 0,31	5,05 ± 0,37	4,59 ± 0,69
15	α-terpineol	1186	1188	-	-	1,47 ± 0,11	1,10 ± 0,10	-	-	-	-	-	-
16	ni	1224	-	0,43 ± 0,01	-	2,78 ± 0,22	2,29 ± 0,38	0,39 ± 0,01	-	0,95 ± 0,05	0,91 ± 0,07	-	0,53 ± 0,14
17	neral	1237	1238	20,43 ± 1,92	19,98 ± 1,15	16,62 ± 0,75	15,34 ± 0,47	18,60 ± 1,63	17,20 ± 0,97	16,33 ± 0,09	16,02 ± 1,74	30,18 ± 0,82	30,54 ± 0,08
18	ni	1238	-	-	-	0,51 ± 0,01	-	0,67 ± 0,01	-	0,66 ± 0,01	-	2,29 ± 0,37	2,02 ± 0,21
19	geranial	1267	1267	28,06 ± 3,29	26,67 ± 1,51	21,94 ± 1,11	19,90 ± 0,77	25,18 ± 2,77	22,72 ± 1,68	21,80 ± 0,24	20,49 ± 2,13	42,03 ± 1,93	40,87 ± 0,38
20	ni	1251	-	2,05 ± 0,31	0,85 ± 0,01	0,77 ± 0,21	0,93 ± 0,16	1,47 ± 0,54	1,54 ± 0,01	0,70 ± 0,07	0,77 ± 0,11	0,81 ± 0,10	0,52 ± 0,01
21	ni	1342	-	-	2,45 ± 0,13	-	-	-	-	1,64 ± 0,01	-	-	-
22	trans-cariofileno	1414	1419	2,10 ± 0,39	2,17 ± 0,10	2,32 ± 0,65	2,63 ± 0,50	2,99 ± 0,41	2,47 ± 0,07	2,05 ± 0,41	1,65 ± 0,24	-	-
23	α-guaieno	1434	1439	2,57 ± 0,58	2,29 ± 0,13	1,84 ± 0,41	1,68 ± 0,28	2,81 ± 0,36	2,01 ± 0,08	2,01 ± 1,03	2,07 ± 0,30	-	-

Nº	Substância	IRL. cal	IRL.. lit	X6M6		X6M7		X6M33		X6M?C		<i>C. citratus</i>	
				1º corte	2º corte	1º corte	2º corte						
25	γ -muuroleno	1475	1478	0,88 \pm 0,33	1,47 \pm 0,02	1,21 \pm 0,50	1,79 \pm 0,46	2,18 \pm 0,24	1,72 \pm 0,09	0,96 \pm 0,29	1,35 \pm 0,22	-	-
26	α -bulneseno	1499	1509	1,67 \pm 0,48	1,58 \pm 0,10	1,17 \pm 0,16	1,18 \pm 0,17	1,31 \pm 0,78	1,13 \pm 0,46	1,14 \pm 0,30	1,25 \pm 0,24	-	-
27	ni	1508	-	0,65 \pm 0,26	-	0,54 \pm 0,01	0,43 \pm 0,01	2,25 \pm 0,31	1,43 \pm 0,01	0,62 \pm 0,01	-	-	-
28	óxido de cariofileno	1575	1583	1,25 \pm 0,43	-	1,25 \pm 0,19	0,46 \pm 0,01	0,79 \pm 0,24	0,48	1,11 \pm 0,24	0,57 \pm 0,16	0,95 \pm 0,22	-
	Hidrocarbonetos monoterpênicos			30,58 \pm 1,25	34,63 \pm 1,58	22,96 \pm 2,08	29,43 \pm 2,54	34,04 \pm 2,25	41,61 \pm 2,22	42,84 \pm 2,52	44,97 \pm 2,36	14,86 \pm 1,57	16,43 \pm 1,98
	Monoterpenos oxigenados			54,07 \pm 2,41	50,2 \pm 2,05	61,69 \pm 3,04	56,75 \pm 2,63	48,46 \pm 2,45	44,85 \pm 2,89	42,79 \pm 2,79	41,37 \pm 2,57	76,41 \pm 3,59	75,67 \pm 3,51
	Hidrocarbonetos Sesquiterpênicos			7,22 \pm 1,05	7,51 \pm 1,54	6,54 \pm 1,53	7,28 \pm 1,27	9,29 \pm 1,88	7,33 \pm 1,58	6,16 \pm 1,32	6,32 \pm 1,69	-	-
	Sesquiterpenos oxigenados			1,25 \pm 0,34	-	1,25 \pm 0,21	0,46 \pm 0,15	0,79 \pm 0,17	0,48 \pm 0,19	1,11 \pm 0,43	0,57 \pm 0,24	0,95 \pm 0,25	-
	Não identificadas			7,64 \pm 1,40	7,73 \pm 1,87	5,87 \pm 0,43	4,91 \pm 1,25	10,4 \pm 1,57	7,18 \pm 1,26	8,15 \pm 2,22	5,13 \pm 1,79	8,55 \pm 1,33	8,04 \pm 1,44

IRL. Cal: índice de retenção linear calculado. IRL. Lit: índice de retenção linear da literatura (Adams, 2017). ni: substância não identificada.

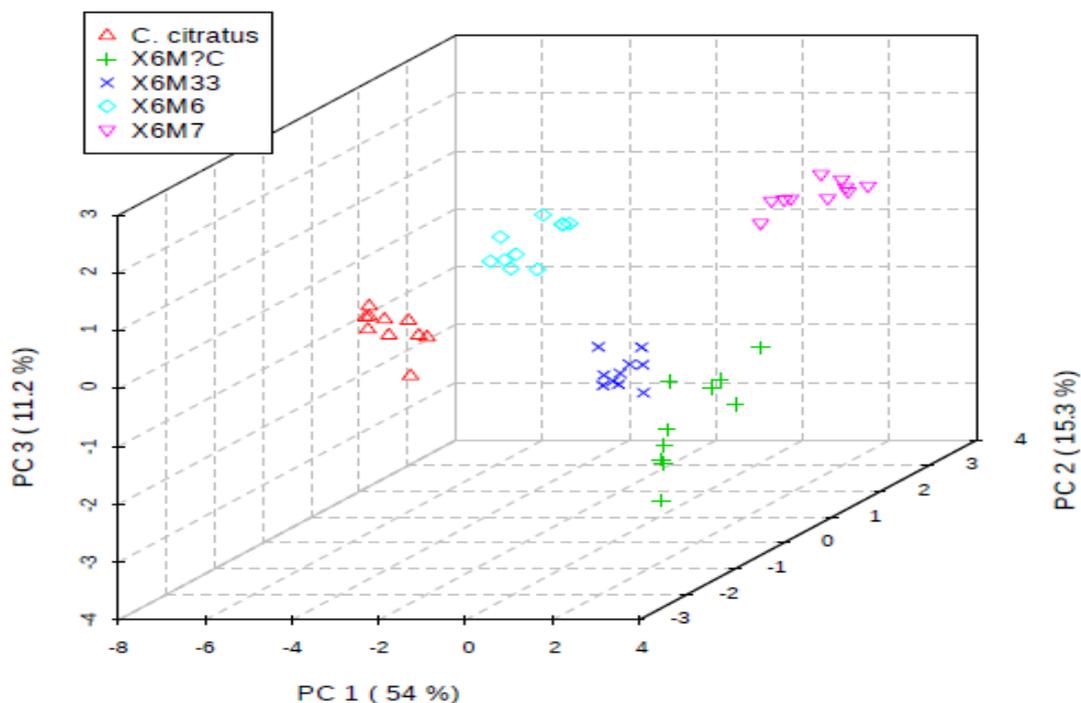
Todas as amostras, exceto as do clone X6M7, independente do corte, apresentaram o mesmo padrão químico quanto as substâncias majoritárias, com destaque para o mirceno, neral e geranial, cujos resultados estão de acordo com dados da literatura referentes à composição química da espécie *Lippia alba* (JANNUZZI et al. 2011; BLANK et al. 2015).

O clone X6M7, ao contrário dos demais, em ambas as colheitas realizadas, apresentou além do mirceno, geranial e neral, o eucaliptol entre as substâncias mais abundantes, com percentual médio acima de 15%. O perfil do óleo essencial, em relação a todas as substâncias, mostra-se mais complexo para os clones de *Lippia alba* em comparação com o *Cymbopogon citratus*. As substâncias encontradas nos clones somam 15 a mais que o *Cymbopogon citratus*, sendo que a principal diferença decorre da ausência da classe dos sesquiterpenos nas plantas de *Cymbopogon citratus*.

A compreensão das variações observadas entre as espécies é de fundamental importância, uma vez que apesar de serem utilizadas para mesma finalidade terapêutica, principalmente como calmante, apresentam alterações no conteúdo de óleo essencial. Essas variações podem refletir diretamente no potencial de ação, bem como nas características sensoriais do chá.

Devido à complexidade dos dados de composição química, em termos de variáveis, o emprego da análise de componentes principais reduziu a dimensionalidade dos dados e permitiu observar padrões entre as amostras analisadas. Na figura 3 é apresentado o gráfico de *score*, com três componentes principais, que juntas explicaram 80,5% da variação observada. Verifica-se que a magnitude do efeito do ambiente sobre a composição química entre cortes é mínima, uma vez que não foram formados grupos em função do corte realizado, para os genótipos avaliados.

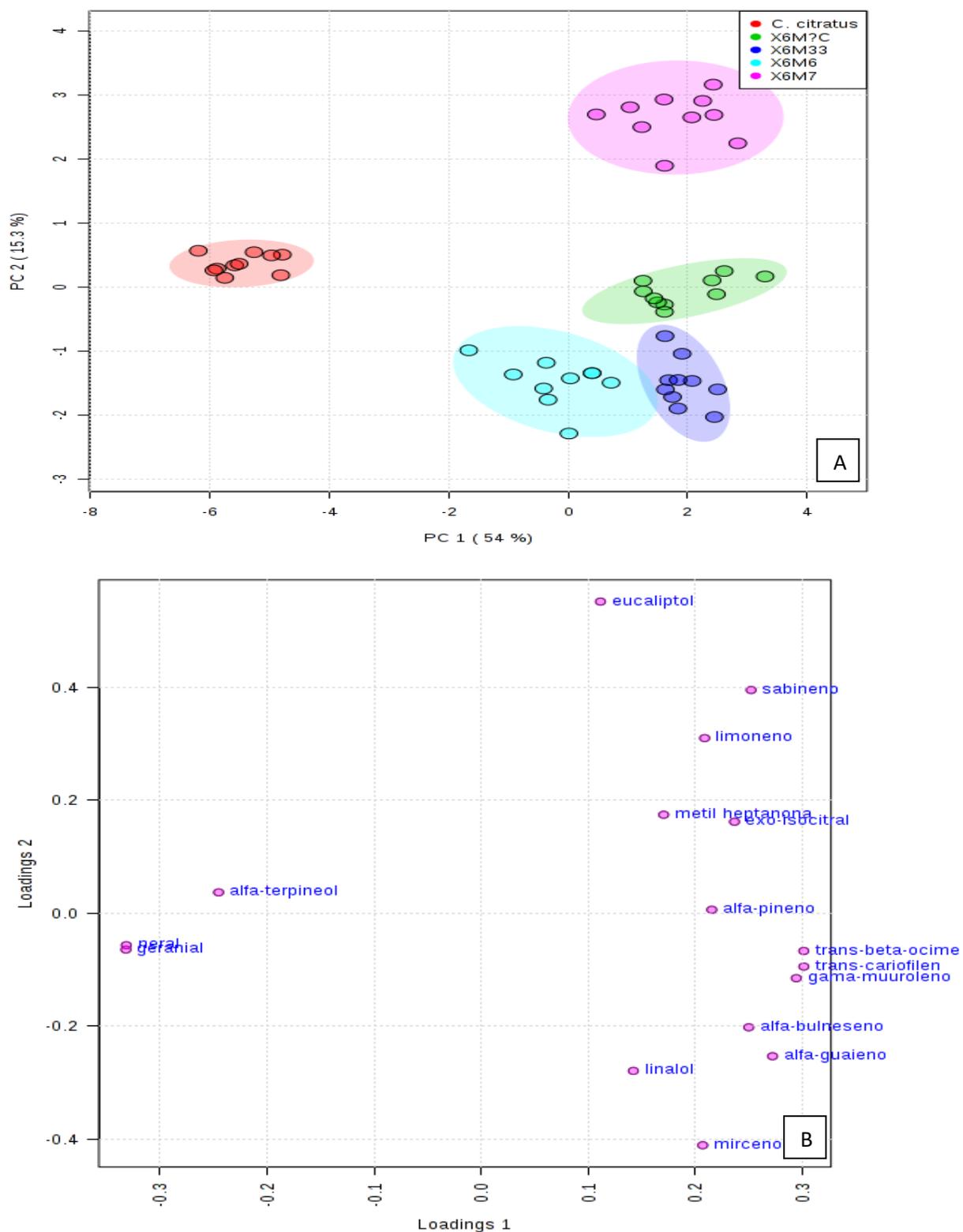
Figura 3 - Gráfico tridimensional (3D) da análise de componentes principais, em função da composição química do óleo essencial de clones de *Lippia alba* do quimiotipo citral e *C.citratus*, submetidos a dois cortes de produção



Fonte: Do autor (2019).

As componentes 1 e 2 (FIGURA 4), juntas englobaram 69,3% da variação observada, sendo possível distinguir três grupos. Do lado esquerdo da figura 2A é possível observar o agrupamento formado pelas amostras de *Cymbopogon citratus*, isoladas dos clones avaliados. Do lado superior direito o clone X6M7 distingue-se dos demais, enquanto os clones X6M33, X6M6 e X6M?C localizados na parte inferior direita apresentam expressão fenotípica próxima entre si. Os padrões observados estão relacionados à composição química do óleo essencial. Para o grupo representado pelo *Cymbopogon citratus*, as substâncias com maior contribuição foram neral, geranial e terpineol, enquanto o grupo referente ao clone X6M7 difere-se dos demais devido ao maior percentual de eucaliptol. O grupo formado pelos clones X6M33, X6M6 e X6M?C, apresentou como substâncias de maior contribuição os monoterpenos mircenol, limoneno e *trans*- β -ocimeno; e os sesquiterpenos *trans*-cariofileno, α -guaianeno, α -bulneseno e γ -muuroleno.

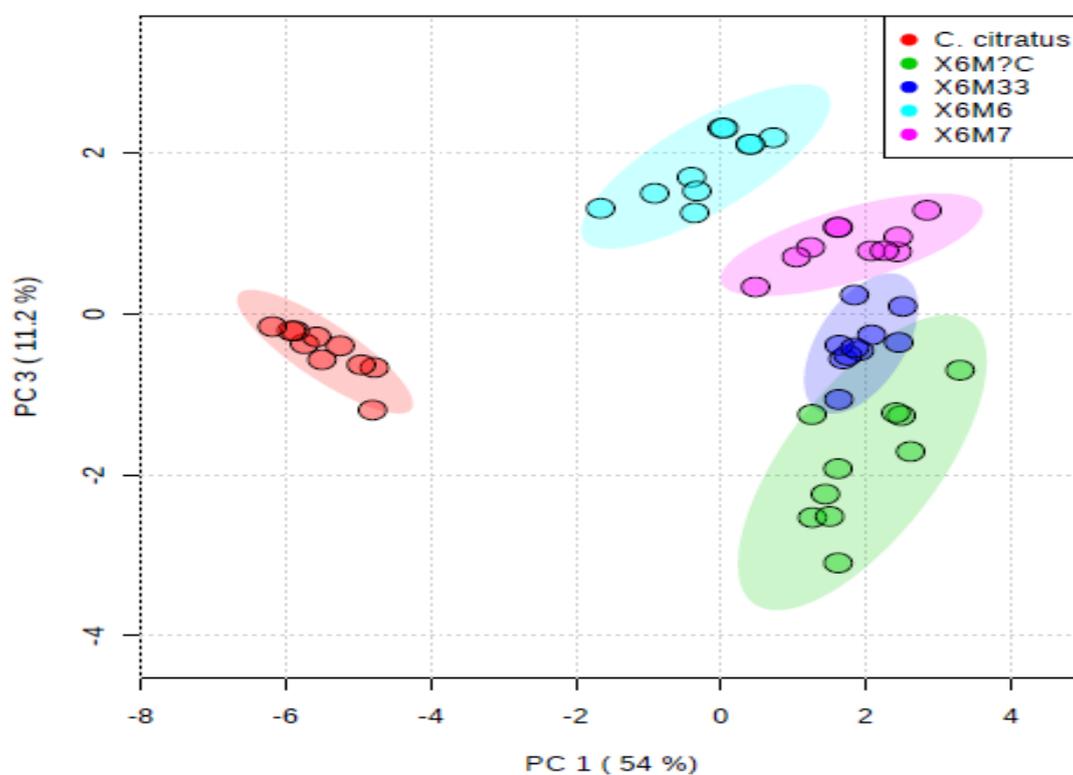
Figura 4 - Gráfico de score (A) e loadings (B) das componentes principais 1 e 2 em função da composição química do óleo essencial de clones de *Lippia alba* do quimiotipo citral e *C.citratus*, referentes a dois cortes de produção



Fonte: Do autor (2019).

Apesar das semelhanças entre os clones X6M33, X6M6 e X6M?C, a variação explicada pelas componentes principais 1 e 3 (FIGURA 5) permitiu separar o clone X6M6 dos demais.

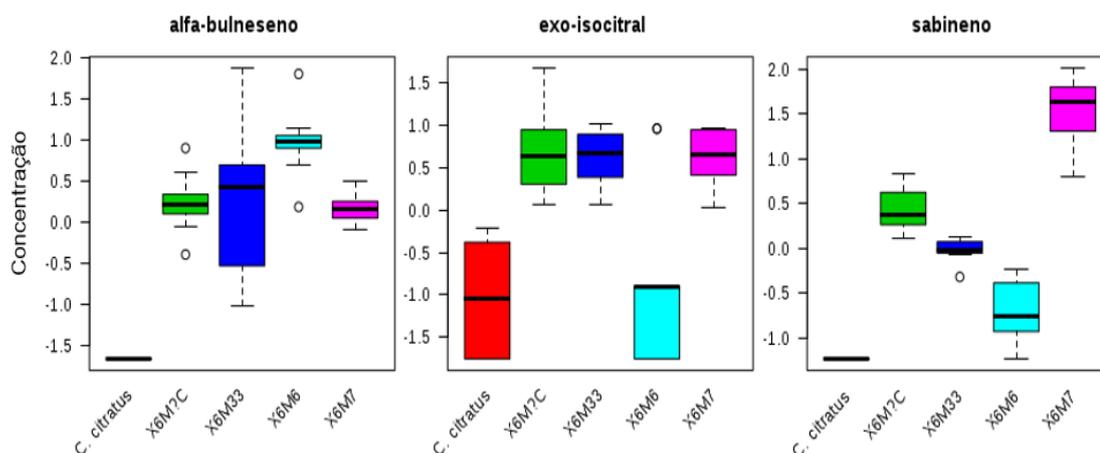
Figura 5 - Gráfico de score das componentes principais 1 e 3 em função da composição química do óleo essencial de clones de *Lippia alba* do quimiotipo citral e *C.citratus* referentes a dois cortes de produção



Fonte: Do autor (2019).

Esses dados estão de acordo com a figura 3, onde é possível verificar que as amostras do clone X6M6, embora apresentem semelhanças químicas com os clones X6M33 e X6M?C por estarem no mesmo sentido no plano longitudinal, distingue-se das mesmas em profundidade devido às substâncias α -bulneseno, *exo*-isocitral e sabineno, sendo essa variação determinante para distingui-lo em outro grupo. (FIGURA 6).

Figura 6 - Gráfico de loadings das substâncias α -bulneseno, exo-isocitral e sabineno de clones de *Lippia alba* do quimiotipo citral e *C.citratius*, referentes a dois cortes de produção

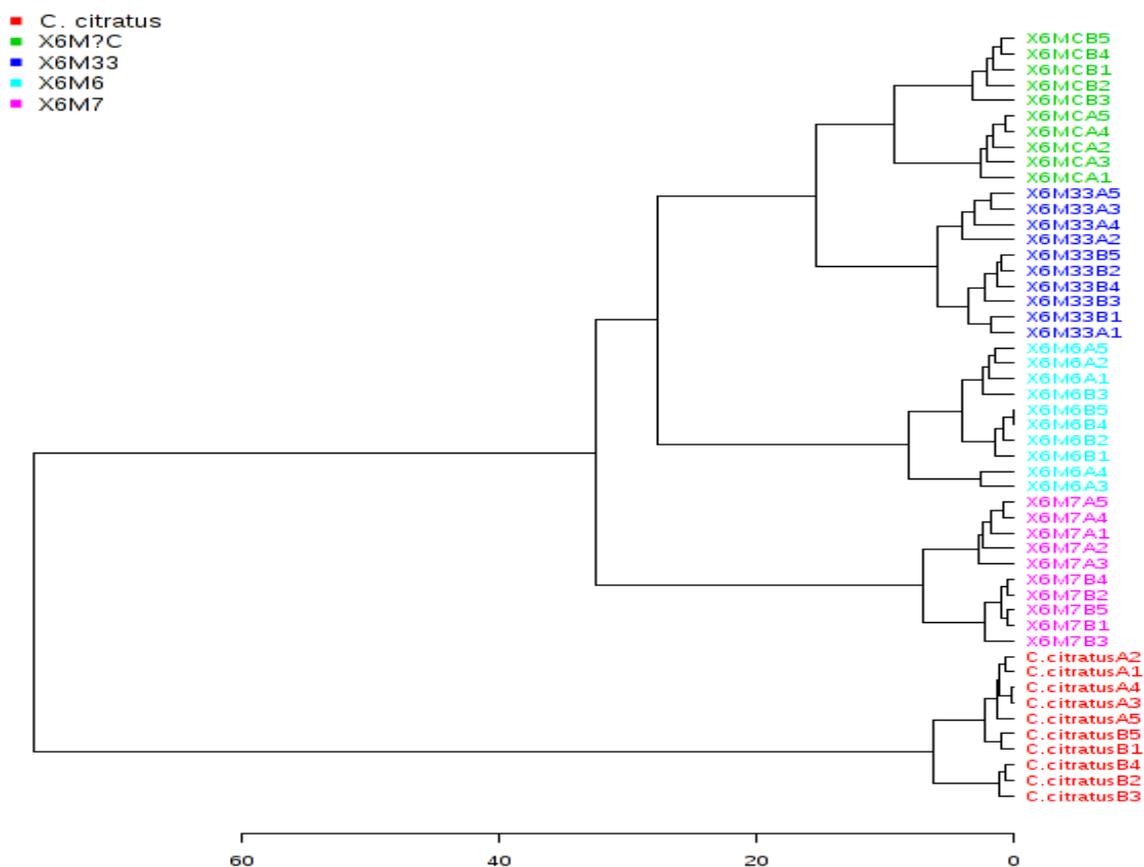


Fonte: Do autor (2019).

De forma geral, através da análise de componentes principais foram determinados quatro grupos de acordo com o perfil químico do óleo essencial, sendo eles: Grupo 1 (*Cymbopogon citratus*); Grupo 2 (clone X6M7); Grupo 3 (clone X6M6) e grupo 4 (clones X6M33 e X6M7C).

Os resultados obtidos pela ACP foram confirmados pela análise de agrupamentos hierárquicos, sendo formados os 4 grupos descritos anteriormente, com 25% de dissimilaridade (FIGURA 7). No entanto, diferente do observado na ACP, as amostras dentro de cada genótipo avaliado, exceto os clones X6M6 e X6M33 foram separadas de acordo com o corte realizado. Nesses casos, verifica-se influência do ambiente, mesmo que mínima associada a fatores climáticos, que foram as únicas fontes de variação entre colheitas.

Figura 7 - Análise de agrupamentos hierárquicos de acordo com a distância euclidiana de clones de *Lippia alba* do quimiotipo citral e *C. citratus* referentes a dois cortes de produção



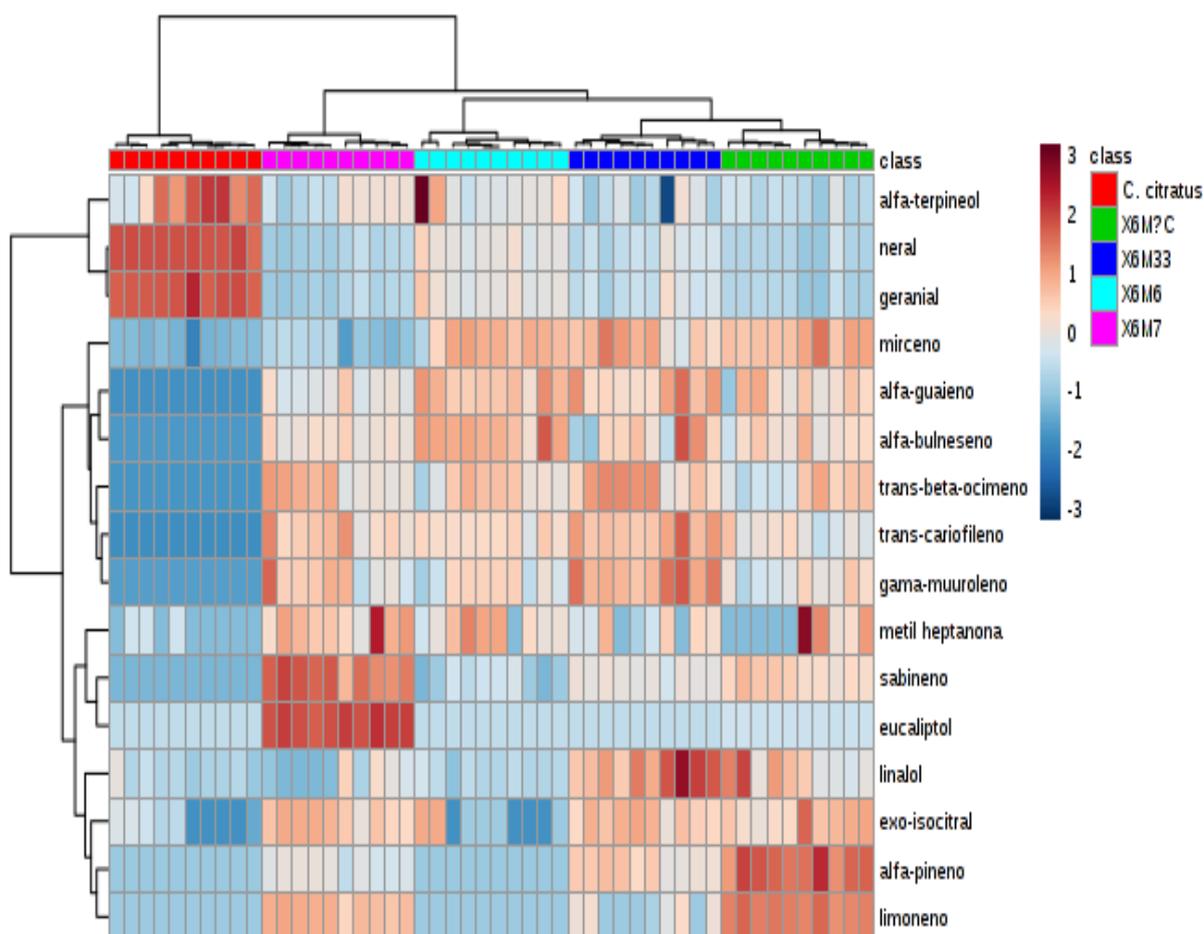
Fonte: Do autor (2019).

Nota: A=primeiro corte e B=segundo corte.

Através do mapa de calor (*heatmap*) apresentado na figura 8 é possível identificar claramente que as amostras de *Cymbopogon citratus*, em relação aos clones avaliados são menos complexas, formando um bloco distinto dos demais, em função principalmente da alta correlação com o citral (neral e geranial) e terpineol. O clone X6M7 constitui o segundo bloco, com regiões de coloração mais intensa, referente às substâncias eucaliptol, sabineno e metil-heptanona. O terceiro bloco representado pelo clone X6M6, apresenta certa similaridade com os demais clones, no entanto, difere-se em função de regiões de menor correlação, associadas as substâncias *exo*-isocitral, linalol, sabineno e β -pineno. Os clones X6M33 e X6M?C

juntos compõem o último bloco, devido à maior similaridade entre o perfil químico do óleo essencial.

Figura 8 - Mapa de calor (*heatmap*) com base na composição química do óleo essencial de clones de *Lippia alba* do quimiotipo citral e *C.citratius* referentes a dois cortes de produção



Fonte: Do autor (2019).

1.3.3 Análise sensorial

Por meio dos agrupamentos formados pelos avaliadores quanto à similaridade das amostras em relação ao aroma e sabor, gerou-se uma matriz de co-ocorrência (TABELA 6), onde é possível visualizar o percentual de vezes em que duas amostras foram enquadradas no mesmo grupo. Valores percentuais de 10 a 15%, de 16 a 25% e maiores que 25% representam baixa, média e alta co-ocorrência, respectivamente.

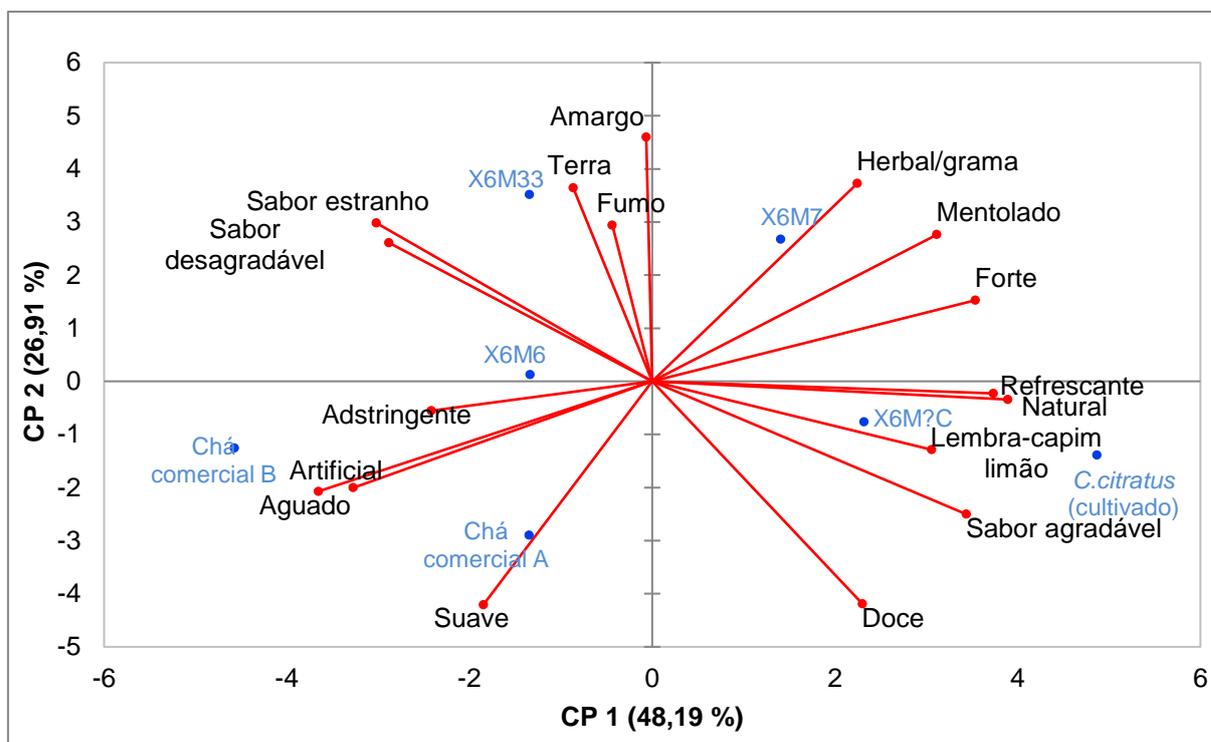
Tabela 6 - Matriz de co-ocorrência de amostras de chá de clones do quimiotipo citral de *Lippia alba* e amostras comerciais e cultivada de *C.citratu*s

	<i>C. citratu</i> s (cultivado)	X6M6	X6M7	X6M33	X6M?C	<i>C.citratu</i> s chá comercial B	<i>C.citratu</i> s chá comercial A
<i>C. citratu</i> s (cultivado)	100%	19%	22%	22%	33%	19%	6%
X6M6		100%	41%	37%	40%	29%	35%
X6M7			100%	43%	48%	17%	16%
X6M33				100%	40%	17%	22%
X6M?C					100%	22%	19%
<i>C.citratu</i> s (chá comercial B)						100%	46%
<i>C.citratu</i> s (chá comercial A)							100%

Os clones de *Lippia alba* apresentam alta co-ocorrência entre si (>25%), indicando similaridade quanto as características de aroma e sabor. Em relação à co-ocorrência observada entre as amostras de *C. citratu*s (cultivada e comerciais) e as dos clones, os maiores percentuais foram encontrados entre *C.citratu*s cultivada e o clone X6M?C e o chá comercial A com o clone X6M6. As amostras de *C.citratu*s comerciais apresentaram alta co-ocorrência (46%) entre si, no entanto quanto comparadas com a amostra cultivada, observa-se baixa (6%) e média (19%) co-ocorrência para *C. citratu*s A e B, respectivamente. As variações nesse caso, uma vez que se trata a mesma espécie podem ser relacionados ao processamento das amostras.

A compreensão e o estabelecimento de parâmetros químicos e sensoriais, para predição da qualidade do chá são fundamentais para avaliação do seu potencial de mercado bem com agregação de valor ao produtor. Dessa forma, a partir do questionário direcionado quanto às características de aroma e sabor dos chás avaliados, foi possível determinar através da análise de componentes principais (FIGURA 9), quais as características destacaram-se para cada amostra. Por meio de duas componentes principais foi possível explicar 75,10% da variação observada, sendo perceptível, que apesar das semelhanças observadas através da matriz de co-ocorrência, as amostras avaliadas apresentam características sensoriais distintas.

Figura 9 - Análise de componentes principais de acordo com o aroma e sabor de amostras de chá de clones de *Lippia alba* e amostras comerciais (A e B) e cultivada de *C.citratrus*



Fonte: Do autor (2019).

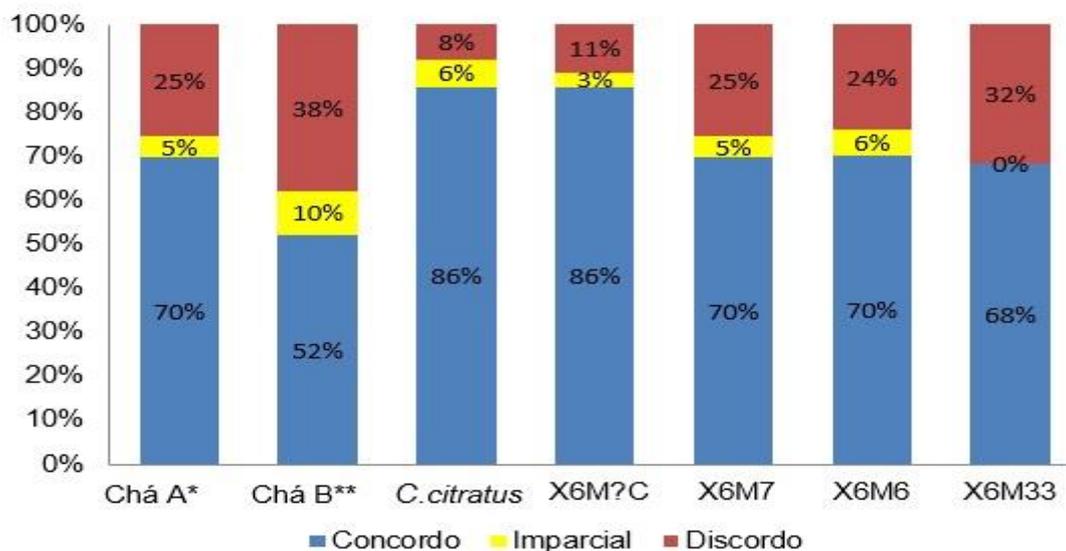
O chá comercial A se destacou em relação a característica de sabor suave, enquanto para o chá comercial B prevaleceu as características de sabor adstringente, artificial e aguado. Para o clone X6M33 as características que mais contribuíram para a variação observada foram sabor amargo, de terra e aroma de fumo. Já para o clone X6M7, que em termos de composição química do óleo essencial destaca-se dos demais devido ao alto percentual de eucaliptol, tem como características mais marcante o aroma herbal e sabor mentolado e forte.

O clone X6M?C e *C. citratrus* (cultivado) apresentaram maior proximidade em termos sensoriais, sendo descritos quanto ao sabor como agradáveis, naturais e refrescantes e quanto ao aroma como odor que lembra capim-limão, nome popular dado a espécie *Cymbopogon citratrus*.

Ainda não há padrão de qualidade do chá para *Lippia alba*, bem como, para espécie *C.citratrus* quanto ao sabor e aroma e tampouco existem resultados quanto a contribuição odorífera dos compostos voláteis presentes nas bebidas com seus

descritores. Tendo em vista o crescimento do mercado nacional e internacional, é importante para a indústria conhecer o que o consumidor reconhece como um produto de qualidade. Dessa forma, os avaliadores foram questionados se as amostras de chá degustadas se assemelham com as de chá de consumo (FIGURA 10).

Figura 10 – Percentual (%) referente ao posicionamento dos consumidores quanto ao questionamento: O aroma e sabor da amostra se assemelham aos dos chás de consumo?



Fonte: Do autor (2019).

Para todas amostras de chá, mais de 50% dos avaliadores consideraram o aroma e sabor como próximos aos dos chás de consumo, com destaque para o clone X6M?C e o *C.citratus* cultivado, ambas com percentuais de 86%. De forma geral, todos os clones de *L. alba* apresentaram percentuais próximos ou acima das amostras comerciais, sendo o menor percentual referente ao chá comercial B (52%). Esses resultados indicam potencial de aplicação comercial do chá da espécie *Lippia alba*, principalmente do clone X6M?C, dada suas características sensoriais descritas anteriormente e similaridade com chás comerciais de consumo.

1.4 CONCLUSÃO

Os clones de *Lippia alba* quimiotipo citral avaliados apresentam variações fenotípicas, tanto em relação à produtividade de biomassa, quanto à produtividade e composição química de óleo essencial. Os clones X6M33 e X6M7 se destacaram devido maior produção de biomassa, bem como produção de óleo essencial. Em relação ao perfil químico, os clones diferem entre si, bem como em relação ao *C.citratu*s, apesar de apresentarem o citral (mistura de neral e geranial) como principal constituinte químico, sendo entre os clones, o X6M7 o mais divergente.

Em termos sensoriais os chás apresentam variações quanto ao aroma e sabor. Foram observadas diferenças sensoriais entre os clones e destes com as amostras de *C.citratu*s comerciais e cultivada. De acordo com as características de aroma e sabor, os clones X6M?C e X6M7 apresentam potencial de aplicação na indústria alimentícia na forma de chá.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, Robert P. **Identification of essential oils by ion trap mass spectroscopy**. Academic press, 2017.
- ADDINSOFT, S. A. R. L. XLSTAT software, version 9.0. **Addinsoft, Paris, France**, 2010.
- ALCANTARA, M. De; FREITAS-SÁ, D. D. G. C. Metodologias sensoriais descritivas mais rápidas e versáteis, uma atualidade na ciência sensorial. **Brazilian Journal Food Technology**, v. 21, p. 1-12, 2018.
- BARRIENTOS, Juan Carlos et al. Potencial económico de cuatro especies aromáticas promisorias para producir aceites esenciales en Colombia. 2012.
- BLANK, Arie Fitzgerald et al. Chemical diversity in *Lippia alba* (Mill.) NE brown germplasm. **The Scientific World Journal**, 2015.
- Food Agriculture Organization (FAO), 2018. World **tea** production and trade. current and future development. Disponível em <www.fao.org/news/story/en/item/1136255/icode/> Acesso em 20 de setembro de 2018.
- GILBERT, Benjamin. **Monografias de plantas medicinais brasileiras e aclimadas**. Abifito, 2005.
- GOMES, Angélica Ferraz et al. Seasonal variation in the chemical composition of two chemotypes of *Lippia alba*. **Food chemistry**, v. 273, p. 186-193, 2019.
- JANNUZZI, H. et al. Avaliação agronômica e química de dezessete acessos de erva-cidreira [*Lippia alba* (Mill.) NE Brown]-quimiotipo citral, cultivados no Distrito Federal. **Revista brasileira de plantas medicinais**, v. 13, n. 3, p. 258-264, 2011.
- JANNUZZI, Hermes et al. Avaliação agronômica e identificação de quimiotipos de erva cidreira no Distrito Federal. **Horticultura Brasileira**, v. 28, n. 4, p. 412-417, 2010.
- LAWLESS, Harry T.; HEYMANN, Hildegard. **Sensory evaluation of food: principles and practices**. Springer Science & Business Media, 2010.
- MARENCO, Ricardo Antonio et al. Fisiologia de espécies florestais da Amazônia: fotossíntese, respiração e relações hídricas. **Ceres**, v. 61, n. 7, 2015.
- MONTOYA, José Omar Cardona; FLÓREZ, Jaime Eduardo Muñoz. Phytochemical variability between Colombian accessions of *Lippia alba* (Mill.) NE Brown. **Revista de Investigación Agraria y Ambiental**, v. 7, n. 2, 2016.

- NUNES, Michael Ramos et al. Antioxidant and antimicrobial methylcellulose films containing *Lippia alba* extract and silver nanoparticles. **Carbohydrate polymers**, v. 192, p. 37-43, 2018.
- OMBITO, Japheth Omollo et al. A review on the chemistry of some species of genus *Lippia* (Verbenaceae family). **J Sci Innov Res**, v. 3, n. 4, p. 460-466, 2014.
- REIS, Aryane C. et al. *Lippia alba* (Verbenaceae): A new tropical autoploid complex?. **American journal of botany**, v. 101, n. 6, p. 1002-1012, 2014.
- SALIMENA, Fátima Regina; MÚLGURA, Maria Ema. Notas taxonômicas em Verbenaceae J. St. Hil. do Brasil. **Rodriguésia-Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, v. 66, n. 1, p. 191-197, 2015.
- SANTOS, Maurício RA; INNECCO, Renato. Adubação orgânica e altura de corte da erva-cidreira brasileira. **Horticultura Brasileira**, v. 22, n. 2, p. 182-185, 2004.
- SCHOCKEN, NATALIE REGINA LEOZ. Obtenção de quimiotipos híbridos de *Lippia alba* (Mill) NE Brown. **Campinas, SP**, v. 82, 2007.
- SILVA, N. A. et al. Caracterização química do óleo essencial da erva cidreira (*Lippia alba* (Mill.) NE Br.) cultivada em Ilhéus na Bahia. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, n. 3, p. 52-55, 2006.
- STASHENKO, Elena E. et al. *Lippia origanoides* chemotype differentiation based on essential oil CG-MS and principal component analysis. **Journal of separation science**, v. 33, n. 1, p. 93-103, 2010.
- STONE, Herbert et al. Sensory evaluation by quantitative descriptive analysis. **Descriptive Sensory Analysis in Practice**, p. 23-34, 2004.
- TEIXEIRA DE OLIVEIRA, Graziela et al. Phytochemical characterisation and bioprospection for antibacterial and antioxidant activities of *Lippia alba* Brown ex Britton & Wilson (Verbenaceae). **Natural product research**, v. 32, n. 6, p. 723-731, 2018.
- TIMÓTEO, Patrícia et al. A validated HPLC method for the analysis of herbal teas from three chemotypes of Brazilian *Lippia alba*. **Food chemistry**, v. 175, p. 366-373, 2015.
- VAN DEN DOOL, H. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Jornal Chromatography. A**, v. 11, p. 463-471, 1963.
- XIA, Jianguo et al. MetaboAnalyst 3.0—making metabolomics more meaningful. **Nucleic acids research**, v. 43, n. W1, p. W251-W257, 2015.

CAPÍTULO 2

PERFIL QUÍMICO DO ÓLEO ESSENCIAL DE CLONES SELECIONADOS DE *Lippia alba* DO QUIMIOTIPO CITRAL POR CROMATOGRÁFIA GASOSA UNIDIMENSIONAL (CG) E BIDIMENSIONAL ABRANGENTE (CG×CG)

RESUMO

Lippia alba, da família Verbenaceae é uma espécie medicinal consagrada pelo seu uso popular na forma de chá, devido suas ações calmante e ansiolítica. Essas propriedades são comumente atribuídas ao óleo essencial presente em suas folhas, rico em citral (mistura de neral e geranial). Apesar das ações terapêuticas da espécie serem relacionadas às substâncias majoritárias, o potencial de ação, bem como às características sensoriais do chá decorrem do perfil químico do óleo essencial, representado pelo conjunto de metabólitos presentes no meio. Dessa forma, para a compreensão das propriedades observadas para a espécie, faz-se necessário o uso de técnicas com maior capacidade de separação e detecção das substâncias do óleo essencial. Nesse contexto, o objetivo do estudo foi avaliar a composição química do óleo essencial de clones de *Lippia alba* do quimiotipo citral por cromatografia gasosa unidimensional (CG) e bidimensional abrangente (CG×CG). Foram identificadas 47 substâncias por CG×CG e 26 por CG. Apesar de apresentarem o neral e geranial como substâncias majoritárias, os clones avaliados se diferem quanto ao perfil químico do óleo essencial, principalmente devido as substâncias presentes em menores percentuais. As informações obtidas via CG×CG forneceram maior capacidade de detecção dos metabólitos dos óleos essenciais dos clones em relação ao CG, constituindo uma importante ferramenta no estudo metabolômico dos constituintes voláteis da espécie.

Palavras-chave: Erva-cidreira. Perfil-químico. CG×CG.

ABSTRACT

Lippia alba, from the Verbenaceae is a medicinal species consecrated for its popular use in the form of tea, due to its soothing and anxiolytic actions. These properties are commonly attributed to the essential oil present in its leaves, rich in citral (mix of neral and geranial). Despite the fact that the therapeutic actions of the species are related to the major substances, the action potential, as well as the sensorial characteristics of the tea, derive from the chemical profile of the essential oil, represented by the set of metabolites present in the environment. Thus, for the understanding of the properties observed for the species, it is necessary to use techniques with greater capacity for separation and detection of essential oil substances. In this context, the objective of the study was to evaluate the chemical composition of the essential oil of clones of *Lippia alba* of the citral chemotype by one-dimensional gas chromatography (CG) and two-dimensional comprehensive gas Chromatography (CG×CG). 47 substances were identified by CG×CG e 26 by CG. Although the neral and geranial present as major substances, the clones evaluated differ in the chemical profile of the essential oil, mainly due to the substances present in smaller percentages. The information obtained through CG×CG provided a greater capacity of detection of the metabolites of the essential oils regarding the CG, constituting an important tool in the metabolomic study of the volatile constituents of the species.

Keywords: Erva-cidreira. Chemical profile. GC×GC

2.1 INTRODUÇÃO

A tendência dos consumidores por produtos de origem naturais em substituição aos sintéticos é uma realizada crescente (BÉNARD et al., 2018; DITLEVSEN; SANDOE; LASSEN, 2019). Dessa forma, a comunidade científica está cada vez mais organizada para desenvolver estudos com plantas com potencial de aplicação industrial. Nesse contexto o Brasil destaca-se devido sua biodiversidade representada pelos diferentes biomas e ecossistemas constituídos por espécies com potencial de geração de produtos para as indústrias farmacêutica, cosmética, de alimentos, de higiene e afins.

Entre as plantas nativas do Brasil, *Lippia alba* (Mill) N.E.Br. destaca-se pelo seu uso popular consolidado na forma de chá, devido suas propriedades calmantes e ansiolíticas decorrentes do citral (neral + geranial) presente no óleo essencial extraído de suas folhas (SOUZA, 2018; SOUSA et al., 2015). Apesar das ações terapêuticas da espécie serem relacionadas às substâncias majoritárias, as propriedades biológicas e o potencial de ação decorrem do perfil químico do óleo essencial, representado pelo conjunto de substâncias presentes no meio (RAUT; KARUPPAYIL, 2014; DONSI; FERRARI, 2016). Dessa forma, o emprego de técnicas com maior capacidade de detecção, auxiliam na exploração de possíveis relacionamentos sinérgicos entre componentes da matriz e sua bioatividade (KEPPLER, 2018; STRACZYNSKI; LIGOR, 2018).

A determinação de substâncias voláteis via de regra é realizada por cromatografia gasosa (CG). Apesar da eficiência da técnica, o estudo de matrizes complexas, tais como óleos essenciais, comumente é caracterizado pela coeluição de substâncias. Nesses casos, o uso da cromatografia gasosa bidimensional abrangente, tem-se destacado como solução, devido a utilização de sistemas ortogonais de separação (SANTOS et al., 2015; TRANCHIDA, 2016; TRANCHIDA; FRANCHINA; MONDELLO, 2017).

A principal diferença entre o sistema de cromatografia gasosa bidimensional abrangente (CG×CG) em relação unidimensional (CG) refere-se ao uso de uma segunda coluna, com propriedades distintas da primeira. Normalmente, observa-se o emprego de uma fase estacionária apolar, seguida de uma segunda fase polar, com comprimento menor em relação a primeira (MEINERT; MEIERHENRICH, 2012;

TRANCHIDA; FRANCHINA; MONDELLO, 2017). O mecanismo de separação na primeira coluna, devido ao gradiente de temperatura ocorre com base na volatilidade do analito. Enquanto ao longo da segunda, as substâncias são separadas de acordo com interações moleculares específicas entre o analito e a fase estacionária. A utilização de duas fases estacionárias não reflete em maior tempo de análise, sendo essa uma vantagem adicional do sistema bidimensional (STRACZYNSKI; LIGOR, 2018).

A aplicação da cromatografia gasosa bidimensional abrangente em análises de produtos de origem vegetal, tem apresentado avanços significativos em termos de resolução de picos. Esta técnica possui capacidade de detecção duas vezes maior do que aquela observada via cromatografia gasosa unidimensional (WONG; PERLMUTTER; MARRIOTT, 2017). Dado ao enfoque cada vez maior aos estudos metabolômicos, a separação aprimorada do sistema CG×CG torna-se uma excelente abordagem para o estudo de matrizes complexas, com propriedades de interesse, tal como os óleos essenciais presentes em plantas medicinais e aromáticas (KEPPLER, 2018; WONG; PERLMUTTER; MARRIOTT, 2017).

O entendimento aprofundado da composição química do óleo essencial de *Lippia alba*, bem como das características sensoriais do chá, reflete diretamente na indicação de uso da espécie e no seu potencial de aplicação em setores indústrias. No entanto, a ausência de informações fitoquímicas associadas a variabilidade genética da espécie refletem na falta de investimentos para o desenvolvimento de novos produtos. Dessa forma, espécies exóticas já domesticadas utilizadas para a mesma finalidade terapêutica, em função do citral presente no óleo essencial, se mostram mais abrangentes quanto ao uso e comercialização, tal como *Cymbopogon citratus* (dc) Stapf.

Diante do contexto apresentado e ao potencial uso econômico de *Lippia alba*, o objetivo do estudo consistiu em caracterizar a composição química do óleo essencial de clones de *Lippia alba* do quimiotipo citral por cromatografia gasosa unidimensional (CG) e bidimensional abrangente (CG×CG).

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliados quatro clones do quimiotipo citral de *Lippia alba* pertencentes ao banco de germoplasma do Instituto Agrônomo IAC, situado em Campinas, obtidos por meio de cruzamentos e com potencial para inserção na indústria de chá, sendo eles: X6M6; X6M7; X6M33 e X6M?C. Como tratamento adicional empregou-se a espécie *Cymbopogon citratus* (dc) Stapf. adicionada ao experimento para comparação com os clones, por se tratar de uma espécie consolidada no mercado de chá, com características terapêuticas similares à *Lippia alba* em decorrência da presença do citral no seu óleo essencial.

Estacas dos clones de *Lippia alba* foram cultivadas em campo em delineamento blocos casualizados, sendo avaliado a rebrota após 93 dias do primeiro corte. A análise da composição química dos óleos essenciais pela técnica unidimensional (CG) foi realizada no Centro de Pesquisa de Recursos Genéticos Vegetais do Instituto Agrônomo (IAC) e a bidimensional (CG×CG) conduzida no Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas (IQ-Unicamp) sob a supervisão do pesquisador Dr. Leandro Wang Hantao.

2.2.1 Extração do óleo essencial

A extração do óleo essencial foi realizada por hidrodestilação em aparato Clevenger a partir de 50 g de folhas secas (40° C) por 1 h e 30 min. Os óleos essenciais foram separados da fase aquosa e acondicionados em frascos de 5 mL, mantidos ao abrigo da luz sob refrigeração a 4°C.

2.2.2 Análise por CG-EM

A análise qualitativa da composição química do óleo essencial foi realizada em cromatografo a gás acoplado ao espectrômetro de massas (CG-EM, QP 5000 – Shimadzu) dotado de coluna capilar OV-5 MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) e hélio (99,9999% de pureza) como gás de arraste (vazão: 1 mL.min⁻¹). O sistema foi operado

no modo *full scan*, com impacto de elétrons (70 eV), e faixa de 40 a 450 m/z. O injetor foi mantido a 220 °C, com divisão de vazão do gás de arraste (*split*) na razão de 1:20, seguindo a programação da temperatura de 60°C - 240°C (3 °C.min⁻¹). A temperatura da interface foi mantida em 240°C. As amostras de óleo essencial foram diluídas em acetato de etila (grau cromatográfico, 1mg.mL⁻¹) e injetado 1 µL de solução. Os dados foram analisados através do software CLASS 5000, juntamente com a biblioteca *National Institute of Standards and Technology* (Nist). O índice de retenção (IR) relativo de cada composto foi calculado segundo Van Den Dool and Kratz (1963), e comparado com informações da literatura (ADAMS, 2017).

2.2.3 Análise por CG-DIC

A análise quantitativa dos óleos essenciais foi conduzida em cromatografo a gás com detector de ionização de chama (CG-DIC, Shimadzu, CG-2010/AOC-20i), dotado de coluna capilar de sílica fundida OV - 5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm, *Ohio Valley Specialty Chemical* hélio como gás de arraste vazão de 1,0 mL min⁻¹), injetor a 280°C, detector a 300°C, split 1:20 e o mesmo programa de temperatura do sistema CG-EM. A abundância relativa (%) das substâncias foi obtida a partir da área de pico do cromatograma (CG) e organizada de acordo com a ordem de eluição.

2.2.4 Análise por CG×CG –EM

A análise bidimensional da composição química dos óleos essenciais foi realizada em cromatografo a gás Thermo (CG TRACE 1310) equipado com detector de ionização em chamas (DIC) e um espectrômetro de massas (EM) quadrupolo ISQ (QMS - *Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA*), com divisão da amostra na razão de 2:8 para os detectores EM e DIC, respectivamente. O conjunto de colunas utilizadas consistiu em uma coluna primaria de 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm (HP 5 MS) e uma coluna secundaria de 5 m x 0,25 mm x 0,25 µm (HP 50 *Wall coated tubular (Wcot)*). O hélio foi utilizado como gás de arraste com vazão 1 mL.min⁻¹. A modulação foi realizada por meio de modulador INSIGHT (*SepSolve Analytical - Frankfurt, Alemanha*), com períodos de modulação de 5s. As amostras foram injetadas modo

split (1/20) e a análise conduzida com a mesma programação de temperatura do sistema unidimensional.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise unidimensional dos óleos essenciais de clones de *Lippia alba* revelou através do cromatograma de íons totais regiões de baixa resolução, caracterizadas pela sobreposição de picos. Nessas regiões, o emprego da cromatografia unidimensional não permitiu a separação e identificação da grande quantidade de substâncias presentes no óleo essencial. Diante disso, e visando maior resolução do sistema, as análises foram conduzidas em sistema bidimensional, que resultou em maior capacidade de detecção e identificação de metabólitos.

No apêndice A são apresentados os cromatogramas de ambas as análises, onde é possível observar a diferença no número de substâncias detectadas. A análise por CG-EM dos óleos essenciais de clones de *Lippia alba* resultou na identificação de 26 substâncias e no CGxCG-EM de 47. Em termos de detecção, esse número é maior com 58 detectados via CGxCG-EM contra 30 do CG.

A tabela 1 contém os dados referentes à composição química e o índice de retenção calculado (IRL cal.) e de literatura (IRL lit.) para cada substância. Uma boa relação entre os índices foi obtida tanto para o sistema CG-EM ($r^2 = 0,98^{**}$), quanto para o sistema CGxCG-EM ($r^2 = 0,97^{**}$), aumentando a confiabilidade na identificação das substâncias.

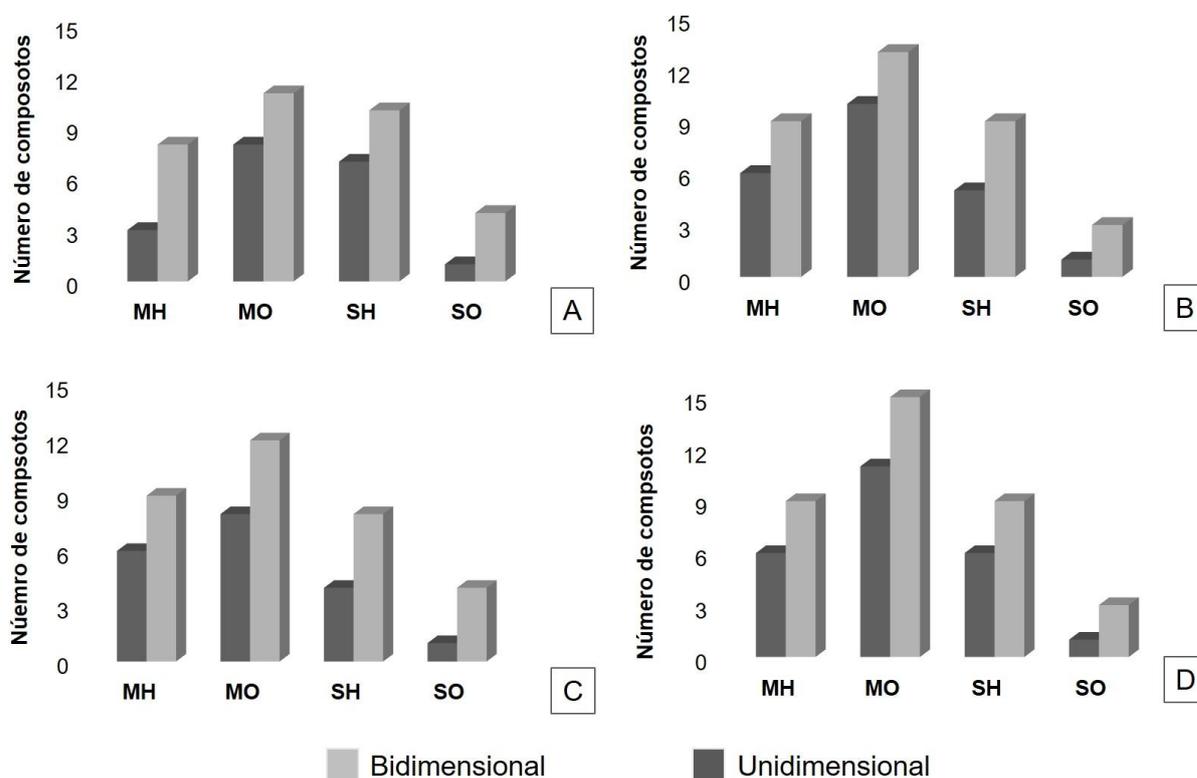
Substâncias	IRL.cal. (CG)	IRL.cal. (CGxCG)	IRL. lit.	Clones								
				<u>X6M6</u>		<u>X6M7</u>		<u>X6M33</u>		<u>X6M?C</u>		
				CG	CGxCG	CG	CGxCG	CG	CGxCG	CG	CGxCG	
20 citronelal	-	1157	1153	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21 <i>cis</i> -crisantenol	-	1168	1164	-	-	-	-	-	-	-	-	0,16 ± 0,10
22 δ-terpineol	1162	1172	1166	1,80 ± 0,11	1,24 ± 0,15	1,60 ± 0,15	0,20 ± 0,08	1,56 ± 0,18	0,84 ± 0,24	1,57 ± 0,18	0,14 ± 0,05	
23 epóxido de rosefuran	-	-	1177	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24 <i>trans</i> -isocitral	1178	1186	1180	3,03 ± 0,21	2,41 ± 0,37	0,35 ± 0,01	0,18 ± 0,10	2,66 ± 0,043	0,89 ± 0,37	2,64 ± 0,31	1,89 ± 0,21	
25 α-terpineol	1185	1190	1188	-	0,14 ± 0,04	1,10 ± 0,10	1,54 ± 0,18	1,81	0,38 ± 0,12	-	0,62 ± 0,19	
26 mirtenol	1191	1198	1195	-	-	-	0,22 ± 0,12	-	-	-	0,35 ± 0,11	
27 nerol	-	1233	1229	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28 neral	1236	1248	1238	19,98 ± 1,15	21,01 ± 0,89	15,34 ± 0,47	15,93 ± 1,03	17,20 ± 0,97	19,99 ± 0,98	16,02 ± 1,74	19,08 ± 1,71	
29 geraniol	-	1250	1252	-	0,73 ± 0,15	0,93 ± 0,16	0,47 ± 0,17	-	0,10 ± 0,01	-	0,65 ± 0,23	
30 geranial	1265	1279	1267	26,67 ± 1,51	27,51 ± 1,17	19,90 ± 0,77	19,97 ± 0,89	22,72 ± 1,68	27,28 ± 1,28	20,49 ± 2,13	26,43 ± 1,18	
Hidrocarbonetos sesquiterpênicos				6,72 ± 1,27	11,44 ± 2,14	7,28 ± 1,17	8,15 ± 1,02	7,33 ± 1,45	11,25 ± 1,74	6,32 ± 0,58	7,46 ± 1,84	
31 β-elemeno	-	1391	1390	0,85 ± 0,01	0,17 ± 0,08	-	0,21 ± 0,11	-	0,19 ± 0,05	-	0,41 ± 0,15	
32 sesquitujeno	-	1402	1405	2,45 ± 0,13	0,89 ± 0,24	-	0,39 ± 0,14	-	0,07 ± 0,08	0,77 ± 0,11	0,15 ± 0,01	
33 <i>trans</i> -cariofileno	1265	1424	1419	2,17 ± 0,10	2,25 ± 0,38	2,63 ± 0,50	2,36 ± 0,65	2,47 ± 0,07	3,16 ± 0,21	1,65 ± 0,24	1,45 ± 0,20	
34 α-guaieno	1433	1437	1439	2,29 ± 0,13	3,00 ± 0,58	1,68 ± 0,28	1,83 ± 0,15	2,01 ± 0,08	2,93 ± 0,24	2,07 ± 0,30	2,37 ± 0,52	
35 <i>cis</i> -β-farneseno	-	1457	1442	-	0,45 ± 0,12	-	0,12 ± 0,01	-	-	-	0,10 ± 0,01	
36 α-humuleno	1447	1461	1454	1,38	0,92 ± 0,26	0,71	0,58 ± 0,12	-	1,17 ± 0,21	0,78	0,65 ± 0,25	
37 dehidro-aromadendrano	-	1465	1462	-	0,33 ± 0,16	-	-	-	0,17 ± 0,01	-	-	
38 γ-muuroleno	1475	1486	1479	1,47 ± 0,02	1,08 ± 0,27	1,79 ± 0,46	1,26 ± 0,27	1,72 ± 0,09	1,65 ± 0,21	1,35 ± 0,22	0,53 ± 0,14	
39 γ-curcumeno	-	1498	1482	-	-	-	-	-	0,27 ± 0,12	-	-	
40 <i>cis</i> -β->guaieno	-	1506	1502	-	0,34 ± 0,09	-	0,10 ± 0,01	-	-	-	1,21 ± 0,19	
41 <i>trans</i> -α-farneseno	-	1508	1505	-	0,16 ± 0,04	-	-	-	-	-	0,19 ± 0,10	
42 β-bisaboleno	-	1512	1505	-	-	-	-	-	-	-	0,30 ± 0,08	
43 α-bulneseno	1499	1514	1509	1,58 ± 0,12	2,18 ± 0,34	1,18 ± 0,17	1,30 ± 0,37	1,13 ± 0,46	1,81 ± 0,35	1,25 ± 0,24	0,10 ± 0,01	

Substâncias	IRL.cal. (CG)	IRL.cal. (CG×CG)	IRL. lit.	Clones								
				<u>X6M6</u>		<u>X6M7</u>		<u>X6M33</u>		<u>X6M?C</u>		
				CG	CG×CG	CG	CG×CG	CG	CG×CG	CG	CG×CG	
Sesquiterpenos oxigenados				1,23 ± 0,18	1,49 ± 0,15	0,46 ± 0,20	0,98 ± 0,31	0,48 ± 0,17	1,66 ± 0,47	0,57 ± 0,15	2,28 ± 0,84	
44	óxido de carofileno	1575	1592	1583	1,23	0,83 ± 0,11	0,46 ± 0,01	0,78 ± 0,15	0,48 ± 0,20	1,05 ± 0,21	0,57 ± 0,16	1,41 ± 0,44
45	epóxido de humuleno	-	1619	1608	-	0,14 ± 0,01	-	0,20 ± 0,07	-	0,21 ± 0,10	-	0,26 ± 0,01
II	46 β-atlantol	-	1626	1608	-	0,19 ± 0,08	-	-	-	0,23 ± 0,11	-	0,61 ± 0,21
Não identificadas				2,05 ± 0,23	1,01 ± 0,20	4,91 ± 1,18	3,24 ± 0,19	7,18 ± 1,09	3,2 ± 0,32	5,13 ± 1,28	1,34 ± 0,37	
47	ni	-	1005	-	-	0,10 ± 0,01	-	-	-	-	-	-
48	ni	1052	1059	-	-	-	-	2,05 ± 0,01	1,87 ± 0,28	-	-	-
49	ni	-	1086	-	-	0,06 ± 0,01	-	-	-	-	-	-
50	ni	-	1135	-	-	-	-	-	-	-	-	0,16 ± 0,05
51	ni	1224	1236	-	-	-	2,29 ± 0,38	1,94 ± 0,19	-	-	0,91 ± 0,07	0,10 ± 0,01
52	ni	1251	-	-	2,05 ± 0,31	1,74 ± 0,21	0,93 ± 0,16	0,41 ± 0,14	1,54 ± 0,01	0,98 ± 0,12	0,77 ± 0,11	0,55 ± 0,14
53	ni	-	1352	-	-	-	-	0,19 ± 0,10	-	-	-	-
54	ni	-	1535	-	-	-	-	0,56 ± 0,21	-	0,09 ± 0,01	-	-
55	ni	-	1580	-	-	0,56 ± 0,17	-	0,14 ± 0,02	-	0,20 ± 0,04	-	0,38 ± 0,01
56	ni	-	1597	-	-	0,10 ± 0,01	-	-	-	-	-	-
57	ni	-	1600	-	-	-	-	-	-	-	-	0,03 ± 0,01
58	ni	-	1668	-	-	0,19 ± 0,03	-	-	-	0,06 ± 0,02	-	0,28 ± 0,10

IRL. Cal: índice de retenção linear calculado. IRL. lit.: índice de retenção linear da literatura (ADAMS, 2017). ni: substância não identificada.

As principais classes de substâncias presentes nas amostras foram hidrocarbonetos monoterpênicos, monoterpênos oxigenados, hidrocarbonetos sesquiterpênicos e sesquiterpenos oxigenados. Na figura 1 é possível observar as diferenças em relação ao número de substâncias identificadas entre os sistemas de separação, quanto as classes de metabólitos especializados. Para todas as classes, a técnica de CG×CG correspondeu a maiores ganhos de separação e identificação

Figura 1 - Classes de substâncias identificadas nos óleos essenciais de clones de *Lippia alba*



Fonte: Do autor (2019).

Legenda: A: Clone X6M6, B: cloneX6M7, C: clone X6M33, D: clone X6M?C, MH: hidrocarbonetos monoterpênicos, MO: monoterpênos oxigenados, SH: hidrocarbonetos sesquiterpênicos, SO: sesquiterpenos oxigenados.

No óleo essencial do clone X6M6 foi identificado maior número de hidrocarbonetos monoterpênicos no CG×CG (sete substâncias) em relação ao CG (quatro substâncias). Para clone X6M7, a maior diferença foi encontrada para os hidrocarbonetos sesquiterpênicos, com quatro substâncias a mais observadas em relação ao CG-EM.

O clone X6M33 apresentou quatro substâncias a mais para as classes dos monoterpenos oxigenados e hidrocarbonetos sesquiterpênicos em relação ao CG. Para o clone X6M7C, a principal diferença foi observada na classe dos monoterpenos oxigenados, sendo 4 compostos a mais detectados no CG×CG .

Todos os clones, exceto o X6M7, apresentaram como substâncias mais abundantes, por ambas técnicas de análise empregados, o mirceno, neral e geranial. O clone X6M7, diferente dos demais, além das substâncias citadas apresenta entre as majoritárias o eucaliptol, com percentual acima de 15%.

Em termos gerais, os resultados encontrados demonstram claramente que a complexidade dos óleos essenciais dos clones de *Lippia alba* é muito maior do que aquela obtida pela análise por cromatografia gasosa unidimensional. Apesar de alguns picos se mostrarem aparentemente bem resolvidos, estes apresentaram coeluição. Como exemplo, no presente estudo a substância *trans*-verbenol, apresenta o mesmo tempo de retenção e conseqüentemente índice de retenção que o *exo*-isocitral (15,25 min). Entretanto, na análise unidimensional foi detectado apenas o *exo*-isocitral, sendo o *trans*-verbenol observado apenas no sistema bidimensional. Dessa forma, foi possível a separação dessas substâncias, com maior período de retenção na segunda coluna do *trans*-verbenol (2,76 s) em comparação com o *exo*-isocitral (2,98 s)

Apesar das semelhanças, os perfis químicos dos óleos essenciais dos clones avaliados mostram-se diferentes, principalmente em relação aos compostos presentes em menores proporções relativas, em sua maioria detectados apenas no CG×CG– EM. Este fato consiste em mais uma vantagem adicional do sistema CG×CG – EM, em relação ao convencional. Para Wong, Perlmutter e Marriott (2017), este caso decorre da maior relação sinal/ruído (s/n) dos sistemas bidimensionais, com melhor sensibilidade na separação de picos, sendo esta uma preocupação universal, de quase todas as plataformas que fazem uso do detector EM.

Associado a capacidade de separação de picos, a descrição minuciosa do perfil químico de óleos essenciais, por meio da identificação das substâncias presentes nas amostras é outro fator importante a ser considerado nas análises instrumentais. Esse processo é de extrema importância para o entendimento das propriedades biológicas atribuídas a diferentes espécies medicinais, devido ao sinergismo entre os constituintes químicos presentes no meio, que alteram suas propriedades biológicas.

2.4 CONCLUSÃO

Os clones de *Lippia alba* se diferem quanto ao perfil químico dos óleos essenciais, em especial em relação às substâncias presentes em menores abundâncias relativas. A técnica bidimensional abrangente (CG×CG) em comparação ao unidimensional (CG) apresentou maior capacidade de separação e detecção dos metabólitos dos óleos essenciais, sendo uma importante ferramenta metabolômica para a avaliação dos constituintes voláteis do metabolismo especializado da espécie.

REFERÊNCIAS

ADAMS, Robert P. **Identification of essential oils by ion trap mass spectroscopy**. Academic press, 2017.

BÉNARD, Marc et al. Association between time perspective and organic food consumption in a large sample of adults. **Nutrition journal**, v. 17, n. 1, p. 1, 2018.

DITLEVSEN, Kia; SANOE, Peter; LASSEN, Jesper. Healthy food is nutritious, but organic food is healthy because it is pure: The negotiation of healthy food choices by Danish consumers of organic food. **Food Quality and Preference**, v. 71, p. 46-53, 2019.

DONSI, Francesco; FERRARI, Giovanna. Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food. **Journal of biotechnology**, v. 233, p. 106-120, 2016.

ACREE, T.; ARN, Heinrich. Flavornet. **DATU, Inc., Geneva, NY. Disponível em :[http://www. flavornet. Org](http://www.flavornet.Org)**. Acesso em 02 de janeiro de 2018.

KEPPLER, Emily A. Higgins et al. Advances in the application of comprehensive two-dimensional gas chromatography in metabolomics. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, 2018.

MEINERT, Cornelia; MEIERHENRICH, Uwe J. A New Dimension in Separation Science: Comprehensive two-dimensional gas chromatography. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 51, n. 42, p. 10460-10470, 2012.

RAUT, Jayant Shankar; KARUPPAYIL, Sankunny Mohan. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 250-264, 2014.

SANTOS, Anaí L. et al. Comprehensive two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometry (CG× CG/TOFMS) for the analysis of volatile compounds in *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. essential oils. **Microchemical Journal**, v. 118, p. 242-251, 2015.

SANTOS, Thalita G. et al. Characterization of the essential oils of two species of Piperaceae by one-and two-dimensional chromatographic techniques with quadrupole mass spectrometric detection. **Microchemical Journal**, v. 115, p. 113-120, 2014.

SOUSA, D. G. et al. Essential oil of *Lippia alba* and its main constituent citral block the excitability of rat sciatic nerves. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, n. 8, p. 697-702, 2015.

SOUZA, Carine F. Souza et al. Citral and linalool chemotypes of *Lippia alba* essential oil as anesthetics for fish: a detailed physiological analysis of side effects during anesthetic recovery in silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Fish physiology and biochemistry**, v. 44, n. 1, p. 21-34, 2018.

STRACZYNSKI, Grzegorz; LIGOR, Tomasz. Comprehensive Gas Chromatography: Food and Metabolomics Applications. **Critical reviews in analytical chemistry**, v. 48, n. 3, p. 176-185, 2018.

TRANCHIDA, Peter Q. et al. Comprehensive two-dimensional gas chromatography-mass spectrometry: recent evolution and current trends. **Mass spectrometry reviews**, v. 35, n. 4, p. 524-534, 2016.

TRANCHIDA, Peter Q.; FRANCHINA, Flavio A.; MONDELLO, Luigi. Analysis of essential oils through comprehensive two-dimensional gas chromatography: General utility. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 32, n. 4, p. 218-227, 2017.

VAN DEN DOOL, H. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **J. Chromatogr. A**, v. 11, p. 463-471, 1963.

WONG, Yong Foo; PERLMUTTER, Patrick; MARRIOTT, Philip J. Untargeted metabolic profiling of Eucalyptus spp. leaf oils using comprehensive two-dimensional gas chromatography with high resolution mass spectrometry: Expanding the metabolic coverage. **Metabolomics**, v. 13, n. 5, p. 46, 2017.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados encontrados nesse trabalho evidenciaram que apesar dos clones avaliados possuírem os mesmos compostos majoritários (neral e geranial), se diferem quanto a produtividade de biomassa e óleo essencial, bem como em relação ao perfil químico do óleo essencial. As variações observadas estão relacionadas a fatores genéticos, uma vez que todos os clones foram cultivados sob as mesmas condições ambientais.

Os clones de *Lippia alba* e a espécie *C.citratus* apresentam variações entre si quanto a composição química do óleo essencial, apesar de todos apresentarem o citral (neral e geranial) como composto majoritário, sendo entre os clones o X6M7 o mais divergente. Dessa forma, diferentes potenciais de ação podem ser encontrados de acordo com a espécie, bem como dos genótipos de *Lippia alba*.

Os clones X6M?C e X6M7 se destacaram com melhores resultados sensoriais, em termos de aroma e sabor, indicando potencial de aplicação na indústria alimentícia na forma de chá. Entretanto ao relacionar os dados de produção de biomassa com as características sensoriais, observa-se que o clone X6M?C apesar dos bons resultados de aceitação por parte dos consumidores em relação ao chá, está entre os clones menos produtivos em termos de biomassa e óleo essencial ao contrário do X6M7, que apresentou bons resultados para esses parâmetros, quanto em relação à percepção dos avaliadores em função do aroma e sabor do chá.

A utilização da técnica de cromatografia gasosa bidimensional abrangente (CG×CG) acentuou as diferenças entre os clones de *Lippia alba*, devido a melhor resolução obtida na separação de substâncias coeluídas. As variações observadas referem-se principalmente às substâncias presentes em menores percentuais, cuja maioria foi observada apenas via CG×CG. Em função da maior da maior capacidade de cobertura metabólica, o emprego do sistema de cromatografia gasosa bidimensional abrangente constitui como importante ferramenta metabolômica no estudo de voláteis do metabolismo especializado da espécie *Lippia alba*.

REFERÊNCIAS

ALEXANDRINO, Guilherme L. et al. Optimizing loop-type cryogenic modulation in comprehensive two-dimensional gas chromatography using time-variable combination of the dual-stage jets for analysis of crude oil. **Journal of Chromatography A**, v. 1536, p. 82-87, 2018.

BÉNARD, Marc et al. Association between time perspective and organic food consumption in a large sample of adults. **Nutrition journal**, v. 17, n. 1, p. 1, 2018.

BLANK, Arie Fitzgerald et al. Chemical diversity in *Lippia alba* (Mill.) NE brown germplasm. **The Scientific World Journal**, v. 2015, 2015.

CORDERO, Chiara et al. Comprehensive two-dimensional gas chromatography and food sensory properties: potential and challenges. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 407, n. 1, p. 169-191, 2015.

DITLEVSEN, Kia; SANOE, Peter; LASSEN, Jesper. Healthy food is nutritious, but organic food is healthy because it is pure: The negotiation of healthy food choices by Danish consumers of organic food. **Food Quality and Preference**, v. 71, p. 46-53, 2019.

Euromonitor Internacional, 2018 Herbal/Traditional Products in Brazil Disponível em <<https://www.euromonitor.com/herbal-traditional-products-in-brazil/report>> Acesso em 01 de outubro de 2018.

FEIJÓ, E. V. R. S. et al. Levantamento preliminar sobre plantas medicinais utilizadas no bairro Salobrinho no município de Ilhéus, Bahia. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 4, p. 595-604, 2013.

JANNUZZI, Hermes et al. Avaliação agronômica e química de dezessete acessos de erva-cidreira [*Lippia alba* (Mill.) NE Brown]-quimiotipo citral, cultivados no Distrito Federal. **Revista brasileira de plantas medicinais**, v. 13, n. 3, p. 258-264, 2011.

JANNUZZI, Hermes et al. Avaliação agronômica e identificação de quimiotipos de erva cidreira no Distrito Federal. **Horticultura Brasileira**, v. 28, n. 4, p. 412-417, 2010.

LINDE, G. et al. Quimiotipos, extracción, composición y aplicaciones del aceite esencial de *Lippia alba*. **Rev Bras Plant Med**, v. 18, p. 191-200, 2015.

LIU, Zaiyou; PHILLIPS, John B. Comprehensive two-dimensional gas chromatography using an on-column thermal modulator interface. **Journal of Chromatographic Science**, v. 29, n. 6, p. 227-231, 1991.

MASWAL, Masrat; DAR, Aijaz Ahmad. Formulation challenges in encapsulation and delivery of citral for improved food quality. **Food Hydrocolloids**, v. 37, p. 182-195, 2014.

MEINERT, Cornelia; MEIERHENRICH, Uwe J. A New Dimension in Separation Science: Comprehensive two-dimensional gas chromatography. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 51, n. 42, p. 10460-10470, 2012.

OLIVEIRA, Ana Claudia Dias et al. Os dez anos da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) e os principais entraves da cadeia produtiva de extratos vegetais e medicamentos fitoterápicos no Brasil. 2016.

PASCUAL, M. E. et al. Lippia: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of ethnopharmacology**, v. 76, n. 3, p. 201-214, 2001.

RODRIGUES, Waldecy. Competitividade e mudança institucional na cadeia produtiva de plantas medicinais no Brasil. **Interações (Campo Grande)**, v. 17, n. 2, 2016.

SALIMENA, Fátima Regina; MÚLGURA, Maria Ema. Notas taxonômicas em Verbenaceae J. St. Hil. do Brasil. Rodriguésia-Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, v. 66, n. 1, p. 191-197, 2015.

SCHOCKEN, NATALIE REGINA LEOZ. Obtenção de quimiotipos híbridos de *Lippia alba* (Mill) NE Brown. **Campinas, SP**, p. 82, 2007.

THOGERSEN, John. Visioning a green future or longing for the good old days? Basic drivers of organic food consumption in Europe. In: **International Conference of Environmental Psychology**. 2017.

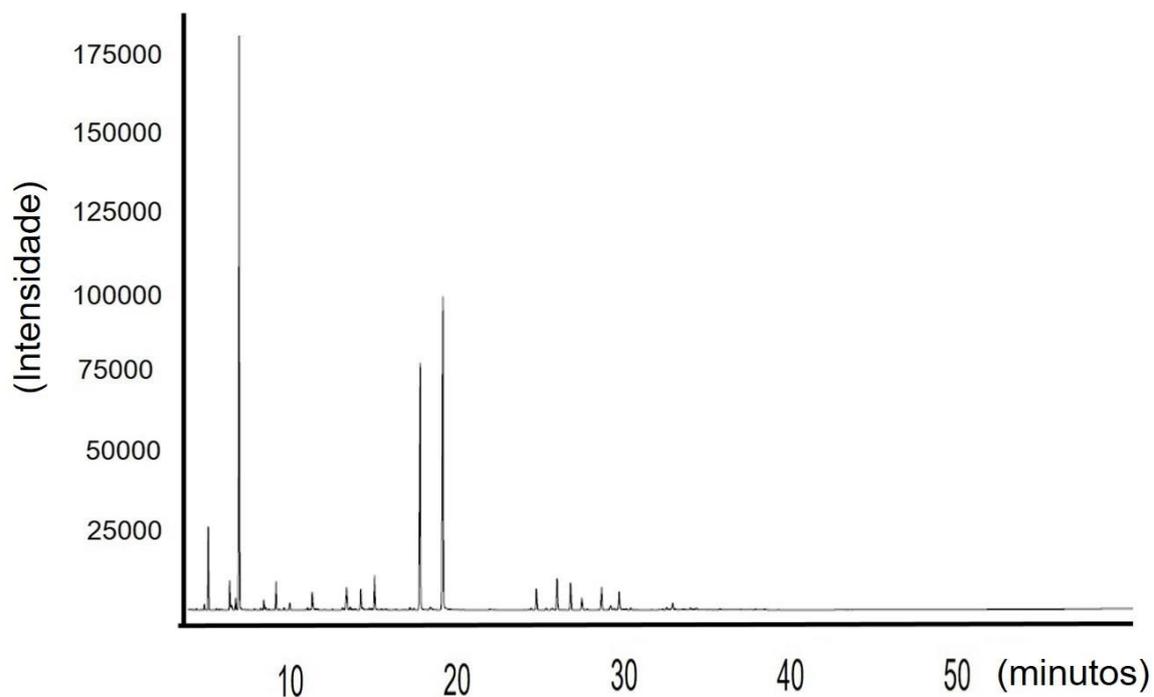
VÁSQUEZ, Silvia Patricia Flores; MENDONÇA, MS de; NODA, S. do N. Etnobotânica de plantas medicinais em comunidades ribeirinhas do Município de Manacapuru, Amazonas, Brasil. **Acta Amazonica**, v. 44, n. 4, p. 457-472, 2014.

YANG, Ziyin; BALDERMANN, Susanne; WATANABE, Naoharu. Recent studies of the volatile compounds in tea. **Food Research International**, v. 53, n. 2, p. 585-599, 2013.

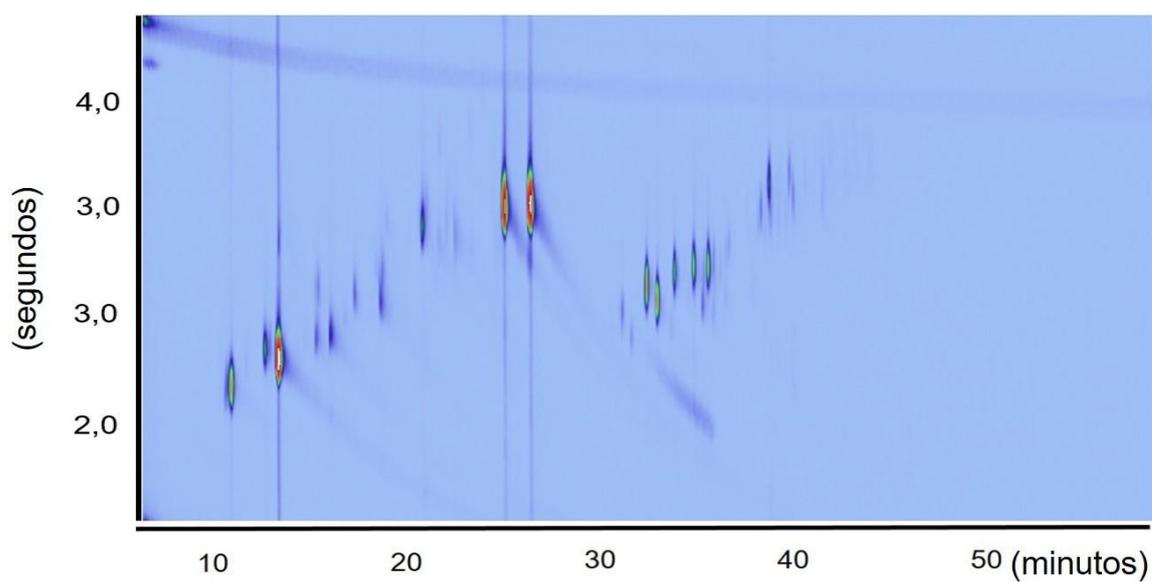
ZINI, Cláudia Alcaraz. Cromatografia gasosa bidimensional. **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 1, p. 31-49, 2009.

APÊNDICE A – CROMATOGRAMAS UNI (1D) E BIDIMENSIONAL (2D) DO ÓLEO
ESSENCIAL DE CLONES DE *Lippia alba*

Continua

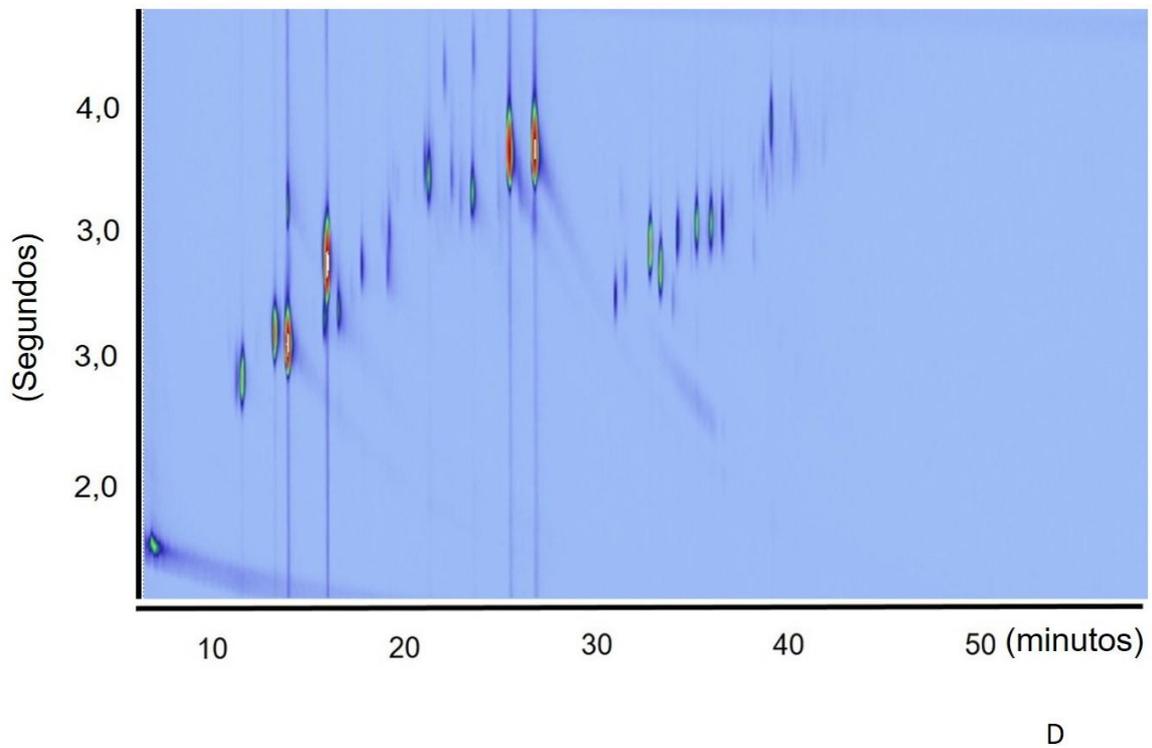
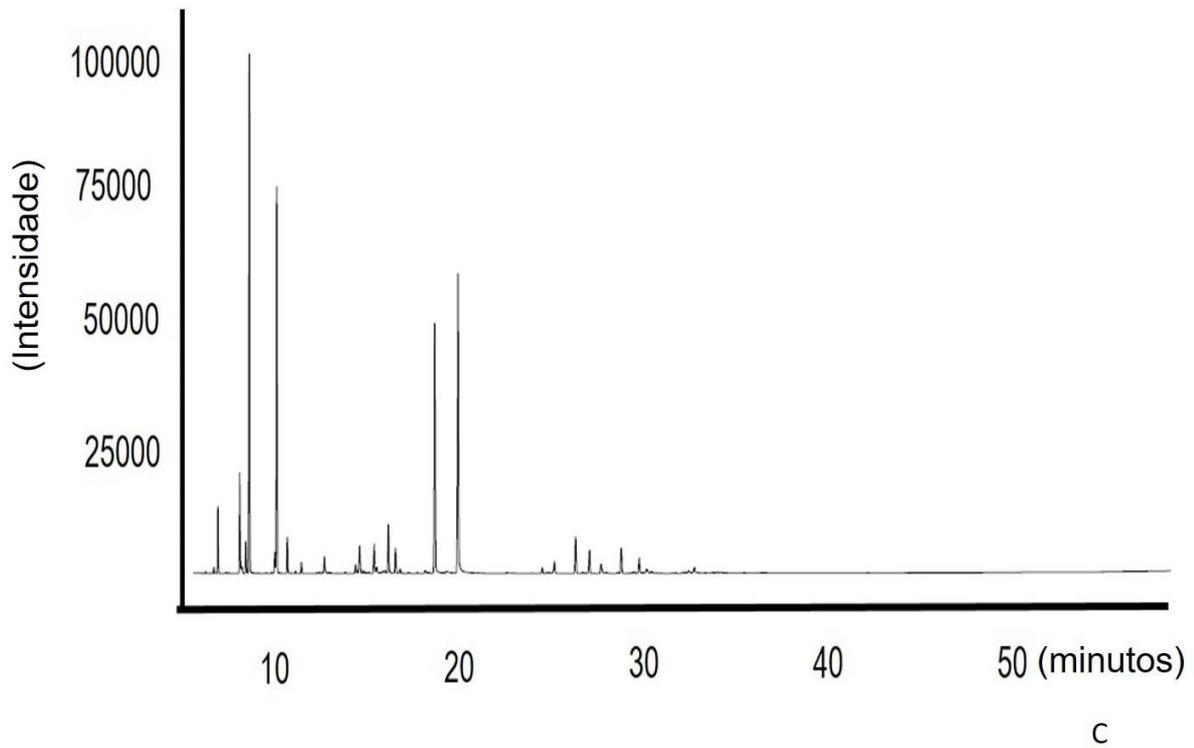


A



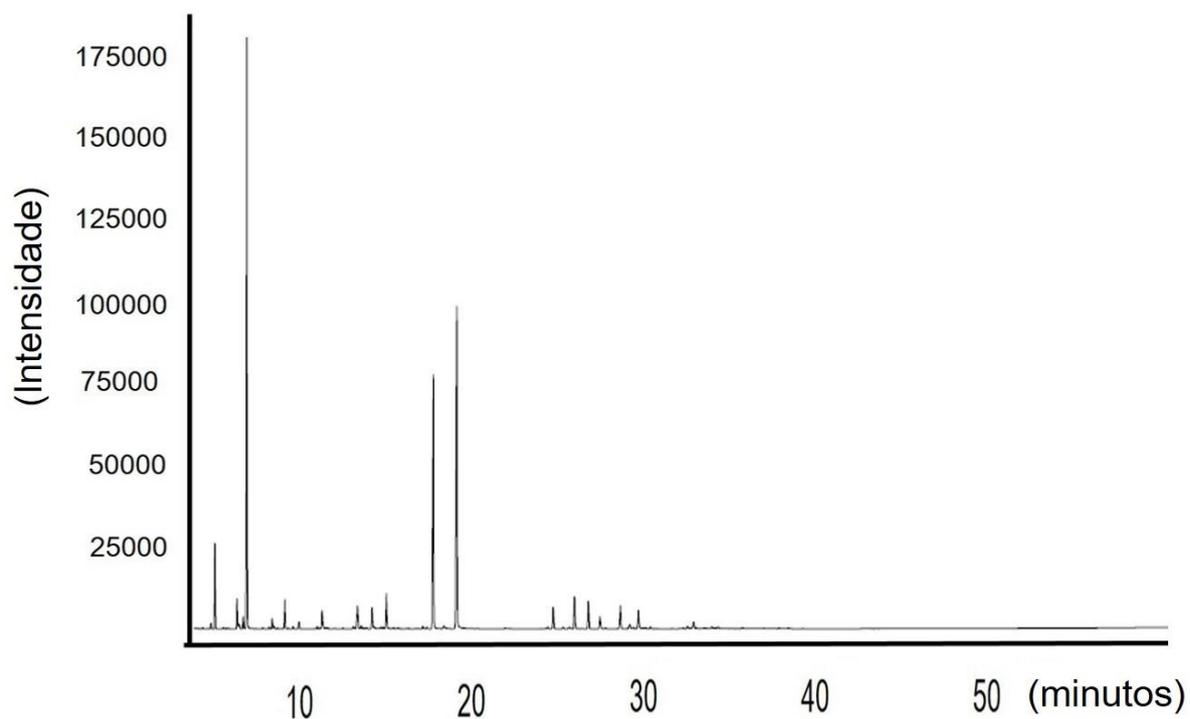
B

Legenda: A= Cromatograma 1D clone X6M6. B= Cromatograma 2D clone X6M6

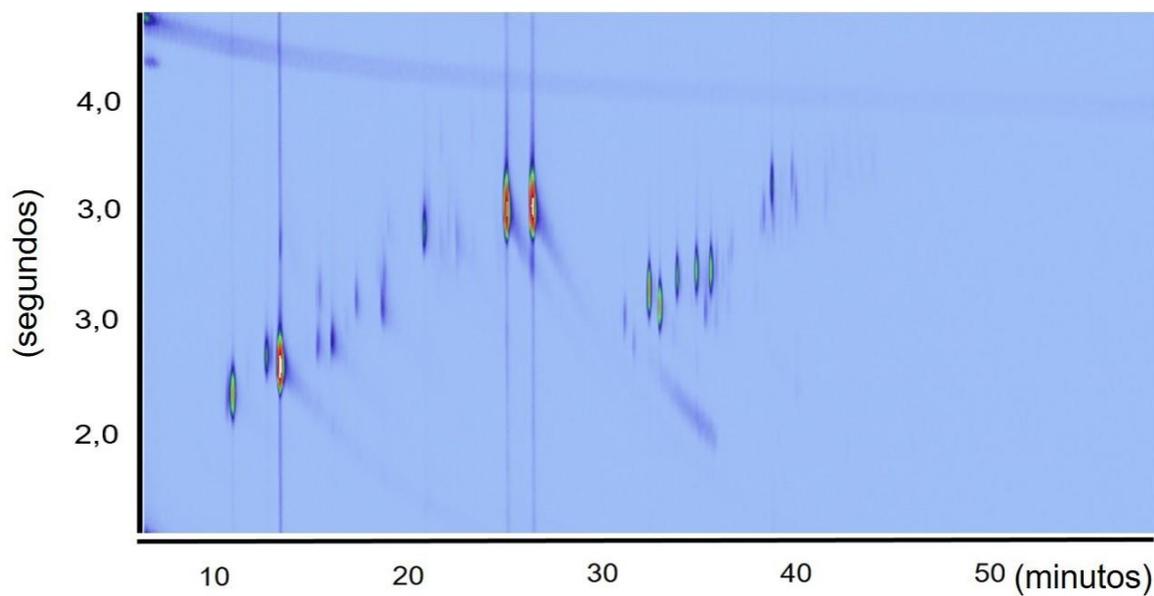
Continuação

Legenda: C= Cromatograma 1D clone X6M7. D= Cromatograma 2D clone X6M7

Continuação

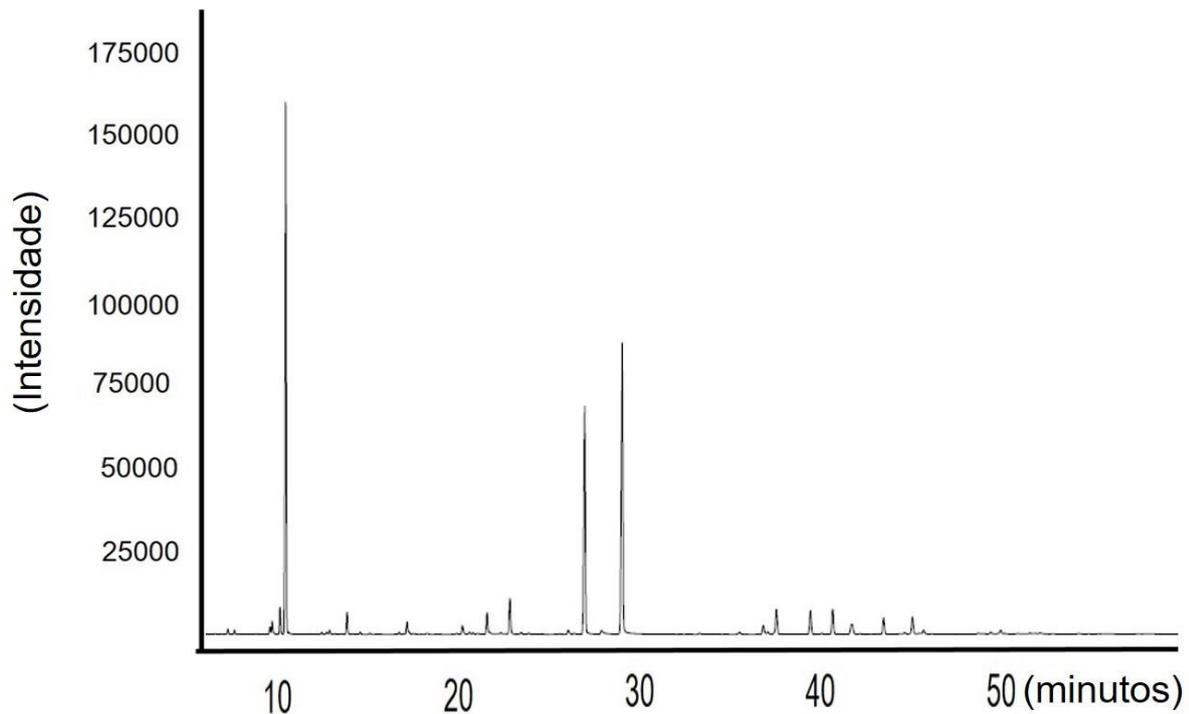


E

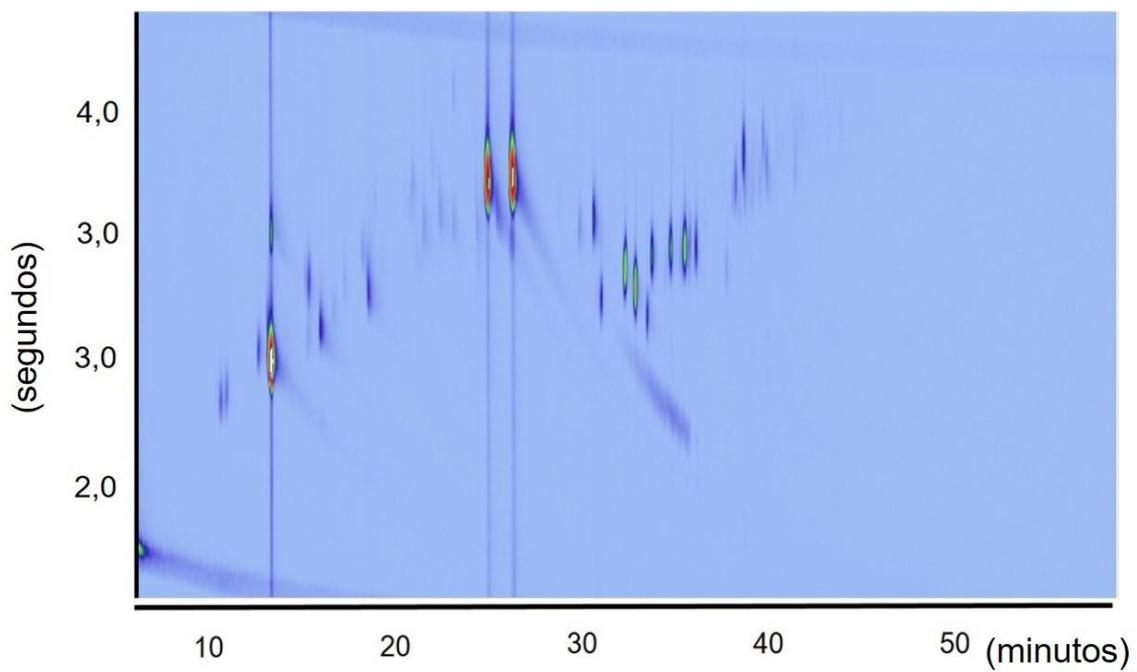


F

Legenda: E= Cromatograma 1D clone X6M33. F= Cromatograma 2D clone X6M33

continuação

G



H

Legenda: G= Cromatograma 1D clone X6M?C. H= Cromatograma 2D clone X6M?