



Universidade Federal de Santa Catarina  
Centro de Ciências da Saúde  
Departamento de Ciências Farmacêuticas  
Curso de Graduação em Farmácia

Maria Luiza Bopprê Philippi da Silva

**Validação de metodologia analítica para a determinação da eficiência de  
encapsulação do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon flexuosus*)**

Florianópolis  
2022

Maria Luiza Bopprê Philippi da Silva

**Validação de metodologia analítica para a determinação da eficiência de encapsulação do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon flexuosus*)**

Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Giovana Carolina Bazzo  
Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Bianca Ramos Pezzini

Florianópolis  
2022

Silva, Maria Luiza Bopprê Philippi da  
Validação de metodologia analítica para a determinação da  
eficiência de encapsulação do óleo essencial de capim-limão  
(*Cymbopogon flexuosus*) / Maria Luiza Bopprê Philippi da  
Silva ; orientador, Giovana Carolina Bazzo, coorientador,  
Bianca Ramos Pezzini, 2022.  
54 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -  
Universidade Federal de Santa Catarina, , Graduação em ,  
Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. . 2. Validação de metodologia analítica. I. Bazzo,  
Giovana Carolina. II. Ramos Pezzini, Bianca. III.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em . IV.  
Titulo.

Maria Luiza Bopprê Philippi da Silva

**Validação de metodologia analítica para a determinação da eficiência de encapsulação do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon flexuosus*)**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de “Bacharel em Farmácia” e aprovado em sua forma final pelo curso de Farmácia.

Florianópolis, 08 de dezembro de 2022.

**Banca Examinadora:**

---

Profa. Giovana Carolina Bazzo  
Orientadora  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof. Marcos Antonio Segatto Silva  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Profa. Vivia Buzzi  
Universidade da Região de Joinville

## Resumo

Os óleos essenciais são compostos altamente voláteis e instáveis. Uma maneira de contornar esses problemas é através da sua microencapsulação, permitindo que os compostos bioativos presentes no óleo essencial possuam maior estabilidade e durabilidade. A eficiência de encapsulação é a análise realizada para avaliar o quanto de óleo essencial efetivamente ficou retido na micropartícula produzida. Para garantir a confiabilidade e comprovar de que o método analítico utilizado na análise da eficiência de encapsulação é adequado para o uso pretendido, realiza-se a sua validação. Neste trabalho realizou-se a validação de uma metodologia por espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta para quantificar o óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon flexuosus*) em micropartículas produzidas com hidroxipropilmetilcelulose e goma arábica. Os parâmetros analíticos avaliados foram: seletividade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão e robustez, de acordo com a RDC nº 166/2017. Considerando os critérios de aceitação pré-estabelecidos, os resultados obtidos para os parâmetros analíticos avaliados foram satisfatórios e com isto o método analítico para a quantificação e determinação da eficiência de encapsulação do óleo essencial de capim-limão foi validado.

Palavras-chave: óleo essencial de capim-limão; micropartículas; eficiência de encapsulação; validação de metodologia analítica.

## Abstract

Essential oils are highly volatile and unstable compounds. One way to circumvent these problems is through its microencapsulation, which will allow the bioactive compounds present in the essential oil to have greater stability and durability. The encapsulation efficiency is the analysis performed to assess how much essential oil was effectively retained in the microparticle produced. To ensure reliability and prove that the analytical method used in the analysis of the encapsulation efficiency is adequate for the intended use, the validation of the analytical method used is carried out. This work carried out the validation of a methodology by absorption spectrophotometry in the ultraviolet region applied to quantification lemongrass essential oil (*Cymbopogon flexuosus*) in microparticles produced with hydroxypropylmethylcellulose and arabic gum. The analytical parameters evaluated were: selectivity, linearity, detection limit, quantification limit, precision, accuracy and robustness according to RDC n° 166/2017. Considering the pre-established acceptance criteria, the results obtained for the evaluated analytical parameters were satisfactory and with this the analytical method for determining the efficiency of encapsulation of lemongrass essential oil was validated.

Keywords: lemongrass essential oil; microparticles; encapsulation efficiency; validation of analytical methodology.

## Lista de tabelas

Tabela 1 – Resultados da Anova para o teste F. ....	39
Tabela 2 – Resultados da Anova para o teste t.....	39
Tabela 3 – Resultados da análise de resíduos.....	40
Tabela 4 – Resultados da análise da repetibilidade obtidos pelo primeiro analista...41	
Tabela 5 – Resultados da análise da repetibilidade obtidos pelo segundo analista..42	
Tabela 6 – Resultados do Teste F para a análise da precisão intermediária. ....	42
Tabela 7 – Resultados do Teste t para a análise da precisão intermediária. ....	42
Tabela 8 – Resultados obtidos na análise da exatidão, através dos percentuais de recuperação do OECL adicionado à solução de HPMC.....	43
Tabela 9 – Resultados obtidos na análise da exatidão, através dos percentuais de recuperação do OECL adicionado à solução de goma arábica.....	44
Tabela 10 – Resultados obtidos na análise da robustez utilizando diferentes marcas de reagentes. ....	44
Tabela 11 –Resultados do Teste F para análise da robustez variando-se as marcas de reagente utilizadas. ....	45
Tabela 12 – Resultados obtidos na análise da estabilidade da solução contendo 5µg/mL do óleo essencial de capim-limão. ....	45
Tabela 13 –Resultados do Teste F para análise da estabilidade da solução contendo 5µg/mL do óleo essencial de capim-limão. ....	45

## Lista de figuras

Figura 1 – Espectro de varredura na faixa do UV (200 a 400 nm). .....	35
Figura 2 – Curva de calibração 1. ....	37
Figura 3 – Curva de calibração 2. ....	37
Figura 4 – Curva de calibração 3. ....	38
Figura 5 – Curva de calibração média.....	38
Figura 6 – Dispersão de resíduos. ....	40
Figura 7 – Gráfico de probabilidade normal. ....	40

## Lista de Siglas

Anova	Análise de variância
AOAC	Associação dos Químicos Analíticos Oficiais
CG	Cromatografia gasosa
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CV	Coeficiente de variação
DPR	Desvio padrão relativo
EE	Eficiência de encapsulação
GA	Goma arábica
HPMC	Hidroxipropilmetilcelulose
Inmetro	Instituto Nacional de Metrologia
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MMQ	Método dos mínimos quadrados
MMQO	Método dos mínimos quadrados ordinários
MMQP	Método dos mínimos quadrados ponderados
OE	Óleo essencial
OEs	Óleos essenciais
OECL	Óleo essencial de capim-limão
RDC	Resolução da diretoria colegiada
SQR	Substância química de referência
TCC	Trabalho de conclusão de curso
UV	Ultravioleta

## Sumário

<b>1.</b>	<b>Introdução</b> .....	<b>12</b>
<b>2.</b>	<b>Objetivos</b> .....	<b>14</b>
2.1.	Objetivo Geral.....	14
2.2.	Objetivos Específicos .....	14
<b>3.</b>	<b>Justificativa</b> .....	<b>15</b>
<b>4.</b>	<b>Revisão Teórica</b> .....	<b>16</b>
4.1.	Óleos essenciais na indústria .....	16
4.2.	Óleo essencial de capim-limão e suas características físico-químicas.....	17
4.3.	Microencapsulação.....	17
4.4.	Eficiência de encapsulação .....	18
4.5.	Metodologias para a determinação da eficiência de encapsulação.....	19
4.6.	Validação de metodologias analíticas.....	21
4.7.	Parâmetros analíticos e critérios de aceitação .....	22
4.7.1.	Seletividade .....	22
4.7.2.	Linearidade.....	22
4.7.3.	Precisão.....	25
4.7.4.	Exatidão.....	26
4.7.5.	Faixa de trabalho .....	27
4.7.6.	Limite de detecção.....	28
4.7.7.	Limite de quantificação .....	28
4.7.8.	Robustez .....	28
<b>5.</b>	<b>Materiais</b> .....	<b>30</b>
<b>6.</b>	<b>Metodologia</b> .....	<b>30</b>
6.1.	Definição das condições analíticas.....	30
6.2.	Validação do método analítico.....	31
6.2.1.	Seletividade .....	31
6.2.2.	Linearidade e faixa de trabalho .....	32
6.2.3.	Limite de detecção e limite de quantificação .....	32

6.2.4.	Precisão.....	32
6.2.5.	Exatidão.....	33
6.2.6.	Robustez .....	34
<b>7.</b>	<b>Resultados e discussão.....</b>	<b>35</b>
7.1.	Seletividade .....	35
7.2.	Linearidade e faixa de trabalho .....	36
7.3.	Limite de detecção e Limite de quantificação .....	41
7.4.	Repetibilidade e precisão intermediária.....	41
7.5.	Exatidão.....	43
7.6.	Robustez .....	44
<b>8.</b>	<b>Conclusão .....</b>	<b>47</b>
	<b>Referências.....</b>	<b>48</b>

## 1. Introdução

Os óleos essenciais (OEs) são substâncias complexas, constituídas principalmente de compostos terpênicos, que possuem alta volatilidade e são facilmente degradados quando armazenados na presença de luz, oxigênio e em altas temperaturas. Sendo assim, a microencapsulação destes compostos é uma solução para melhorar a sua estabilidade físico-química e, desta forma, aumentar a durabilidade dos compostos bioativos e também proporcionar uma liberação prolongada ou direcionada, quando desejado (MAMUSA *et al.*, 2021).

A microencapsulação consiste em englobar o composto ativo com uma substância encapsulante, normalmente um material polimérico, com a finalidade de estabilizar o composto ativo, liberá-lo de forma controlada, aumentar sua vida útil, além de prevenir reações com fatores externos ou com outros componentes da formulação (PEREIRA *et al.*, 2018).

Para avaliar a eficiência do processo de microencapsulação é essencial que se tenha um método analítico que determine o quanto de óleo essencial (OE) efetivamente foi encapsulado. Dito isto, um dos parâmetros que devem ser analisados é a eficiência de encapsulação (EE), que consiste na determinação da quantidade de óleo essencial que realmente foi encapsulada na micropartícula produzida (ALENCAR *et al.*, 2022).

A validação de uma metodologia analítica é realizada com o intuito de garantir que o objetivo do método foi alcançado, bem como a sua confiabilidade e rastreabilidade (SILVA *et al.*, 2017). Com isso, para garantir a confiabilidade dos resultados e determinar a quantidade do óleo essencial presente nas micropartículas, deve-se realizar a validação do método analítico empregado na sua quantificação.

Este trabalho de conclusão de curso (TCC) deriva de um projeto de pesquisa que tem o objetivo de produzir micropartículas contendo o óleo essencial de capim-limão (OECL) e aplicá-las em um produto cosmético. Visto que, no Brasil, ainda não há legislação vigente que aborde sobre a validação de metodologias analíticas aplicadas a produtos cosméticos, a resolução da diretoria colegiada (RDC) nº 166/2017 será utilizada como parâmetro.

Dito isto, neste trabalho serão abordados os parâmetros e os critérios de aceitação exigidos pela RDC nº 166/2017 para a validação de um método analítico

empregado na análise da eficiência de encapsulação do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon flexuosus*) presente em micropartículas, através de espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta (UV).

## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivo Geral

Validar um método espectrofotométrico na região do ultravioleta para a quantificação do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon flexuosus*) com possível aplicação na determinação da eficiência de encapsulação em micropartículas.

### 2.2. Objetivos Específicos

- Determinar as condições analíticas a serem empregadas no ensaio, como tipo de solvente, concentração de trabalho e comprimento de onda para a leitura das absorvâncias.
- Avaliar os parâmetros analíticos recomendados pela RDC nº 166/2017 para a validação de métodos analíticos quantitativos, sendo eles: seletividade, linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão, exatidão e robustez.

### 3. Justificativa

Conforme mencionado anteriormente, a validação de um método analítico é fundamental para que resultados confiáveis sejam obtidos. A validação da metodologia analítica e sua posterior documentação irá comprovar que o objetivo do método e os critérios de aceitação pré-estabelecidos foram alcançados (ANVISA, 2017).

Em um trabalho desenvolvido paralelamente a este TCC, foram definidas as condições para a obtenção das micropartículas contendo o óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon flexuosus*). Com o objetivo de avaliar a eficiência do processo em microencapsular o óleo essencial é necessário que se tenha um método analítico validado para quantificação, onde através desta validação pode-se garantir a confiabilidade e rastreabilidade dos resultados obtidos.

A metodologia por espectrofotometria no UV foi selecionada para este trabalho por ser de rápida e simples execução, por estar descrita na literatura para avaliar a eficiência de encapsulação de diversos óleos essenciais, além de possuir baixo custo comparando-se com outros métodos mais robustos como a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e a cromatografia gasosa (CG).

Vale ressaltar que o objetivo deste TCC é validar uma metodologia aplicada à análise da eficiência de encapsulação do OECL e não quantificar os compostos químicos presentes no óleo essencial. Dito isto, um método que identifique e quantifique os compostos presentes no OE não é necessário nesta etapa, sendo a espectrofotometria no UV adequada para a finalidade deste trabalho.

## 4. Revisão Teórica

### 4.1. Óleos essenciais na indústria

Os óleos essenciais, com o decorrer dos anos, ganharam notoriedade em diversas áreas da indústria farmacêutica, alimentícia e cosmética por possuírem atividades biológicas. E é por esta razão que os OEs estão sendo considerados como uma alternativa para tratar infecções causadas por bactérias multirresistentes, ajudar na melhora psíquica de pacientes, combater micro-organismos causadores de intoxicações alimentares, adicionados a produtos alimentícios para melhorar sua conservação, além de serem utilizados em produtos cosméticos (ASBAHANI *et al.*, 2015; BAKKALI *et al.*, 2008).

Os OEs ganharam espaço na indústria de alimentos devido às suas atividades antimicrobianas e antifúngicas, sendo utilizados assim para aumentar a vida útil do produto, ou seja, são adicionados aos alimentos visando sua conservação e prevenindo o crescimento de micro-organismos patogênicos (TIWARI *et al.*, 2009; MILLEZI *et al.*, 2012). Alguns óleos essenciais, por possuírem sabores e odores agradáveis, também são utilizados na indústria alimentícia como aditivos de sabor aos alimentos produzidos (BAKKALI *et al.*, 2008; MILLEZI *et al.*, 2012).

Já na indústria farmacêutica os OEs possuem um amplo campo de aplicação devido a suas atividades antimicrobiana, antioxidante, antifúngica e antiviral (ASBAHANI *et al.*, 2015). Muitos estudos são realizados com o objetivo de estabelecer quais são os mecanismos de ação dos OEs e com isso direcionar o desenvolvimento de novas formulações (SOUSA *et al.*, 2022).

A exemplo, devido a crescente preocupação relacionada ao aumento das bactérias multirresistentes, os óleos essenciais estão sendo considerados como uma alternativa aos antibióticos sintéticos, visto que muitos OEs possuem atividades antimicrobianas comprovadas tanto para bactérias gram-positivas, quanto para gram-negativas (ASBAHANI *et al.*, 2015; PANDINI *et al.*, 2017; MAYAUD *et al.*, 2008).

E por fim, na indústria cosmética os OEs podem ser utilizados com diferentes finalidades. Uma delas é atuarem como conservantes, por possuírem atividades antimicrobianas, e como antioxidantes, assim prevenindo a oxidação de componentes da formulação, aumentando o tempo de prateleira do produto. Os OEs também podem ser utilizados nas formulações com o objetivo de proteger a pele

contra radicais livres, assim prevenindo o seu envelhecimento, surgimento de rugas e a perda da sua elasticidade (MAMUSA *et al.*, 2021; CARVALHO *et al.*, 2015).

#### 4.2. Óleo essencial de capim-limão e suas características físico-químicas

O capim-limão pertencente à família Poaceae e é considerado uma planta medicinal e aromática (PRINS *et al.*, 2008). O gênero *Cymbopogon* possui mais de 140 espécies, dentre elas o *C. flexuosus* e o *C. citratus* se destacam por possuírem, em seus respectivos óleos essenciais, cerca de 80 a 84% de citral (monoterpeno majoritário) (GANJEWALA, 2009).

A composição do OECL depende da sua fonte de extração, ou seja, de qual parte da planta ele foi extraído, e o seu rendimento e qualidade são influenciados pelas condições do plantio, como o clima, qualidade do solo, características genéticas da planta, entre outros (GANJEWALA, 2009; PINTO *et al.*, 2014; SOUSA *et al.*, 2020).

De acordo com a Farmacopeia Brasileira 6ªed. (2019) o óleo essencial de capim-limão, obtido por hidrodestilação a partir das folhas frescas de *Cymbopogon citratus*, deve conter no mínimo 60% de citral, sendo este o componente responsável pelas atividades biológicas já comprovadas e pelo odor característico de limão presente no óleo essencial (SANTOS *et al.*, 2014; ANVISA, 2019; AVOSEH *et al.*, 2015).

Segundo a monografia do óleo de capim-limão presente na Farmacopeia Brasileira 6ª ed. (2019), o óleo deve possuir um aspecto amarelo pálido, com densidade relativa entre 0,875 a 0,930 g/mL, índice de refração entre 1,480 a 1,493 e uma rotação óptica de  $-3,10^\circ$  a  $-1,10^\circ$  (ANVISA, 2019). O OECL possui solubilidade em solventes orgânicos como o etanol e é insolúvel em água (SANTOS *et al.*, 2014).

#### 4.3. Microencapsulação

A microencapsulação consiste no revestimento do material a ser encapsulado, independente do seu estado físico (sólido, líquido ou gasoso), através de um agente encapsulante (invólucro) que irá isolar as partículas (núcleo) do meio externo, protegendo-as (SOUSA *et al.*, 2022).

As micropartículas podem ser classificadas como: microcápsulas ou microesferas. As microcápsulas possuem as partículas encapsuladas na região

central revestidas pelo agente encapsulante, já as microesferas possuem o material encapsulado disperso na matriz e, conseqüentemente, possuem a substância encapsulada presente tanto na superfície quanto no interior da micropartícula (PEREIRA *et al.*, 2018; SOUSA *et al.*, 2022).

Pelo fato dos óleos essenciais serem substâncias altamente voláteis e instáveis, eles são facilmente degradados por fatores externos como luz, temperatura e oxigênio (ASBAHANI *et al.*, 2015). Por esses motivos a microencapsulação dos OEs é utilizada com o objetivo de proteger os compostos bioativos, aumentando a sua estabilidade e, conseqüentemente, sua durabilidade (NHAN *et al.*, 2020).

Diversos trabalhos são descritos na literatura envolvendo a microencapsulação de OEs, através de diferentes técnicas, como o trabalho de Araújo *et al.* (2020), no qual foi avaliada a volatilidade e oxidação do óleo essencial de laranja doce (*Citrus aurantium*), comparando com o OE livre e o OE microencapsulado.

Os resultados obtidos por Araújo *et al.* (2020) comprovaram que o óleo essencial possuía maior estabilidade térmica e oxidativa quando presente nas micropartículas produzidas, ou seja, o objetivo do processo de microencapsulação foi alcançado, pois o agente encapsulante utilizado no processo protegeu o OE de ser degradado rapidamente e, conseqüentemente, sua estabilidade e durabilidade aumentaram.

Resultado semelhante foi descrito por Hernández-Hernández *et al.* (2014), onde a microencapsulação do óleo essencial de orégano (*Lippia graveolens* e *Origanum vulgare*) protegeu seus componentes bioativos e, com isto, a atividade antimicrobiana presente no óleo foi mantida.

#### 4.4. Eficiência de encapsulação

Para avaliar o quanto de OE ficou retido na micropartícula faz-se necessário a realização do ensaio da eficiência de encapsulação (EE), onde o resultado deste ensaio depende de diversos fatores, como o método empregado, a taxa de remoção do solvente, a solubilidade do agente encapsulante no solvente utilizado, entre outros (JYOTHI *et al.*, 2010). Contudo, a EE é afetada principalmente pela composição do material utilizado no invólucro, que tem a função de proteger o núcleo de fatores externos, bem como prevenir possíveis interações do material

encapsulado com os ingredientes utilizados na formulação do produto em que ela será adicionada (GARAVAND *et al.*, 2021).

O ensaio de eficiência de encapsulação consiste em analisar a quantidade de óleo essencial que efetivamente ficou presente nas micropartículas produzidas, podendo ser definida pela razão entre a concentração do óleo essencial determinada na micropartícula e a quantidade de óleo essencial inicialmente utilizada na produção dessas micropartículas, multiplicado por cem, para assim se obter o resultado em porcentagem (PIACENTINI *et al.*, 2016).

#### 4.5. Metodologias para a determinação da eficiência de encapsulação

Metodologias por espectrofotometria no ultravioleta (UV) e por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) já foram descritas para a análise da eficiência de encapsulação do óleo essencial de capim-limão (ANTONIOLI *et al.*, 2020; KUMAR *et al.*, 2022). Contudo, como o objetivo deste trabalho é a validação de uma metodologia por espectrofotometria no ultravioleta, metodologias por cromatografia não serão abordadas. Sendo assim, a seguir serão apresentados alguns exemplos de metodologias já descritas na literatura para a análise da eficiência de encapsulação do OECL em micropartículas e seus respectivos resultados.

Martins *et al.* (2021) determinaram a eficiência de encapsulação utilizando hexano como solvente, através de espectrofotometria no UV, realizando a leitura das absorvâncias no comprimento de onda de 255 nm, sendo que o óleo essencial utilizado na produção das micropartículas possuía 90% de citral. Neste estudo, as micropartículas foram produzidas por liofilização e utilizou-se uma mistura de maltodextrina e gelatina (4:1) como agentes encapsulantes. Neste caso foram preparadas três formulações de micropartículas contendo quantidades crescentes do óleo essencial de capim-limão, sendo elas 5, 10 e 15%. Como resultado da eficiência de encapsulação obteve-se 22,45%, 13,77% e 10% para a formulação contendo 5, 10 e 15% do OECL, respectivamente (MARTINS *et al.*, 2021).

Já Alencar *et al.* (2022) utilizou como solvente uma mistura de etanol-água (1:1) e a absorvância foi medida no comprimento de onda de 260 nm. Neste caso, o OE utilizado possuía 39,18% de citral. Os autores utilizaram uma mistura de maltodextrina e gelatina (9:1) como agente encapsulante, sendo utilizada a técnica de secagem por aspersion para a obtenção das micropartículas. Neste estudo também foram preparadas micropartículas contendo variações de 5, 10 e 15% do

OECL, contudo prepararam-se nove formulações diferentes, onde foram alteradas as porcentagens de maltodextrina e de óleo essencial. A eficiência de encapsulação para as diferentes formulações variou de 15,86 a 61,95%, sendo a maior EE atribuída para a formulação que continha 20% de maltodextrina e 5% do óleo essencial (ALENCAR *et al.*, 2022).

Outro estudo que utilizou a espectrofotometria no UV para a determinação da EE foi descrito por Lima *et al.* (2021), que empregou a quitosana como polímero para a produção das micropartículas pela técnica de secagem por aspersão. Neste estudo foram preparados micropartículas contendo uma quantidade fixa do OECL variando-se apenas a porcentagem de quitosana. O OECL utilizado possuía cerca de 83% de citral em sua composição, sendo a absorvância em 229 nm utilizada nas análises. Como solvente utilizou-se uma mistura de ácido clorídrico (0,01 mol.L<sup>-1</sup>) e etanol a 95% (3:2). Como resultado da EE se obteve 12,55 e 11,47% para as formulações contendo 10 e 5% de quitosana, respectivamente (LIMA *et al.*, 2021).

Independente da metodologia utilizada para a determinação da EE, observa-se que quanto menor a quantidade do óleo essencial utilizado na produção das micropartículas, maior será a sua eficiência de encapsulação, devido a melhor distribuição do óleo essencial no agente encapsulante. Outra maneira observada para se obter uma maior EE é aumentando a concentração do agente encapsulante utilizado na produção das micropartículas, pois com isto a capacidade do agente encapsulante em revestir o óleo essencial aumentará (MARTINS *et al.*, 2021; ALENCAR *et al.*, 2022; LIMA *et al.*, 2021).

Outros autores já descreveram resultados e conclusões semelhantes a estas, porém com diferentes OEs, como Hasheminejad *et al.* (2019) e Radünz *et al.* (2019) com o OE de cravo, Pilicheva *et al.* (2021) com o OE de lavanda e Huang *et al.* (2020) com o OE de orégano.

Pilicheva *et al.* (2021) descreveu a maior mudança no resultado da eficiência de encapsulação quando alterada a porcentagem do polímero utilizado na produção das micropartículas contendo o OE de lavanda (*Lavandula angustifolia*). Neste estudo, foram produzidos diferentes tipos de micropartículas utilizando-se dois polímeros, a goma arábica (GA) e a maltodextrina. A eficiência de encapsulação variou de 19,77 a 91,08%, sendo os resultados mais baixos atribuídos as micropartículas produzidas com 10% de polímero. A maior EE obtida neste estudo foi das micropartículas produzidas com 20% de maltodextrina e 5% do OE, no qual

houve um aumento de 64,55% em comparação com as micropartículas produzidas com 10% de polímero (PILICHEVA *et al.*, 2021).

Dito isto, é possível correlacionar o resultado da eficiência de encapsulação com a concentração adicionada tanto do OE, quanto do polímero, bem como a interação entre estes dois compostos, visto que, com uma maior interação entre eles, maior será a retenção do óleo na micropartícula e, conseqüentemente, maior será a sua eficiência de encapsulação (ALENCAR *et al.*, 2022; HASHEMINEJAD *et al.*, 2019; HUANG *et al.*, 2020; LIMA *et al.*, 2021; MARTINS *et al.*, 2021; RADÜNZ *et al.* 2019; PILICHEVA *et al.*, 2021).

Contudo, deve-se lembrar que a EE também pode ser influenciada pela técnica escolhida para a produção das micropartículas, visto que, na técnica de secagem por aspersão, por exemplo, a temperatura do ar de entrada e a pressão de atomização de alimentação escolhidas podem acarretar perdas do OE e, conseqüentemente, diminuir a eficiência de encapsulação (SHAMAEI *et al.*, 2017).

Fato este descrito por Pilicheva *et al.* (2021) com o OE de hortelã-pimenta (*Mentha piperita*), no qual obteve-se uma EE de 19,77% devido a evaporação do óleo na produção das micropartículas. Pilicheva *et al.* (2021) também ressalta a importância da combinação ideal do material de alimentação e das condições de secagem utilizados, para assim se conseguir alcançar a máxima retenção do óleo e conseqüentemente a maior eficiência de encapsulação.

#### 4.6. Validação de metodologias analíticas

De acordo com a ABNT ISO 17025 (2017), a validação é a verificação de que os requisitos especificados são adequados para o uso pretendido através do fornecimento de evidências objetivas. No Brasil, a RDC nº 166/2017 é a legislação vigente que aborda os parâmetros necessários para a validação de métodos analíticos envolvendo insumos farmacêuticos, medicamentos e produtos biológicos em todas as fases de produção (ANVISA, 2017).

Como já descrito anteriormente, as micropartículas contendo o OECL serão aplicadas em um produto cosmético. Contudo, no Brasil, não há legislação específica para a validação de métodos analíticos envolvendo estes produtos, por isto, neste trabalho, a RDC nº 166/2017 foi utilizada como base para todas as análises realizadas, levando em conta que, por mais que neste trabalho as micropartículas não tenham sido utilizadas para este fim, elas poderiam ser

utilizadas como insumo farmacêutico na produção de medicamentos e, com isso, enquadrando-se nas abrangências desta resolução (BOUKHATEM *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2021).

Após a validação do método ser realizada deve-se registrar, através de documentações e relatórios técnicos, os dados obtidos com o objetivo de comprovar a sua execução. Estes documentos deverão conter a descrição dos procedimentos realizados, seus parâmetros analíticos, os resultados obtidos juntamente com seus critérios de aceitação e, quando adequado, deve conter uma avaliação estatística (ANVISA, 2017).

#### 4.7. Parâmetros analíticos e critérios de aceitação

De acordo com o anexo I da RDC nº 166/2017 há parâmetros analíticos obrigatórios que devem ser avaliados no estudo de validação, dependendo da finalidade do método analítico que será validado (ANVISA, 2017). O ensaio para determinação da eficiência de encapsulação é um ensaio quantitativo. Dito isto, os parâmetros analíticos avaliados para a validação do método utilizado na análise da eficiência de encapsulação do óleo essencial de capim-limão (*C. flexuosus*) presente nas micropartículas produzidas, bem como seus critérios de aceitação, estão descritos a seguir.

##### 4.7.1. Seletividade

A seletividade é a capacidade do método analítico de identificar ou quantificar o analito de interesse sem a interferência de outros componentes presentes na amostra, como produtos de degradação, impurezas e componentes da matriz ou excipientes (ARAUJO, 2009; ANVISA, 2017).

Para demonstrar a seletividade do método, deve-se comprovar que a resposta analítica obtida é exclusivamente pela presença do analito, ou seja, sem interferência da matriz e solventes, por exemplo (ANVISA, 2017).

##### 4.7.2. Linearidade

Quando os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito presente na amostra, o método é considerado linear (MOEIN *et al.*, 2017). Para se avaliar a linearidade, deve-se realizar no mínimo três curvas de calibração com, no mínimo, cinco concentrações diferentes da substância química

de referência (SQR), onde os resultados obtidos na curva devem abranger toda a faixa de valores estabelecida para o método em questão (ANVISA, 2017).

A partir das curvas de calibração é obtida a equação da reta, o coeficiente de correlação ( $r$ ) e o coeficiente de determinação ( $r^2$ ), onde, de acordo com a RDC nº 166/2017, o coeficiente angular, obtido pela equação da reta, deve ser diferente de zero e o coeficiente de correlação deve ser superior a 0,990 para o método ser considerado linear (ANVISA, 2017).

O Guia nº 10/2017 da ANVISA descreve que a comprovação da significância do coeficiente angular é de extrema importância para demonstrar a linearidade do método e, para tal, realiza-se o teste F da análise de variância (Anova) (ANVISA, 2017).

O modelo matemático utilizado para obter a equação da reta é o método dos mínimos quadrados (MMQ), podendo este ser o método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO) ou o método dos mínimos quadrados ponderados (MMQP). O MMQO é aplicado diretamente quando a variância de  $y$  para cada valor  $x$  for constante, já no MMQP há um fator de ponderação e é aplicado quando forem observadas alterações na variância de  $y$  em relação aos valores de  $x$  (ANVISA, 2017). A partir da equação da reta obtida por um destes modelos é realizada a análise de variância.

Para definir qual destes métodos será utilizado deve-se verificar se os dados obtidos são homocedásticos ou heterocedásticos. Para isto, aplica-se o teste de Cochran, onde a hipótese nula considera que as variâncias dos valores sejam todas iguais e a hipótese alternativa considera que pelo menos uma das variâncias seja diferente das demais (ANVISA, 2017). Para a realização deste teste utiliza-se a equação 1 descrita abaixo, onde se o  $C$  calculado for menor que o valor crítico (tabelado), a um nível de significância de 5%, aceita-se a hipótese nula, ou seja, os dados são considerados homocedásticos e, para a análise de variância, deve-se utilizar o método dos mínimos quadrados ordinários (ANVISA, 2017).

$$C = \frac{\text{maior variância em } y}{\text{soma de todas as variâncias em } y} \quad (1)$$

A Anova é realizada pela avaliação da regressão (modelo), dos resíduos (erro) e da soma das variações destes. Para se comprovar a linearidade do método

é necessário demonstrar que a variação devido à regressão é maior que a variação devido aos resíduos (ANVISA, 2017).

Dito isto, utiliza-se o método dos mínimos quadrados ordinários ou ponderados, dependendo se os dados são homocedásticos ou não, para realização do teste F. Este teste se baseia em duas hipóteses, uma de que o coeficiente angular é igual a zero e outra do coeficiente angular ser diferente de zero. Se o F calculado (equação 2) for maior ou igual ao valor crítico (tabelado) rejeita-se a hipótese de que o coeficiente angular é igual a zero e assume-se que y varia em função de x, sendo assim o método é considerado linear (ANVISA, 2017).

$$F = \frac{\text{Quadrado médio da regressão}}{\text{Quadrado médio dos resíduos}} \quad (2)$$

O Guia nº 10/2017 da ANVISA também recomenda a realização do teste t para verificar se o coeficiente linear é ou não estatisticamente diferente de zero, sendo esperado que este seja equivalente a zero (ANVISA, 2017). Como queremos avaliar se o coeficiente linear é ou não estatisticamente diferente de zero formula-se duas hipóteses. A hipótese nula em que se considera o intercepto equivalente a zero e a hipótese alternativa em que se considera o intercepto diferente de zero.

Se o t calculado (equação 3) for maior que o t tabelado rejeita-se a hipótese nula e assume-se que o coeficiente linear é estatisticamente diferente de zero. Para confirmar o resultado obtido no teste t pode-se avaliar o p-valor, onde se este for maior que o nível de significância ( $\alpha$ ) aceita-se a hipótese nula (MORETTIN; BUSSAB, 2010).

$$t = \frac{\sqrt{n}(X - \mu)}{S} \quad (3)$$

Onde n é o tamanho da amostra, X é a média amostral, S é o desvio padrão amostral e  $\mu$  é a média populacional.

Além dos itens já citados, a RDC nº 166/2017 traz que o gráfico de dispersão dos resíduos deve ser apresentado, juntamente com a sua análise estatística para avaliar se o método pode ser considerado linear. Os resíduos quantificam a distância entre o valor real e o valor estimado, ou seja, é a diferença

entre o valor encontrado de  $y$  e o valor estimado pela equação em um determinado ponto (ANVISA, 2017).

Deve-se investigar a normalidade, homocedasticidade e independência dos resíduos. Para poder afirmar que os erros do modelo são consequência apenas das variações comuns da análise, espera-se que os resíduos possuam uma distribuição normal e sejam independentes entre si. Para a análise dos resíduos é realizado uma análise visual do gráfico de resíduos e testes estatísticos de normalidade, como gráficos de probabilidade ou histograma, por exemplo, onde a distribuição dos dados no gráfico de resíduos deve parecer constante (ANVISA, 2017).

#### 4.7.3. Precisão

A precisão avalia a proximidade dos resultados obtidos na análise através do cálculo do desvio padrão relativo (DPR), também conhecido como coeficiente de variação (CV), podendo ser obtido pela análise da repetibilidade, da precisão intermediária ou da reprodutibilidade (ANVISA, 2017). Para o cálculo do DPR a equação 4 descrita abaixo é utilizada.

$$\text{DPR} = \frac{S}{\bar{X}} \times 100 \quad (4)$$

Onde DPR é o desvio padrão relativo,  $S$  é o desvio padrão e  $\bar{X}$  é a média dos valores determinados.

A reprodutibilidade é avaliada pela proximidade dos resultados obtidos em dois laboratórios diferentes. Já a precisão intermediária analisa a proximidade dos resultados das amostras em dias diferentes por analistas diferentes. E a repetibilidade avalia as amostras nas mesmas condições de operação, pelo mesmo analista, em uma única corrida (ANVISA, 2017).

A proximidade dos resultados obtidos na precisão intermediária pode ser analisada pelos testes estatísticos  $F$  e  $t$ , no qual será avaliado se as variâncias e as médias obtidas por analistas diferentes são estatisticamente semelhantes ou não.

Para a realização destes testes formulam-se duas hipóteses, a hipótese nula que considera as variâncias ou médias estatisticamente semelhantes e a hipótese alternativa que considera as variâncias ou médias estatisticamente diferentes. Se o  $F$  calculado for maior que o  $F$  tabelado rejeita-se a hipótese nula e assume-se que

as variâncias são estatisticamente diferentes. Se o  $t$  calculado for maior que o  $t$  tabelado rejeita-se a hipótese nula e assume-se que as médias obtidas são estatisticamente diferentes (MORETTIN; BUSSAB, 2010).

Para avaliar a precisão deve-se realizar, no mínimo, nove determinações que contemplem o intervalo de linearidade do método, com níveis altos, médios e baixos, sendo cada um destes níveis realizados em triplicada ou deve-se realizar seis réplicas a 100% da concentração do teste preparadas individualmente (ANVISA, 2017).

De acordo com a RDC nº 166/2017, os critérios de aceitação para a precisão devem ser definidos e justificados de acordo com o objetivo do método, variabilidade intrínseca do método, concentração de trabalho e concentração do analito na amostra. Contudo, o documento orientativo sobre validação de métodos analíticos do Instituto Nacional de Metrologia (Inmetro) traz como sugestão os critérios de aceitação sugeridos pela Associação dos Químicos Analíticos Oficiais (AOAC), onde o DPR sugerido, para o analito a 100%, é de 1,3% (INMETRO, 2020). Dito isto, o critério de aceitação utilizado para a análise da precisão neste trabalho foi de um DPR menor ou igual a 1,3%.

#### 4.7.4. Exatidão

A exatidão é obtida pelo grau de concordância dos resultados individuais obtidos pelo método em relação a um valor considerado verdadeiro. Para a determinação da exatidão devem ser realizadas nove determinações dentro do intervalo linear do método analítico, onde essas determinações serão realizadas em triplicatas para cada nível de concentração, sendo eles baixo, médio e alto (ANVISA, 2017).

Este parâmetro deve ser expresso pela recuperação, em porcentagem, do analito de concentração conhecida que foi adicionado à amostra, ou seja, o ensaio para avaliar a recuperação consiste em adicionar diferentes concentrações do analito pesquisado na amostra ou no placebo e, em seguida, determinar sua concentração (BRITO *et al.*, 2003). O percentual recuperado pode ser calculado por uma das equações abaixo.

$$\text{Recuperação} = \frac{\text{CA (amostra adicionada)} - \text{CA (amostra)}}{\text{CTA}} \times 100 \quad (5)$$

$$\text{Recuperação} = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100 \quad (6)$$

Onde CA é a concentração experimental do analito e CTA é a concentração teórica do analito adicionado.

De acordo com a RDC nº 166/2017, os critérios de aceitação para a exatidão devem ser definidos e justificados de acordo com o objetivo do método, variabilidade intrínseca do método, concentração de trabalho e concentração do analito na amostra.

Para a exatidão, o documento orientativo sobre validação de métodos analíticos do Inmetro também traz os critérios de aceitação sugeridos pela AOAC, onde para amostras com 1% do analito de interesse a recuperação pode variar de 97 a 103% (INMETRO, 2020).

Sendo assim, para definir o critério de aceitação, os itens citados pela RDC nº 166/2017 e os critérios sugeridos pela AOAC foram levados em consideração, juntamente com a descrição de que, geralmente, o critério de aceitação para a recuperação varia de 70 a 120% dependendo da preparação da amostra e do procedimento analítico (SILVA *et al.*, 2017; SILVA-BUZANELLO *et al.*, 2015; MÖRSCHBÄCHER *et al.*, 2018).

Considerando que o analito de interesse é um óleo essencial, a faixa de 97 a 103% foi considerada muito estreita, em contrapartida a faixa de 70 a 120% é muito ampla. Dito isto, realizou-se uma média dos limites aceitos para definir o critério de aceitação utilizado neste trabalho, ou seja, o critério de aceitação definido para a análise da exatidão foi de 83 a 111% de recuperação.

#### 4.7.5. Faixa de trabalho

A partir dos estudos de linearidade, juntamente com os resultados da precisão e exatidão, a faixa de trabalho deve ser estabelecida. Contudo, para definir a faixa de trabalho deve-se considerar o objetivo do método em questão (ANVISA, 2017).

#### 4.7.6. Limite de detecção

O limite de detecção (LD) é a menor quantidade do analito presente na amostra que pode ser detectado pelo método utilizado, contudo, esta quantidade não precisa ser necessariamente quantificável (ANVISA, 2017; TAVERNIERS *et al.*, 2004).

Uma das maneiras de se calcular o LD é aplicar os dados obtidos na curva de calibração na equação 7 descrita abaixo.

$$LD = \frac{3,3 \times S}{IC} \quad (7)$$

Onde LD é o limite de detecção, S é o desvio padrão do intercepto com o eixo y e IC é a inclinação da curva de calibração.

#### 4.7.7. Limite de quantificação

A menor quantidade do analito presente na amostra que pode ser determinado com precisão e exatidão aceitáveis pelo método analítico utilizado é chamado de limite de quantificação (LQ) (ANVISA, 2017).

O limite de quantificação sempre será maior que o limite de detecção, contudo, isso não significa que valores abaixo do LQ não possam ser quantificáveis, apenas que os resultados obtidos não seriam confiáveis devido ao alto valor da incerteza de medição associada a eles (TAVERNIERS *et al.*, 2004).

O LQ, assim como o LD, pode ser calculado aplicando os dados obtidos na curva de calibração na equação 8 descrita abaixo.

$$LQ = \frac{10 \times S}{IC} \quad (8)$$

Onde LQ é o limite de quantificação, S é o desvio padrão do intercepto com o eixo y e IC é a inclinação da curva de calibração.

#### 4.7.8. Robustez

A robustez avalia a capacidade do método de resistir a pequenas variações nas condições analíticas. Este parâmetro é utilizado para definir quais são os fatores

que podem interferir significativamente no resultado obtido pelo método analítico avaliado (ANVISA, 2017; BRITO *et al.*, 2003).

No caso de métodos espectrofotométricos, a RDC nº 166/2017 traz que a variação do pH da solução e diferentes lotes ou marcas de reagentes podem ser avaliados para a análise da robustez (ANVISA, 2017).

Para avaliar a semelhança dos resultados obtidos na robustez pode-se utilizar o teste F, onde a hipótese nula considera os dados estatisticamente semelhantes e a hipótese alternativa considera os dados estatisticamente diferentes. Se o F calculado for menor que o F tabelado aceita-se a hipótese nula e assume-se que os dados são estatisticamente semelhantes, com isto o método será considerado robusto em relação a variação da condição analítica avaliada (MORETTIN; BUSSAB, 2010).

## 5. Materiais

Todos os materiais utilizados foram obtidos por doação ou estavam disponíveis no laboratório, como excedentes de outros projetos: óleo essencial de capim-limão da marca Harmonie Aromaterapia (São José, SC), lote 121, com especificação de ter sido extraído da planta *Cymbopogon flexuosus* por arraste de vapor; etanol das marcas Vetec Química e Química Moderna; goma arábica (GA) e hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) das marcas Instantgum e Colorcon, respectivamente.

## 6. Metodologia

As análises foram realizadas no Laboratório de Controle de Qualidade do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Santa Catarina.

A validação da metodologia analítica realizada neste trabalho será aplicada, futuramente, a dois tipos de micropartículas produzidas pela técnica de spray dryer (secagem por aspersão). Uma das micropartículas será produzida com a hidroxipropilmetilcelulose e a outra com a goma arábica como agente encapsulante. Como já citado, as condições para a obtenção destas micropartículas contendo o OECL (*C. flexuosus*) serão definidas em um outro estudo, dito isto elas não serão abordadas neste trabalho. Para definição das concentrações empregadas nos ensaios descritos abaixo, considerou-se a proporção de polímero e óleo essencial que será empregada no preparo das micropartículas: 95% de polímero (HPMC ou goma arábica) e 5% de OECL.

### 6.1. Definição das condições analíticas

A metodologia a ser validada foi adaptada de Benavides *et al.* (2016), ou seja, foi utilizado um método por espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta (UV), empregando um espectrofotômetro Varian (UV-Vis Cary), onde inicialmente foram realizados alguns testes para a definição das condições analíticas, como tipo de solvente, concentração de trabalho e comprimento de onda.

Para a escolha do solvente, foram consideradas tanto a solubilidade do óleo essencial de capim-limão quanto a solubilidade dos polímeros utilizados na

produção das micropartículas. Assim como Benavides *et al.* (2016), uma mistura de etanol-água (1:1) foi selecionada para a realização das análises devido ao fato do óleo essencial ser insolúvel em água e necessitar de um solvente orgânico, como o etanol, para ser solubilizado (SANTOS *et al.*, 2014). Por outro lado, para solubilizar os polímeros, de caráter hidrofílico, não poderia ser empregado um solvente orgânico apolar. Empregando a mistura etanol-água na proporção 1:1 foi possível solubilizar tanto o OECL quanto os polímeros.

Para definir o comprimento de onda ( $\lambda$ ) realizou-se uma varredura na faixa do UV (200 - 400 nm) com uma solução contendo 5  $\mu\text{g/mL}$  do OECL utilizando-se como solvente a mistura de etanol-água (1:1). A faixa de trabalho foi, posteriormente, estipulada com base no resultado desta varredura e o comprimento de onda utilizado nas análises subsequentes foi aquele em que a solução do OECL apresentou o maior pico de absorção.

## 6.2. Validação do método analítico

A validação do método analítico foi realizada de acordo com as especificações da RDC 166/2017. Por se tratar de um método quantitativo, os parâmetros analíticos avaliados foram: seletividade, linearidade, precisão, precisão intermediária, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez.

### 6.2.1. Seletividade

Para verificar a seletividade do método foram preparadas cinco soluções: uma solução do OECL na concentração de 5  $\mu\text{g/mL}$  em etanol-água (1:1), duas soluções de hidroxipropilmetilcelulose na concentração de 950  $\mu\text{g/mL}$  e duas soluções de goma arábica na concentração de 950  $\mu\text{g/mL}$ , sendo que uma das soluções, tanto de HPMC tanto de GA, foram preparadas em água e a outra em etanol-água (1:1).

Para cada solução obteve-se um espectro de varredura na faixa 200 a 400 nm, com o objetivo de comparar os resultados obtidos. Também foram realizadas varreduras dos solventes utilizados para verificar se estes apresentariam picos de absorção no mesmo comprimento de onda do OECL.

### 6.2.2. Linearidade e faixa de trabalho

Para a determinação da linearidade preparou-se uma solução estoque na concentração de 100 µg/mL do OECL em etanol-água (1:1). A partir desta solução estoque foram preparadas cinco soluções, em triplicata, para assim se obter três curvas de calibração, nas concentrações de 5,0; 7,5; 10,0; 12,5 e 15,0 µg/mL, sendo esta a faixa de trabalho estipulada, ou seja, de 5 a 15 µg/mL.

As leituras das absorvâncias foram determinadas em 240 nm e as curvas foram construídas correlacionando as médias das absorvâncias obtidas em função das concentrações das soluções preparadas.

A partir dos resultados adquiridos das três curvas de calibração obteve-se uma curva de calibração média, assim como a equação da reta, o coeficiente de correlação e o coeficiente de determinação pelo método dos mínimos quadrados ordinários de acordo com o resultado do teste de Cochran realizado.

Para comprovar a significância do coeficiente angular obtido realizou-se o teste F e para verificar se o coeficiente linear é equivalente a zero realizou-se o teste t da Anova utilizando o Excel (Office 365) com um nível de significância de 5%. Através desta mesma ferramenta, realizou-se a análise dos resíduos (gráfico de dispersão dos resíduos) e o teste estatístico de normalidade (gráfico de probabilidade).

### 6.2.3. Limite de detecção e limite de quantificação

Com os dados das curvas de calibração obtidos anteriormente calculou-se o limite de detecção e o limite de quantificação, utilizando as equações 7 e 8, respectivamente, como já descrito nos itens 4.7.6 e 4.7.7.

### 6.2.4. Precisão

A precisão foi avaliada pela análise da repetibilidade e da precisão intermediária. Para avaliar a repetibilidade foram preparadas seis soluções do OECL na concentração de 10 µg/mL em etanol-água (1:1), pelo mesmo analista, nas mesmas condições de operação. Já para avaliar a precisão intermediária o mesmo procedimento foi realizado por um segundo analista, em um dia diferente.

A partir das absorvâncias das soluções calculou-se a média dos valores determinados e o desvio padrão, para assim calcular o desvio padrão relativo conforme equação 4 descrita anteriormente no item 4.7.3.

Para avaliar a proximidade dos resultados obtidos pelos dois analistas, ou seja, se as variâncias e as médias encontradas são estatisticamente iguais ou não, realizou-se o teste F e o teste t através da Anova utilizando o Excel (Office 365) com um nível de significância de 5%. Foi definido como critério de aceitação um desvio padrão relativo menor ou igual a 1,3% (INMETRO, 2020).

#### 6.2.5. Exatidão

Como serão, em um trabalho futuro, produzidos dois tipos de micropartículas (uma usando a HPMC e outra utilizando a GA como agente encapsulante), a análise da exatidão foi realizada para cada polímero, individualmente. Dito isto, a exatidão do método foi determinada pela análise da recuperação do OECL adicionado a soluções contendo os respectivos polímeros em etanol-água (1:1).

Para o preparo da solução estoque de HPMC pesou-se cerca de 0,950 g deste polímero e solubilizou-se em etanol-água (1:1) sob agitação constante. Após completa solubilização foram realizadas diluições para obter a solução estoque na concentração de 950 µg/mL. Para o preparo da solução estoque de GA o mesmo procedimento foi realizado, porém a solução foi centrifugada a 8000 rpm por 40 minutos, em uma centrífuga (Quimis, modelo Q222T2). Para a diluição da GA utilizou-se o sobrenadante obtido na centrifugação até se obter a concentração de 950 µg/mL.

Como especificado na RDC nº 166/2017, a exatidão deve ser verificada com no mínimo nove determinações com três concentrações diferentes (baixa, média e alta) dentro da faixa de linearidade do método, ou seja, deve-se preparar no mínimo três soluções para cada nível de concentração.

Desta forma, preparou-se uma solução estoque de OECL na concentração de 100 µg/mL e desta retirou-se alíquotas de 0,75; 1,0 e 1,25 mL para balões volumétricos de 10 mL, para assim obter concentrações de 7,5; 10,0 e 12,5 µg/mL, sendo preparados três balões para cada alíquota. Na sequência os balões foram preenchidos com as soluções estoque, sendo nove balões preenchidos com a solução estoque de hidroxipropilmetilcelulose e outros nove com a solução estoque de goma arábica, ambas a 950 µg/mL.

Com os resultados das absorvâncias, determinadas em 240 nm, calculou-se a concentração média experimental e, em seguida, a porcentagem de recuperação, pela equação 6 já descrita anteriormente no item 4.7.4, sendo o critério de aceitação

para a recuperação pré-determinado de 83 a 111%, conforme justificado no mesmo item.

#### 6.2.6. Robustez

Como a RDC nº 166/2017 traz que diferentes marcas de reagentes podem ser avaliadas na análise da robustez, realizou-se a leitura de soluções contendo 5 µg/mL do OECL em etanol-água (1:1) preparadas com duas marcas de etanol, em triplicata. Os resultados obtidos foram avaliados pelo teste F através da Anova utilizando o Excel (Office 365) com um nível de significância de 5%.

Além de alterar a marca do reagente utilizado, a estabilidade da solução contendo o óleo essencial de capim-limão dentro de 24 horas foi analisada. Para isto, preparou-se uma solução de 5 µg/mL do OECL em etanol-água (1:1), em triplicata. Realizou-se as leituras das absorbâncias em 240 nm e em seguida a solução foi mantida sob refrigeração por 24 horas. Decorrido este período, foram realizadas novas leituras das absorbâncias em 240 nm e os resultados obtidos foram comparados utilizando-se o teste F através da Anova utilizando o Excel (Office 365) com um nível de significância de 5%.

Se os resultados obtidos nos testes realizados forem estatisticamente semelhantes o método será considerado robusto para as variações das condições analíticas avaliadas.

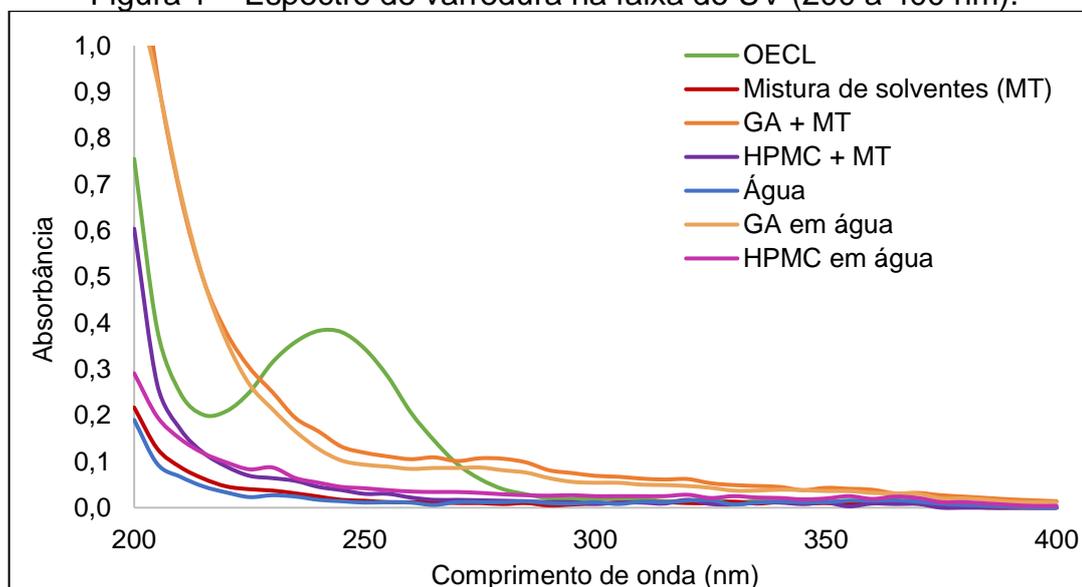
## 7. Resultados e discussão

### 7.1. Seletividade

As concentrações das soluções utilizadas para esta análise foram selecionadas com base em estudos que demonstram uma maior eficiência de encapsulação em micropartículas que possuem maior concentração do agente encapsulante em comparação a porcentagem do óleo essencial utilizada na sua produção (BENAVIDES *et al.*, 2016; HUANG *et al.*, 2020; PILICHEVA *et al.*, 2021). Sendo assim, preparou-se soluções contendo 5 µg/mL do óleo essencial de capim-limão e 950 µg/mL de cada um dos polímeros (considerando a proporção de polímeros e de OECL a ser empregada no preparo das micropartículas e sua respectiva concentração após o preparo das diluições para quantificação).

Na varredura obtida da solução a 5 µg/mL do OECL observou-se um pico de absorção em 240 nm, sendo este o comprimento de onda utilizado nas análises subsequentes. Já as soluções preparadas apenas com os polímeros não apresentaram picos de absorção. A varredura obtida na faixa do UV para todas as soluções está ilustrada na Figura 1.

Figura 1 – Espectro de varredura na faixa do UV (200 a 400 nm).



Fonte: Elaborado pelo autor.

O comprimento de onda obtido na varredura da solução contendo o OECL é diferente dos comprimentos de ondas citados na literatura. Uma hipótese que justifica este resultado pode ser atribuída ao fato dos óleos essenciais terem variações nas suas composições químicas de acordo com o método de secagem e

extração empregada, além do quimiotipo da planta utilizada para a obtenção do óleo (COSTA *et al.*, 2005; SANTOS *et al.*, 2014).

Deve-se considerar também o tipo de solvente empregado na análise, visto que os solventes utilizados nos estudos citados na literatura não foram os mesmos utilizados neste trabalho, e com isto o deslocamento do comprimento de onda pode ser justificável devido a esta alteração (SOUZA *et al.*, 2019).

Com estes resultados o método pode ser considerado seletivo, pois a mistura de solventes e as soluções contendo os polímeros não possuíram absorção na faixa avaliada, ou seja, o método apresentou-se seletivo para a quantificação do OECL.

Por fim, com o resultado da varredura da solução contendo 5 µg/mL de óleo essencial de capim-limão, estipulou-se uma faixa de trabalho de 5 a 15 µg/mL para a execução das curvas de calibração.

## 7.2. Linearidade e faixa de trabalho

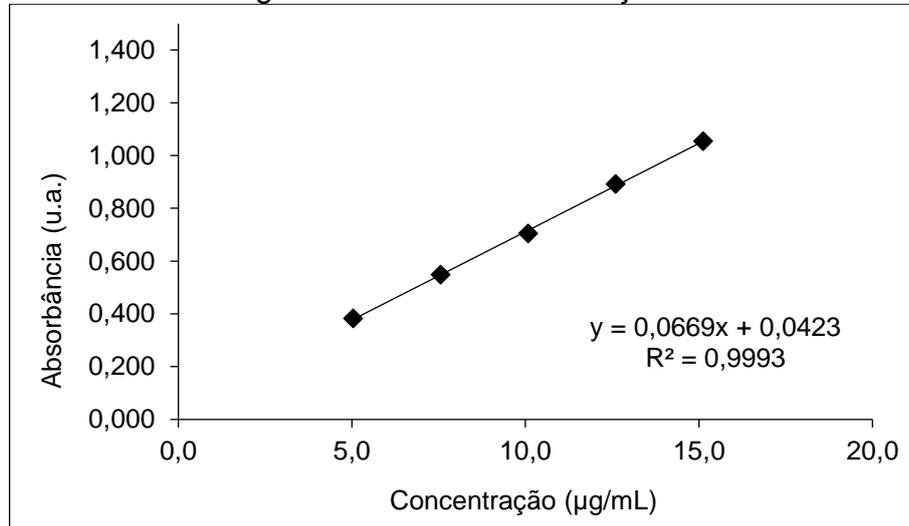
A faixa de trabalho para este estudo foi estipulada entre 5 e 15 µg/mL com base na varredura realizada anteriormente e levando em conta as variações das concentrações do óleo essencial utilizadas para a produção das micropartículas.

Para avaliar qual modelo matemático usar (MMQO ou MMQP) para obter a equação da reta e realizar a análise de variância, avaliou-se a homoscedasticidade dos dados obtidos através do teste de Cochran, considerando um nível de significância de 5%. Através da análise de regressão obteve-se um C calculado igual a 0,014, sendo o valor crítico tabelado igual a 0,335 (ANVISA, 2017). Como o C calculado obtido é menor que o C tabelado aceita-se a hipótese nula e considera-se os dados como homocedásticos, ou seja, deve-se utilizar o método dos mínimos quadrados ordinários para a análise de variância não sendo necessário ponderar os dados obtidos.

Com isto, foram construídas três curvas de calibração na faixa de 5 a 15 µg/mL, onde os resultados obtidos foram avaliados por meio de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados ordinários. Na curva de calibração 1 (Figura 2) a equação da reta obtida foi  $y = 0,0669x + 0,0423$ , com um coeficiente de determinação igual a 0,9993 e o coeficiente de correlação igual a 0,9996. Na curva de calibração 2 (Figura 3) a equação da reta obtida foi  $y = 0,0689x + 0,0127$ , com um coeficiente de determinação igual a 0,9994 e o coeficiente de correlação igual a

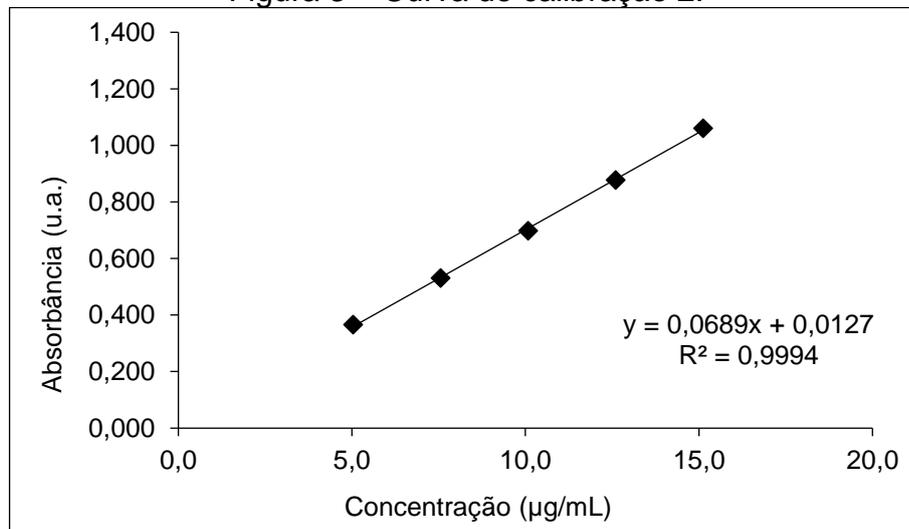
0,9997. Já na curva de calibração 3 (Figura 4) a equação da reta obtida foi  $y = 0,0729x - 0,0369$ , com um coeficiente de determinação igual a 0,9999 e o coeficiente de correlação igual a 0,9999.

Figura 2 – Curva de calibração 1.



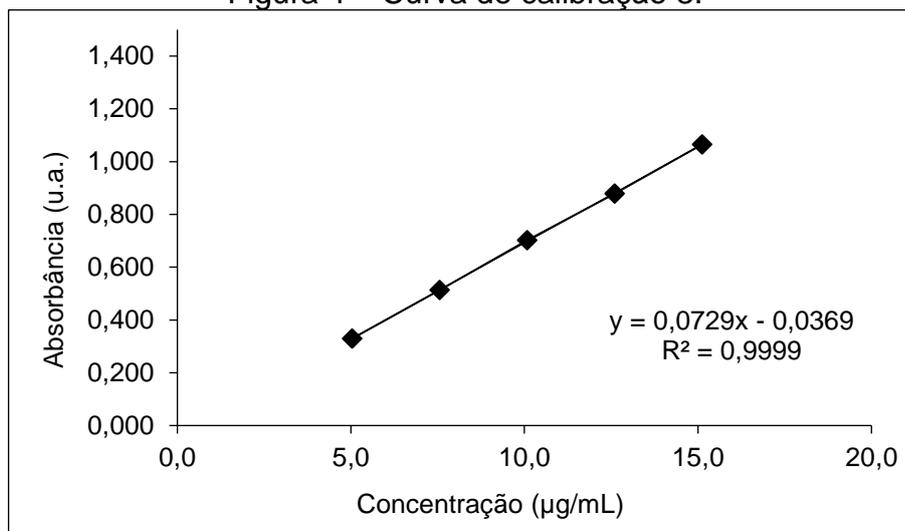
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 3 – Curva de calibração 2.



Fonte: Elaborado pelo autor.

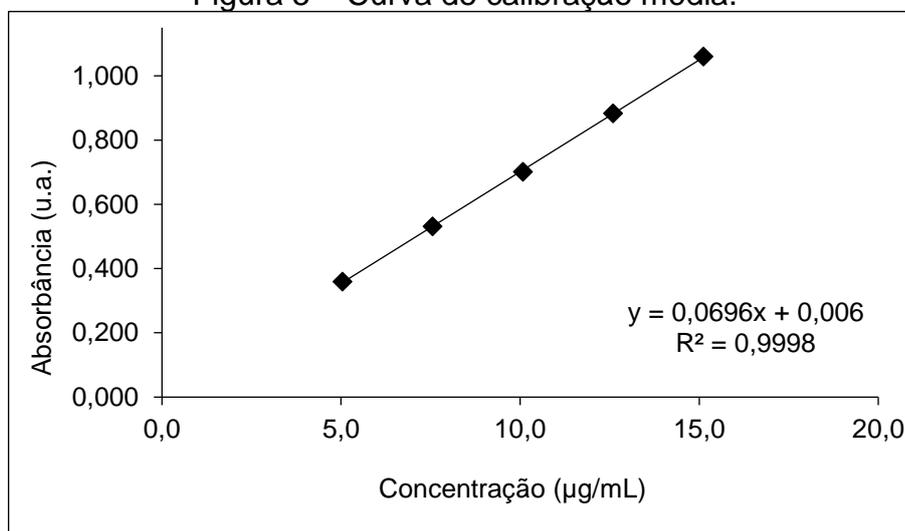
Figura 4 – Curva de calibração 3.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A partir dos resultados das três curvas obteve-se uma curva de calibração média (Figura 5) onde a equação da reta obtida foi  $y = 0,0696x + 0,006$ , com um coeficiente de determinação igual a 0,9998 e um coeficiente de correlação igual a 0,9999.

Figura 5 – Curva de calibração média.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Avaliando visualmente a curva de calibração média observa-se que os pontos estão equidistantes e que os valores de x e y aumentam proporcionalmente. A partir desta curva também pode-se avaliar o coeficiente de correlação, onde este apresenta-se maior que 0,990, ou seja, pode-se dizer que o método é linear.

Contudo, seguindo o Guia nº 10/2017 da ANVISA, para concluir que o método é linear deve-se comprovar a significância do coeficiente angular e verificar se o coeficiente linear é equivalente a zero. Para isto realizou-se uma análise de dados por regressão no Excel (Office 365), no qual obteve-se os resultados apresentados nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1 – Resultados da Anova para o teste F.

	<b>Graus de Liberdade</b>	<b>Soma dos Quadrados</b>	<b>Quadrados médios</b>	<b>F</b>
<b>Regressão</b>	1	0,92139	0,92139	4439,84
<b>Resíduo</b>	13	0,00270	0,00021	-
<b>Total</b>	14	0,92409	-	-

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 2 – Resultados da Anova para o teste t.

	<b>Coefficiente linear</b>	<b>Erro padrão</b>	<b>Valor t</b>	<b>p-valor</b>
<b>Intersecção</b>	0,006	0,011	0,55	0,59

Fonte: Elaborada pelo autor.

Avaliando o resultado obtido no teste F rejeita-se a hipótese de que o coeficiente angular é igual zero e assume-se que  $y$  varia em função de  $x$ , pois obteve-se um  $F$  calculado (4439,84) maior que o valor crítico tabelado (4,67) para um nível de significância de 5%, sendo assim o método é considerado linear (MORETTIN; BUSSAB, 2010).

Com relação aos resultados do teste  $t$  obteve-se um  $t$  calculado de 0,55, sendo menor que o  $t$  tabelado (2,14) para um nível de significância de 5%. Com isto aceita-se a hipótese nula e assume-se que o coeficiente linear é equivalente a zero (MORETTIN; BUSSAB, 2010). Este resultado se confirma ao avaliar o  $p$ -valor, onde obteve-se um  $p$ -valor de 0,59, ou seja, maior que o nível de significância ( $\alpha = 0,05$ ), e com isto aceita-se a hipótese nula e assume-se que o intercepto é equivalente a zero.

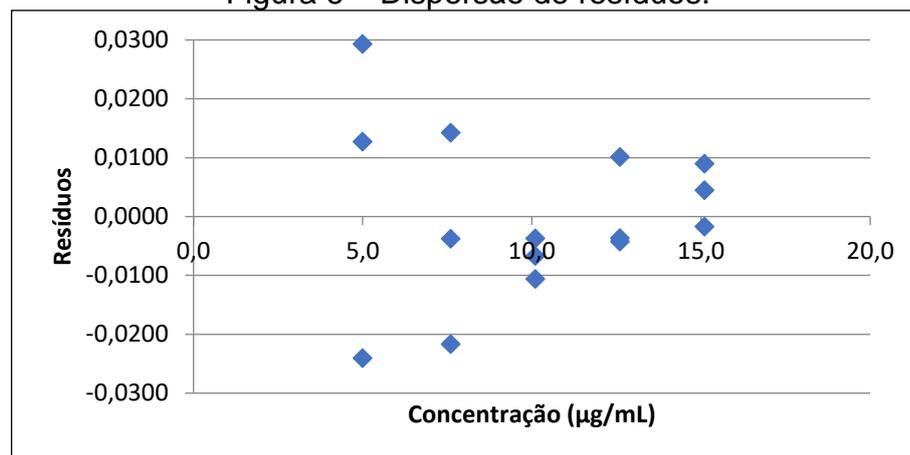
Através da análise de dados por regressão no Excel (Office 365) obteve-se os resultados da análise de resíduos (Tabela 3), onde a partir destes plotou-se o gráfico de dispersão de resíduos ilustrado na Figura 6. O teste estatístico de normalidade também foi obtido pela análise dos dados por regressão no Excel (Office 365), no qual o resultado obtido está representado na Figura 7.

Tabela 3 – Resultados da análise de resíduos.

Observações	Absorbância prevista	Absorbância observada	Resíduos
1	0,3538	0,3832	0,0294
2	0,3538	0,3666	0,0128
3	0,3538	0,3298	-0,0240
4	0,5346	0,5489	0,0143
5	0,5346	0,5309	-0,0037
6	0,5346	0,5130	-0,0216
7	0,7085	0,7048	-0,0037
8	0,7085	0,6979	-0,0106
9	0,7085	0,7018	-0,0067
10	0,8823	0,8781	-0,0043
11	0,8823	0,8925	0,0101
12	0,8823	0,8787	-0,0037
13	1,0562	1,0545	-0,0017
14	1,0562	1,0607	0,0045
15	1,0562	1,0652	0,0090

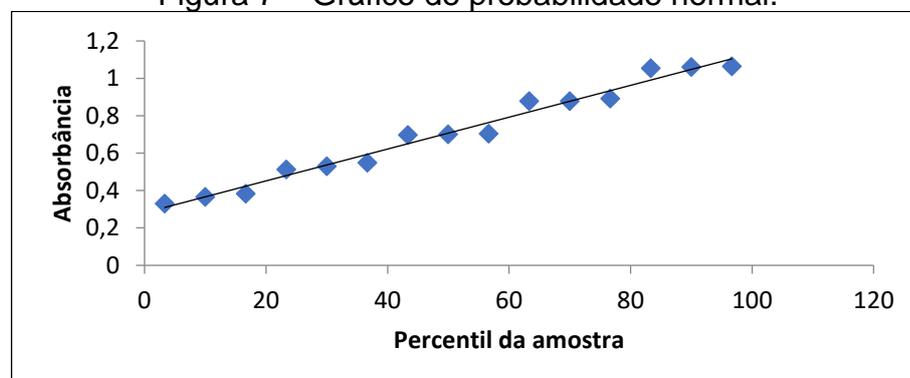
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 6 – Dispersão de resíduos.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 7 – Gráfico de probabilidade normal.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Analisando visualmente o gráfico de dispersão de resíduos percebe-se que eles estão distribuídos próximos ao zero, porém há uma variância perceptivelmente

maior nas menores concentrações. O ideal seria os resíduos estarem aleatoriamente distribuídos próximos ao zero sem estes desvios muito discrepantes (MORETTIN; BUSSAB, 2010).

Avaliando o gráfico de probabilidade normal visualiza-se que os dados estão dispostos ao longo de uma reta, sendo assim os resíduos são considerados normalmente distribuídos (MORETTIN; BUSSAB, 2010).

Com os resultados obtidos da equação da reta, do coeficiente de correlação, do teste F e do teste t, o método pode ser considerado linear dentro da faixa de trabalho avaliada.

### 7.3. Limite de detecção e Limite de quantificação

A partir dos dados obtidos na curva de calibração média calculou-se o LD e o LQ conforme as equações 7 e 8.

Como resultado obteve-se um limite de detecção de 0,7 µg/mL e um limite de quantificação de 2,3 µg/mL, ou seja, através desta metodologia é possível detectar uma concentração de no mínimo 0,7 µg/mL de óleo essencial de capim-limão na amostra. Contudo, para afirmar que esta metodologia pode quantificar, com precisão e exatidão, o OECL a partir de 2,3 µg/mL, deve-se testar esta concentração nas análises de precisão e exatidão (ANVISA, 2017).

### 7.4. Repetibilidade e precisão intermediária

Os resultados obtidos por cada um dos analistas estão descritos nas Tabelas 4 e 5.

Tabela 4 – Resultados da análise da repetibilidade obtidos pelo primeiro analista.

Concentração teórica (µg/mL)	Concentração experimental (µg/mL)	Concentração média experimental (µg/mL)	Desvio padrão	DPR (%)
10,0	10,21	10,20	0,05	0,53
	10,11			
	10,17			
	10,21			
	10,27			
	10,24			

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 5 – Resultados da análise da repetibilidade obtidos pelo segundo analista.

Concentração teórica (µg/mL)	Concentração experimental (µg/mL)	Concentração média experimental (µg/mL)	Desvio padrão	DPR (%)
10,0	10,23	10,35	0,08	0,81
	10,47			
	10,36			
	10,29			
	10,41			
	10,35			

Fonte: Elaborada pelo autor.

Avaliando os resultados obtidos pelo primeiro analista pode-se afirmar que o método é considerado preciso no nível de repetibilidade devido ao desvio padrão relativo obtido de 0,53% ser menor que o critério de aceitação estipulado de 1,3%. O mesmo se aplica aos resultados do segundo analista, visto que este obteve um desvio padrão relativo de 0,81%.

Com relação à precisão intermediária foram realizados o teste F e o teste t para a comparação das variâncias e das médias obtidas pelos dois analistas, utilizando a ferramenta de análise de dados do Excel (Office 365) com um nível de significância de 5%. Os dados obtidos nestes testes estão descritos nas Tabelas 6 e 7.

Tabela 6 – Resultados do Teste F para a análise da precisão intermediária.

	Variável 1	Variável 2
<b>Média</b>	10,20	10,35
<b>Variância</b>	0,003	0,007
<b>Observações</b>	6	6
<b>Graus de Liberdade</b>	5	5
<b>F calculado</b>	0,43	-
<b>F tabelado (uni-caudal)</b>	5,05	-

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 7 – Resultados do Teste t para a análise da precisão intermediária.

	Variável 1	Variável 2
<b>Média</b>	10,20	10,35
<b>Variância</b>	0,003	0,007
<b>Observações</b>	6	6
<b>Hipótese da diferença de média</b>	0	-
<b>Graus de Liberdade</b>	10	-
<b>t calculado</b>	-3,66	-
<b>t tabelado (bi-caudal)</b>	2,23	-

Fonte: Elaborada pelo autor.

Avaliando o resultado obtido no teste F observa-se que o F calculado é menor que o F tabelado, sendo assim a variação dos resultados obtidos pelos analistas 1 e 2 são estatisticamente semelhantes. Já com relação ao resultado obtido no teste t, obteve-se um t calculado menor que o t tabelado, sendo assim considera-se que as médias obtidas pelos dois analistas são estatisticamente semelhantes.

Com as análises estatísticas demonstrando que não há diferença estatisticamente significativa nos resultados obtidos pelos dois analistas, pode-se afirmar que a variação das médias depende da concentração real do analito na amostra e não devido à presença de erros aleatórios.

#### 7.5. Exatidão

As médias das recuperações do OECL na solução de HPMC foram de 102,6; 101,5 e 100,7% para as concentrações de 7,6; 10,1 e 12,6 µg/mL, respectivamente, conforme demonstrado na Tabela 8.

Tabela 8 – Resultados obtidos na análise da exatidão, através dos percentuais de recuperação do OECL adicionado à solução de HPMC.

Concentração teórica (µg/mL)	Concentração experimental (µg/mL)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)	Desvio padrão
7,6	7,6	101,3	102,6	1,5
	7,7	102,3		
	7,8	104,3		
10,1	10,1	100,7	101,5	0,8
	10,2	101,4		
	10,3	102,4		
12,6	12,5	99,3	100,7	1,9
	12,9	102,9		
	12,5	99,8		

Fonte: Elaborada pelo autor.

Já para recuperação do OECL adicionado à solução de goma arábica, a média das recuperações foram de 108,2; 104,4 e 104,0% para as concentrações de 7,6; 10,1 e 12,6 µg/mL, respectivamente, conforme demonstrado na Tabela 9.

Tabela 9 – Resultados obtidos na análise da exatidão, através dos percentuais de recuperação do OECL adicionado à solução de goma arábica.

Concentração teórica (µg/mL)	Concentração experimental (µg/mL)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)	Desvio padrão
7,6	8,0	105,4	108,2	2,4
	8,3	109,6		
	8,3	109,6		
10,1	10,3	101,9	104,4	2,2
	10,6	105,2		
	10,7	106,1		
12,6	12,8	101,8	104,0	2,3
	13,1	103,7		
	13,4	106,5		

Fonte: Elaborada pelo autor.

O critério de aceitação pré-estabelecido para a exatidão foi de 83 a 111% de recuperação, sendo assim os resultados obtidos estão dentro da faixa de aceitação estipulada para os dois tipos de micropartículas a serem produzidas e, com isto, o método é considerado exato.

#### 7.6. Robustez

Os resultados obtidos das leituras das soluções contendo 5 µg/mL do OECL em etanol-água (1:1) preparadas com diferentes marcas de reagente estão descritas na tabela 10. Os resultados obtidos no teste F, para esta variação da condição analítica, estão descritos na Tabela 11.

Tabela 10 – Resultados obtidos na análise da robustez utilizando diferentes marcas de reagentes.

	Marca A	Marca B
Concentração teórica (µg/mL)	5,5	5,0
Concentração experimental (µg/mL)	5,6	5,6
	5,3	5,4
	5,1	4,8
Concentração experimental média (µg/mL)	5,3	5,3
Desvio padrão	0,26	0,39

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 11 – Resultados do Teste F para análise da robustez variando-se as marcas de reagente utilizadas.

	Variável 1	Variável 2
<b>Média</b>	5,3	5,3
<b>Variância</b>	0,07	0,15
<b>Observações</b>	3	3
<b>Graus de Liberdade</b>	2	2
<b>F calculado</b>	0,47	-
<b>F tabelado (uni-caudal)</b>	19	-

Fonte: Elaborada pelo autor.

Avaliando os dados obtidos observa-se que o F calculado é menor que o F tabelado, sendo assim aceita-se a hipótese nula e assume-se que os dados são estatisticamente semelhantes. Dito isto, pode-se afirmar que a marca do reagente utilizado não exerceu influência sobre os resultados obtidos.

Os resultados das leituras da solução contendo 5 µg/mL do óleo essencial de capim-limão no tempo zero e em 24 horas estão descritas na Tabela 12 e os resultados obtidos no teste F, para esta condição analítica, estão representados na Tabela 13.

Tabela 12 – Resultados obtidos na análise da estabilidade da solução contendo 5µg/mL do óleo essencial de capim-limão.

	Tempo 0	24 horas
<b>Concentração teórica (µg/mL)</b>	5,0	5,0
<b>Concentração experimental (µg/mL)</b>	5,0	5,5
	5,3	5,5
	5,1	5,7
<b>Concentração experimental média (µg/mL)</b>	5,1	5,6
<b>Desvio padrão</b>	0,14	0,10

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 13 – Resultados do Teste F para análise da estabilidade da solução contendo 5µg/mL do óleo essencial de capim-limão.

	Variável 1	Variável 2
<b>Média</b>	5,1	5,6
<b>Variância</b>	0,02	0,01
<b>Observações</b>	3	3
<b>Graus de Liberdade</b>	2	2
<b>F calculado</b>	2,1	-
<b>F tabelado (uni-caudal)</b>	19	-

Fonte: Elaborada pelo autor.

Avaliando os dados obtidos observa-se que o F calculado é menor que o F tabelado, sendo assim aceita-se a hipótese nula e assume-se que os dados são estatisticamente semelhantes. Dito isto, pode-se afirmar que a solução avaliada se mantém estável dentro de 24 horas, sob refrigeração, e com isso o método é considerado robusto pois não há variação estatisticamente significativa nos resultados obtidos.

## 8. Conclusão

O método analítico utilizado para a quantificação do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon flexuosus*) obteve resultados satisfatórios em todos os parâmetros analíticos avaliados.

O método apresentou-se seletivo, demonstrando que a quantificação do OECL ocorre sem a interferência de outros componentes presentes na amostra; linear, no qual os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito presente na amostra; preciso, demonstrando que os resultados são reproduzíveis através da proximidade dos valores obtidos pela análise da repetibilidade e precisão intermediária; exato, exibindo concordância nos resultados obtidos com o valor considerado verdadeiro; e robusto, comprovando que o método não sofre variações nos resultados obtidos quando se utiliza a mesma solução do OECL dentro de 24 horas e quando troca-se a marca do etanol utilizada no preparo da mistura de solventes.

Destaca-se que o ideal seria ter realizado ensaios com as micropartículas prontas. No entanto, alguns imprevistos impossibilitaram o preparo das micropartículas antes da finalização deste trabalho. Se necessário, a complementação das análises poderá ser realizada em outro momento. De qualquer forma, o método proposto pode ser considerado validado e poderá ser aplicado na quantificação do OECL em micropartículas.

## Referências

- ALENCAR, Denise Dantas de Oliveira *et al.* Microencapsulation of *Cymbopogon citratus* D.C. Stapf Essential Oil with Spray Drying: development, characterization, and antioxidant and antibacterial activities. **Foods**, [S.L.], v. 11, n. 8, p. 1111, 13 abr. 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9031753/>. Acesso em: 01 jun. 2022.
- ANTONIOLI, Gabriela *et al.* Poly(lactic acid) nanocapsules containing lemongrass essential oil for postharvest decay control: in vitro and in vivo evaluation against phytopathogenic fungi. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 326, p. 126997, out. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32422511/>. Acesso em: 01 jun. 2022.
- ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia nº 10/2017: Guia para tratamento estatístico da validação analítica**. 2017.
- ANVISA, **RDC nº 166, de 24 de julho de 2017**. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Diário oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 24 jul. 2017.
- ARAÚJO, Jayuri Susy Fernandes de *et al.* Microencapsulation of sweet orange essential oil (*Citrus aurantium* var. *dulcis*) by liophylization using maltodextrin and maltodextrin/gelatin mixtures: preparation, characterization, antimicrobial and antioxidant activities. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [S.L.], v. 143, p. 991-999, jan. 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813019359422?via%3Dihub#b0145>. Acesso em: 28 ago. 2022.
- ARAUJO, Pedro. Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. **Journal Of Chromatography B**, [S.L.], v. 877, n. 23, p. 2224-2234, ago. 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18929516/>. Acesso em: 16 fev. 2022.
- ASBAHANI, A. El *et al.* Essential oils: from extraction to encapsulation. **International Journal Of Pharmaceutics**, [S.L.], v. 483, n. 1-2, p. 220-243, abr. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.12.069>. Acesso em: 02 maio 2022.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR ISO/IEC 17025**: Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração. ABNT, 2017.
- AVOSEH, Opeyemi *et al.* *Cymbopogon* Species; Ethnopharmacology, Phytochemistry and the Pharmacological Importance. **Molecules**, [S.L.], v. 20, n. 5, p. 7438-7453, 23 abr. 2015. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/20/5/7438/htm>. Acesso em: 28 ago. 2022.

BAKKALI, F. *et al.* Biological effects of essential oils – A review. **Food And Chemical Toxicology**, [S.L.], v. 46, n. 2, p. 446-475, fev. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>. Acesso em: 02 maio 2022.

BENAVIDES, Sergio *et al.* Development of alginate microspheres containing thyme essential oil using ionic gelation. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 204, p. 77-83, ago. 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814616302746?via%3Dihub>. Acesso em: 01 jun. 2022.

BOUKHATEM, Mohamed Najib *et al.* Lemon grass (*Cymbopogon citratus*) essential oil as a potent anti-inflammatory and antifungal drugs. **Libyan Journal Of Medicine**, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 25431, jan. 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4170112/>. Acesso em: 17 ago. 2022.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Farmacopeia Brasileira**: monografias plantas medicinais. 6. ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2019. 745 P. 2 v. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/farmacopeia-brasileira>. Acesso em: 15 ago. 2022.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Guia de validação e controle de qualidade analítica: fármacos em produtos para alimentação e medicamentos veterinários**. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, 2011. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/laboratorios/arquivos-publicacoes-laboratorio/guia-de-validacao-controle-de-qualidade-analitica.pdf>. Acesso em: 24 maio 2022.

BRITO, Natilene Mesquita *et al.* VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS: estratégia e discussão. **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, [S.L.], v. 13, p. 130-146, 31 dez. 2003. Universidade Federal do Parana. Disponível em: <https://revistas.ufpr.br/pesticidas/article/view/3173>. Acesso em: 23 maio 2022.

CARVALHO, I. T. *et al.* Application of microencapsulated essential oils in cosmetic and personal healthcare products - a review. **International Journal Of Cosmetic Science**, [S.L.], v. 38, n. 2, p. 109-119, 25 maio 2015. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ics.12232>. Acesso em: 20 maio 2022.

COSTA, Larissa C. do B. *et al.* Secagem e fragmentação da matéria seca no rendimento e composição do óleo essencial de capim-limão. **Horticultura Brasileira**, [S.L.], v. 23, n. 4, p. 956-959, dez. 2005. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/hb/a/rDVgPJy4ZjyxGJzpzCB8vbg/?lang=pt>. Acesso em: 30 maio 2022.

GANJEWALA, D.. Cymbopogon essential oils: chemical compositions and bioactivities. **International Journal Of Essential Oil Therapeutics**. Vellore, p. 56-65. 2009. Disponível em: <http://www.theoildropper.com/wp-content/uploads/2014/07/lemongrass-study.pdf>. Acesso em: 21 out. 2022.

GARAVAND, Farhad *et al.* Encapsulation of phenolic compounds within nano/microemulsion systems: a review. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 364, p. 130376,

dez. 2021. Disponível em:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814621013820?via%3Dihub>.  
Acesso em: 19 maio 2022.

GUIMARÃES, Luiz Gustavo de Lima *et al.* Atividades antioxidante e fungitóxica do óleo essencial de capim-limão e do citral. **Revista Ciência Agronômica**, [S.L.], v. 42, n. 2, p. 464-472, jun. 2011. Disponível em:  
<https://www.scielo.br/j/rca/a/MjxmmxfFtg3WXB5p3WtLPJp/?lang=pt>. Acesso em: 30 maio 2022.

HASHEMINEJAD, Nayeresadat *et al.* Improving the antifungal activity of clove essential oil encapsulated by chitosan nanoparticles. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 275, p. 113-122, mar. 2019. Disponível em:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030881461831656X?via%3Dihub>. Acesso em: 15 ago. 2022.

HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, Elvia *et al.* Microencapsulation, Chemical Characterization, and Antimicrobial Activity of Mexican (*Lippia graveolens*H.B.K.) and European (*Origanum vulgare*L.) Oregano Essential Oils. **The Scientific World Journal**, [S.L.], v. 2014, p. 1-12, 2014. Disponível em:  
<https://www.hindawi.com/journals/tswj/2014/641814/>. Acesso em: 28 ago. 2022.

HUANG, Haohe *et al.* Preparation and characterization of  $\beta$ -cyclodextrin-oregano essential oil microcapsule and its effect on storage behavior of purple yam. **Journal Of The Science Of Food And Agriculture**, [S.L.], v. 100, n. 13, p. 4849-4857, 2 jul. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32476141/>. Acesso em: 15 ago. 2022.

INMETRO. DOQ-CGCRE-008. **Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos**: Documento de caráter orientativo. INMETRO, jun. 2020. Disponível em: [http://www.inmetro.gov.br/monitoramento\\_BPL/documentos\\_aplic.asp?tOrganismo=Inspetores-BPL](http://www.inmetro.gov.br/monitoramento_BPL/documentos_aplic.asp?tOrganismo=Inspetores-BPL) . Acesso em: 02 nov. 2022.

JYOTHI, N. Venkata Naga *et al.* Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency. **Journal Of Microencapsulation**, [S.L.], v. 27, n. 3, p. 187-197, maio 2010. Disponível em:  
<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/02652040903131301>. Acesso em: 19 maio 2022.

KUMAR, Akshay *et al.* Assessing the efficacy of chitosan nanomatrix incorporated with *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf essential oil against the food-borne molds and aflatoxin B1 production in food system. **Pesticide Biochemistry And Physiology**, [S.L.], v. 180, p. 105001, jan. 2022. Disponível em:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34955184/>. Acesso em: 01 jun. 2022.

LEIMANN, Fernanda V. *et al.* Antimicrobial activity of microencapsulated lemongrass essential oil and the effect of experimental parameters on microcapsules size and morphology. **Materials Science And Engineering: C**, [S.L.], v. 29, n. 2, p. 430-436, mar. 2009. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493108002129>. Acesso em: 30 maio 2022.

LI, Chunlian *et al.* A comparative study on chemical compositions and biological activities of four essential oils: cymbopogon citratus (dc.) stapf, cinnamomum cassia (l.) presl, salvia japonica thunb. and rosa rugosa thunb.. **Journal Of Ethnopharmacology**, [S.L.], v. 280, p. 114472, nov. 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34332066/>. Acesso em: 17 ago. 2022.

LIMA, Laysa Rocha *et al.* Anti-acetylcholinesterase and toxicity against Artemia salina of chitosan microparticles loaded with essential oils of Cymbopogon flexuosus, Pelargonium x ssp and Copaifera officinalis. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [S.L.], v. 167, p. 1361-1370, jan. 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813020350157?via%3Dihub>. Acesso em: 15 ago. 2022.

MAMUSA, Marianna *et al.* Encapsulation of volatile compounds in liquid media: fragrances, flavors, and essential oils in commercial formulations. **Advances In Colloid And Interface Science**, [S.L.], v. 298, p. 102544, dez. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cis.2021.102544>. Acesso em: 11 maio 2022.

MARTINS, Wanderson da Silva *et al.* Lemongrass (Cymbopogon citratus DC. Stapf) essential oil microparticles: development, characterization, and antioxidant potential. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 355, set. 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33799254/>. Acesso em: 26 maio 2022.

MAYAUD, L. *et al.* Comparison of bacteriostatic and bactericidal activity of 13 essential oils against strains with varying sensitivity to antibiotics. **Letters In Applied Microbiology**, [S.L.], v. 47, n. 3, p. 167-173, set. 2008. Disponível em: <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1472-765X.2008.02406.x?src=getftr>. Acesso em: 10 set. 2022.

MILLEZI, Alessandra Farias *et al.* In vitro antimicrobial properties of plant essential oils thymus vulgaris, cymbopogon citratus and laurus nobilis against five important foodborne pathogens. **Food Science And Technology**, [S.L.], v. 32, n. 1, p. 167-172, 24 fev. 2012. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cta/a/xQF9FgQCWm6ttTG7TgzDxNc/?lang=en>. Acesso em: 07 set. 2022.

MOEIN, Mohammad Mahdi *et al.* Bioanalytical method development and validation: critical concepts and strategies. **Journal Of Chromatography B**, [S.L.], v. 1043, p. 3-11, fev. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27720355/>. Acesso em: 21 maio 2022.

MORETTIN, Pedro Alberto; BUSSAB, Wilton de O.. **ESTATÍSTICA BÁSICA**. 6. ed. São Paulo: Saraiva, 2010.

MÖRSCHBÄCHER, Ana Paula *et al.* Validation of an analytical method for the quantitative determination of selenium in bacterial biomass by ultraviolet-visible spectrophotometry. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 255, p. 182-186, jul. 2018. Disponível

em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814618302930>. Acesso em: 22 out. 2022.

NHAN, Nguyen Phu Thuong *et al.* Microencapsulation of Lemongrass (*Cymbopogon citratus*) Essential Oil Via Spray Drying: effects of feed emulsion parameters.

**Processes**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 40, 1 jan. 2020. Disponível em:

<https://www.mdpi.com/2227-9717/8/1/40>. Acesso em: 21 out. 2022.

PANDINI, J. A. *et al.* Chemical composition, antimicrobial and antioxidant potential of the essential oil of *Guarea kunthiana* A. Juss. **Brazilian Journal Of Biology**, [S.L.], v. 78, n. 1, p. 53-60, 27 jul. 2017. Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/bjb/a/vSkgXLDtqVFNsMrS3d8jMND/?lang=en>. Acesso em: 10 set. 2022.

PEREIRA, Keyla Carvalho *et al.* Microencapsulação e liberação controlada por difusão de ingredientes alimentícios produzidos através da secagem por atomização: revisão. **Brazilian Journal Of Food Technology**, [S.L.], v. 21, 14 jun. 2018.

Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjft/a/grd6gfXLgGSqTqqwcGGkxYb/?lang=pt>. Acesso em: 25 maio 2022.

PIACENTINI, Emma *et al.* Encapsulation Efficiency. **Encyclopedia Of Membranes**, [S.L.], p. 706-707, 2016. Disponível em:

[https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/978-3-662-44324-8\\_1945#howtocite](https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/978-3-662-44324-8_1945#howtocite). Acesso em: 19 maio 2022.

PILICHEVA, Bissera *et al.* Comparative Study on Microencapsulation of Lavender (*Lavandula angustifolia* Mill.) and Peppermint (*Mentha piperita* L.) Essential Oils via Spray-Drying Technique. **Molecules**, [S.L.], v. 26, n. 24, p. 7467, 9 dez. 2021.

Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/26/24/7467/htm>. Acesso em: 28 ago. 2022.

PINTO, D. A. *et al.* Produtividade e qualidade do óleo essencial de capim-limão, *Cymbopogon citratus*, DC., submetido a diferentes lâminas de irrigação. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v. 16, n. 1, p. 54-61, jun. 2014.

Disponível em: chrome-

extension://efaidnbmnnnibpajpcgclefindmkaj/<https://www.scielo.br/j/rbpm/a/yXNNBNvks3r6rSNZtNxVP4d/?lang=pt&format=pdf>. Acesso em: 28 ago. 2022.

PRINS, Cláudia Lopes *et al.* Efeitos do confinamento do sistema radicular sobre capim-limão (*Cymbopogon citratus*). **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 39, n. 3, p. 416-421, set. 2008. Disponível em:

<http://ccarevista.ufc.br/seer/index.php/ccarevista/article/view/80/75>. Acesso em: 28 ago. 2022.

RADÜNZ, Marjana *et al.* Antimicrobial and antioxidant activity of unencapsulated and encapsulated clove (*Syzygium aromaticum*, L.) essential oil. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 276, p. 180-186, mar. 2019. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814618317588?via%3Dihub>. Acesso em: 15 ago. 2022.

SANTOS, M. S. *et al.* **Extração e caracterização físico-química do óleo essencial de capim limão (*Cymbopogon citratus*)**. 54º Congresso Brasileiro de Química. Natal, 2014. Disponível em: <http://www.abq.org.br/cbq/2014/trabalhos/13/4817-16698.html>. Acesso em: 15 ago. 2022.

SHAMAEI, Samira *et al.* Microencapsulation of walnut oil by spray drying: effects of wall material and drying conditions on physicochemical properties of microcapsules. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, [S.L.], v. 39, p. 101-112, fev. 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1466856416307184?via%3Dihub>. Acesso em: 15 ago. 2022.

SILVA, Jéssica Thaís do Prado *et al.* Analytical validation of an ultraviolet–visible procedure for determining lutein concentration and application to lutein-loaded nanoparticles. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 230, p. 336-342, set. 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814617304387?via%3Dihub#b0175>. Acesso em: 25 maio 2022.

SILVA-BUZANELLO, Rosana Aparecida da; FERRO, Ana Caroline; BONA, Evandro; CARDOZO-FILHO, Lúcio; ARAÓJO, Pedro Henrique Hermes de; LEIMANN, Fernanda Vitória; GONÇALVES, Odinei Hess. Validation of an Ultraviolet–visible (UV–Vis) technique for the quantitative determination of curcumin in poly(l-lactic acid) nanoparticles. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 172, p. 99-104, abr. 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814614013831?via%3Dihub#b0150>. Acesso em: 22 out. 2022.

SOUSA, Andryne Veras de *et al.* ÓLEO ESSENCIAL DE CAPIM LIMÃO: UMA REVISÃO. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DA AGROINDÚSTRIA, 1., 2020, Recife. **Ciências, tecnologia e inovação: do campo à mesa**. [S.L.]: IIVD, 2020. Disponível em: <https://ciagro.institutoidv.org/anais.php>. Acesso em: 28 ago. 2022.

SOUSA, Vânia Isabel *et al.* Microencapsulation of Essential Oils: a review. **Polymers**, [S.L.], v. 14, n. 9, p. 1730, 23 abr. 2022. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4360/14/9/1730/htm>. Acesso em: 20 maio 2022.

SOUZA, Michele *et al.* INVESTIGAÇÃO DO SOLVATOCROMISMO E IONOCROMISMO DO CORANTE AZUL DO NILO ATRAVÉS DAS ESPECTROSCOPIAS RAMAN, INFRAVERMELHO E UV-VIS. **Química Nova**, [S.L.], ago. 2019. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/FcmRVGRy4BgbRknwTnHMZNq/?lang=pt#>. Acesso em: 28 nov. 2022.

TAVERNIERS, Isabel *et al.* Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. **Trac Trends In Analytical Chemistry**, [S.L.], v. 23, n. 8, p. 535-552, set. 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2004.04.001>. Acesso em: 02 maio 2022.

TIWARI, Brijesh K. *et al.* Application of Natural Antimicrobials for Food Preservation. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [S.L.], v. 57, n. 14, p.

5987-6000, 23 jun. 2009. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf900668n>.  
Acesso em: 07 set. 2022.