

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

OTIMIZAÇÃO NO PREPARO DO COMPLEXO DE INCLUSÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Psidium cattleianum* S. EM HP β CD

Luiza Alves Mendes¹, Rafael Resende Assis Silva², Loren Cristina Vasconcelos³, Róbson Ricardo Teixeira¹, Marcia Flores da Silva Ferreira³, Renata Pereira Lopes Moreira¹.

¹Universidade Federal de Viçosa (UFV). Av. Peter Henry Rolfs, s/n, Campus Universitário, 36.570-000 Viçosa – MG, Brasil, luiza.alves@ufv.br (L.A.M), robsonr.teixeira@ufv.br (R.R.T.), renata.plopes@ufv.br (R.P.L.).

²Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Rod. Washington Luiz, s/n, 13565-905 São Carlos – SP, Brasil, rafael.resendeas@gmail.com (R.R.A.S.).

³Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). Alto Universitário, s/n, Guararema, 29.500-000 Alegre – ES, Brasil, loren-vasconcelos@hotmail.com (L.C.V.), mfloressf@gmail.com (M.F.S.F.).

Resumo

Descreve-se na presente investigação a preparação de complexos de inclusão (CI) do óleo essencial (OE) de *Psidium cattleianum* (CAT) em 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD). O OE foi extraído das folhas de CAT com rendimento de 0,79% (m m⁻¹) e é constituído majoritariamente por sesquiterpenos, sendo o β -cariofileno o principal componente (34,2%). Para obter condições otimizadas para a preparação do CI, através do método físico de maceração, foram variados os parâmetros razão molar OE/HP β CD e o tempo de maceração. A melhor razão molar de OE:HP β CD foi de 1:1,14 e o tempo de maceração correspondeu a 30 min. A eficiência de complexação utilizando as condições otimizadas foi de (94,9 $\pm$ 1,7)%. O CI preparado foi caracterizado por espectroscopia na região UV-Vis, FTIR, TGA e DLS para comprovar a interação do OE com a HP β CD.

Palavras-chave: Complexo de inclusão. Araçá. Óleo essencial.

Área do Conhecimento: Química.

Introdução

A espécie *Psidium cattleianum* S. (CAT) pertence à família Myrtaceae e é conhecida popularmente como araçazeiro, produzindo frutos denominados como goiaba morango ou araçá (CASTRO et al., 2015). Essa espécie é nativa do Brasil e possui importância comercial, que é atribuída aos seus frutos utilizados na indústria alimentícia (PEREIRA et al., 2018; SANTOS et al., 2007).

Além disso, CAT apresenta atividades antioxidantes, antifúngicas e antimicrobianas (CASTRO et al., 2015; MEDINA et al., 2011; SCUR et al., 2016). Essas bioatividades têm sido atribuídas principalmente aos altos níveis de compostos fenólicos, minerais, ácidos graxos, açúcares, carotenoides e aos OEs (PEREIRA et al., 2018). Destaque é dado ao OE, alvo deste trabalho, que apesar das potencialidades, possuem baixa solubilidade em água, são voláteis e instáveis na presença de calor, luz e oxigênio (MOSSA, 2016). Para superar essas limitações, tecnologias têm sido desenvolvidas, ampliando assim suas aplicações. Dessa forma, é possível produzir complexos de inclusão (CIs) dos OEs com oligossacarídeos cíclicos, sendo as ciclodextrinas as mais frequentemente utilizadas (JANSOOK; OGAWA; LOFTSSON, 2018). A 2-hidroxipropil-beta-ciclodextrina (HP β CD), que é derivada do amido, possui alta solubilidade em água e têm sido utilizada para a preparação de CI contendo OE. A síntese do CI pode ser otimizada para alcançar níveis de eficiência de complexação próximos a 100%. Logo, quase todo o OE utilizado é incorporado às cavidades da HP β CD. Para isso pode ser utilizado um planejamento estatístico multivariado, que é pouco utilizado na literatura para essa finalidade, e pode proporcionar a economia de reagentes e a síntese do CI contendo mais OE.

Considerando as premissas, o objetivo desta investigação foi obter o CI do OE das folhas de CAT utilizando HP β CD e otimizar o processo de complexação, além de caracterizá-lo por técnicas analíticas.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Metodologia

Coleta e extração do óleo essencial das folhas de *P. cattleyanum*

As amostras vegetais foram coletadas em julho de 2020 no município de Alegre, no estado do Espírito Santo. O OE foi obtido através de hidrodestilação em aparelho Clevenger, durante quatro horas de extração. O rendimento das extrações do OE foi determinado, em triplicata, pela razão entre a massa do OE extraído e da massa da planta seca.

Perfil cromatográfico do óleo essencial

As análises qualitativa e semiquantitativa dos constituintes do OE das folhas foram realizadas utilizando a cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (GCMS-QP2010 Ultra, Shimadzu, Kyoto, Japão) de acordo com a metodologia de Mendes et al. (2017). Foram identificados compostos com $A_{relativa} > 5\%$.

Preparação dos complexos de inclusão

Os CIs foram obtidos pelo método de maceração seguindo a metodologia de Mendes et al. (2022), com algumas adaptações. Os CIs foram obtidos pela variação das proporções molares do OE e da HP β CD e dos tempos de maceração. Esses parâmetros foram obtidos através do delineamento composto central rotacional (DCCR) com fatorial 2^2 , contendo 4 pontos no cubo, 4 pontos axiais e 5 pontos centrais para melhor estimativa de erro. A Tabela 1 mostra os 13 experimentos obtidos a partir do DCCR, além dos fatores codificados e decodificados.

Tabela 1 - Delineamento experimental realizado para otimizar a quantidade de óleo essencial de *Psidium cattleyanum* complexado em HP β CD.

Tratamento	Variáveis codificadas*		Variáveis decodificadas		V_{etanol}^b (μ L)
	X ₁	X ₂	OE:HP β CD (mol) ^a	Tempo de maceração (min.)	
1	+1	+1	1,4 : 1	38,4	192
2	-1	+1	1 : 1,4	38,4	384
3	-1	-1	1 : 1,4	7,0	384
4	(+1,41)	0	2 : 1	22,5	136
5	0	0	1 : 1	22,5	272
6	(-1,41)	0	1 : 2	22,5	545
7	0	0	1 : 1	22,5	272
8	0	0	1 : 1	22,5	272
9	0	0	1 : 1	22,5	272
10	0	0	1 : 1	22,5	272
11	0	(+1,41)	1 : 1	45,0	272
12	0	(-1,41)	1 : 1	0,0	272
13	+1	-1	1,4 : 1	7,0	192

^aProporção molar de óleo essencial e HP β CD, respectivamente; ^bVolume de etanol (95%) correspondente a 2 mmol mL⁻¹ de HP β CD. *(-1) = nível inferior, (0) = nível médio, (+1) = nível superior e $\alpha = (+/-1,41)$; X₁ = OE:HP β CD (mol) e X₂ = tempo de maceração (min.).

Para avaliar a melhor condição de preparo do CI, a eficiência de complexação (EC) foi determinada por espectroscopia na região do UV-Vis, de acordo com a metodologia descrita a seguir. A partir das respostas foi obtida uma superfície de resposta através do *software* Desing-Expert®. O complexo ideal foi preparado em triplicata a partir do resultado da otimização da proporção molar e do tempo de maceração.

Caracterização do complexo de inclusão

Curva analítica

Para determinar a EC foi obtida uma curva analítica do OE utilizando um espectrofotômetro UV-Vis no modo de varredura na faixa de 190 a 1100 nm. Para essa análise foram preparadas, em triplicata, dez soluções padrão com concentrações crescentes do OE em acetonitrila (2,03 a 20,3 μ g mL⁻¹). Foram obtidos os valores de absorbâncias em 193 nm para construção da curva, cujos pontos foram submetidos a regressão linear pelo Método dos Mínimos Quadrados. Foram realizadas leituras em

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

duplicata no espectrofotômetro. A fim de quantificar a concentração do OE removido dos CIs, 25 mg dos materiais foram dissolvidos em 50 mL de acetonitrila 99,9% e o sistema foi mantido ao abrigo de luz a 580 rpm em mesa agitadora por 48 h. Esse procedimento foi realizado em triplicata e adaptado de Hill; Gomes; Taylor (2013). Na sequência, as amostras foram centrifugadas a 2857 rpm por 15 min a 25 °C para decantar a HP β CD, deixando apenas o OE solúvel em acetonitrila. As soluções contendo o óleo em solvente foram submetidas a análise UV-Vis, monitorando-se 193 nm. As concentrações do OE (mg mL⁻¹) foram obtidas pela curva analítica, sendo possível determinar as massas de OE extraídas. As eficiências de complexação (ECs) foram determinadas utilizando a Equação 1:

$$EC (\%) = \frac{OE_{ext} (mg)}{OE_{adic} (mg)} \times 100\% \quad (Eq. 1)$$

Em que OE_{ext} é a massa do OE extraído do CI (mg) e OE_{adic} é a massa do OE adicionada no início do processo de complexação (mg).

Análise termogravimétrica

A medida da estabilidade térmica foi realizada por meio de análise termogravimétrica (TGA) com auxílio de um analisador térmico DTG. Cerca de 4 mg da HP β CD, do OE e do CI otimizado foram pesados em microbalança analítica. Em seguida, as amostras foram aquecidas na faixa de temperatura de 30 a 450 °C em uma razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹.

Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

A HP β CD, o OE e o CI otimizado foram submetidos às análises de espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Foi utilizado um espectrofotômetro de reflectância total atenuada (ATR) com cristal de germânio na região de 4000 a 700 cm⁻¹, com 32 varreduras e resolução espectral de 4 cm⁻¹.

Análise de tamanho, índice de polidispersão e potencial Zeta por DLS

Por meio da técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS) foram realizadas as medidas de tamanho, índice de polidispersão (PDI) e potencial Zeta (PZ) da HP β CD e do CI otimizado. Para isso, foi utilizado o Zetasizer Nano ZS, uma célula DTS 1070 com dois. As amostras foram diluídas em água tipo 1 até a concentração de 1 mg mL⁻¹.

Análise estatística

A obtenção dos parâmetros estatísticos: análise de variância, regressão linear e delineamento experimental da otimização no processo de complexação foi realizada utilizando o Programa Minitab, versão 17. A superfície de resposta foi obtida pelo Programa Design Expert, versão 11.

Resultados

O rendimento do OE obtido das folhas da CAT foi de 0,79% (m m⁻¹). Foram identificados seis compostos presentes no OE da CAT: α -pineno (10%), limoneno (14,9%), 1,8-cineol (9,7%), β -cariofileno (34,2%), α -humuleno (9,3%) e óxido de cariofileno (16,6%).

Na Fig. 1a são apresentados os resultados de 13 ensaios do preparo dos complexos de inclusão empregando o planejamento multivariado composto central rotacional (Tabela 1). Através dos resultados de eficiência de complexação (EC) obtidos, foi possível construir a superfície de resposta (Fig. 1b). A equação da regressão do modelo quadrático foi $\hat{Y} = 33,31 + 3,94P + 4,003T - 3,615P^2 - 0,06882T^2$, com $R^2_{ajustado} = 0,9393$ e $F_{ajuste} = 0,010$. Todos os coeficientes (β) foram significativos ($\beta_{proporção} = 0,010$; $\beta_{tempo} = 0,000$; $\beta_{proporção \times proporção} = 0,004$; $\beta_{tempo \times tempo} = 0,000$) à $\alpha = 0,05$.

Considerando o CI otimizado, a sua EC foi obtida a partir da curva analítica do OE da CAT em espectrofotômetro UV-Vis. O comprimento de onda de máxima de absorção ocorre em 193 nm e este foi adotado para identificar e quantificar o OE extraído do CI. A equação da regressão linear obtida pela curva analítica foi $y = 53,024x + 0,03732$, com $R^2_{ajustado} = 0,9976$ e $F_{ajuste} = 0,591$ ($p < 0,05$). A EC do CI otimizado foi de $(94,9 \pm 1,7)\%$.

As curvas termogravimétricas para o OE, HP β CD e CI são apresentadas na Fig. 2a. Os espectros de FTIR da HP β CD, do OE, do CI, do OE e do CI, ambos aquecidos a 180 °C são mostrados na Fig. 2b.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Figura 1 - a) Resultado do delineamento experimental realizado para otimização da eficiência de complexação do óleo essencial de *Psidium cattleianum* em HP β CD; b) Gráfico da superfície de resposta da otimização da eficiência de complexação com a equação do modelo de regressão e coeficientes à $\alpha = 0,05$.

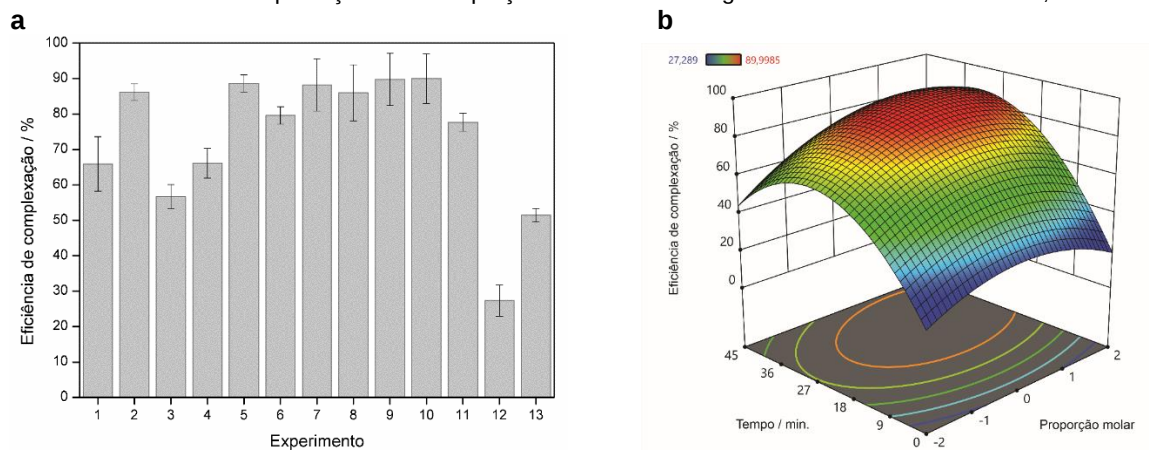
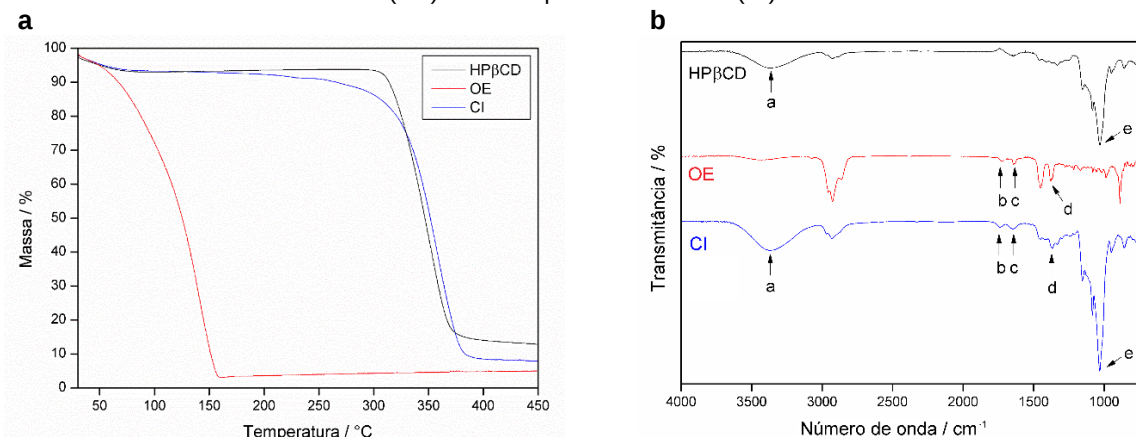


Figura 2 - a) Curvas termogravimétricas da HP β CD, do óleo essencial da espécie *Psidium cattleianum* (OE) e do complexo de inclusão (CI); b) Espectros de FTIR para a HP β CD, óleo essencial da espécie *Psidium cattleianum* (OE) e do complexo de inclusão (CI).



O tamanho hidrodinâmico médio e a distribuição de tamanho (PDI - índice de polidispersidade) do CI e da HP β CD foram apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Diâmetro hidrodinâmico da partícula, potencial Zeta e índice de polidispersão da HP β CD e do complexo de inclusão.

Amostra	Diâmetro médio da partícula (nm)	Potencial Zeta (mV)	Índice de polidispersão (PDI)
HP β CD	431,9 ^a $\pm$ 18,8	-25,1 ^b $\pm$ 0,9	0,38 ^a $\pm$ 0,06
CI	440,1 ^a $\pm$ 13,9	-40,9 ^a $\pm$ 2,2	0,23 ^b $\pm$ 0,01

Letras iguais entre colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey, à $p < 0,05$.

Discussão

Ao comparar o rendimento do OE da CAT, 0,79% (m m^{-1}), com o da *P. guajava*, espécie com maior relevância comercial do gênero, percebe-se que *P. cattleianum* possui maior quantidade de OE nas folhas. Os rendimentos dos OEs das folhas da *P. guajava* são em torno de 0,3% (m m^{-1}) dependendo da cultivar avaliada (MENDES *et al.*, 2017; SOUZA *et al.*, 2017). Em relação a composição química, majoritariamente foram encontrados sesquiterpenos (60,1%) e o principal composto foi o β -cariofileno. Outros autores que identificaram o perfil cromatográfico do OE das folhas da CAT também observaram

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

predominantemente sesquiterpenos (ADAM et al., 2011; ALVES et al., 2022; CASTRO et al., 2015; CHALANNAVAR et al., 2013; PINO et al., 2004).

O método de maceração pode ser considerado o mais comum para formar CI, sendo bastante simples, fornece um bom rendimento e possui baixo custo de produção (PATIL et al., 2010). Pode-se observar na Fig. 1a que o tempo de maceração é uma variável fundamental na otimização do processo de produção dos CIs, alcançando alta EC, gerando economia de reagentes e tempo para obtenção. Como observado no ensaio 12, tanto não macerar (mistura física), quanto macerar por maior tempo, como observado no ensaio 11, mantendo a proporção molar, são insuficientes para um processo com os mais altos valores de EC do OE da CAT em HP β CD. A superfície de resposta (Fig. 1b) indica que os maiores valores de eficiência apresentam coloração vermelha e os menores azul. As condições para obter a melhor EC na preparação do CI a partir do OE da CAT foram preditas pelo *software* Minitab. A otimização obtida foi de utilizar a razão molar OE:HP β CD de 1:1,14 e macerar por 30 min. Os CIs foram produzidos nessas condições e caracterizados com as técnicas analíticas descritas a seguir.

A alta eficiência de complexação (94,9%) está relacionada a proporção de OE da CAT e HP β CD otimizada, além do tempo ideal de maceração, pois considerando a alta volatilidade e instabilidade do OE, macerar por muito tempo pode contribuir para a degradação dos compostos.

A curva termogravimétrica do OE apresenta perda de massa em um evento contínuo com a volatilização e degradação ocorrendo a partir de 30 °C, tendo o máximo de degradação em 142 °C. Em 170 °C, o OE é totalmente degradado. A HP β CD e o CI têm o máximo de degradação em torno de 350 °C, logo, o CI apresenta grande estabilidade térmica (Fig. 2a).

A espectroscopia na região do infravermelho contribui para a verificação da formação do CI através da visualização de bandas pertencentes ao OE e a HP β CD que se apresentam simultaneamente no CI, indicando a interação entre hóspede e hospedeiro (Fig. 2b). As bandas **a** e **e** foram destacadas na HP β CD e as bandas **b**, **c** e **d** no OE, sendo que todas elas estão presentes no CI. A banda larga representada por **a**, que possui número de onda de aproximadamente 3400 cm⁻¹ e pode ser atribuída ao estiramento da ligação O-H (BARBOSA, 2007). As bandas **b**, **d** e **e** confirmaram que houve interação entre o OE e a HP β CD. A banda **c** em 1640 cm⁻¹ aparece devido à deformação angular da H₂O presente tanto no OE quanto no CI em pequena quantidade (BARBOSA, 2007).

O diâmetro hidrodinâmico do CI e da HP β CD foram iguais entre si e acima de 400 nm (Tabela 2). Em solução aquosa esses materiais apresentaram tendência de agregação (MENDES et al., 2022). Geralmente, os aglomerados não ocorrem de maneira uniforme, podendo gerar variabilidade no tamanho dos CIs, o que justifica os valores de PDI obtidos (HILL; GOMES; TAYLOR, 2013; KOTRONIA et al., 2017; MIRANDA et al., 2019). Sabe-se que um sistema com PDI $\leq 0,1$ é considerado altamente monodisperso, valores entre 0,1 e 0,4 são moderadamente polidispersos e $> 0,4$ são altamente polidispersos (BHATTACHARJEE, 2016). Dessa forma, o CI e a HP β CD podem ser classificados como moderadamente e altamente polidispersos, respectivamente. O potencial Zeta é um indicador da estabilidade dos CIs em suspensão. Partículas com valores mais elevados em módulo ($>|30|$ mV) representam uma repulsão eletrostática mais forte e, portanto, melhor estabilidade das partículas (MIRANDA et al., 2019). Sendo assim, o CI pode ser classificado como maior estabilidade em suspensão aquosa em comparação com a HP β CD.

Conclusão

O processo de produção do CI, formado a partir do OE da CAT com a HP β CD, foi otimizado e apresentou alta eficiência de complexação. O estudo das variáveis tempo de maceração e proporção molar foram parâmetros imprescindíveis para a obtenção de CI com alta eficiência de complexação. O CI obtido foi caracterizado por técnicas analíticas comprovando que o OE foi complexado na cavidade da HP β CD. Considerando que o CI otimizado que foi produzido tem alta solubilidade aquosa e estabilidade térmica, é um produto com potencial de ser explorado comercialmente.

Referências

ADAM, F. et al. Aromatic Plants of French Polynesia. V. Chemical Composition of Essential Oils of Leaves of *Psidium guajava* L. and *Psidium cattleianum* Sabine. **Journal of Essential Oil Research**, v. 23, n. 1, p. 98–101, jan. 2011.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

- ALVES, T. A. et al. Phytotoxicity and cytogenetic action mechanism of leaf extracts of *Psidium cattleianum* Sabine in plant bioassays. **Brazilian Journal of Biology**, v. 84, p. e260985, 2022.
- BARBOSA, L. C. DE A. **Espectroscopia no Infravermelho**. 1. ed. Viçosa: UFV, 2007.
- BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? **Journal of Controlled Release**, v. 235, p. 337–351, ago. 2016.
- CASTRO, M. R. et al. Essential oil of *Psidium cattleianum* leaves: Antioxidant and antifungal activity. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, n. 2, p. 242–250, fev. 2015.
- CHALANNAVAR, R. K. et al. Chemical constituents of the essential oil from leaves of *Psidium cattleianum* var. *cattleianum*. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 7, p. 783–789, 2013.
- HILL, L. E.; GOMES, C.; TAYLOR, T. M. Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing essential oils (trans-cinnamaldehyde, eugenol, cinnamon bark, and clove bud extracts) for antimicrobial delivery applications. **LWT - Food Science and Technology**, v. 51, n. 1, p. 86–93, abr. 2013.
- JANSOOK, P.; OGAWA, N.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins: structure, physicochemical properties and pharmaceutical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 535, n. 1–2, p. 272–284, jan. 2018.
- KOTRONIA, M. et al. Encapsulation of Oregano (*Origanum onites* L.) Essential Oil in β -Cyclodextrin (β -CD): Synthesis and Characterization of the Inclusion Complexes. **Bioengineering**, v. 4, n. 4, p. 74, 9 set. 2017.
- MEDINA, A. L. et al. Araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) fruit extracts with antioxidant and antimicrobial activities and antiproliferative effect on human cancer cells. **Food Chemistry**, v. 128, n. 4, p. 916–922, out. 2011.
- MENDES, L. A. et al. Larvicidal effect of essential oils from Brazilian cultivars of guava on *Aedes aegypti* L. **Industrial Crops and Products**, v. 108, p. 684–689, dez. 2017.
- MENDES, L. A. et al. Development of inclusion complexes of 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin with *Psidium guajava* L. essential oil by freeze-drying and kneading methods for application as *Aedes aegypti* L. larvicide. **Natural Product Research**, p. 1–5, 18 ago. 2022.
- MIRANDA, M. et al. Nanostructuring lipid carriers using *Ridolfia segetum* (L.) Moris essential oil. **Materials Science and Engineering: C**, v. 103, p. 109804, out. 2019.
- MOSSA, A.-T. H. Green Pesticides: Essential Oils as Biopesticides in Insect-pest Management. **Journal of Environmental Science and Technology**, v. 9, n. 5, p. 354–378, 1 maio 2016.
- PATIL, J. S. et al. INCLUSION COMPLEX SYSTEM; A NOVEL TECHNIQUE TO IMPROVE THE SOLUBILITY AND BIOAVAILABILITY OF POORLY SOLUBLE DRUGS: A REVIEW. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 2, n. 2, p. 29–34, 2010.
- PEREIRA, E. DOS S. et al. *Psidium cattleianum* fruits: A review on its composition and bioactivity. **Food Chemistry**, v. 258, p. 95–103, ago. 2018.
- PINO, J. A. et al. Leaf Oils of *Psidium parvifolium* Griseb. and *Psidium cattleianum* Sabine from Cuba. **Journal of Essential Oil Research**, v. 16, n. 4, p. 370–371, jul. 2004.
- SANTOS, M. D. S. et al. Caracterização do suco de araçá vermelho (*Psidium cattleianum* Sabine) extraído mecanicamente e tratado enzimaticamente. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 29, n. 5, p. 617–621, 18 dez. 2007.
- SCUR, M. C. et al. Antimicrobial and antioxidant activity of essential oil and different plant extracts of *Psidium cattleianum* Sabine. **Brazilian Journal of Biology**, v. 76, n. 1, p. 101–108, 12 fev. 2016.
- SOUZA, T. DA S. DE et al. Essential oil of *Psidium guajava*: Influence of genotypes and environment. **Scientia Horticulturae**, v. 216, p. 38–44, fev. 2017.
- TAO, F. et al. Synthesis and characterization of β -cyclodextrin inclusion complexes of thymol and thyme oil for antimicrobial delivery applications. **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, n. 1, p. 247–255, nov. 2014.

Agradecimentos

Agradecemos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro.