

**Mestrado Integrado em Engenharia do Ambiente**

***Extração de Óleos Essenciais para Aplicação como  
Biopesticidas - Estratégias de Prevenção da  
Contaminação Ambiental***

**Dissertação de Mestrado**

de

**Edilson de Jesus Silva Barbosa**

Desenvolvida no âmbito da unidade curricular de Dissertação

realizado em

**LEPABE**

Laboratório para Processos de Engenharia, Ambiente, Biotecnologia e Energia



Orientador na FEUP: Prof. Lúcia Santos



**Departamento de Engenharia Química**

Setembro, 2018



## Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de expressar a minha gratidão à Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto (FEUP), ao Departamento de Engenharia Química (DEQ) e ao Laboratório de Engenharia de Processos, Ambiente, Biotecnologia e Energia (LEPABE) por todos os recursos, e suporte provido para esta dissertação.

Quero agradecer à minha supervisora, Prof.<sup>a</sup> Lúcia Santos, pela oportunidade que me foi dada para trabalhar neste projeto, por toda a ajuda, orientação, confiança, seriedade, motivação, incentivo, disponibilidade e muito entusiasmo, demonstrados ao longo do percurso. Em especial também gostaria de deixar um profundo agradecimento à Eng. Filipa Paulo pela orientação, insistência, preocupação, dedicação, disponibilidade, sacrifício e muita paciência demonstradas ao longo destes meses e à Doutora Patrícia Domingues pela grande ajuda, pela disponibilidade, pelo espírito de ajuda e acima de tudo pela paciência nesta reta final. Portanto a estas duas magníficas mentoras mencionadas anteriormente só dizer “Obrigado” não será suficiente.

A todo o grupo de Laboratório E201, agradeço pelo acolhimento, alegria, ajuda e magnífico ambiente de trabalho, especialmente aos colegas e recentes mestres Ana Mota, Joana Silva e Pedro Castro pela companhia, amizade, brincadeira, apoio e todos os bons momentos partilhados durante 5 meses. Também gostaria de deixar um enorme agradecimento em especial aos técnicos do Laboratório de Métodos Instrumentais de Análise José Luís e Maria de Fátima pela constante ajuda sempre que solicitada. A todos os funcionários do SERAC, deixo um agradecimento enorme pelo apoio e por cada incentivo.

A minha avó, aos meus pais, e meus irmãos, quero expressar toda a minha gratidão por terem investido na minha educação e formação pessoal, agradeço pelo amor incondicional e todo apoio demonstrado principalmente nestes últimos seis anos separados pelo oceano. Também agradeço às minhas tias Paula e Maria José por tudo.

Adicionalmente, aos meus amigos Adélcia Lopes, Ailton Augusto, Braúlio Neto, Edeny Pires, Edlise Gonçalves, Filipe Ferreira, Helder Correia, Ivan Gonçalves, Letícia Ribeiro, Sara Gomes e agradeço por todo o apoio, carinho e por demonstrarem que desistir nunca foi, não é e nunca será uma opção. Por último, mas não menos importante, gostaria de agradecer a todos que conheci ao longo principalmente aos meus colegas de curso que fizeram parte desta jornada e que de alguma forma ajudaram ao longo do percurso.

Este trabalho foi financiado por: Projeto POCI-01-0145-FEDER-006939 (Laboratório de Engenharia de Processos, Ambiente, Biotecnologia e Energia, UID/EQU/00511/2013) - financiado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER), através do COMPETE2020 - Programa Operacional Competitividade e Internacionalização (POCI) e por fundos nacionais através da Fundação para a Ciência e a Tecnologia I.P.

## Resumo

A problemática dos pesticidas tem sido amplamente discutida, dada as possíveis consequências graves no meio ambiente como a contaminação de solos e águas (por exemplo, águas superficiais e subterrâneas). Os alimentos, tanto para consumo humano como animal, têm sido continuamente expostos a este grupo de compostos químicos - os pesticidas - ao longo das diversas etapas de produção, podendo deste modo, colocar em risco a saúde humana.

Os inseticidas e fungicidas sintéticos são exemplos de compostos com ação pesticida que apresentam um longo tempo de degradação. Deste modo, os extratos de óleos essenciais surgem como alternativa, permitindo a redução da utilização dos compostos nocivos para o meio ambiente. Face a este novo paradigma da utilização de pesticidas de origem natural *versus* a utilização de pesticidas de origem sintética, podem definir-se biopesticidas como pesticidas provenientes de organismos vivos, como plantas, sendo progressivamente utilizados como uma alternativa menos impactante ambientalmente, face aos tradicionais pesticidas de origem química.

Este projeto teve como objetivo a otimização de técnicas de extração de compostos bioativos e de técnicas analíticas com vista à futura aplicação destes compostos como biopesticidas usados como alternativa aos tradicionais inseticidas. Este trabalho inclui ainda uma revisão bibliográfica sobre os constituintes de óleos essenciais para a proteção vegetal.

Neste estudo procedeu-se à extração de compostos bioativos das espécies vegetais *Mentha x piperita L.* e *Pelargonium graveolens L.* por extração-destilação simultânea. Foram testadas diversas condições operacionais como o solvente de extração (éter etílico e n-pentano) e tempos de extração (30 e 60 minutos). Os extratos obtidos foram analisados por cromatografia gasosa acoplada a um detetor por ionização de chama.

A *Mentha x piperita L.*, obteve cerca de 2,80% de óleo extraído (30 minutos) e cerca 0,66% de óleo extraído (60 minutos) com o solvente éter etílico e cerca 1,10% de óleo extraído (60 minutos) e cerca de 0,33% de óleo extraído (30 minutos) com o solvente n-pentano.

O *Pelargonium graveolens L.*, obteve cerca de 0,70% de óleo extraído (30 minutos) e cerca 0,65% de óleo extraído (60 minutos) com o solvente éter etílico e cerca 0,33% de óleo extraído (30 minutos) e cerca de 0,42% de óleo extraído (60 minutos) com o solvente n-pentano.

O método analítico desenvolvido permitiu a deteção de dez compostos presentes nos óleos essenciais das plantas estudadas. O método demonstrou ser seletivo e específico.

O método de extração e destilação simultânea associado a um processo de identificação de analitos por cromatografia gasosa acoplada a um detetor por ionização por chama, demonstraram ser adequados para a extração e quantificação de compostos presentes nos óleos essenciais de *Mentha x piperita L.* e *Pelargonium graveolens L.*

Foram determinadas como as melhores condições para extração e destilação simultânea para ambas as plantas 30 minutos de tempo de extração usando o éter etílico como solvente.

**Palavras Chave:** Biopesticidas, óleos essenciais, extração e destilação simultânea, cromatografia gasosa acoplada a um detetor por ionização por chama

## Abstract

The problematic regarding pesticides has been widely discussed, due to the potential environmental consequences such as soil and water contamination (e.g., surface and external water). Foods for human or even animal consumption have been continuously exposed to this group of chemical compounds - the pesticides - throughout the various stages of production, which could endanger human health.

Synthetic insecticides and fungicides are examples of compounds with pesticidal action which have long degradation periods. Therefore, extracts of essential oils can be an alternative to the existing ones, allowing the reduction of the use of environmental harmful compounds. Regarding the new paradigm of the usage of natural pesticides *versus* the usage of synthetic pesticides, biopesticides can be defined as pesticides from living organisms, such as plants, that are progressively used as an alternative to the traditional pesticides from chemical origin.

This project aimed to optimize extraction and analytical techniques for the obtainment of bioactive compounds, regarding the possible future application as biopesticides, as an alternative to traditional insecticides. This work also includes a bibliographical review on the constituents of essential oils for plant protection.

In this study, the bioactive compounds of the plant species *Mentha x piperita* L. and *Pelargonium graveolens* L. were extracted by simultaneous distillation-extraction. Several operating conditions were tested, as the extraction solvent (ethyl ether and n-pentane) and extraction times (30 and 60 minutes). The extracts obtained were analyzed by gas chromatography coupled to a flame ionization detector.

The *Mentha x piperita* L, obtained about 2.80% of extracted oil (30 minutes) and about 0.66% of oil extracted (60 minutes) with ethyl ether solvent and about 1.10% of extracted oil (60 minutes) and about 0.33% of oil extracted (30 minutes) with the n-pentane solvent.

*Pelargonium graveolens* L, obtained about 0.70% of extracted oil (30 minutes) and about 0.65% of oil extracted (60 minutes) with ethyl ether solvent and about 0.33% of extracted oil (30 minutes) and about 0.42% of oil extracted (60 minutes) with the n-pentane solvent.

The analytical method allowed the detection of ten compounds present in the essential oils of each of the plants studied. The method proved to be selective and specific.

The simultaneous extraction and distillation method associated with a gas chromatographic analyzer coupled to a flame ionization detector proved to be adequate for the extraction and quantification of compounds present in the essential oils of *Mentha x piperita* L. and *Pelargonium graveolens* L.

The optimal conditions for simultaneous extraction and distillation of both plants were determined to be 30 minutes of extraction time using diethyl ether as solvent.

**Keywords:** Biopesticides, essential oils, simultaneous extraction and distillation, gas chromatography coupled to a flame ionization detector

## Declaração

Declara, sob compromisso de honra, que este trabalho é original e que todas as contribuições não originais foram devidamente referenciadas com identificação da fonte.

---

(Edilson de Jesus Silva Barbosa)

25 de Setembro, 2018

# Índice

<b>1</b>	<b>Introdução</b>	<b>1</b>
1.1	Enquadramento e Apresentação do Projeto	1
1.2	Metodologia	2
1.2	Organização da Tese	2
1.3	Objetivo Principal do Projeto	3
1.4	Objetivos Secundários	3
<b>2</b>	<b>Estado da Arte</b>	<b>4</b>
2.1	Óleos Essenciais	4
2.1.1	Contextualização Histórica	4
2.1.2	Conceitos dos Óleos Essenciais	4
2.1.3	Importância Económica dos Óleos Essenciais	11
2.1.4	Uso de Óleos Essenciais como Biopesticidas (Pesticidas Botânicos)	12
2.2	Espécies de Plantas Utilizados no Presente Projeto	14
2.2.1	Hortelã Pimenta ( <i>Mentha x piperita L.</i> )	15
2.2.2	Gerânio ( <i>Pelargonium graveolens L.</i> )	15
2.3	Técnicas de Extração de Óleos Essenciais	15
2.3.1	Extração Sólido-Líquido (SLE)	16
2.3.2	Extração Líquido-Líquido (LLE)	16
2.3.3	Extração e Destilação Simultânea (SDE)	17
2.4	Técnicas Analíticas mais Usadas na Análise de Óleos Essenciais	19
2.4.1	Cromatografia Gasosa com Detetor por Ionização de Chama (GC-FID)	19
2.4.2	Cromatografia Gasosa por Espectrometria de Massa (GC-MS)	20
2.4.3	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)	21
2.5	Comparação da Técnica de Extração e de Análise (SDE e GC-FID)	21
<b>3</b>	<b>Materiais e Métodos</b>	<b>22</b>
3.1	Materiais	22
3.1.1	Amostragem das Plantas Presentes no Projeto	22

3.1.2	Padrões e Reagentes.....	22
<b>3.2</b>	<b>Métodos .....</b>	<b>23</b>
3.2.1	Preparação dos Padrões.....	23
3.2.2	Extração dos Óleos Essenciais.....	24
3.2.3	Procedimento da Extração por SDE .....	25
3.2.4	Análise do Óleo Essencial por Cromatografia Gasosa (GC - FID).....	25
<b>4</b>	<b>Resultados e Discussão.....</b>	<b>28</b>
<b>4.1</b>	<b>Desenvolvimento da Metodologia Analítica (GC-FID).....</b>	<b>28</b>
4.1.1	Identificação dos Compostos por GC-FID.....	28
4.1.2	Quantificação de Compostos e Calibração dos Padrões por GC-FID.....	29
4.1.3	Parâmetros Estatísticos para Desenvolvimento do Método Analítico .....	30
<b>4.2</b>	<b>Avaliação da Eficiência de Extração .....</b>	<b>33</b>
<b>4.3</b>	<b>Extração por SDE e Análise por GC-FID da Composição de Extratos.....</b>	<b>35</b>
4.3.1	Extração do Óleo Essencial de <i>Mentha x piperita L.</i> por SDE .....	35
4.3.2	Extração do Óleo Essencial de <i>Pelargonium graveolens L.</i> por SDE.....	39
<b>5</b>	<b>Conclusões .....</b>	<b>43</b>
<b>6</b>	<b>Avaliação do Trabalho Realizado.....</b>	<b>44</b>
6.1	Objetivos Realizados .....	44
6.2	Limitações e Trabalho Futuro .....	44
<b>7</b>	<b>Referências.....</b>	<b>45</b>
<b>8</b>	<b>Anexos .....</b>	<b>49</b>
8.1	Anexo 1 - Identificação dos Compostos após Injeção Direta.....	49
8.2	Anexo 2 - Representação dos Gráficos dos Compostos Obtidos por GC - FID Usando Acetofenona como Padrão Interno .....	53
8.3	Anexo 3 - Análise Cromatográfica em GC-FID para os Óleos Essenciais das Plantas Presentes no Projeto .....	59
8.4	Anexo 4 - Legislação Aplicável, Instituições Intervenientes e Respetivas Responsabilidades .....	61
8.5	Anexo 5 - Pesquisas Bibliográficas sobre Plantas Aromáticas no Combate a Pragas... 63	63



## Lista de Figuras

<i>Figura 1 - Hortelã pimenta no seu estado natural (A); Óleo essencial após extração (B) <sup>[12]</sup> .....</i>	5
<i>Figura 2 - Diagrama de árvore da ampla ramificação de especializações no campo de óleos essenciais <sup>[11]</sup> .</i>	5
<i>Figura 3- Taxas de exportações e importações de óleos essenciais em 2016 <sup>[38]</sup>.....</i>	12
<i>Figura 4 - Mentha x piperita L. (A) e Pelargonium graveolens L. (B)<sup>[12]</sup>.....</i>	14
<i>Figura 5 - Ilustração do Soxhlet <sup>[51]</sup>.....</i>	16
<i>Figura 6 - Processo de extração líquido-líquido para um soluto <sup>[52]</sup>.....</i>	16
<i>Figura 7- Esquema do SDE (Adaptado Seidel e Lindner, 1993) <sup>[5]</sup> .....</i>	17
<i>Figura 8- Processo de obtenção de óleos essenciais.....</i>	19
<i>Figura 9- Diagrama de blocos para cromatografia gasosa usando espectro de massa. (A) gás de arraste; (B) Injetor de amostra; (C) Coluna; (D) Ionização de eletrão; (E) Analisador de massa <sup>[57]</sup> .....</i>	20
<i>Figura 10 - Esquema do SDE <sup>[5]</sup> e respetiva fotografia do aparelho Likens-Nickerson modificado operando com a extração de amostra de planta .....</i>	24
<i>Figura 11 -Aparelho GC - 2010 SHIMADZU utilizado nas análises dos extratos .....</i>	26
<i>Figura 12 - Programa de temperaturas para quantificação por GC - FIG) .....</i>	26
<i>Figura 13 - Cromatograma evidenciado a identificação dos compostos de estudo através da injeção de uma solução de mistura (concentração de 50 mg/L de cada composto)<sup>a</sup> .....</i>	29
<i>Figura 14 - Eficiência de extração da solução mistura utilizando os solventes éter etílico e n-pentano....</i>	31
<i>Figura 15- Análise cromatográfica em GC-FID para o óleo da Mentha x piperita L. extraído pelo SDE usando éter etílico como solvente durante 30 minutos (Compostos não identificados: 93,69%) .....</i>	38
<i>Figura 16 - Análise cromatográfica em GC-FID para o óleo da Mentha x piperita L. extraído pelo SDE usando n-pentano como solvente durante 60 minutos (Compostos não identificados: 94,43%) .....</i>	39
<i>Figura 17 - Análise cromatográfica em GC-FID para o óleo de Pelargonium graveolens L. extraído pelo SDE usando éter etílico como solvente durante 30 minutos (Compostos não identificados: 52,24%).....</i>	40
<i>Figura 18 - Análise cromatográfica em GC-FID para o óleo de Pelargonium graveolens L. extraído pelo SDE usando n-pentano como solvente durante 30 minutos (Compostos não identificados: 62,49%) .....</i>	41
<i>Figura A1 - Cromatograma resultante da injeção individual de 2,2-6 TrimetilciclohexanonaHortelã .....</i>	49
<i>Figura A2 - Cromatograma resultante da injeção individual da Mentona .....</i>	49
<i>Figura A3- Cromatograma resultante da injeção individual de Acetato Borneol.....</i>	49
<i>Figura A4 - Cromatograma resultante da injeção individual da Pulegona.....</i>	50
<i>Figura A5 - Cromatograma resultante da injeção individual de (S)-(-)-a-Terpineol.....</i>	50
<i>Figura A6 - Cromatograma resultante da injeção individual do Borneol.....</i>	50

<i>Figura A7- Cromatograma resultante da injeção individual de Acetato Geraniol.....</i>	<i>51</i>
<i>Figura A8- Cromatograma resultante da injeção individual do Citronelol .....</i>	<i>51</i>
<i>Figura A9- Cromatograma resultante da injeção individual do Geraniol .....</i>	<i>51</i>
<i>Figura 10 - Cromatograma resultante da injeção individual do Eugenol .....</i>	<i>52</i>
<i>Figura A11 - Cromatograma resultante da injeção individual do Padrão Interno (Acetofenona) .....</i>	<i>52</i>
<i>Figura A12 - Representação do gráfico da curva de calibração do 2,2-6 Trimetilciclohexanona.....</i>	<i>53</i>
<i>Figura A13 - Representação do gráfico da curva de calibração da Mentona .....</i>	<i>53</i>
<i>Figura A14 - Representação do gráfico da curva de calibração do Acetato Borneol.....</i>	<i>54</i>
<i>Figura A15- Representação do gráfico da curva de calibração da Pulegona.....</i>	<i>54</i>
<i>Figura A16 - Representação do gráfico da curva de calibração do (S)-(-)-a-Terpineol.....</i>	<i>55</i>
<i>Figura A17 - Curva de calibração dos compostos presentes nas soluções-stock e nas soluções padrão de calibração por injeção direta ( cinco primeiros compostos) .....</i>	<i>55</i>
<i>Figura A18 - Representação do gráfico da curva de calibração do Borneol .....</i>	<i>56</i>
<i>Figura A19 - Representação do gráfico da curva de calibração do Acetato Geraniol.....</i>	<i>56</i>
<i>Figura A20- Representação do gráfico da curva de calibração do Citronelol .....</i>	<i>57</i>
<i>Figura A21 - Representação do gráfico da curva de calibração do Geraniol .....</i>	<i>57</i>
<i>Figura A22 - Representação do gráfico da curva de calibração do Eugenol .....</i>	<i>58</i>
<i>Figura A23 - Curva de calibração dos compostos presentes nas soluções-stock e nas soluções padrão de calibração por injeção direta ( cinco últimos compostos) .....</i>	<i>58</i>
<i>Figura A24 - Análise cromatográfica em GC-FID para o óleo da Mentha x piperita L. extraído pelo SDE usando éter etílico como solvente durante 30 minutos (Compostos não identificados: 95,64%).....</i>	<i>59</i>
<i>Figura A25 - Análise cromatográfica em GC-FID para o óleo de Mentha x piperita L. extraído pelo SDE usando n-pentano como solvente durante 60 minutos (Compostos não identificados: 97,21%) .....</i>	<i>59</i>
<i>Figura A26 - Análise cromatográfica em GC-FID para o óleo de Pelargonium graveolens L. extraído pelo SDE usando éter etílico como solvente durante 30 minutos (Compostos não identificados: 61,07%) .....</i>	<i>60</i>
<i>Figura A27 - Análise cromatográfica em GC-FID para o óleo de Pelargonium graveolens L. extraído pelo SDE usando n-pentano como solvente durante 60 minutos (Compostos não identificados: 84,53%).....</i>	<i>60</i>

## Lista de Tabelas

<i>Tabela 1 - Classificação do terpenos de acordo com o número de unidades de isopreno .....</i>	6
<i>Tabela 2 - Propriedades físico-químicas dos compostos em estudo.....</i>	7
<i>Tabela 2 (Cont.) - Propriedades físico-químicas dos compostos em estudo.....</i>	8
<i>Tabela 2 (Cont.) - Propriedades físico-químicas dos compostos em estudo.....</i>	9
<i>Tabela 2 (Cont.) - Propriedades físico-químicas dos compostos em estudo.....</i>	10
<i>Tabela 3 - Taxas de exportações e importações de óleos essenciais <sup>[38]</sup> .....</i>	11
<i>Tabela 4- Principais características das plantas utilizadas no estudo do projeto <sup>[46,48,49]</sup> .....</i>	14
<i>Tabela 5 - Propriedades físico-químicas dos padrões analíticos utilizados no estudo .....</i>	22
<i>Tabela 6 - Principais solventes/reagentes utilizados no estudo da composição química de óleo essencial .</i>	23
<i>Tabela 7 - Concentração soluções-stock individuais e as suas respectivas massas .....</i>	23
<i>Tabela 8 - Condições analíticas utilizadas para a análise dos extratos por GC - FID.....</i>	27
<i>Tabela 9 - Tempo de retenção obtido por injeção direta das soluções - mãe dos padrões analíticos e respectivas concentrações .....</i>	28
<i>Tabela 10 - Concentrações dos compostos presentes nas soluções-stock e nas soluções padrão de calibração .....</i>	30
<i>Tabela 11 - Equações das retas de calibração e os seus respectivos parâmetros para desenvolvimento do método analítico .....</i>	32
<i>Tabela 12 - Gama de linearidade, coeficiente de determinação e limites de detenção e quantificação para os compostos .....</i>	33
<i>Tabela 13 - Eficiência de extração e coeficiente de variação dos compostos em estudo.....</i>	34
<i>Tabela 14 - Massa de porções de Mentha x piperita L. para cada extração (n=3) .....</i>	36
<i>Tabela 15- Principais resultados obtidos na análise do extrato de Mentha x piperita L. com o solvente éter etílico após SDE durante 30 e 60 minutos (n=3) .....</i>	37
<i>Tabela 16- Principais resultados obtidos na análise do extrato de Mentha x piperita L. com o solvente n-pentano após SDE durante 30 e 60 minutos (n=3) .....</i>	38
<i>Tabela 17 - Massa das porções de Pelargonium graveolens L. para cada extração (n=3) .....</i>	39
<i>Tabela 18- Principais resultados obtidos na análise do extrato de Pelargonium graveolens L. com o solvente éter etílico após SDE durante 30 e 60 minutos (n=3) .....</i>	40
<i>Tabela 19- Principais resultados obtidos na análise do extrato de Pelargonium graveolens L. com o solvente n-pentano após SDE durante 30 e 60 minutos (n=3) .....</i>	41
<i>Tabela A1 - Legislação aplicável, instituições intervenientes e respetivas responsabilidades <sup>[41]</sup> .....</i>	61

*Tabela A1 (cont.) - Legislação aplicável, instituições intervenientes e respetivas responsabilidades..... 62*

*Tabela A2 - Plantas aromáticas e seus respetivos componentes no combate a pragas..... 63*

*Tabela A2 (cont.) - Plantas aromáticas e seus respetivos componentes no combate a pragas ..... 64*

*Tabela A2 (cont.) - Plantas aromáticas e seus respetivos componentes no combate a pragas .....65*

*Tabela A2 (cont.) - Plantas aromáticas e seus respetivos componentes no combate a pragas ..... 66*

*Tabela A2 (cont.) - Plantas aromáticas e seus respetivos componentes no combate a pragas ..... 67*

*Tabela A2 (cont.) - Plantas aromáticas e seus respetivos componentes no combate a pragas ..... 68*

## Notação e Glossário

### Letras de Símbolos

$S$	desvio padrão
$F_w$	Fluxo de destilação a vapor
$F_s$	Fluxo de destilação por solvente
$p_i^0$	Pressão de vapor do analito $i$ (kPa)
$p_{tot}$	Pressão total (kPa)
$T_w$	Temperatura na amostra ( $^{\circ}C$ )
$t$	Duração da extração (minutos)
$R$	Recuperação do analito
$\gamma_i^w$	Coefficiente de atividade do analito
$C_1$	Concentração de soluto no balão da fase aquosa (mg/L)
$C_2$	Concentração de soluto no balão da fase orgânica (mg/L)
$W$	Volume de água no balão da fase aquosa (mL)

### Lista de Siglas

APA	Agência Portuguesa do Ambiente
Ac. Bor	Acetato Borneol
Ac. Geraniol	Acetato Geraniol
Bor	Borneol
Cit	Citronelol
GC-FID	Cromatografia Gasosa por Ionização de Chama
GC-MS	Cromatografia Gasosa por Espectrometria de Massa
HPLC	Cromatografia Líquida de alta Eficiência
EUA	Estados Unidos da América
Eug	Eugenol
SDE	Extração e Destilação Simultânea
SFC	Extração com Fluido supercrítico
LLE	Extração Líquido-Líquido
SLE	Extração Sólido-Líquido
Ger	Geraniol
Ment	Mentona
SPME	Microextração em fase Sólida
OEs	Óleos Essenciais
PI	Padrão Interno
PNICE	Plano Nacional de Implementação da Convenção de Estocolmo
Pul	Pulegona
Terp	(S)-(-)- $\alpha$ -Terpineol
Hex	2,2-6 Trimetilciclohexanona

# 1 Introdução

As plantas autotróficas são consideradas uma importante fonte de substâncias biologicamente ativas, pois ocupam o primeiro nível na maioria das cadeias tróficas terrestres. As substâncias biologicamente ativas têm grande importância econômica e agregam valor à espécie de onde foram isoladas. De um modo geral, estas substâncias são produzidas a partir das reações do metabolismo secundário destas espécies, participando diretamente nos processos de crescimento e desenvolvimento da planta. Estas substâncias podem ainda ser utilizadas na proteção de culturas agrícolas, de microrganismos patogênicos bem como de pragas, com a vantagem de não se acumularem no ambiente <sup>[1]</sup>.

Muitos destes metabolitos secundários, estão presentes no dia - a - dia, sendo utilizados em todo o mundo para produzir substâncias provenientes de diversas indústrias (como a alimentar, cosmética e perfumaria) <sup>[2,3]</sup>.

É importante mencionar que a estação do ano em que é feita a recolha da amostra da planta é um dos fatores de maior importância, visto que a quantidade da composição dos constituintes ativos nem sempre são os mesmos durante o ano. Relacionando as alterações qualitativas e quantitativas de metabolitos secundários, ressaltam-se as interações bióticas: planta/microrganismos, planta/insetos, planta/planta, idade e estágio de desenvolvimento e ritmo circadiano; e os fatores abióticos: luminosidade, temperatura, pluviosidade, estado nutricional, sazonalidade, disponibilidade de água, radiação ultravioleta, composição atmosférica e altitude <sup>[3]</sup>.

Algumas plantas possuem maior resistência a fungos, bactérias, insetos e pragas de um modo geral devido à presença de óleos essenciais, agindo, por exemplo, para sua autodefesa, repelindo predadores que são afetados pelo contacto com a planta. Além disso, as plantas podem repelir outras plantas que possam competir com nutrientes e solo necessários para sua sobrevivência e domínio local, conseguindo garantir alimento, espaço e evitar a sua extinção perante o surgimento de ameaças <sup>[4]</sup>.

Nem todas as plantas aromáticas possuem óleos essenciais (OEs), uma vez que nem todas possuem constituintes significativos, havendo casos em que as quantidades de OEs são insignificantes e outros extremamente marcantes. Existem várias técnicas de extração destes tipos de compostos, nomeadamente o método de extração sólido-líquido, método de extração líquido-líquido, extração e destilação simultânea entre outros, e para fazer uma análise com precisão usa-se um cromatógrafo de fase gasosa <sup>[5]</sup>.

## 1.1 Enquadramento e Apresentação do Projeto

O conceito de utilização de produtos naturais substituindo os produtos sintéticos, é um tema antigo. Contudo, existem relatos bíblicos da sua presença como importante composto volátil (exemplo OE de Bálsamo) eram utilizados em banhos, aromatização e até para embalsamar (perfumar) casas <sup>[6]</sup>.

Atualmente existe cada vez mais necessidade do uso de pesticidas (compostos sintéticos aplicados para proteger a quantidade e a qualidade das culturas agrícolas). No entanto, estes produtos químicos podem ter efeitos colaterais na saúde humana e no meio ambiente. Por outro lado, cada vez mais as pragas se tornam, resistentes aos pesticidas existentes, havendo a necessidade de os substituir por métodos mais eficazes e agressivos <sup>[7]</sup>.

A problemática dos pesticidas pode ter consequências graves no meio ambiente como a contaminação de solos e águas (por exemplo, águas superficiais e subterrâneas), colocando a saúde humana em perigo uma vez que não se sabe com clareza se o alimento consumido foi exposto a esse tipo de produto e se realmente o produtor seguiu as orientações corretas para a sua aplicação. Os inseticidas e fungicidas sintéticos são compostos com elevado tempo de degradação. Os extratos de óleos essenciais surgem como alternativa, permitindo a redução da utilização dos compostos que prejudicam o meio ambiente. Para a obtenção dos OEs e caracterização do extrato de óleo essencial recorrem-se a técnicas de extração, por extração e destilação simultânea e identificação e quantificação por cromatografia gasosa com detetor de ionização de chamas [7].

A coletividade de certos compostos pode ou não aumentar o poder antibiótico e antifúngico a espécies vegetais. Contudo pode deduzir-se que a utilização de alguns óleos essenciais (principalmente de plantas aromáticas), poderá ser capaz de afetar uma larga gama de microrganismos e insetos [7].

Este projeto teve como objetivo a otimização de técnicas de extração de compostos bioativos e de técnicas analíticas com vista à futura aplicação destes compostos como biopesticidas usados como alternativa aos tradicionais inseticidas. Este trabalho inclui ainda uma revisão bibliográfica sobre os constituintes de óleos essenciais para a proteção vegetal.

## 1.2 Metodologia

Para a extração dos compostos bioativos foi utilizado a técnica de extração e destilação simultânea (SDE) adaptado de Linkens - Nickerson modificado [5]. Para a análise do extrato é utilizado a técnica analítica por Cromatografia gasosa com detetor de ionização de chama (GC-FID). Os dados foram obtidos com recurso do programa GC Solution e o tratamento dos mesmos foram efetuados no Excel 2016.

## 1.2 Organização da Tese

Este trabalho está organizado e dividido por capítulos (total de seis capítulos), com início na introdução e terminando nas conclusões. O primeiro capítulo corresponde à introdução do projeto realizado, fazendo um pequeno enquadramento dos principais tópicos. O segundo capítulo refere-se ao estado da arte, em que se descrevem os métodos utilizados e temas relacionados com o trabalho desenvolvido. O terceiro capítulo refere as metodologias utilizadas para a realização do projeto, os materiais e equipamentos utilizados durante este processo, descrevendo os passos de cada etapa do trabalho realizado, desde a preparação de amostras até à análise destas pelos equipamentos. O quarto capítulo refere-se aos resultados e discussão destes, em que são analisados os dados obtidos por cada método, são discutidos os principais pontos do trabalho e a existência de problemas ou influência externa que altere estes resultados. O quinto capítulo refere-se às conclusões gerais do trabalho, em que são referidos os principais resultados e que conclusões se podem retirar destes. Por fim, o sexto capítulo corresponde aos principais problemas que ocorreram durante o trabalho e perspectivas para trabalhos futuros.

### 1.3 Objetivo Principal do Projeto

Identificar e quantificar os constituintes dos óleos essenciais e do extrato de plantas aromáticas extraídos com diferentes solventes.

### 1.4 Objetivos Secundários

Este trabalho teve como objetivos secundários, identificar e quantificar alguns constituintes de OEs no extrato de *Mentha x piperita* L. (Hortelã pimenta) e de *Pelargonium graveolens* L. (Gerânio) com propriedades biopesticidas, pela técnica de extração e pela técnica analítica.

Com a técnica de extração pretende-se determinar as percentagens de OEs presentes no extrato, o melhor solvente de extração (éter etílico ou n-pentano) e por fim o melhor tempo de extração (30 minutos ou 60 minutos) por extração e destilação simultânea (SDE), técnica adotada para este trabalho.

Com a técnica analítica, pretende-se fazer uma análise cromatográfica dos constituintes pretendidos para este trabalho por cromatografia gasosa com detetor de ionização de chama (GC-FID), técnica adotada para a análise.

## 2 Estado da Arte

### 2.1 Óleos Essenciais

#### 2.1.1 Contextualização Histórica

Acredita-se que o uso de óleos essenciais a partir de plantas aromáticas começou com os chineses, em 2700 a.C., sendo que o livro mais antigo de ervas do mundo, Shen Nung, relata plantas muito conhecidas como por exemplo o gengibre. No ano 2000 a.C., há relatos de que os persas e egípcios já utilizavam estes compostos. O físico árabe Avicena (980 - 1073), é considerado como o primeiro a extrair óleo de rosas. Com o avançar da tecnologia, a partir dos séculos XVI e XVII, o tema “óleo essencial” ganhou destaque a nível mundial uma vez que, começou-se a explorar suas propriedades e a comercialização dos seus produtos sendo muito valioso principalmente na Europa [6].

O químico francês René-Maurice Gattefossé em 1928, ficou conhecido como o “pai” da aromaterapia, ao criar este termo associado a óleos essenciais. Após sofrer um pequeno acidente no laboratório causado por uma explosão, ficou gravemente ferido nos braços, mergulhando os mesmos numa banheira com lavanda (*Lavandula angustifolia*) pensando ser água. Logo notou que em poucos minutos a sua dor havia passado, desaparecendo mais tarde as cicatrizes [8].

#### 2.1.2 Conceitos dos Óleos Essenciais

Os óleos essenciais podem ser definidos como material volátil presente em plantas e, geralmente, de odor e fragrância características. Os óleos essenciais podem ser extraídos de diversas maneiras. Podem ser extraídos por diferentes vias/técnicas nomeadamente, SDE, destilação a vapor, prensagem a frio das cascas (normalmente para frutos), entre outras diversas formas. O resultado final será um óleo essencial onde predominam monoterpenos, compostos derivados de hidrocarbonetos com dez carbonos na sua estrutura molecular [9].

As aplicações genéricas mais importantes dos óleos essenciais são [9]:

- As baseadas no odor, constituindo-se nos fundamentos de indústria e da arte de perfumaria e da aromatização de produtos industriais;
- As que se fundamentam no sabor, proporcionando às indústrias de alimentos e bebidas recursos importantes para a valorização destes produtos;
- As que possibilitam a obtenção de produtos terapêuticos, de solventes e emulsões industriais ou produtos intermediários para produtos sintéticos;
- As que se baseiam na associação odor-sabor, permitindo a maior valorização dos produtos comestíveis.

Somesh et al., 2015, define um óleo essencial como um líquido hidrofóbico concentrado contendo compostos aromáticos voláteis da planta. Os óleos essenciais apresentam vantagens pela sua concentração de aroma, sendo a maioria deles razoavelmente antioxidantes naturais e agentes antimicrobianos [10].

Os OEs são geralmente incolores (quando frescos), não são muito estáveis na presença do ar, luz e calor, mas com o tempo podem oxidar adquirindo uma cor escura, logo devem ser armazenados ao abrigo do ar e da luz, à baixa temperatura, uma vez que à temperatura ambiente

estes tendem a evaporar-se e em frascos de vidro âmbar de preferência cheios evitando assim a oxidação (Figura 1) [11].

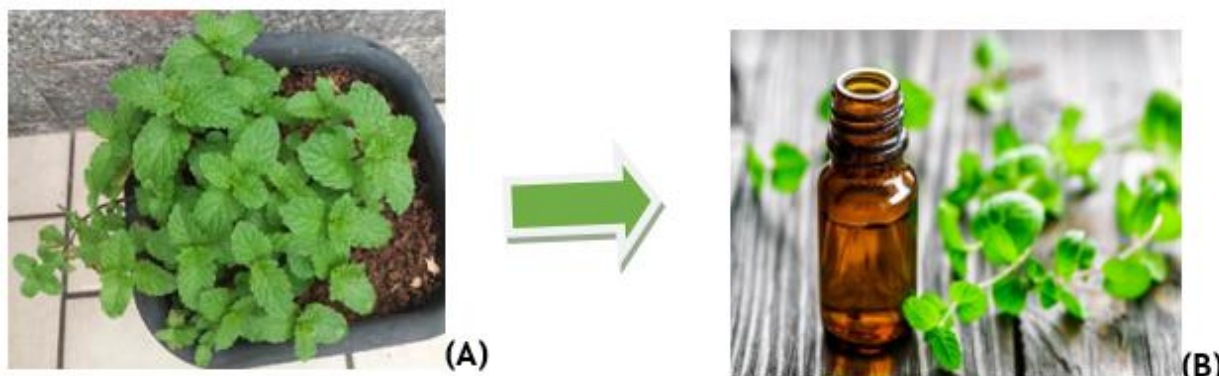


Figura 1 - Hortelã pimenta no seu estado natural (A); Óleo essencial após extração (B) [12]

Geralmente após extração a separação de um óleo essencial da fase aquosa, é realizado por um método físico que não leva a mudanças significativas na sua composição química, conforme mostra a ilustração da Figura 2.

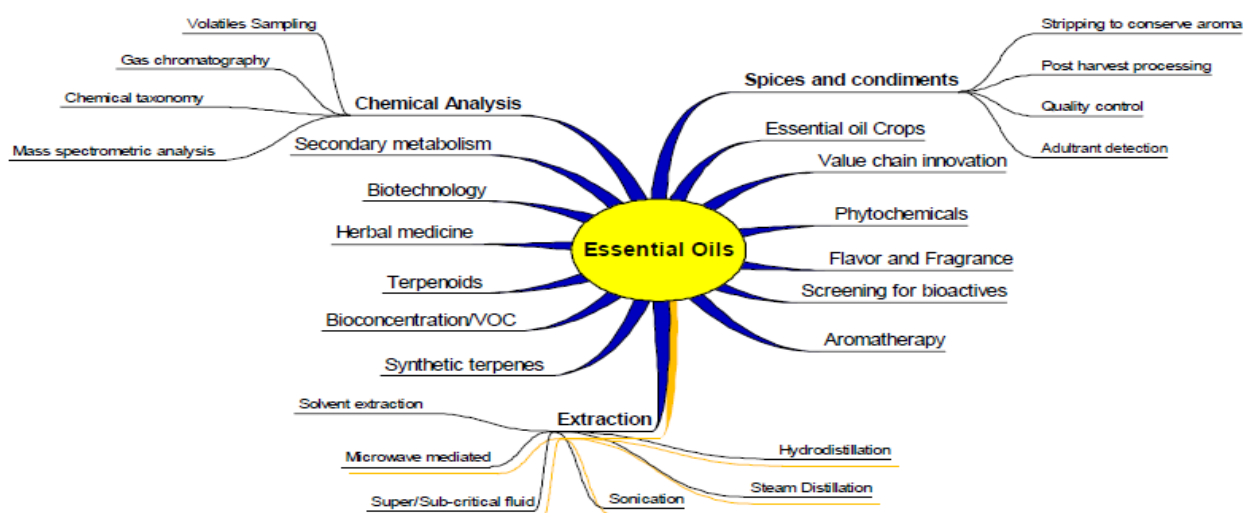


Figura 2 - Diagrama de árvore da ampla ramificação de especializações no campo de óleos essenciais [11]

Atualmente existem um enorme interesse em extrair óleo essencial de plantas ou de produtos das plantas. Para tal é preciso haver formas ou técnicas simples de extração para os esses tipos de compostos. Uma das técnicas que foi introduzida por Linkens e Nickerson em 1964 denominada por processo de SDE, onde combina a destilação a vapor com a extração contínua com um solvente imiscível com a água em apenas uma etapa [5].

Em relação à análise cromatográfica dos compostos por cromatografia gasosa com detetor de ionização de chamas (GC-FID), pode-se utilizar dois modos de injeção distintas: o “split” é a técnica

utilizada para a análise de soluções muito concentradas, sendo que nesta técnica, uma parte da amostra é descartada após a sua vaporização. A técnica de injeção “*splitless*” é técnica utilizada para a análise de soluções já diluídas, com a transferência da maior parte da amostra vaporizada contida no injetor para o interior da coluna. Nesta técnica com a saída do divisor fechada, o fluxo de gás dentro do injetor é diminuído devido a resistência oferecida pela coluna capilar <sup>[13]</sup>.

Os principais componentes dos óleos essenciais são os terpenos, de fórmula química  $(C_5H_8)_n$ . A estrutura dos terpenos podem ser essencialmente derivados do isopreno <sup>[14]</sup>. Os terpenos são classificados em diferentes grupos de acordo com o número de unidades de isopreno. A classificação dos terpenos pode ser observada com mais detalhes na Tabela 1.

**Tabela 1 - Classificação dos terpenos de acordo com o número de unidades de isopreno <sup>[13]</sup>**

Unidades de isopreno	Fórmula química	Classificação	Exemplos	Ref.
1	$C_5H_8$	Hemiterpenos	Isopreno; Prenol; Ácido isovalérico; etc.	[14,15]
2	$C_{10}H_{16}$	Monoterpenos	Eugenol; Geraniol; $\alpha$ -pineno; Limoneno; timol; etc.	[14]
3	$C_{15}H_{24}$	Sequiterpenos	Farnesol; $\beta$ -cariofileno; Nerolidol; Eugenil; etc.	[14,15]
4	$C_{20}H_{32}$	Diterpenos	Cafestol; Retinol (vitamina A); Esteviosídeo; etc.	[14,15]
5	$C_{25}H_{40}$	Sesterpenos	Sem informação	[14]
6	$C_{30}H_{48}$	Triterpenos	$\beta$ -caroteno; Ácido asiático; etc.	[14,15]
N	$(C_5H_8)_n$	Politerpenos	Látex	[14]

Na Tabela 2 (página 7 a 10), pode ser observada também alguns exemplos de monoterpenos, sendo estes os compostos utilizados no estudo do projeto, de acordo com a literatura e disponibilidade de alguns destes compostos no laboratório.

**Nota:** A Tabela 2 está organizada por ordem crescente de ponto de ebulição, apresentados primeiros os compostos com menores ponto de ebulição, seguindo posteriormente os que apresentavam maiores ponto de ebulição. É de salientar referir que os compostos apresentados na Tabela 2, não são os únicos exemplos de monoterpenos existentes na composição de OEs de espécies vegetais.

Tabela 2 - Propriedades físico-químicas dos compostos em estudo

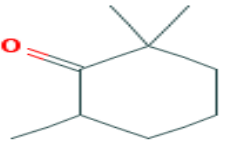
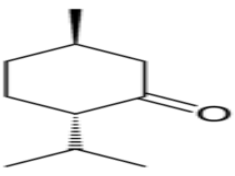
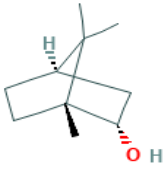
Composto Número CAS Fórmula Química	Estrutura Química	Ponto de ebulição/ fusão a 760 mmHg (°C)	Log K <sub>ow</sub>	Solubilidade em água a 25 °C (mg/L)	Solubilidade em solventes orgânicos	Pressão de vapor	Densidade	pK <sub>a</sub>	Ref.
2,2,6- Trimetilciclohexanona (Hex) 2408-37-9 C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> O		178,5/-31,8	2,29	1640	s.i.	1,0±0,3 mmHg a 25°C	0,9±0,1 g/cm <sup>3</sup>	-7.5	[16-18]
Mentona (Ment) 89-80-5 C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O		205,0/-6	2,62	688	Muito solúvel em álcool e óleos fixos ; Ligeiramente muito solúvel em água	0,3±0,4 mmHg a 25°C	0,9±0,1 g/cm <sup>3</sup>	s.i.	[19,20]
Borneol (Bor) 507-70-0 C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O		212,0/202,0	2,71	738	Ligeiramente solúvel em álcool e éter	0,0±0,9 mmHg a 25°C	1,0±0,1 g/cm <sup>3</sup>	s.i.	[21,22]

Tabela 2 (Cont.) - Propriedades físico-químicas dos compostos em estudo

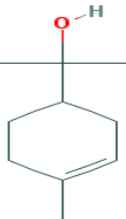
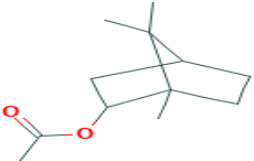
Composto Número CAS Fórmula Química	Estrutura Química	Ponto de ebulição/ fusão a 760 mmHg (°C)	Log K <sub>ow</sub>	Solubilidade em água a 25 °C (mg/L)	Solubilidade em solventes orgânicos	Pressão de vapor	Densidade	pK <sub>a</sub>	Ref.
(S)-(-)- $\alpha$ -Terpineol (Terp) 98-55-5 C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O		217,5/35,0 a 40,0	2,79	7100	Solúvel em 50% de álcool; muito solúvel em éter benzeno, acetona	0,0±0,9 mmHg a 25 °C	0,9±0,1 g/cm <sup>3</sup>	s.i.	[23,24]
Acetato Borneol (Ac. Bor) 76-49-3 C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>		223,5/25 a 29	3,60	9,72	Solúvel em álcool e dipropileno glicol	0,1±0,4 mmHg a 25 °C	1,0±0,1 g/cm <sup>3</sup>	s.i.	[25,26]

Tabela 2 (Cont.) - Propriedades físico-químicas dos compostos em estudo

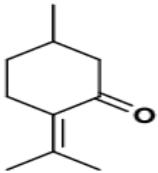

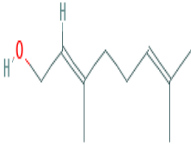
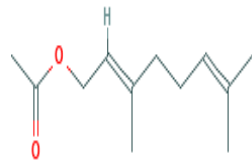
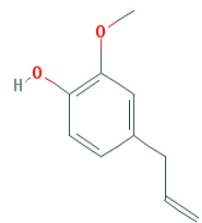
Composto Número CAS Fórmula Química	Estrutura Química	Ponto de ebulição/ fusão a 760 mmHg (°C)	Log K <sub>ow</sub>	Solubilidade em água a 25 °C (mg/L)	Solubilidade em solventes orgânicos	Pressão de vapor	Densidade	pK <sub>a</sub>	Ref.
<b>Pulegona (Pul)</b> 89-82-7 C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O		224,0/inferior a 25	2,56	276	Mistura-se com álcool, éter e clorofórmio	0,1±0,4 mmHg a 25 °C	0,9±0,1 g/cm <sup>3</sup>	0,123 a 25 °C	[27,28]
<b>Citronelol (Cit)</b> 106-22-9 C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O		224,5/Inferior a -20	3,38	200	Solúvel em óleos fixos, propileno glicol; Insolúvel em glicerina; Mistura-se com etanol e éter, (+) - citronelol	0,0±0,9 mmHg a 25 °C	0,8±0,1 g/cm <sup>3</sup>	17,11 a 25 °C	[29,30]
<b>Geraniol (Ger)</b> 106-24-1 C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O		229,5/inferior a -15	3,28	100	Mistura-se com éter e acetona; Solúvel em 70% de álcool, óleos fixos	0,0±1,0 mmHg a 25 °C	0,9±0,1 g/cm <sup>3</sup>	s.i.	[31,32]

Tabela 2 (Cont.) - Propriedades físico-químicas dos compostos em estudo

Composto Número CAS Fórmula Química	Estrutura Química	Ponto de ebulição/ fusão a 760 mmHg (°C)	Log K <sub>ow</sub>	Solubilidade em água a 25 °C (mg/L)	Solubilidade em solventes orgânicos	Pressão de vapor	Densidade	pK <sub>a</sub>	Ref.
Acetato Geraniol (Ac. Ger) 105-87-3 C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>		247,5/s.i.	4,10	6,8	Solúvel em 70% álcool e na maioria dos óleos fixos	0,0±0,5 mmHg a 25 °C	0,9±0,1 g/cm <sup>3</sup>	s.i.	[33,34]
Eugenol (Eug) 97-53-0 C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>		255,0/-9,2	2,20	2460	Mistura-se com álcool (1 mL se dissolve em 2 mL de álcool a 70%), clorofórmio, éter, óleos	0,0±0,5 mmHg a 25 °C	1,1±0,1 g/cm <sup>3</sup>	10,19 a 20 °C	[35,36]

s.i.: Sem informação

### 2.1.3 Importância Económica dos Óleos Essenciais

O uso de óleos essenciais vegetais para perfumaria, aditivos em alimentos /confeitaria, bem como para produtos farmacêuticos e cosméticos, tem sido uma tendência crescente no mercado mundial e uma parte importante na indústria medicinal ao longo do século XX <sup>[37]</sup>.

Existem mais de 250 tipos de óleos essenciais. Vários países produzem diferentes tipos de óleos essenciais, sendo os países da América do Norte e da Ásia os que dominam no comércio mundial de óleos essenciais <sup>[38]</sup>. A enorme produção de óleos essenciais, avaliado num valor maior que 70.000 toneladas por ano, é alcançado principalmente por grandes cultivadores e produtores como os Estados Unidos da América (EUA), Brasil, Índia e China. Mas da mesma forma, Austrália, Malásia, Indonésia, Tailândia, África do Sul, Egito, França, Espanha, Itália, Alemanha, Rússia, Nepal, Bangladesh e Paquistão são importantes colaboradores na produção mundial de óleos essenciais de plantas como cravo-da-índia, capim-limão, manjeriço, aipo, alecrim, gerânio, lavanda, entre outros <sup>[37]</sup>.

De acordo com o Índice de Produtos de Complexidade (PCI), 2016, desde 1962 até 2016 os principais exportadores de óleos essenciais foram EUA (\$621 milhões/534,344 milhões de euros), a Índia (\$604 milhões/519,716 milhões de euros), a China (\$421 milhões/362,253 milhões de euros), a França (\$394 milhões/339,020 milhões de euros) e o Brasil (\$338 milhões/290,835 milhões de euros). Os principais importadores são os EUA (\$1,06 bilhões/0,91209 bilhões de euros), a França (\$383 milhões/329,555 milhões de euros), a Alemanha (\$355 milhões/305,462 milhões de euros), o Reino Unido (\$285 milhões/ 245,230 milhões de euros) e a Índia (\$212 milhões/182,417 milhões de euros). A listagem dos maiores consumidores e fornecedores de óleos essenciais a nível mundial no ano de 2016, segundo o PCI pode ser analisada na Tabela 3 <sup>[39]</sup>.

*Tabela 3 - Taxas de exportações e importações de óleos essenciais <sup>[39]</sup>*

Países	Taxas de exportação (%)	Taxa de importação (%)
Estados Unidos da América	13	22
Canada	1,4	2,8
México	3,1	2,1
Brasil	6,9	1,4
Argentina	4,2	0,1
Índia e China (*)	11	4,4
Singapura	0,1	3,1
Indonésia	4,7	2,7
Hong Kong e Arabia Saudita (*)	0,3	1,2
Japão	0,2	3,7
França	8,4	8,2
Alemanha	4,0	6,6
Reino Unido	3,4	6,1
Holanda	1,0	3,3
Suíça	1,3	3,0
Espanha	3,0	2,8
Itália	3,0	1,5
Áustria e Bélgica (*)	0,8	1,0
Irlanda	0,6	2,9
Portugal	0,1	0,1

(\*) - mesmas percentagens

É possível concluir que, os principais fornecedores de óleos essenciais no ano 2016, foram: Estados Unidos da América (13%), China (11%), Índia (11%), França (8,4%) lidera a nível europeu, Brasil (6,9%) e a Indonésia (4,7%), conforme pode observar no gráfico seguinte (Figura 3):

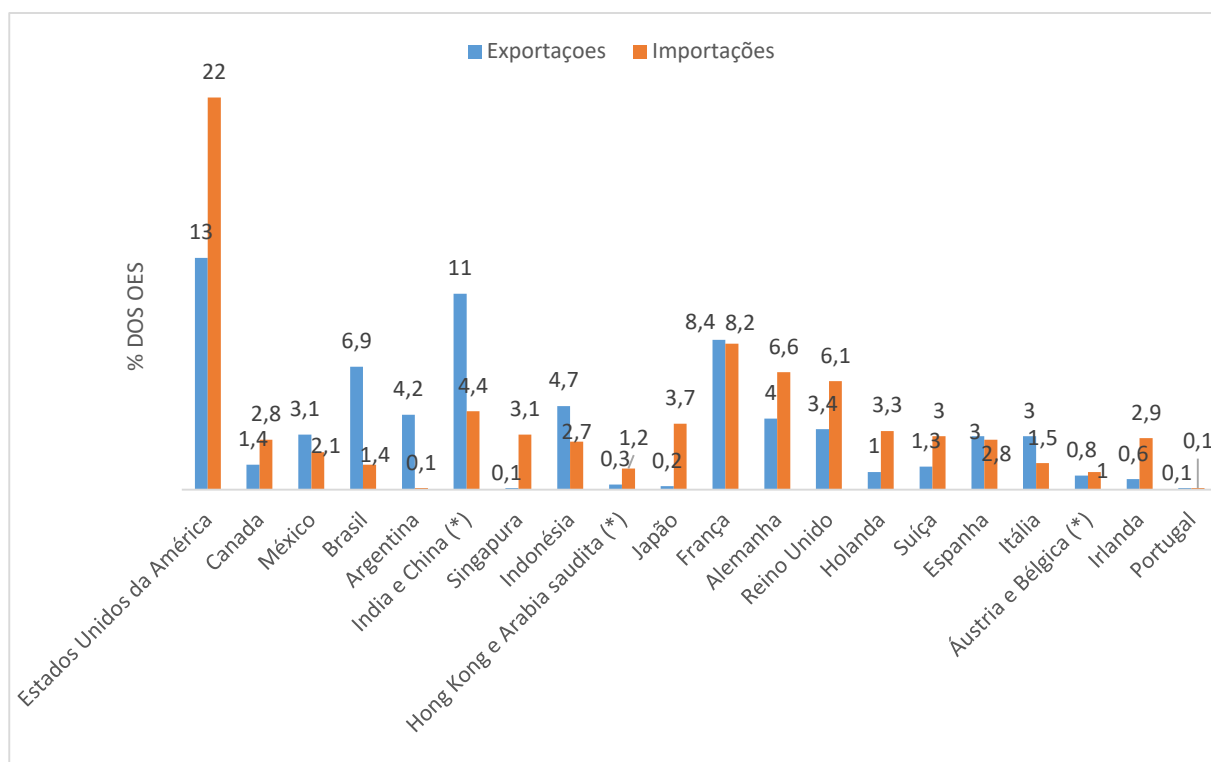


Figura 3- Taxas de exportações e importações de óleos essenciais em 2016 [39]

#### 2.1.4 Uso de Óleos Essenciais como Biopesticidas (Pesticidas Botânicos)

Em relação ao uso medicinal, os óleos essenciais podem atuar como antibacteriano, antifúngico, anticancerígeno, antidiabético, anti-inflamatório, antioxidante, antimicrobiano, entre outras aplicações [37].

Os óleos essenciais constituem várias moléculas ativas, portanto, afetam múltiplos alvos numa célula. O risco de vários efeitos tóxicos, como irritação e corrosão, sensibilização das células, absorção percutânea, toxicidade aguda no sistema orgânico e carcinogenicidade podem limitar o uso medicinal de OEs [37].

Nas primeiras semanas deste projeto, efetuou-se várias pesquisas bibliográficas sobre plantas aromáticas, principais constituintes químicos, óleos essenciais e as possíveis pragas que estes podem combater, bem como os riscos mencionados anteriormente, podendo ser analisada as informações com mais detalhes na Tabela A2 (página 63 a 69) do anexo 5 deste trabalho.

##### 2.1.4.1 Pesticidas: Conceitos e Legislação Aplicável

De acordo com o ponto 10, do Artigo 3º, da Diretiva 2009/128/EC, os pesticidas podem ser definidas como: (a) um produto fitossanitário conforme definido na Regulamentação (EC) nº 1107/2009; (b) um produto biocida como definido na Diretiva 98/8/EC do Parlamento Europeu e do Conselho, de 16 de Fevereiro de 1998, relativa à comercialização de produtos biocidas [40].

A nível mundial, a lista de pesticidas cresce a cada ano. Mesmo com baixos níveis de exposição podem ter influências associadas a problemas de saúde humana. Como consequência, vários setores das indústrias, devem atender aos padrões de níveis máximos de resíduos nos seus produtos. A Estratégia Temática para o Uso Sustentável de Pesticidas, publicada em 2006, define alguns objetivos <sup>[41]</sup> : (a) minimizar os perigos e riscos para a saúde e para o meio-ambiente, gerados pelo uso de pesticidas; (b) controlar o uso e distribuição de pesticidas; (c) reduzir os níveis de substâncias ativas nocivas, substituindo as mais perigosas por alternativas mais seguras (incluindo não-químicas), entre outros.

Na Tabela A1 do Anexo 4 podem ser observados mais informações sobre Legislação aplicável, instituições intervenientes e respetivas responsabilidades do uso de pesticidas, de acordo com o Plano Nacional de Implementação da Convenção de Estocolmo (PNICE)<sup>[42]</sup>.

Em geral, o uso de óleos essenciais como pesticidas botânicos tem inúmeras vantagens, incluindo as seguintes <sup>[43]</sup>:

- Alta eficácia contra uma ampla gama de pragas e doenças de importância agrícola e médica;
- Múltiplos mecanismos de ação, devido ao grande número de ingredientes ativos em cada mistura, o desenvolvimento da resistência é menos provável;
- Baixa toxicidade (resíduos) contra organismos não-alvo, incluindo humanos;
- Os processos de produção são relativamente simples e baratos;

## 2.2 Espécies de Plantas Utilizados no Presente Projeto

De acordo com a literatura, a Pulegona e o Eugenol são os dois constituintes dos OEs com mais significado biopesticida, sendo a Pulegona existente em grande percentagem no Poejo, no entanto este não tem Eugenol na sua composição. Ainda de acordo com a literatura existem várias espécies de plantas que têm Pulegona e Eugenol entre outros constituintes na composição dos OEs, nomeadamente a hortelã pimenta e o gerânio (Figura 4).



Figura 4 - *Mentha x piperita* L. (A) e *Pelargonium graveolens* L. (B)<sup>[12]</sup>

Portanto, neste projeto foi utilizada a técnica SDE para extrair óleos essenciais de duas plantas de espécies diferentes, nomeadamente a hortelã pimenta (*Mentha x piperita*. L) e gerânio (*Pelargonium graveolens* L.), apresentando características muito distintas (Tabela 4).

Tabela 4- Principais características das plantas utilizadas no estudo do projeto <sup>[44-46]</sup>

Principais características das plantas		
Nome	Hortelã pimenta	Gerânio
Nome científico	<i>Mentha x piperita</i> L.	<i>Pelargonium graveolens</i> L.
Família	<i>Lameaceae</i>	<i>Geraniaceae</i>
Género	<i>Mentha</i>	<i>Pelargonium</i>
Local de origem	Nativa da Europa, popular no Japão e Estados Unidos	África do Sul (na sua maioria), Austrália e Nova Zelândia.
Parte da planta utilizada	Partes áreas (folhas)	Partes aéreas saudáveis e frescas
Descrição do óleo	Líquido pouco denso, ligeiramente amarelo, forte odor mentolado	Líquido pouco denso, brilhante, de coloração que varia do amarelo pálido ao amarelo esverdeado
Composição (maior %)	Mentol (38-48%) / cânfora de hortelã	Geraniol
Aplicações	Fabricação de perfumes e fragâncias e cosméticos. Usado como analgésico e cicatrizante, etc.	Fabricação de perfumes e fragâncias, de cosméticos, como analgésico e cicatrizante. Utilizado como calmante, sedativo e como repelente de insetos

### 2.2.1 Hortelã Pimenta (*Mentha x piperita* L.)

A *Mentha x piperita* L., é considerada produto do cruzamento entre *Mentha spicata* L. (hortelã verde) e *Mentha aquatica* L. (hortelã da água). Originária da região mediterrânica da Europa e pertencente a família *Lamiaceae* do género *Mentha*, é considerado uma das plantas mais utilizadas no mundo devido às suas propriedades biopesticida, uma vez que graças ao seu aroma, consegue com o seu óleo essencial combater pragas de formigas, pulgas e ratos [47]. A erva da *Mentha x piperita* L. é muito conhecida na medicina tradicional Chinesa e há indícios que as suas folhas secas foram encontradas nas pirâmides egípcias [48]. A composição química das suas folhas pode variar com a maturidade da planta, região geográfica e condições de processamento. Em muitos dos casos a planta é colhida em plena floração, com teor de humidade de 0,75 - 0,85 (g água / g matéria húmida) [49]. O óleo essencial da *Mentha x piperita* L. é composto principalmente por um monoterpene, como o mentol (38 - 48%) e mentona (30 - 65%). De entre os outros constituintes menores, pode-se incluir limoneno (2,3%), acetato de metila (2,8%) e 1,8-cineol (8%) [45].

### 2.2.2 Gerânio (*Pelargonium graveolens* L.)

O *Pelargonium graveolens* L. (Figura 4) verdadeiro é uma planta com flores de cores variadas, enquanto que a planta que se utiliza nos jardins para adornar as varandas e terraços designa-se por pelargónio, planta proveniente da África do Sul que não tolera invernos frios. O *Pelargonium graveolens* L. também pode encontrado no litoral mediterrânico podendo sobreviver todo o ano no exterior se for protegido de eventuais geadas. Trata-se de uma planta arbustiva, muito ramificada, que pode atingir uma altura de até 1,3 m e uma extensão de 1 m, apresentando na sua fase jovem folhas macias ao toque e com presença de numerosos pêlos glandulares. Portanto é uma planta de crescimento rápido que requer muita luz, e nutrientes. É muito importante eliminar as flores antigas para evitar problemas de apodrecimento e favorecer a floração [50].

É um tipo de planta, muito procurada para a extração de óleo essencial devido ao seu aroma, sendo o rendimento do seu óleo de extração muito baixo, entre 0,2 e 1,1 %. O componente maioritário do óleo essencial do *Pelargonium graveolens* L. é um monoterpene (geraniol) cuja biossíntese pertence à rota do mevalonato. De entre outros elementos constituintes estão o citronelol, linalol, geraniol, formiato de geraniol, iso-mentona [46].

## 2.3 Técnicas de Extração de Óleos Essenciais

A extração de compostos voláteis, pode ser definida como o método de obtenção de um soluto ou misturas de compostos, utilizando um solvente apropriado. O soluto pode ser extraído num meio sólido ou líquido, e o solvente usado para a extração pode ser água, um solvente miscível ou imiscível em água. Contudo a escolha do solvente a usar depende do soluto a ser extraído ou das condições experimentais a ser usados.

Os óleos essenciais podem ser extraídos em quantidade suficiente para serem utilizados em sínteses químicas ou como novos materiais, para uso científico ou comercial. Contudo, utilizam-se diferentes métodos de extração para isolar óleos essenciais de plantas aromáticas, tais como Extração Sólido-Líquido (SLE), Extração Líquido-Líquido (LLE), Extração com Fluido supercrítico (SFC), dentre outros, sem deixar escapar de mencionar a técnica de SDE, técnica adaptada para desenvolver este projeto. Uma vez que a técnica que se interessa para este estudo foi o SDE, só foi efetuado uma pequena introdução de algumas das técnicas mencionadas acima [51].

### 2.3.1 Extração Sólido-Líquido (SLE)

Neste tipo de extração, é utilizado um extrator Soxhlet (Figura 5), o qual permite transferir o soluto para os solventes. O extrator Soxhlet foi inventado em 1879 por Franz Von Soxhlet <sup>[52]</sup>. Este extrator pode extrair solutos de sólidos, usando um solvente volátil desejado, que pode ser ou não miscível em água. O balão é aquecido até à ebulição, onde o vapor sobe pelo tubo exterior e passa ao estado líquido, quando entra em contato com o condensador (parte superior do Soxhlet). Quando o nível de líquido enche o corpo do extrator, o solvente cai sobre o cartucho onde se encontra a amostra, extraíndo os compostos. O solvente retorna ao balão respectivo quando atinge uma determinada altura.

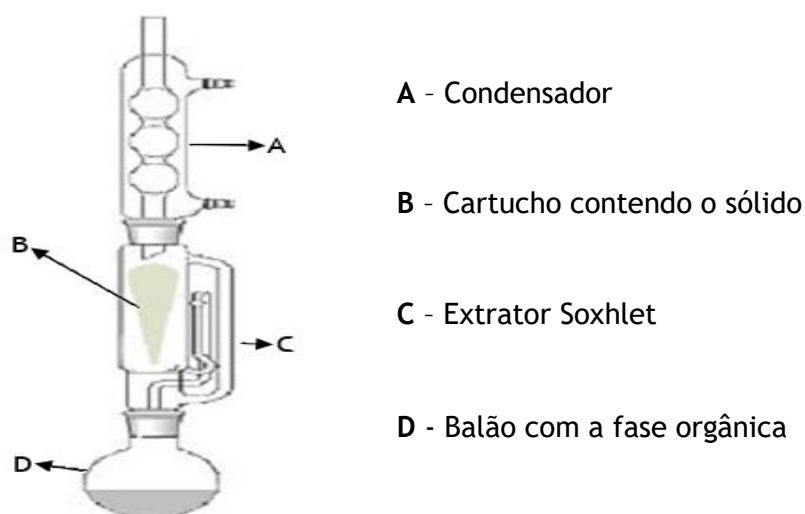


Figura 5 - Ilustração do Soxhlet <sup>[52]</sup>

### 2.3.2 Extração Líquido-Líquido (LLE)

A extração líquido/líquido é também designada de extração por solventes e envolve a distribuição do soluto entre duas fases de líquidos imiscíveis. Uma fase aquosa que contém o soluto a extrair, também chamada refinado, e uma fase orgânica, também chamada solvente (extrato), que irá necessariamente interagir com o soluto <sup>[53]</sup>.

O processo de extração efetua-se em três etapas (Figura 6): i) Introdução das fases; ii) Agitação das fases até atingirem o equilíbrio; iii) Separação das fases.

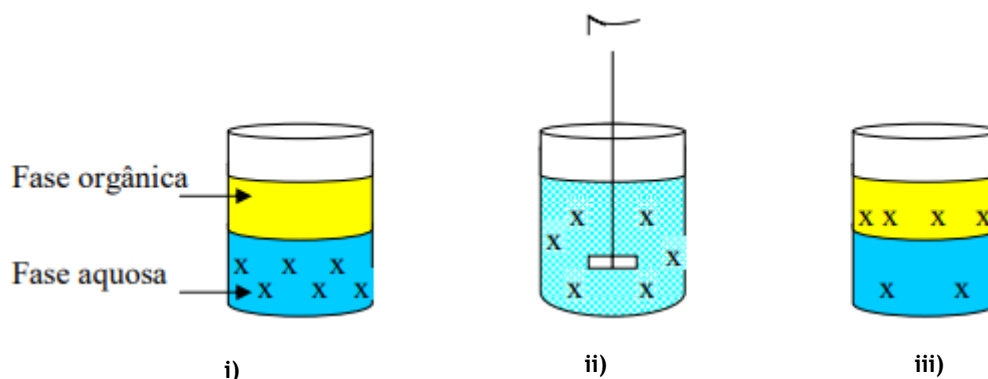


Figura 6 - Processo de extração líquido-líquido para um soluto <sup>[53]</sup>



Para verificar a aplicabilidade desta técnica, existe um modelo de balanços de massa nas várias zonas do SDE para a eficiência de extração do soluto em ambas as fases em função do tempo de extração (t), podendo ser observado na expressão seguinte:

$$R = \frac{1}{C_1 - C_2} \left\{ C_1 \left[ 1 - \exp\left(-\frac{t}{C_1}\right) \right] - C_2 \left[ 1 - \exp\left(-\frac{t}{C_2}\right) \right] \right\} \quad (1)$$

sendo:

$$C_1 = \frac{W}{F_w} \left( \frac{p_{tot}}{p_i^o \gamma_i^w} \right) \quad (2) \qquad C_2 = \frac{W}{F_s} \quad (3)$$

Sendo:

$F_w$	Fluxo de destilação a vapor
$F_s$	Fluxo de destilação por solvente
$p_i^o$	Pressão de vapor do analito i (kPa)
$p_{tot}$	Pressão total (kPa)
$T_w$	Temperatura na amostra (°C)
t	Duração da extração (minutos)
R	Recuperação do analito
$\gamma_i^w$	Coeficiente de atividade do analito
$C_1$	Concentração de soluto no balão da fase aquosa (mg/L)
$C_2$	Concentração de soluto no balão da fase orgânica (mg/L)
W	Volume de água no balão da fase aquosa (mL)

### Efeito do Tempo de Extração e da Concentração

O tempo de extração tem grande influência na eficiência de extração, nomeadamente para compostos com elevado ponto de ebulição (compostos polares), onde permite que  $C_1 \gg C_2$ . Simplificando e transformando a equação (1) numa nova expressão:

$$R = 1 - \exp\left(-\frac{t}{C_1}\right) \quad (4)$$

Para compostos com baixo ponto de ebulição (compostos apolares) a equação (1) simplificada é representada da seguinte forma:

$$R = 1 - \exp\left(-\frac{t}{C_2}\right) \quad (5)$$

Relativamente ao efeito da concentração, está análise só pode ser confirmada por resultados experimentais uma vez que de acordo com a equação (1), a eficiência de extração é independente da concentração dos compostos na amostra em qualquer que seja a amostra.

## 2.4 Técnicas Analíticas mais Usadas na Análise de Óleos Essenciais

Resumidamente, pode verificar o processo de obtenção de óleo essencial desde a colheita da planta até a fase de análise do composto (Figura 8).

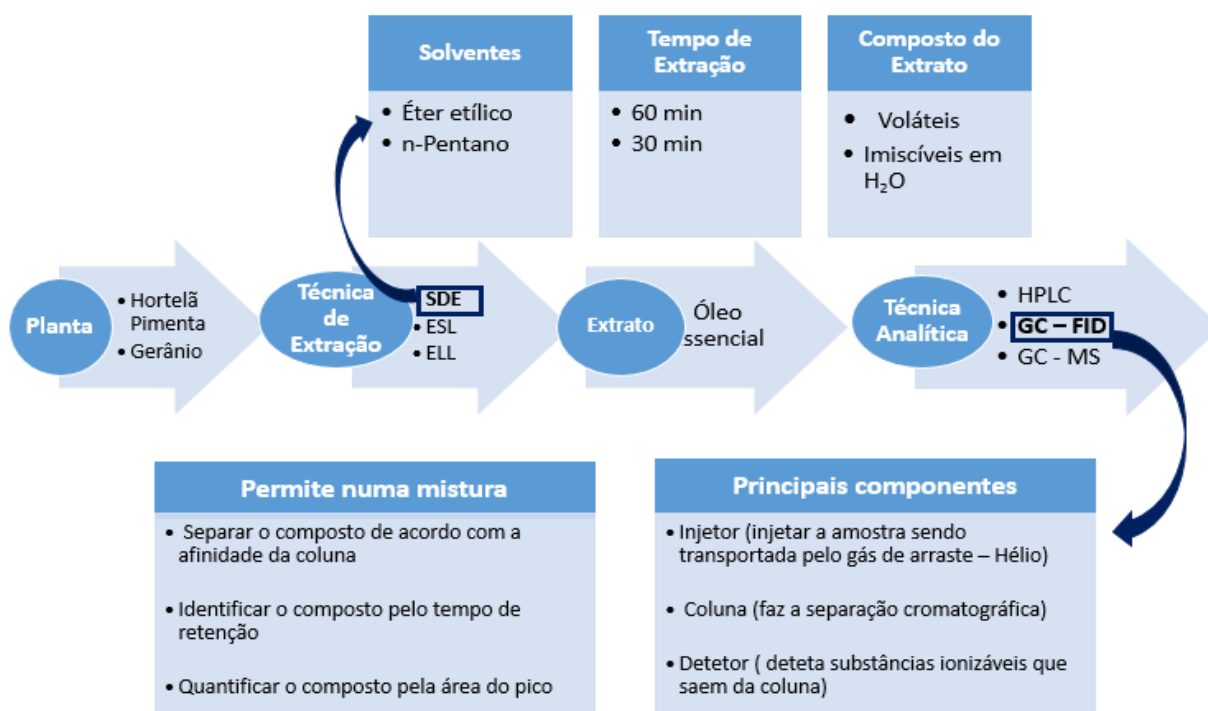


Figura 8- Processo de obtenção de óleo essencial

### 2.4.1 Cromatografia Gasosa com Detetor por Ionização de Chama (GC-FID)

Cromatografia gasosa com detetor por ionização de chama, ou GC-FID, é uma técnica analítica muito comum que é amplamente utilizada na indústria petroquímica, farmacêutica e em mercados de gás natural. Um FID (Detetor por Ionização de Chama) geralmente usa uma chama de hidrogênio/ar pela qual passa a amostra para oxidar moléculas orgânicas e produz partículas eletricamente carregadas, ou seja, iões [55].

Como é comum em outras técnicas de CG, é necessário um gás de arraste com baixo nível de impurezas de água e oxigênio, pois a água e o oxigênio podem interagir com a fase estacionária e causar problemas significativos, como elevado ruído de base e sangramento da coluna no cromatograma do gás de saída, o que reduz tanto a sensibilidade do analisador quanto a vida útil da coluna. O FID também é extremamente sensível a impurezas de hidrocarboneto no fornecimento de hidrogênio e de ar da chama. Impurezas de hidrocarbonetos podem causar aumento do ruído de base e reduzir a sensibilidade do detetor [56].

Os detetores de ionização de chama são usados amplamente em cromatografia gasosa devido a várias vantagens [57]:

- Custo: os detetores de ionização por chama são relativamente baratos de adquirir e operar;
- Baixa necessidade de manutenção: Além de limpar ou substituir o jato FID, esses detetores exigem pouca manutenção;
- Construção robusta: os FIDs são relativamente resistentes ao uso indevido;

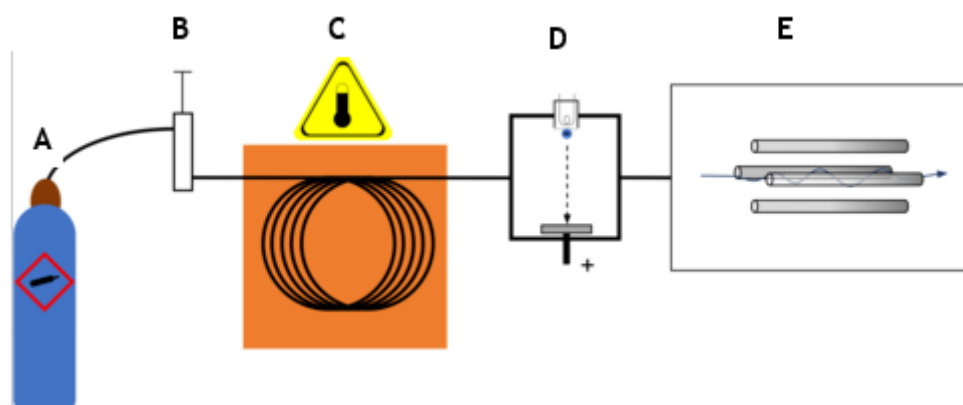
- Intervalos de linearidade e detecção: os FIDs podem medir a concentração de substâncias orgânicas em níveis muito baixos ( $10^{-13}$  g/s) e muito altos, com uma faixa de resposta linear de  $10^7$  g/s.

Os detetores de ionização por chama têm algumas limitações uma vez que não conseguem detetar substâncias inorgânicas e algumas espécies altamente oxigenadas ou funcionalizadas, (exemplo, como a tecnologia infravermelha). Outra limitação é que a chama do FID oxida todos os compostos oxidáveis que passam por ela, ou seja, todos os hidrocarbonetos são oxidados em dióxido de carbono [57].

## 2.4.2 Cromatografia Gasosa por Espectrometria de Massa (GC-MS)

Muitas das vezes, o GC-FID não é suficiente para uma análise completo do extrato, logo pode-se recorrer a cromatografia gasosa por espectrometria de massa (GC-MS), afim de completar a identificação dos picos que não representam os compostos pretendidos.

A cromatografia gasosa por espectrometria de massa (GC - MS) é uma técnica instrumental, compreendendo um cromatógrafo a gás (GC) acoplado a um espectrômetro de massa (MS), pelo qual misturas complexas de produtos químicos podem ser separadas, identificadas e quantificadas (Figura 8). A escolha do gás de arraste ao utilizar a GC-MS é fundamental, uma vez que o espectrómetro de massa é muito sensível ao oxigênio, à água e a impurezas de hidrocarbonetos. Quaisquer danos no espectro de massa, bem como na fase estacionária da cromatografia gasosa, podem dar origem a problemas significativos, como muito ruído de fundo e fuga da coluna no cromatograma do gás de saída, o que contribui, ao mesmo tempo, para reduzir a sensibilidade do analisador e diminuir a vida útil da coluna [58].



**Figura 9** - Diagrama de blocos para cromatografia gasosa usando espectro de massa. (A) gás de arraste; (B) Injetor de amostra; (C) Coluna; (D) Ionização de elétron; (E) Analisador de massa [59].

A solução da amostra é injetada na entrada do GC, onde é vaporizada e dispersada para uma coluna cromatográfica pelo gás de arraste. A amostra flui através da coluna e os compostos compreendendo a mistura de interesse são separados em virtude de sua interação relativa com o revestimento da coluna (colunas capilares), mas pode ser filme adsorvido diretamente a um sólido adsorvente (coluna empacotada) na fase estacionária, e do gás de arraste (fase móvel) [58].

O GC-MS apresenta algumas vantagens, nomeadamente: o GC tem alta resolução, a quantificação é feita através de monitoramento de um ou mais iões e maior sensibilidade (maior

massa implica maior sensibilidade). Por sua vez também apresenta algumas limitações, uma vez apresenta tempos razoavelmente longos e em muitos casos haverá necessidade de reações químicas)<sup>[58]</sup>.

### 2.4.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), é tipo de cromatografia que emprega uma fase móvel líquida e uma fase estacionária para ter um fluxo razoável (0,1 - 10 mL/min)<sup>[60]</sup>. É uma forma altamente aperfeiçoada de cromatografia em coluna, sendo que em vez de permitir que um solvente destile através de uma coluna sob gravidade, força-o a passar por altas pressões<sup>[61]</sup>.

Este tipo de cromatografia permite utilizar um tamanho de partícula muito menor para o material de empacotamento da coluna, o que dá uma área de superfície muito maior para interações entre a fase estacionária e as moléculas que passam por ela, permitindo uma separação muito melhor dos componentes da mistura.

A coluna é preenchida com minúsculas partículas de sílica e o solvente é apolar, por exemplo n-hexano. Os compostos polares na mistura durante a passagem pela coluna, ficam mais tempo na sílica polar do que os compostos não polares. Condições da coluna: um diâmetro interno de 4,0 - 20mm e um comprimento de 100 - 300 mm<sup>[60,61]</sup>.

## 2.5 Comparação da Técnica de Extração e de Análise (SDE e GC-FID)

Por se tratar de compostos muito voláteis, selecionou-se a técnica de extração e destilação simultânea (SDE) e a técnica analítica nomeadamente, a cromatografia gasosa com um detetor de ionização de chamas (GC-FID). O SDE baseia-se na volatilidade e solubilidade dos analitos a extrair, sendo que são fixados os seguintes parâmetros de temperatura durante a operação: Temperatura da amostra (~120°C) e temperatura dos solventes orgânicos (10°C acima do ponto de ebulição). Escolheu-se esta técnica pelas seguintes razões: permite realizar numa única operação a extração, ausência nos extratos de material não volátil, apresenta elevadas eficiências de extração e apresenta tempos de operação baixos.

O GC-FID baseia-se na identificação e quantificação dos compostos pela análise cromatográfica. A escolha desta técnica deve-se pelas razões seguintes: alta sensibilidade, os seus componentes devem ser voláteis e termicamente estáveis (temperatura até 300°C), faz separação de misturas complexas e é uma técnica de baixo custo e com baixas necessidades de manutenção.

## 3 Materiais e Métodos

### 3.1 Materiais

#### 3.1.1 Amostragem das Plantas Presentes no Projeto

Efetou-se a recolha de folhas das plantas (*Mentha x piperita* L. - Hortelã pimenta e *Pelargonium graveolens* L. - Gerânio) em Canidelo, Gaia. As amostras foram recolhidas durante a Primavera (meados de maio e início de junho). Foram selecionadas apenas folhas frescas e em bom estado afim de obter “maior quantidade” de óleos essenciais”. Durante o desenvolvimento do projeto, os locais de recolha dos extratos de plantas foram sempre no mesmo local.

Para a extração foram utilizadas folhas na fase adulta, saudáveis e frescas, recolhidas a partir dos ramos superiores das plantas. As plantas foram colhidas no dia anterior à extração e depositadas num ambiente com ventilação e protegido da ação direta da luz no laboratório onde se encontravam os equipamentos para a realização das experiências. As porções das plantas que não foram utilizadas no dia da extração foram armazenadas em sacos de plásticos no frigorífico a aproximadamente 3 °C e reutilizadas no máximo até dois dias após a colheita (podem causar variabilidade no rendimento ou qualidade do óleo essencial)

#### 3.1.2 Padrões e Reagentes

Para avaliar a composição do óleo essencial obtido das nas espécies em estudo, foram selecionados dez padrões individuais (os existentes nas referidas planta em maior quantidade, de acordo com a literatura mas só os disponíveis no laboratório). Na Tabela 9 estão apresentadas algumas propriedades físico-químicas dos compostos utilizados ao longo do projeto.

Tabela 5 - Propriedades físico-químicas dos padrões analíticos utilizados no estudo

Compostos	Fórmula Química	Massa Molar (g.mol <sup>-1</sup> )	Ponto de Ebulição (°C)	Grau de pureza (%)	Marca
2,2-6 Trimethylciclohexanona (Hex)	C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> O	140,2	178,5	99,0	Fluka
Mentona (Ment)	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	154,2	205,0	97,0	Fluka
Borneol (Bor)	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	154,2	212,0	99,0	Fluka
(S)-(-)-α-Terpineol (Terp)	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	154,3	217,5	99,0	Fluka
Acetato Borneol (Ac. Bor)	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	196,7	223,5	99,0	Fluka
Pulegona (Pul)	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	152,2	224,0	97,0	Sigma
Citronelol (Cit)	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O	156,3	224,5	95,0	Sigma
Geraniol (Ger)	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	154,2	229,5	98,0	Sigma
Acetato Geraniol (Ac. Ger)	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	196,3	247,5	99,0	Fluka
Eugenol (Eug)	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	164,2	255,0	99,0	Sigma

Para a extração dos óleos essenciais e respetiva análise cromatográfica foram usados os compostos/solventes de extração apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Principais solventes/reagentes utilizados no estudo da composição química de óleo essencial

Compostos	Fórmula Química	Massa Molar (g/mol)	Ponto de Ebulição (°C)	Grau de pureza (%)	Marca
n- Hexano	C <sub>4</sub> H <sub>14</sub>	86,1	68,7	95,0	Merk
n- Pentano	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub>	72,1	36,0	99,5	VWR Chemicals
Éter etílico	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O	74,1	34,6	≥ 99,8	Honeywell
Sulfato de Magnésio anidro (agente exsiccante)	MgSO <sub>4</sub>	120,3	-	96,0	Panreac
Acetofenona (Padrão interno)	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O	120,1	202,0	≥ 98,0	Fluka

## 3.2 Métodos

### 3.2.1 Preparação dos Padrões

Para a preparação das soluções *stock* individuais (em n-hexano), a partir de cada um dos padrões individuais e da solução de padrão interno (acetofenona), pipetou-se para um balão volumétrico de 25,00 ± 0,04 mL cerca de 100 µL e pesou-se rigorosamente numa balança analítica, Mettler Toledo AG 245, sendo essas massas utilizadas para determinar as concentrações de soluções *stock* individuais. Para o cálculo da concentração (Tabela 7), utilizaram-se as seguintes expressões:

$$m = C \left( \frac{mg}{L} \right) \times V (L) \Leftrightarrow C_{Sol\ Mãe} \left( \frac{mg}{L} \right) = \frac{m(mg)}{V(L)} \quad (6)$$

$$Erro \left( \frac{mg}{L} \right) = \sqrt{\left( \frac{Erro\ da\ balança\ (mg)}{Massa\ pesada\ (mg)} \right)^2 + \left( \frac{Erro\ do\ balão\ (L)}{Vol,medido\ (L)} \right)^2} \times C_{sol\ mãe} \left( \frac{mg}{L} \right) \quad (7)$$

Sendo:

C<sub>Sol Mãe</sub> - solução concentrada (sem diluições) em mg/L;

V - Volume da amostra preparada (25 mL)

 Tabela 7- Concentrações de soluções *stock* individuais com as suas respetivas massas

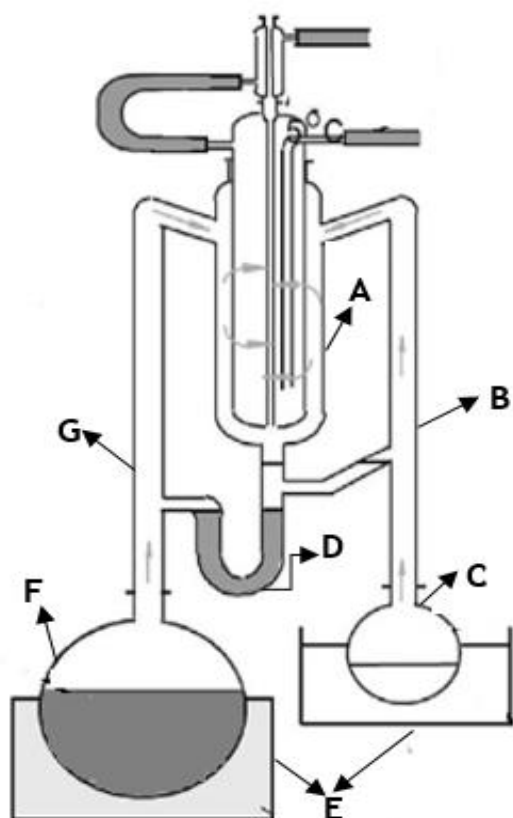
Composto	Massa composto (mg)	Conc. (mg/L)	Erro (mg/L)	Volume (µL)
2,2,6-Trimetilciclohexanona (Hex)	113,0	4 520,0	8,3	2765,5
Mentona (Ment)	109,3	4 372,0	8,1	2859,1
Borneol (Bor)	97,7	3 908,0	7,4	3198,6
(S)-(-)-α-Terpineol (Terp)	191,3	7 652,0	12,9	1633,6
Acetato Borneol (Ac. Bor)	109,7	4 388,0	8,1	2848,7
Pulegona (Pul)	117,6	4 704,0	8,5	2657,3
Acetofenona (PI)	96,1	3 844,0	7,3	3251,8
Citronelol (Cit)	292,0	11 680,0	19,1	1070,2
Geraniol (Ger)	110,5	4 420,0	8,1	2828,1
Acetato Geraniol (Ac. Ger)	112,8	4 512,0	8,3	2770,4
Eugenol (Eug)	333,1	13 324,0	21,7	938,2

Os 10 padrões individuais e o padrão interno (concentração do padrão interno foi de 3844,0 mg/L  $\pm$  7,3 mg/L) utilizados foram preparadas em n-hexano, sendo as medições para cada um dos padrões realizadas com seringas de 50, 100 e 500  $\mu$ L (a partir das soluções *stock* individuais) para um balão volumétrico de 10,000  $\pm$  0,025 mL. Uma vez preparadas as soluções padrões individuais de todos os compostos, uma solução mista (solução MIX 50 mg/L) contendo todos os 10 padrões com a exceção do padrão interno também foi preparada num balão volumétrico de 50,00  $\pm$  0,06 mL por diluições apropriadas em n-hexano seladas com *parafilm*, protegidos da ação direta da luz e armazenadas num ambiente apropriado a aproximadamente 3 °C para utilizações futuras.

O processamento de dados foi efetuado de forma automática utilizando o software GC Resolution GC-2010 Plus (Shimadzu, Quioto, Japão). Todas as injeções no GC-FID ao longo deste projeto foram efetuadas automaticamente (injeção automática) pelo que não foi necessário efetuar reajustamentos nos valores obtidos nos tempos de retenção para dos compostos.

### 3.2.2 Extração dos Óleos Essenciais

Para a extração do óleo essencial das espécies usadas neste estudo, nomeadamente a *Mentha x piperita* L. e *Pelargonium graveolens* L., foi utilizada a técnica do SDE, cujo esquema (1) e fotografia (2) se encontram na Figura 9.



(1)



(2)

A - Condensador; B - Braço B; C - Balão fase orgânica; D - Zona de separação de fases; E - Manta de aquecimento; F - Balão fase aquosa; G - Braço

Figura 8 - Esquema do SDE [5] e respetiva fotografia do aparelho Likens-Nickerson modificado operando com a extração de amostra de planta

### 3.2.3 Procedimento da Extração por SDE

A amostra foi rigorosamente pesada numa balança analítica de alta precisão, Mettler AE 200, a aproximadamente 5g, sendo posteriormente triturada num gobelé de 400 mL, utilizando uma varinha mágica (BOSCH Ergo Mixx, 600 W). No balão de 500 mL de fundo redondo, da fase aquosa, foi introduzida a amostra já triturada juntamente com 250 mL de água destilada, onde posteriormente se ligou o braço A do aparelho e ligou-se a manta de aquecimento á temperatura adequada. Num outro balão de fundo redondo (fase orgânica) de 100 mL, foi introduzido  $50,0 \pm 0,5$  mL do solvente orgânico e foi conectado ao braço B do aparelho, mas este só foi ligado aproximadamente 10 minutos depois.

O sistema de condensação foi conectado a um banho de água refrigerada (refrigerador de água - Grant LT D6G) mantido a aproximadamente a 5 °C. Os braços do condensador foram isolados para evitar variações de temperatura durante o tempo de extração. A manta de aquecimento com o balão da fase aquosa foi mantida a uma temperatura a aproximadamente de 120 °C e o da fase orgânica foi mantido a uma temperatura de 10 °C acima do ponto de ebulição do solvente usado.

A zona de separação das fases orgânica e aquosa, em U, do aparelho SDE foi cheia, primeiro com água destilada até à marca de referência e depois com solvente até começar a verter líquido em cada um dos dois braços do aparelho. Os compostos voláteis foram destilados a vapor através da parte superior do braço A e os vapores do solvente foram destilados através da parte superior do braço B.

Foram estudados tempo de extração de 30 e 60 minutos. No fim da extração, desligou-se primeiro a manta de aquecimento da fase aquosa e passando aproximadamente 10 minutos desligou-se o da fase orgânica retirando as mantas de ambas e deixou-se arrefecer utilizando como suporte a sogra. Após o arrefecimento do sistema, aproveitou-se a fase orgânica ainda presente na zona de separação de fases e transferiu-se para o respetivo balão.

Para evitar a presença de vestígios de água, adicionou-se à fase orgânica o sulfato de magnésio anidro ( $MgSO_4$ ) garantindo a ausência de água no extrato final. De seguida procedeu-se á filtração sob vácuo na hotte. Posteriormente o solvente foi removido por evaporação no evaporador rotativo ou rotavapor (BÜCHI Rotavapor R-210) a aproximadamente 20 °C ligado a um banho a aproximadamente 15 °C.

Num frasco de vidro de 30 mL rigorosamente pesado e lavado com uma pequena quantidade de solvente utilizado na extração, foi transferido o extrato final obtido e posteriormente exposto a uma corrente de azoto ou simplesmente linha de azoto de 0,5 L/min até próximo da secura.

O frasco contendo o extrato, foi selado com *parafilm*, protegido e guardado no congelador (-20°C) para ensaios futuros.

### 3.2.4 Análise do Óleo Essencial por Cromatografia Gasosa (GC – FID)

Para a análise de óleos essenciais presentes nos extratos, foi utilizado um cromatógrafo gasoso GC - 2010 SHIMADZU, com detetor de ionização de chama (FID) e com uma coluna capilar TRB - WAX com número de série NF - 33426 (30 m de comprimento x 0,32 mm diâmetro interno x 0,25 µm filme). Na Figura 10 pode observar o esquema do equipamento utilizado para a análise do óleo essencial (presente no laboratório onde decorreram as experiências).



- 1 - Hélio (gás de arraste)
- 2 - Ar puro
- 3 - Hidrogénio
- 4 - Estabilizador de corrente
- 5 - Injetor automático AOC - 20i
- 6 - Coluna TRB - WAX
- 7- Detetor (FID)
- 8 - Rack Auto sample
- 9 - Aquisição de dados

Figura 9 -Aparelho GC - 2010 SHIMADZU utilizado nas análises dos extratos

### Programa e Condições Cromatográficas

O programa de temperatura do forno foi aumentado de 50 °C (mantido por 1 min) para 250 °C (mantido por 1 min), a uma taxa de 40 °C/min. O hélio (pureza de 99,9999%) foi o gás utilizado. O injetor estava a 250 °C em modo *splitless* e o detetor era mantido a 280 °C. A quantidade de amostra injetada foi de 1,0 µL e o tempo total de corrida foi de 15,5 min (Figura 12 e Tabela 8)

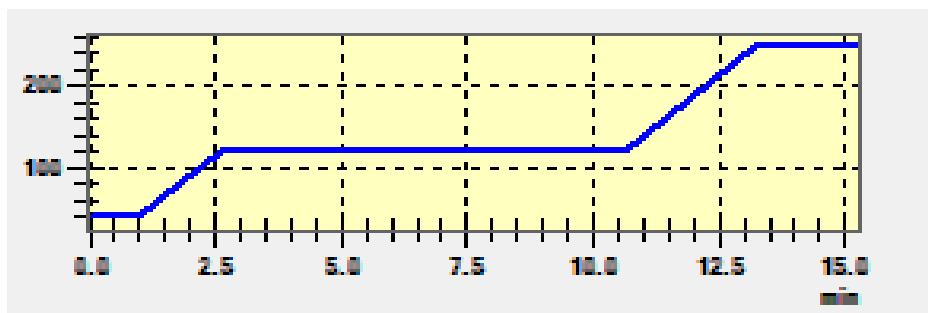


Figura 10 - Programa de temperaturas para quantificação por GC - FIG)

As condições analíticas utilizadas na operação para analisar o extrato da solução misturam (MIX 50 mg/L) e das espécies de *Mentha x piperita* L. e *Pelargonium graveolens* L., foram apresentadas na Tabela 8.

Tabela 8 - Condições analíticas utilizadas para a análise dos extratos por GC - FID

Temperatura do Injetor	250 °C
Temperatura do detetor (FID)	280 °C
Gás de arraste	Hélio (pureza de 99,9999%)
Modo de injeção	Splitless
Pressão	100 kPa
Caudal da purga	3,0 mL/min
Caudal da coluna	3,58 mL/min
Volume de injeção	1 µL
Volume (seringa - injetor automático)	10 µL
Velocidade linear	50,4 cm/s
Tempo total de corrida	15,5 min
Número de lavagens da seringa com:	
• solvente antes de injetar	3
• amostra antes de injetar	5
• solvente depois de injetar	3

### Procedimento do Cromatógrafo Gasoso (GC-FID)

Abriu-se os gases de arraste: Hélio (pureza 99,9999%), Hidrogénio (pureza 99,9%) e ar comprimido e de seguida ligou-se o estabilizador de corrente e o cromatógrafo. Com o auxílio de um computador, abriu-se o Software - GC Solution - 1 instrument e definiu-se as condições de análise. Após a preparação das amostras com o solvente adequado (n-hexano) e o padrão interno (acetofenona), encaminhou-se as amostras preparadas (vials de 1,5 mL) para o *Rack Autosampler* (injeção automática) do cromatógrafo, com capacidade para injetar até 12 amostras, definido o programa para as temperaturas na coluna, dando início à corrida das amostras.

### Quantificação de Compostos

Os tempos de retenção dos dez compostos de padrões individuais e da acetofenona (padrão interno) foram identificados por injeção direta das soluções *Stock* individuais. A partir da solução *Stock* dos dez compostos de padrões individuais, foi preparado uma solução mistura (MIX 50 mg/L) sem padrão interno (acetofenona) e desta solução, foram preparadas um conjunto de 10 padrões de calibração com diferentes gamas de concentrações. Os padrões foram preparados em balões volumétricos de 10,000 ± 0,025 mL a fim de obter as curvas de calibração para os dez compostos em estudo. Foi adicionado um volume de 54,2 µL da solução PI (acetofenona) a cada um dos 10 padrões de calibração. O volume de PI foi encontrado após diluição da solução *stock* de PI de modo a que a área correspondente ao PI estivesse na mesma gama das áreas dos compostos de interesse.

As áreas dos picos referentes aos compostos em estudo, foram identificados por comparação com os tempos de retenção dos padrões individuais. A quantificação dos compostos foi determinada pela razão entre a área do pico do composto e o pico da acetofenona. Foram realizadas injeções em triplicado.

Para as amostras de extratos das plantas, as análises de óleos essenciais foram analisadas seguindo o mesmo procedimento usado para soluções de padrões.

## 4 Resultados e Discussão

### 4.1 Desenvolvimento da Metodologia Analítica (GC-FID)

Para avaliar a composição dos óleos essenciais das espécies estudadas, após extração por SDE, houve necessidade de desenvolver um método analítico (GC-FID), utilizado para a separação e quantificação de diversos compostos, podendo também ser usada como técnica de identificação em casos especiais.

#### 4.1.1 Identificação dos Compostos por GC-FID

Primeiramente, foram preparadas as soluções *stock* de dez padrões analíticos e uma solução de PI (acetofenona). Toda as soluções *stock* foram inicialmente injetadas no GC-FID em triplicado de modo a obter os tempos de retenção dos respectivos compostos/padrões analíticos. Os tempos de retenção e as respectivas concentrações das soluções *stock* são apresentados na Tabela 9.

*Tabela 9 - Tempo de retenção obtido por injeção direta das soluções stock dos padrões analíticos e respectivas concentrações*

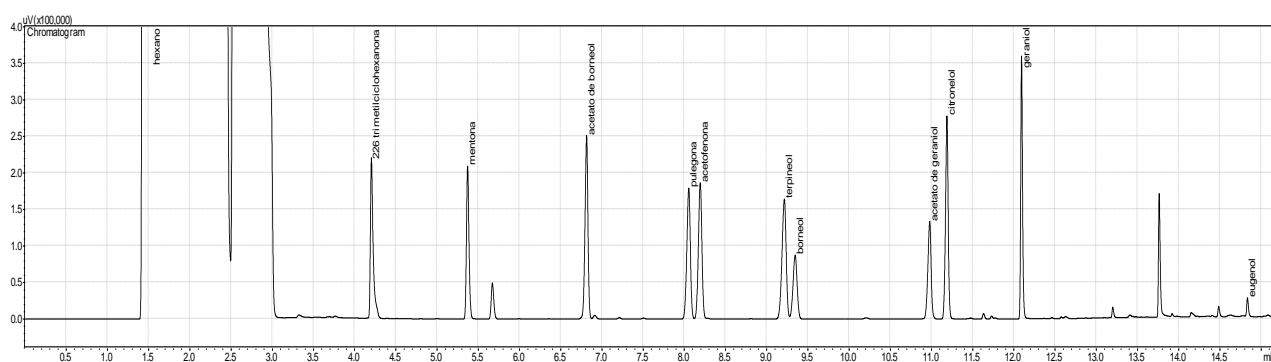
Composto	Concentração da Solução - Mãe (mg/L)	Tempo de retenção (minutos)
2,2-6 Trimetilciclohexanona (Hex)	4 520 ± 8	4,209
Mentona (Ment)	4 372 ± 8	5,374
Acetato de Borneol (Ac. Bor)	4 388 ± 8	6,814
Pulegona (Pul)	4 704 ± 9	8,050
Acetofenona (PI)	3844 ± 7	8,181
(S)-(-)- $\alpha$ -Terpineol (Terp)	7 652 ± 13	9,201
Borneol (Bor)	3 908 ± 7	9,337
Acetato de Geraniol (Ac. Ger)	4 512 ± 8	10,975
Citronelol (Cit)	11 680 ± 19	11,178
Geraniol (Ger)	4 420 ± 8	12,090
Eugenol (Eug)	13 324 ± 22	13,764

Deste modo, a identificação dos compostos foi possível através da comparação com os valores obtidos para os tempos de retenção das soluções *stock* dos padrões analíticos. De entre os dez compostos analisados, a 2,2-6 trimetilciclohexanona foi a que apresentou um menor tempo de retenção na coluna cromatográfica enquanto o eugenol foi o composto que apresentou um tempo de retenção mais elevado na coluna cromatográfica.

A ordem da saída dos compostos na coluna de acordo com os tempos de retenção, apresentados na Tabela 9 foi diferente da ordem dos compostos apresentadas na Tabela 2, de acordo com os pontos de ebulição. Isto porque os tempos de retenção na coluna cromatográfica são influenciados por diversos fatores sendo os predominantes o i) ponto de ebulição do composto e ii) polaridade do composto. Tal como se previu, o composto que apresentou menor tempo de retenção foi 2,2-6 trimetilciclohexanona, já que este também apresenta o menor ponto de ebulição de entre todos os compostos de estudo (gama de ebulição entre 178 a 179 ° C).

Tendo em conta os resultados obtidos para os tempos de retenção das soluções mãe individuais foi possível a identificação de todos os compostos. No entanto, sabe-se que durante corridas cromatográficas em GC-FID, a polaridade e consequentemente a interação entre os compostos e a coluna cromatográfica pode desempenhar um papel determinante na separação dos compostos e consequentemente nos seus tempos de retenção. A título exemplificativo explicita-se os resultados obtidos para os tempos de retenção da pulegona e da acetofenona (PI). Apesar da pulegona apresentar um ponto de ebulição mais elevado (224,0 °C) comparativamente ao PI (ponto de ebulição de 202 °C), o facto destes valores de pontos de ebulição serem próximos, faz com que o fator de polaridade e interação com a coluna cromatográfica seja preponderante. Assim, a pulegona apresentou um tempo de retenção 8,050 minutos ao passo que o PI apresentou um tempo de retenção superior (8,181 minutos). De facto, o PI é um composto mais polar (coeficiente de partição óleo-água de 1,73) do que a pulegona (coeficiente de partição óleo-água de 3,38). Deste modo, dada a proximidade entre os pontos de ebulição do PI e da pulegona, o facto do PI ser mais polar, traduziu-se numa maior e mais prolongada interação com a coluna cromatográfica (também de natureza polar) pelo que o PI apresentou um tempo de retenção superior ao pulegona. Os dados necessários para este tipo de interpretação (propriedades físico-químicas dos compostos de estudo) estão apresentados no capítulo Estado da Arte (Tabelas 2 a 5).

Na Figura 13, apresenta-se a título exemplificativo o cromatograma obtido a partir da injeção da solução mistura (MIX 50 mg/L). Todos os outros cromatogramas (solução padrão individual) obtidos e necessários para a identificação dos compostos estão apresentados no Anexo 1.



**Figura 11** - Cromatograma evidenciado a identificação dos compostos de estudo através da injeção de uma solução de mistura (concentração de 50 mg/L de cada composto)<sup>a</sup>

<sup>a</sup> A escala apresentada neste cromatograma é diferente da escala dos cromatogramas apresentados nas Figuras do Anexo 1 de modo a facilitar a leitura.

Poder-se-á inferir que os compostos mais apolares e com menor ponto de ebulição foram os primeiros a ser observados nos cromatogramas dado que de acordo a técnica analítica utilizada (GC-FID) a separação de compostos dá-se por polaridade (e respetiva interação com a coluna cromatográfica) e a temperatura de ebulição do composto.

#### 4.1.2 Quantificação de Compostos e Calibração dos Padrões por GC-FID

A quantificação dos compostos foi efetuada utilizando o método do padrão interno. Deste modo, considerou-se para efeitos de quantificação, a razão entre a área do pico do composto em estudo e a área do pico do PI (acetofenona). Assim, foi possível minimizar os erros associados ao método e performance do GC-FID. As retas de calibração para cada um dos compostos, considerando

os dez compostos de estudo, foram obtidas por injeção de 10 padrões de calibração (com a mistura de todos os compostos em estudo e com o PI (acetofenona a um nível de concentração no padrão de 13,98 mg/L na mistura) tal como se apresenta na Tabela 10. Na referida tabela, apresentam-se também as concentrações das soluções *stock*, os volumes transferidos de cada composto (mL) bem como a gama de concentrações utilizadas para preparar as diversas soluções de mistura.

**Tabela 10** - Concentrações dos compostos presentes nas soluções-stock e nas soluções padrão de calibração

Composto	Volume soluções-stock (mL)	Gama de Conc MIX 50 (mg/L)	Soluções padrão de calibração - C (mg/L)									
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Hex	0,60	0,11 - 54,24	0,11	0,54	1,08	5,42	8,14	10,85	16,27	21,70	37,97	54,24
Ment	0,60	0,10 - 53,46	0,10	0,52	1,05	5,25	7,87	10,49	15,74	20,99	36,72	52,46
Ac. Bor	0,60	0,11 - 52,66	0,11	0,53	1,05	5,27	7,90	10,53	15,80	21,06	36,86	52,66
Pul	0,60	0,11 - 56,45	0,11	0,56	1,13	5,54	8,47	11,29	16,93	22,58	39,51	56,45
Terp	0,35	0,11 - 53,56	0,11	0,54	1,07	5,36	8,03	10,71	16,07	21,43	37,49	53,56
Bor	0,70	0,11 - 54,71	0,11	0,56	1,05	5,27	7,90	10,94	16,41	21,88	38,30	54,71
Ac. Ger	0,60	0,11 - 54,14	0,11	0,54	1,08	5,41	8,12	10,83	16,24	21,66	37,90	54,14
Cit	0,25	0,12 - 58,40	0,12	0,58	1,17	5,84	8,76	11,68	17,52	23,36	40,88	58,40
Ger	0,60	0,11 - 53,04	0,11	0,53	1,06	5,30	7,96	10,61	15,91	21,22	37,13	53,04
Eug	0,20	0,11 - 53,29	0,11	0,53	1,07	5,33	7,99	10,66	15,99	21,32	37,31	53,29

#### 4.1.3 Parâmetros Estatísticos para Desenvolvimento do Método Analítico

Após os ensaios preliminares de otimização de separação cromatográfica, realizou-se o estudo da linearidade de resposta do detetor, logo foram injetadas, em triplicado misturas dos padrões para gama de concentração entre 0,11 e 58,40 mg/L. Os resultados permitiram uma vez mais estabelecer curvas de calibração para todos os compostos em estudos que podem ser apresentados nas Figuras A17 e A23 do anexo 2. Ainda no mesmo anexo pode-se observar representações gráficas das retas de calibração dos padrões individuais.

Foram realizadas 2 extrações de 60 minutos usando uma solução concentrada (mistura dos padrões) mas com solventes diferentes: éter etílico e n-pentano. Os extratos após a extração seguiram o procedimento adequado e foram preparadas com o padrão interno e um solvente de injeção (n-hexano), sendo injetadas em duplicado. Na Figura 14 é possível observar uma representação gráfica dos resultados de eficiência de extração para as duas extrações com éter etílico e n-pentano analisadas no GC -FID.

De acordo com a Figura 14, pode-se concluir que o melhor solvente de extração para a solução mistura (MIX 50 mg/L), foi o éter etílico, uma vez que se obteve melhores eficiências de extrações e foi o que melhor conseguiu identificar os compostos em estudo.

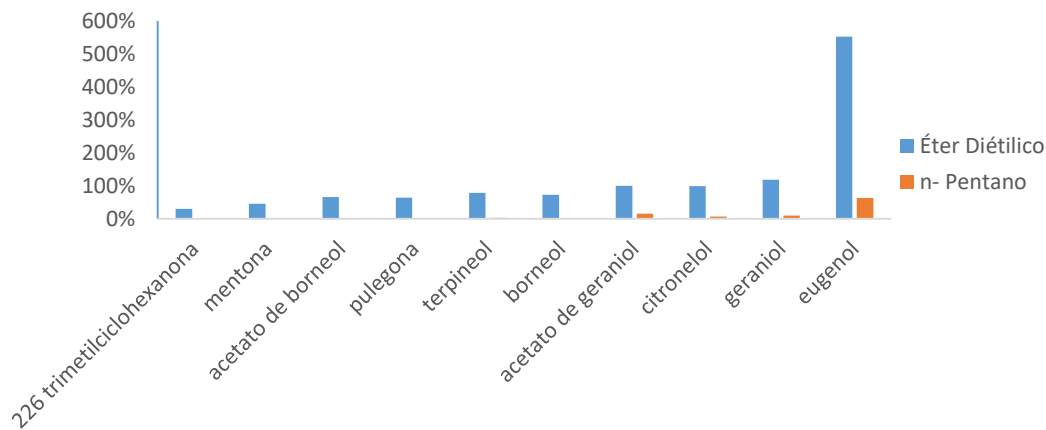


Figura 12 - Eficiência de extração da solução mistura utilizando os solventes éter etílico e n-pentano

Para o estudo da linearidade, foram determinados alguns parâmetros para desenvolvimento do método, como é o caso do desvio padrão dos resíduos da linearização de y sobre x, que pode ser observada na expressão seguinte [62]:

$$s_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}} \quad (8)$$

Sendo:

$S_{y/x}$  - desvio padrão dos resíduos da linearização de y sobre x

$Y_i$  - valores de áreas obtidos experimentalmente

$\hat{Y}_i$  - valores de áreas calculados, para cada valor de x, com base no ajuste linear

n - Número de pontos experimentais

O desvio padrão para o declive (a) e para a ordenada na origem (b) foram calculados por:

$$s_a^2 = \frac{s_{y/x}^2}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2} = \frac{n s_{y/x}^2}{n \sum_i x_i^2 - (\sum_i x_i)^2} \quad s_b^2 = \frac{s_{y/x}^2 \sum_i x_i^2}{n \sum_i (x_i - \bar{x})^2} = \frac{s_{y/x}^2 \sum_i x_i^2}{n \sum_i x_i^2 - (\sum_i x_i)^2} \quad (9)$$

Sendo:

$S_a^2$  - equação do desvio padrão para o declive (a)

$S_b^2$  - equação do desvio padrão para a ordenada na origem (b)

$X_i$  - valor médio da concentração do padrão

$X_{\text{médio}}$  - valor médio da concentração

n - Número de pontos experimentais

Os intervalos de confiança para o declive (a) e a ordenada na origem (b) foram determinados de acordo com as expressões:

$$IC (b) = tS_b \quad e \quad IC (a) = tS_a \quad (10)$$

Sendo:

t - *t de student* com nível de confiança de 95%

Deste modo, são apresentados as equações das retas de calibração e os seus respetivos parâmetros de desenvolvimento do método analítico (Tabela 11).

Tabela 11 - Equações das retas de calibração e os seus respetivos parâmetros para desenvolvimento do método analítico

Composto	Equação Curva de Calibração $Y=(a\pm S_a)x + (b\pm S_b)$	R (> 0,9950)	$S_a/a$ (< 5%)	$\frac{b - S_b}{b + S_b}$	( $b + S_b > 0$ $\wedge$ $b - S_b < 0$ )
2,2,6-Trimetilciclohexanona	PAR= (0,0493±0,0006) C - (0,0222±0,0143)	✓ 0,9994	✓ 1%	$\frac{-0,0365}{-0,0079}$	✗
Mentona	PAR= (0,0503±0,0007) C - (0,0260±0,0146)	✓ 0,9993	✓ 1%	$\frac{-0,0406}{-0,0114}$	
Acetato Borneol	PAR= (0,0719±0,0009) C - (0,0300±0,0200)	✓ 0,9994	✓ 1%	$\frac{-0,0500}{-0,0100}$	
Pulegona	PAR= (0,0500±0,0007) C - (0,0258±0,0158)	✓ 0,9993	✓ 1%	$\frac{-0,0417}{-0,0100}$	
(S)-(-)- $\alpha$ -Terpineol	PAR= (0,0559±0,0007) C - (0,0209±0,0157)	✓ 0,9994	✓ 1%	$\frac{-0,0365}{-0,0052}$	
Borneol	PAR= (0,0277±0,0003) C - (0,0094±0,0072)	✓ 0,9995	✓ 1%	$\frac{-0,0166}{-0,0023}$	
Acetato Geraniol	PAR= (0,0296±0,0005) C - (0,0190±0,0125)	✓ 0,9987	✓ 2%	$\frac{-0,0314}{-0,0065}$	
Citronelol	PAR= (0,0565±0,0008) C - (0,0312±0,0193)	✓ 0,9992	✓ 1%	$\frac{-0,0505}{-0,0119}$	
Geraniol	PAR= (0,0477±0,0009) C - (0,0297±0,0199)	✓ 0,9986	✓ 2%	$\frac{-0,0497}{-0,0098}$	
Eugenol	PAR= (0,0154±0,0014) C - (0,0616±0,0319)	✗ 0,9681	✗ 9%	$\frac{-0,0935}{-0,0297}$	

PAR - Relação da Área do Pico (Área do Pico do composto / Área do Pico da acetofenona); C - Concentração do composto (mg/L); R - coeficiente de correlação; a - declive;  $S_a$  - desvio padrão para o declive;  $S_a / a$  - desvio padrão relativo da inclinação; b - ordenada na origem;  $S_b$  - desvio padrão para a ordenada na origem.

Da análise da Tabela 11 acima apresentada, pode-se concluir que, as curvas de calibração obtidas cumpriram quase todos os parâmetros para o desenvolvimento do método (R e  $S_a/a$ ), com a exceção do eugenol (não cumpriu nenhum parâmetro de validação), uma vez que o resultado da reta de calibração obtido não foi o esperado. Alguns padrões apresentados na reta de calibração do eugenol não estão dentro da gama de calibração, como se pode observar na Figura A23 do anexo 2. Além disso, como o eugenol foi último composto a ser identificado (pelo tempo de retenção) na coluna cromatográfica é possível que esteja sujeito a contaminações.

Em relação ao parâmetro de validação ( $b - S_b < 0 < b + S_b$ ) nenhuma curva cumpriu o parâmetro, dado que este é o parâmetro mais difícil para a validação do método analítico (exemplos, existências de interferentes, estado da coluna, procedimento de extração e remoção de solvente, entre outros <sup>[62]</sup>).

Os limites de deteção e de quantificação do método (Tabela 15) foram calculados com base nas seguintes expressões:

$$LD = 3S_b / a \quad \text{e} \quad LQ = 10S_b / a \quad (11)$$

Sendo:

LD - Limite de deteção; LQ - Limite de quantificação;  $S_b$ - desvio padrão do valor médio medido

Define-se como limite de identificação (LD) a menor quantidade de analito que se pode detetar acima do ruído de fundo do sistema de análise e limite de quantificação (LQ), consiste na menor concentração de um analito que um determinado ensaio tem capacidade de quantificar com exatidão e precisão pretendida, de modo que o método terá de ser exato, preciso e linear nesse ponto [62].

Outros parâmetros como a gama de linearidade, o coeficiente de determinação bem como os limites de deteção (LD) e quantificação (LQ) estão apresentados na Tabela 12.

*Tabela 12 - Gama de linearidade, coeficiente de determinação e limites de deteção e quantificação para os compostos*

Composto	Gama de linearidade (mg/L)	R <sup>2</sup>	LD (mg/L)	LQ (mg/L)
2,2,6-Trimetilciclohexanona	0,11 - 54,24	0,9987	0,87	2,90
Mentona	0,10 - 53,46	0,9987	0,87	2,90
Acetato Borneol	0,11 - 52,66	0,9988	0,84	2,79
Pulegona	0,11 - 56,45	0,9986	0,95	3,17
(S)-(-)- $\alpha$ -Terpineol	0,11 - 53,56	0,9988	0,84	2,80
Borneol	0,11 - 54,71	0,9990	0,78	2,59
Acetato Geraniol	0,11 - 54,14	0,9973	1,26	4,21
Citronelol	0,12 - 58,40	0,9985	1,02	3,41
Geraniol	0,11 - 53,04	0,9973	1,25	4,18
Eugenol	0,11 - 53,29	0,9371	6,23	20,78

R<sup>2</sup> - coeficiente de determinação; LD - limite de deteção; LQ - limite de quantificação

Da Tabela 12 pode-se observar que todos os compostos obtiveram resultados de limite de deteção mais altos do que o padrão mais baixo da gama de linearidade, o que não era de esperar. O intervalo de linearidade para eugenol relativamente maior do que os outros compostos padrão. Isto deve-se ao facto de o eugenol ter uma área de pico menor (Figura 13) do que os outros compostos quando injetados no GC numa concentração semelhante. Portanto como foi referido anteriormente, devia mudar a gama de linearidade para o eugenol uma vez que este era um dos nossos compostos de referência.

## 4.2 Avaliação da Eficiência de Extração

Apesar de ter adotado tempos de extração de 30 e 60 minutos, para a avaliação da eficiência de extração da solução mistura apenas foi utilizado o tempo de 60 minutos. Para a solução mistura, foram realizadas 2 extrações usando uma solução concentrada contendo todos os padrões para ambos os solventes (n-pentano e éter etílico). Após as extrações recorreu-se a análise por GC-FID, sendo posteriormente calculadas as eficiências de extração para cada composto. A eficiência de extração pode ser entendida como a quantidade de extrato obtido após a extração. Os resultados da eficiência de extração (EE) e os seus respetivos coeficientes de variação (CV) (Tabela 13) para os dois solventes foram obtidos a partir das seguintes expressões:

$$Eficiência\ de\ extração\ (EE\%) = \frac{Concentração\ Injetada\ \left(\frac{mg}{L}\right)\ V1\ (mL)}{V2\ (mL)\ Concentração\ MIX\ 50\ \left(\frac{mg}{L}\right)} \quad (12)$$

$$\text{Concentração Injetada } \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}}\right) = \frac{R_{\text{médio}} - b}{a} \quad (13)$$

$$\text{Coeficiente de variação (CV \%)} = \frac{\text{Desvio padrão da razão das áreas}}{\text{Média da razão das áreas}} \quad (14)$$

Sendo:

V1 - Volume da amostra preparada (5 mL)

V2 - Volume do extrato no SDE (2 mL)

a - Declive

b - Ordenada na origem

R<sub>médio</sub> - Razão das áreas do pico (obtidas a partir das curvas de calibração)

Tabela 3 - Eficiência de extração e coeficiente de variação dos compostos em estudo

Compostos	Concentração MIX 50 (mg/L)	Éter etílico			n-pentano		
		Conc. Injetada (mg/L)	EE (%)	CV (%)	Conc. Injetada (mg/L)	EE (%)	CV (%)
2,2,6-Trimetilciclohexanona (Hex)	54,2	6,7	30,8	1,4	0,5	2,1	n.i.
Mentona (Ment)	52,5	9,6	45,9	0,6	0,5	2,5	n.i.
Acetato Borneol (Ac. Bor)	52,7	14,0	66,5	0,1	0,5	2,6	1,5
Pulegona (Pul)	56,4	14,4	64,0	0,1	0,6	2,6	2,8
(S)-(-)- $\alpha$ -Terpineol (Terp)	53,6	16,9	79,1	0,1	0,7	3,1	0,7
Borneol (Bor)	54,7	16,0	73,1	0,4	0,4	2,0	2,4
Acetato Geraniol (Ac. Ger)	54,1	21,7	100,2	0,1	3,4	15,9	0,5
Citronelol (Cit)	58,4	23,2	99,2	0,7	1,7	7,2	0,5
Geraniol (Ger)	53,0	25,2	119,0	0,1	2,2	10,3	0,2
Eugenol (Eug)	53,3	117,7	552,1	0,3	13,5	63,3	0,8

EE - Eficiência de extração; CV- coeficiente de variação; n.i. - não identificado

A partir da Tabela 13, pode-se concluir que em relação a eficiência de extração, com a exceção do composto 2,2-6 trimetilciclohexanona (30,8% - valor muito baixo) todos os outros compostos obtiveram valores elevados usando o solvente éter etílico. Em relação a extração com o solvente n-pentano apenas o eugenol obteve um valor de eficiência de extração (EE) alto, sendo os outros relativamente abaixo dos 20%, devido a uma possível perda de extratos (evaporação do solvente no SDE) durante o procedimento da extração ou nos procedimentos de remoção de solvente (evaporador rotativo e/ou linha de azoto).

É de salientar referir que o tempo de retenção também poderia ter influencia na EE, uma vez que quanto menor for o ponto de ebulição, menor será o tempo de retenção implicando uma menor EE do composto e vice-versa, conforme se pode observar na Tabela 13, mas que não é o caso do eugenol que apresentou uma EE rondando os 552,1% e valores acima da gama de linearidade ( $C_{\text{injetada}} = 117,7 \text{ mg/L}$ ), resultado relativamente fora do normal, podendo ser uma das causas a má calibração.

Relativamente ao coeficiente de variação (CV), pode-se verificar que na Tabela 13, os resultados variam de 0,1 % (acetato de borneol, pulegona, (S)-(-)- $\alpha$ -Terpineol, acetato geraniol e

geraniol) a 1,4% (2,2-6 trimetilciclohexanona) utilizando o solvente éter etílico e de 0,2% (Geraniol) a 2,8% (Pulegona) quando se utiliza o solvente n-Pentano, sendo que neste não foi possível a identificação dos compostos 2,2-6 trimetilciclohexanona e mentona ao fim de 60 minutos de extração.

O solvente éter etílico apresenta valores de eficiência de extração maiores comparadas com o n-pentano, mas em relação ao coeficiente de variação obteve-se valores baixos comparado com o n-pentano. Em suma, obteve-se uma média de 123,0% de eficiência de extração e uma média de 0,4% de coeficiente de variação utilizando o éter etílico, resultados totalmente diferentes quando foi utilizado o solvente n-pentano, com uma média de 11,1% para a eficiência de extração e 1,2% de coeficiente de variação, o que nos permite dizer que, de acordo com os resultados, quanto menor for os valores de eficiência de extração (EE), maior será os valores de coeficiente de variação (CV).

Posto isto, pode-se concluir no geral que, a eficiência de extração foi boa (exceto para o caso do eugenol), houve boa variabilidade, uma vez que o coeficiente de variação para os dois solventes e para os dois tempos de extração utilizados, foram inferiores a 10%, logo houve uma boa precisão.

### 4.3 Extração por SDE e Análise por GC-FID da Composição de Extratos

Todas as extrações foram realizadas em triplicado para tempos de 30 e 60 minutos, adicionando a amostra da planta 250 mL de água destilada. Os solventes utilizados foram n-pentano e éter etílico, a um volume de 50 mL. Após remoção do solvente recorrendo a um evaporador rotativo e exposição do extrato a uma corrente de azoto para purificação do óleo essencial, as amostras foram imediatamente diluídas com n-hexano (solvente utilizado para a análise no cromatógrafo gasoso) em balões volumétricos de 5 mL, sendo posteriormente transferidas para frasco vidro de 10 mL (aconselhável frasco de vidro âmbar). Os frascos foram selados e armazenados a temperaturas adequadas até a análise.

Para a identificação e quantificação dos compostos presentes nos extratos, adicionou-se cerca de  $0,5 \pm 0,7$  mL (micropipeta de 100 a 1000  $\mu$ L) da amostra preparada anteriormente e cerca de  $0,05 \pm 0,8$  mL (micropipeta de 10 a 100  $\mu$ L) de acetofenona a 2% (v / v) em vials de 1 mL para a injeção no GC-FID. As amostras foram injetadas em duplicado, sendo as áreas de pico calculadas pela razão das áreas dos compostos pela área de pico do padrão interno (acetofenona), afim de obter as curvas de calibração para cada um dos compostos, facilitando assim a quantificação dos mesmos identificados no GC-FID.

#### 4.3.1 Extração do Óleo Essencial de *Mentha x piperita* L. por SDE

Foram realizadas três extrações durante 30 e 60 minutos usando dois tipos de solventes diferentes. A média das massas de plantas de *Mentha x piperita* L. das 3 extrações pode ser analisada na Tabela 14.

**Tabela 4 - Massa de porções de Mentha x piperita L. para cada extração (n=3)**

Solventes	Tempo de extração (min.)	Número de extrações	Massa da planta (g)	Média das massas (g)	Massa do óleo (mg)
Éter etílico	30	1	5,0442	5,0333	141,060
		2	5,0347		
		3	5,0211		
	60	1	5,0235	5,0424	33,350
		2	5,0682		
		3	5,0356		
n- pentano	30	1	5,0468	5,0514	16,768
		2	5,0233		
		3	5,0842		
	60	1	5,0374	5,0422	55,082
		2	5,0266		
		3	5,0625		

A partir dos resultados da composição dos extratos e considerando a massa da planta, na Tabela 15 e Tabela 16 são apresentados os resultados obtidos das médias das concentrações dos compostos identificados nos extratos, massa de óleo obtido, rendimento do óleo e a normalização para cada, obtidos de acordo com as expressões que se seguem.

A concentração em  $\text{mg}_{\text{composto}}/\text{L}_{\text{extrato}}$  (equação 15) e em  $\text{mg}_{\text{composto}}/\text{kg}_{\text{extrato}}$  (equação 16) é dado por:

$$\text{Concentração } \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}}\right) = \frac{R_{\text{médio}} - b}{a} \quad (15)$$

$$\text{Concentração } \left(\frac{\text{mg}}{\text{kg}}\right) = \frac{C1 \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}}\right) V1 (\text{L})}{m \text{ planta pesada (g)} \cdot 1000 \left(\frac{\text{kg}}{\text{g}}\right)} \quad (16)$$

Sendo:

C1 - concentração calculada em mg/L

V1 - volume da amostra preparada em L

A normalização (% A) compara a área do composto com a % da composição da mistura, é dada pela seguinte expressão:

$$\text{Normalização } (\%A) = \frac{\text{Área do composto}}{\text{Área total}} \times 100 \quad (17)$$

O rendimento ( $\eta\%$ ) dos compostos presentes nos óleos pela extração por SDE é expressão da seguinte forma:

$$\text{Rendimento } (\eta\%) = \frac{\text{massa de composto em cada extrato (mg)}}{\text{massa de óleo (mg)}} \times 100 \quad (18)$$

A massa de óleo em mg é determinada pela seguinte expressão:

$$\text{Massa de óleo (mg)} = \frac{m_A - m_F}{m_i} \times 1000 \quad (19)$$

Sendo:

$m_A$  - massa da amostra após remoção do solvente orgânico (mg)

$m_F$  - massa do frasco sem a amostra (mg)

$m_i$  - massa da amostra inicial (g)

A partir das expressões acima mencionadas, foi possível obter um conjunto de resultados que permitiram analisar os compostos em estudo, apresentados na Tabela 15.

**Tabela 15-** Principais resultados obtidos na análise do extrato de *Mentha x piperita L.* com o solvente éter etílico após SDE durante 30 e 60 minutos (n=3)

Composto	30 minutos					60 minutos				
	A (%)	C1 (mg/L)	C2 (mg/kg)	m1 (mg)	η (%)	A (%)	C1 (mg/L)	C2 (mg/kg)	m1 (mg)	η (%)
2,2,6-Trimetilciclohexanona (Hex)	0,03	1,65	1,64	0,01	0,01	0,03	1,41	1,40	0,01	0,02
Mentona (Ment)	0,00	0,68	0,67	0,00	0,00	0,01	0,73	0,73	0,00	0,01
Acetato Borneol (Ac. Bor)	0,29	8,65	8,59	0,04	0,03	0,28	10,96	10,87	0,05	0,16
Pulegona (Pul)	0,21	9,28	9,22	0,05	0,03	0,04	3,04	3,02	0,02	0,05
(S)-(-)-α-Terpineol (Terp)	0,10	2,95	2,93	0,01	0,01	0,06	1,49	1,48	0,01	0,02
Borneol (Bor)	1,02	70,60	70,14	0,35	0,25	1,01	94,05	93,25	0,47	1,41
Acetato Geraniol (Ac. Ger)	0,25	17,30	17,18	0,09	0,06	0,38	19,41	19,25	0,10	0,29
Citronelol (Cit)	2,23	68,91	68,45	0,34	0,24	3,13	28,10	27,86	0,14	0,42
Geraniol (Ger)	0,13	5,88	5,84	0,03	0,02	0,59	4,52	4,48	0,02	0,07
Eugenol (Eug)	0,10	16,82	16,70	0,08	0,06	0,79	28,21	27,97	0,14	0,42

C1 - concentração média do composto obtido no extrato em mg/L; C2 - concentração média do composto obtido no extrato em mg/kg; (A) - normalização; m1 - mg de cada composto no óleo; η - rendimento de cada composto no extrato

Através da Tabela 15 pode verificar-se que, alguns compostos obtiveram resultados de concentração de extrato (mg/L) superiores à gama de concentração utilizada, como foi o caso do borneol, aos 30 e 60 minutos, e também no caso do citronelol aos 60 minutos. Compostos como 2,2-6 trimetilciclohexanona, pulegona, eugenol e mentona apresentaram concentrações abaixo de limite de quantificação (LQ) e a abaixo do limite de detecção (LD) está a mentona.

Verificou-se que a percentagem de óleo extraído da planta foi de 2,80% para 30 minutos e 0,66% para 60 minutos, utilizando em ambos os casos, éter etílico como solvente de extração. Para a espécie de *Mentha x piperita L.*, a extração com o solvente éter etílico apresentou melhores resultados de rendimento, os seguintes compostos: borneol (0,25%) e citronelol (0,24%) aos 30 minutos e borneol (1,41%), citronelol (0,42%) e eugenol (0,42%) aos 60 minutos.

Pode-se analisar com mais detalhes a análise cromatográfica para o óleo da *Mentha x piperita L.* ao fim de 60 minutos com o solvente éter etílico (Figura 15) e ao fim de 30 minutos pode ser observada no gráfico da Figura A24 do anexo 3.

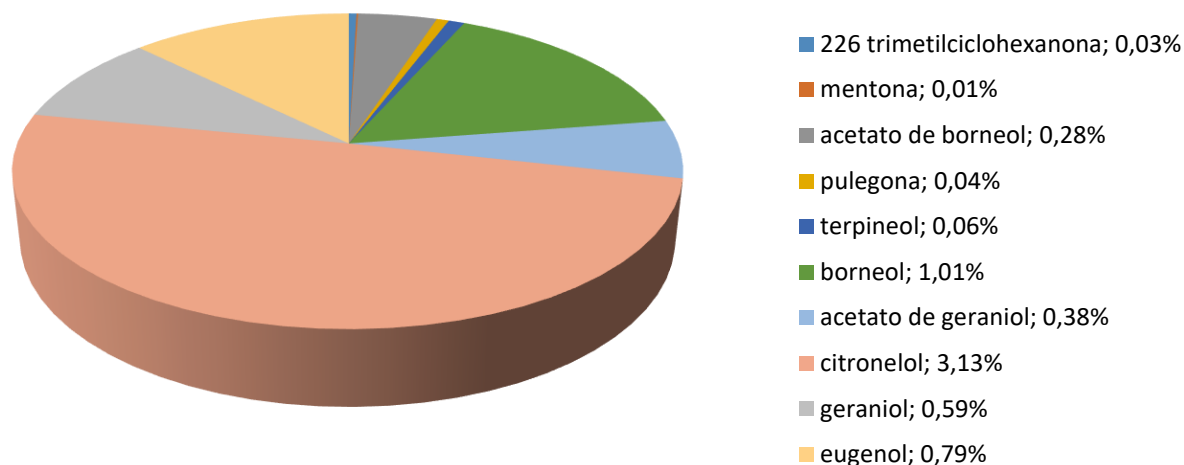


Figura 13- Análise cromatográfica em GC-FID para o óleo da *Mentha x piperita L.* extraído pelo SDE usando éter etílico como solvente durante 60 minutos (Compostos não identificados: 93,69%)

Foi possível obter um conjunto de resultados que permitiram analisar os compostos em estudo, a partir da análise do extrato de *Mentha x piperita L.* com o solvente n-pentano após SDE durante 30 e 60 minutos (Tabela 16).

Tabela 5- Principais resultados obtidos na análise do extrato de *Mentha x piperita L.* com o solvente n-pentano após SDE durante 30 e 60 minutos (n=3)

Composto	30 minutos					60 minutos				
	A (%)	C1 (mg/L)	C2 (mg/kg)	m1 (mg)	η (%)	A (%)	C1 (mg/L)	C2 (mg/kg)	m1 (mg)	η (%)
2,2,6-Trimetilciclohexanona (Hex)	0,02	1,35	1,34	0,01	0,04	0,03	1,79	1,77	0,01	0,02
Mentona (Ment)	0,00	0,63	0,62	0,00	0,02	0,00	0,69	0,69	0,00	0,01
Acetato Borneol (Ac. Bor)	0,27	7,96	7,88	0,04	0,24	0,35	11,63	11,53	0,06	0,11
Pulegona (Pul)	0,03	1,45	1,44	0,01	0,04	0,02	1,29	1,28	0,01	0,01
(S)-(-)-α-Terpineol (Terp)	0,02	1,08	1,07	0,01	0,03	0,03	1,69	1,68	0,01	0,02
Borneol (Bor)	0,77	61,70	61,07	0,31	1,84	1,03	86,07	85,35	0,43	0,78
Acetato Geraniol (Ac. Ger)	0,28	22,46	22,23	0,11	0,67	0,31	24,89	24,69	0,12	0,23
Citronelol (Cit)	0,80	31,32	31,00	0,16	0,93	0,88	30,39	30,13	0,15	0,28
Geraniol (Ger)	0,01	3,65	3,62	0,02	0,11	0,30	5,24	5,19	0,03	0,05
Eugenol (Eug)	3,37	674,87	668,00	3,37	20,12	0,11	20,39	20,22	0,10	0,19

C1 - concentração média do composto obtido no extrato em mg/L; C2 - concentração média do composto obtido no extrato em mg/kg; (A) - normalização; m1 - mg de cada composto no óleo; η - rendimento de cada composto no extrato

Assim como a Tabela 15, pode-se dizer que também na Tabela 16, alguns compostos obtiveram resultados de concentração de extrato (mg/L) superiores à gama de concentração utilizada, como foi o caso do borneol, aos 30 e 60 minutos, e também no caso do eugenol aos 30 minutos. Compostos como 2,2-6 trimetilciclohexanona, mentona, pulegona, (S)-(-)-α-Terpineol e geraniol apresentaram concentrações abaixo de limite de quantificação (LQ) e a abaixo do limite de detecção (LD) está a mentona.

A partir da Tabela 16, pode-se dizer que a extração com o solvente n-pentano, já conseguiu obter melhores resultados de rendimentos, podendo destacar os seguintes compostos: eugenol (20,12%), borneol (1,84%), citronelol (0,93%) e acetato de geraniol (0,67%) aos 30 minutos e borneol

(0,78%), citroneol (0,25%), acetato de geraniol (0,23%) e eugenol (0,19%) aos 60 minutos. Em relação a percentagem de óleo extraído da planta obteve-se cerca de 1,10% no caso de estudo de 60 minutos e 0,33% no caso de estudo de 30 minutos.

A análise cromatográfica para o óleo da *Mentha x piperita L.* com o solvente n-pentano ao fim de 30 minutos pode ser observada no gráfico da Figura 16 e ao fim de 60 minutos na Figura A25 do anexo 3 deste trabalho.

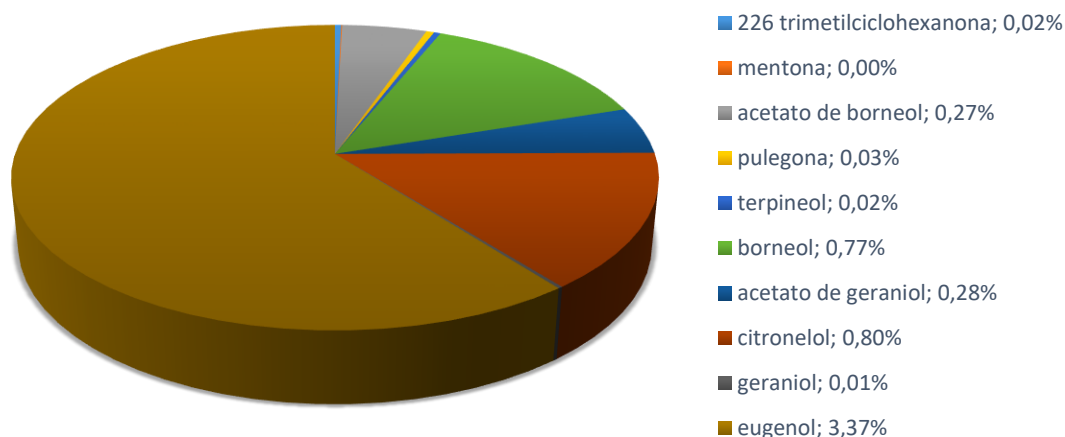


Figura 16- - Análise cromatográfica em GC-FID para o óleo da *Mentha x piperita L.* pelo SDE usando n-pentano com solvente durante 30 minutos (Compostos não identificados: 94,43%)

#### 4.3.2 Extração do Óleo Essencial de *Pelargonium graveolens L.* por SDE

Assim como para a *Mentha x piperita L.*, foi seguido o mesmo procedimento para a espécie *Pelargonium graveolens L.* As médias das massas dos extratos da planta de *Pelargonium graveolens L.* podem ser observadas na Tabela 17.

Tabela 17 - Massa das porções de *Pelargonium graveolens L.* para cada extração (n=3)

Solventes	Tempo de extração (min.)	Número de extrações	Massa da planta (g)	Média das massas (g)	Massa do óleo (mg)
Éter etílico	30	1	5,0602	5,0536	35,599
		2	5,0433		
		3	5,0572		
	60	1	5,1790	5,0864	33,161
		2	5,0649		
		3	5,0152		
n- pentano	30	1	5,0989	5,0742	16,994
		2	5,0971		
		3	5,0266		
	60	1	5,0624	5,0806	21,139
		2	5,0917		
		3	5,0876		

A partir dos resultados da composição dos extratos e considerando a massa da planta fresca, na Tabela 18, foi apresentado os resultados obtidos das médias das concentrações dos compostos identificados nos extratos, o rendimento do óleo, a massa do óleo obtido e normalização para cada composto.

**Tabela 6-** Principais resultados obtidos na análise do extrato de *Pelargonium graveolens* L. com o solvente éter etílico após SDE durante 30 e 60 minutos (n=3)

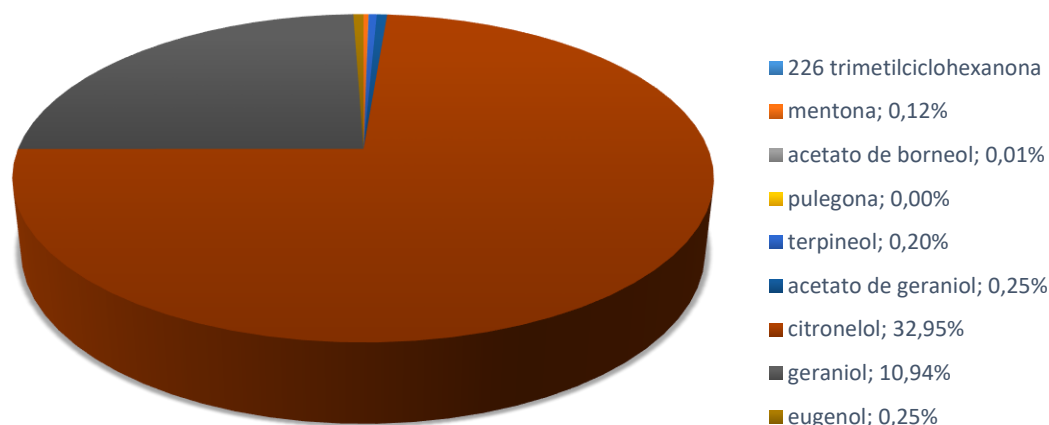
Composto	30 minutos					60 minutos				
	A (%)	C1 (mg/L)	C2 (mg/kg)	m1 (mg)	η (%)	A (%)	C1 (mg/L)	C2 (mg/kg)	m1 (mg)	η (%)
2,2,6-Trimetilciclohexanona (Hex)	0,01	0,57	0,56	0,00	0,01	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
Mentona (Ment)	0,28	6,91	0,00	0,03	0,10	0,12	1,43	1,40	0,01	0,0
Acetato Borneol (Ac. Bor)	0,16	4,00	3,95	0,02	0,06	0,01	0,44	0,44	0,00	0,01
Pulegona (Pul)	0,09	2,62	2,59	0,01	0,04	0,04	0,86	0,84	0,00	0,01
(S)-(-)-α-Terpineol (Terp)	0,23	5,04	4,99	0,03	0,07	0,20	1,84	1,81	0,01	0,03
Borneol (Bor)	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
Acetato Geraniol (Ac. Ger)	0,19	9,23	9,13	0,05	0,13	0,25	3,48	3,42	0,02	0,05
Citronelol (Cit)	22,82	278,43	275,48	1,39	3,91	32,95	132,95	130,70	0,66	2,00
Geraniol (Ger)	13,36	341,54	337,92	1,71	4,80	10,94	88,11	86,61	0,44	1,33
Eugenol (Eug)	0,39	31,36	31,03	0,16	0,44	0,25	11,39	11,19	0,06	0,17

C1 - concentração média do composto obtido no extrato em mg/L; C2 - concentração média do composto obtido no extrato em mg/kg; (A) - normalização; m1 - mg de cada composto no óleo; η - rendimento de cada composto no extrato; n.i. - não identificado

Para a espécie de *Pelargonium graveolens* L., também alguns compostos obtiveram resultados de concentração de extrato (mg/L) superiores à gama de concentração utilizada, como foi o caso do citronelol e geraniol, aos 30 e 60 minutos. Da Tabela 18 também pode-se observar que as concentrações de alguns compostos estão abaixo de LQ (2,2-6 trimetilciclohexanona, mentona, pulegona) e de LD (2,2-6 trimetilciclohexanona).

A extração com o solvente éter etílico apresentou melhores resultados de rendimento para os seguintes compostos: geraniol (4,80%) e citronelol (3,91%) e eugenol (0,44%) aos 30 minutos e geraniol (2,00%) e citronelol (1,33%) e eugenol (0,17%) aos 60 minutos. Em relação a percentagem de extração de óleo da planta, obteve-se 0,70% no caso de estudo de tempo de extração de 30 minutos e 0,65% no caso da extração decorrida ao longo de 60 minutos.

A análise cromatográfica para o óleo de *Pelargonium graveolens* L. com o solvente éter etílico ao fim de 60 minutos pode ser observada no gráfico da Figura 17 e ao fim de 60 minutos na Figura A26 do anexo 3 deste trabalho.



**Figura 17-** Análise cromatográfica em GC-FID para o óleo de *Pelargonium graveolens* L. extraído pelo SDE usando o éter etílico como solvente durante 60 minutos (Compostos não identificados: 55,24%)

Os resultados a partir da análise do extrato de *Pelargonium graveolens* L. com o solvente n-pentano após SDE durante 30 e 60 minutos, podem ser observados na Tabela 19.

**Tabela 19-** Principais resultados obtidos na análise do extrato de *Pelargonium graveolens* L. com o solvente n-pentano após SDE durante 30 e 60 minutos (n=3)

Composto	30 minutos					60 minutos				
	A (%)	C1 (mg/L)	C2 (mg/kg)	m1 (mg)	η (%)	A (%)	C1 (mg/L)	C2 (mg/kg)	m1 (mg)	η (%)
2,2,6-Trimetilciclohexanona (Hex)	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
Mentona (Ment)	0,10	2,39	2,36	0,01	0,07	0,26	8,30	8,17	0,04	0,20
Acetato Borneol (Ac. Bor)	0,10	1,83	1,80	0,01	0,05	0,16	4,00	3,93	0,02	0,09
Pulegona (Pul)	0,04	1,03	1,02	0,01	0,03	0,09	3,19	3,14	0,02	0,08
(S)-(-)-α-Terpineol (Terp)	0,16	2,36	2,32	0,01	0,07	0,17	4,72	4,64	0,02	0,11
Borneol (Bor)	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
Acetato Geraniol (Ac. Ger)	0,43	12,70	12,51	0,06	0,37	0,19	10,35	10,19	0,05	0,24
Citrônolol (Cit)	28,46	93,03	91,67	0,47	2,74	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
Geraniol (Ger)	9,15	102,55	101,05	0,51	3,02	14,36	446,79	439,70	2,23	10,57
Eugenol (Eug)	0,50	24,48	24,13	0,12	0,72	0,24	27,33	26,90	0,14	0,65

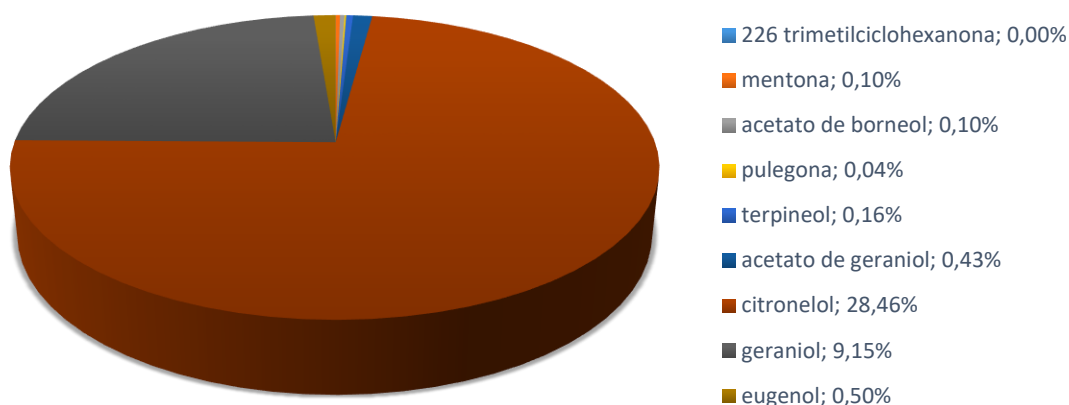
C1 - concentração média do composto obtido no extrato em mg/L; C2 - concentração média do composto obtido no extrato em mg/kg; (A) - normalização; m1 - mg de cada composto no óleo; η - rendimento de cada composto no extrato; n.i. - não identificado

Observando a Tabela 19, pode-se dizer que assim como para a extração com o solvente éter etílico, também se obteve os mesmos resultados de concentração de extrato (mg/L) superiores à gama de concentração utilizada (citrônolol e geraniol) aos 30 e 60 minutos. Da Tabela 19 também pode-se observar que as concentrações de alguns compostos estão abaixo de LQ (mentona, acetato borneol, pulegona, (S)- (-) -α-Terpineol).

Para a extração com o solvente n-pentano obteve-se melhores resultados de rendimento, podendo destacar os seguintes compostos: geraniol (3,02%), citrônolol (2,74%), eugenol (0,72%) e acetato geraniol (0,37%) aos 30 minutos e geraniol (10,57%), eugenol (0,65%) e acetato geraniol (0,24%) aos 60 minutos. Em relação a percentagem de extração de óleo da planta,

obteve-se 0,33% no caso de estudo de tempo de extração de 30 minutos e 0,42% no caso da extração decorrida ao longo de 60 minutos.

A análise cromatográfica para o óleo de *Pelargonium graveolens* L. com o solvente n-pentano ao fim de 30 minutos pode ser observada no gráfico da Figura 18 e ao fim de 30 minutos na Figura A27 do anexo 3 deste trabalho.



**Figura 18** - Análise cromatográfica em GC-FID para o óleo do *Pelargonium graveolens* L. extraído pelo SDE usando o solvente n-pentano durante 30 minutos (Compostos não identificados: 62,49%)

O borneol e o composto 2,2,6-trimetilciclohexanona não foram identificados nos extratos de *Pelargonium graveolens* L. analisados para os dois tempos de extração utilizados para ambos os solventes, o que nos permite concluir que a espécie *Pelargonium graveolens* L. não tem borneol na sua composição e também poderá não ter o 2,2,6-trimetilciclohexanona. O mesmo aconteceu com o citranelol para o solvente n-pentano durante um tempo de extração de 60 minutos. Estes dois últimos casos são evidência da importância da escolha de solvente de extração, bem como do tempo de extração (Tabela 18 e Tabela 19).

Em suma conclui-se que para esta planta, a extração com éter etílico foi melhorada utilizando o tempo de extração de 30 minutos. Quando o solvente utilizado para a extração foi n-pentano, a extração dos compostos variou, i.e., obteve-se melhores teores de compostos utilizando o tempo de extração de 30 minutos e noutros casos, obteve-se melhores teores utilizando o tempo de extração de 60 minutos (Tabela 18 e Tabela 19).

Deste modo conclui-se que a extração do óleo de foi melhorada utilizando éter etílico durante 30 minutos (percentagem de extração de óleo *Pelargonium graveolens* L. a partir da planta de 0,70%).

Para ambas as plantas se verificou que a extração foi favorecida utilizando éter etílico como solvente de extração, em 30 minutos.

## 5 Conclusões

No presente estudo, a extração pelo SDE durante 30 e 60 minutos, das duas espécies estudadas (*Mentha x piperita L.* e *Pelargonium graveolens L.*) foi realizada com dois diferentes solventes, com ponto de ebulição baixos (éter etílico - 36 °C e n-pentano - 35 °C). Os extratos obtidos apresentaram aromas característico das plantas originais e a identificação dos dez compostos foi analisada por GC-FID.

O método de análise dos compostos relacionados, GC-FID, demonstrou ser seletivo, uma vez que conseguiu identificar os compostos pretendidos, conseguindo dentro da gama concentrações, cumprir quase todos os critérios para desenvolver o método analítico.

Em relação à solução de mistura dos padrões (solução MIX 50 mg/L), conclui-se que, o éter etílico foi o melhor solvente de extração, dado que na análise cromatográfica em GC-FID, foi o que melhor conseguiu identificar os compostos em estudo.

Em relação a *Mentha x piperita L.*, para a extração com o solvente éter etílico, obteve-se uma percentagem de óleo extraído de 1,10% no caso de estudo de 60 minutos e 0,33% no caso de estudo de 30 minutos e uma percentagem de óleo extraído de 1,10% no caso de estudo de 60 minutos e 0,33% no caso de estudo de 30 minutos, para a extração com o solvente n-pentano.

No que se refere a espécie *Pelargonium graveolens L.*, obteve-se uma percentagem de extração de óleo, de 0,70% no caso de estudo de 30 minutos e 0,65% no caso da extração decorrida ao longo de 60 minutos para a extração com o solvente éter etílico e em relação a extração com solvente n-pentano obteve-se uma percentagem de extração de óleo de 0,33% no caso de estudo de tempo de extração de 30 minutos e 0,42% no caso da extração decorrida ao longo de 60 minutos.

Para as extrações SDE, com ambas as plantas, as melhores condições de extração foram com o éter etílico como solvente e tempos de extração de 30 minutos. Assim, sugere-se estas condições para futuras extrações destas plantas usando o SDE.

Uma vez que, as folhas de plantas frescas se decompõem rapidamente após a colheita, a extração com folhas secas seria uma boa maneira de preservar as folhas e seus compostos interessantes.

## 6 Avaliação do Trabalho Realizado

### 6.1 Objetivos Realizados

Dos vários métodos de extração, identificação e quantificação de óleos essenciais existentes, o método de extração e destilação simultânea (SDE) e cromatografia gasosa com detetor de ionização de chama (GC-FID) demonstraram-se adequados para extração de óleos essenciais. Em comparação com as pesquisas bibliográficas sobre o tema, os dois métodos acima referidos apresentaram bons resultados no que toca a eficiências de extração.

O método de SDE permitiu colocar em prática alguns conhecimentos adquiridos ao longo do percurso académico.

### 6.2 Limitações e Trabalho Futuro

Ao longo do projeto, vários aspetos podem influenciar os resultados tais como a má calibração da balança analítica, o facto de o óleo essencial em causa ser relativamente volátil, o fato das extrações por SDE serem realizadas apenas com solventes imiscíveis com a água e compostos voláteis, torna-se uma limitação no procedimento.

Em relação a trabalhos futuros, seria interessante a continuidade do sistema de injeção automática facilitando assim processo e reduzir os possíveis erros associados a operação, uma vez que segundo alguns artigos, as injeções das amostras no GC - FID eram executadas manualmente, logo o processo era mais demorado e com mais riscos de contaminação da seringa.

A análise da identificação dos compostos pela técnica GC-MS, garantiria a identificação dos compostos presentes nos extratos e exploraria a análise da composição dos óleos essenciais em geral.

Em relação a atividade antioxidante dos compostos, este não foi avaliada devido a limitações de tempo. Portanto, pode ser estudado essas propriedades num projeto futuro.

Em relação a uso de óleos essenciais como biopesticidas têm-se como os principais desafios:

- Simplificação do complexo e dispendioso processo de autorização para legitimar novos pesticidas botânicos baseados em plantas;
- Extratos com histórico comprovado de uso na indústria de alimentos, cosméticos ou medicamentos;
- Evitar a perda de eficiência contra as pragas alvo no campo, destacando a necessidade de processos eficientes de estabilização (por exemplo, encapsulamento);
- Alternativamente, a síntese botânica de nanoinsecticidas eficazes poderia ajudar a evitar altos níveis de degradação de compostos ativos de óleos essenciais;
- Novas tecnologias de produção que garantem quantidades abundantes de fontes cruas de OE com produtos químicos homogêneos composições.

## 7 Referências

1. Dixon, R. A. Natural products and plant disease resistance. **411**, 843-847 (2001).
2. Petrovska, B. Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacogn. Rev.* **6**, 1 (2012).
3. Vinatoru, M. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrason. Sonochem.* **8**, 303-313 (2001).
4. BULLERMAN, L. B., LIEU, F. Y. & SEIER, S. A. Inhibition of Growth and Aflatoxin Production By Cinnamon and Clove Oils. Cinnamic Aldehyde and Eugenol. *J. Food Sci.* **42**, 1107-1109 (1977).
5. Chaintreau, A. Simultaneous distillation - extraction : from birth to maturity – review. *Flavour Fragr. J.* **16**, 136-148 (2001).
6. Trancoso, M. D. Cotidiano Everyday. *Rev. Práxis* **5**, 89-95 (2013).
7. Yarpuz-Bozdogan, N. The importance of personal protective equipment in pesticide applications in agriculture. *Curr. Opin. Environ. Sci. Heal.* **4**, 1-4 (2018).
8. Óleo essencial - História. Available at: <http://www.tisserand.com.br/?pagina=gattefosse>. (Accessed: 2nd August 2018)
9. Castro Silva, José; Silva Oliveira, J. T. Revista da madeira - Edição nº75. (2003).
10. Somesh Mehra, Rupali Srivastave, Swati Shula, Jose Mathew, M. M. Australian Journal of Basic and Applied Sciences In-vitro Comparative Study on Antimicrobial Activity of five Extract of Few Citrus Fruit : Peel & Pulp vs Gentamicin. *Aust. J. Basic Appl. Sci.* **9**, 165-173 (2015).
11. Rassem, H. H. A., Nour, A. H. & Yunus, R. M. Techniques For Extraction of Essential Oils From Plants : A Review. *Aust. J. Basic Appl. Sci.* **10**, 117-127 (2016).
12. Óleo Essencial da Hortelã. Available at: <http://www.oleosessenciais.org/oleo-essencial-de-hortela/>. (Accessed: 28th August 2018). (Accessed: 2nd August 2018).
13. Fink, J. K. Terpene Resins. *React. Polym. Fundam. Appl.* 303-315 (2013). doi:10.1016/B978-1-4557-3149-7.00012-7
14. Felipe O., Lorena; Bicas L., Juliano. Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais Vol. 39, N° 2, p. 120-130, maio 2017.
15. ChemSpider - 2,2,6-TRIMETHYLCYCLOHEXANONE. Available at: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.16105.html?rid=158dda6b-280d-408c-9aba-680e5ef13599>. (Accessed: 2nd August 2018)
16. PubChem Search Beta - 2,2,6-TRIMETHYLCYCLOHEXANONE. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/17000#section=Top>. (Accessed: 2nd August 2018)
17. FooDB Version 1.0 - 2,2,6-Trimethylcyclohexanone. Available at: <http://foodb.ca/compounds/FDB012038>. (Accessed: 2nd August 2018)
18. ChemSpider- Mentona. Available at: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.391431.html?rid=5f7e45c1-02e4-4446-9efa-4098f8ae129a>. (Accessed: 2nd August 2018)
19. PubChem Search Beta - Mentona. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/26447>. (Accessed: 2nd August 2018)
20. ChemSpider - Borneol. Available at: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.5026296.html?rid=ccfeb9aa-fe40-4cd2-9657-65e7b4f2d9f4>. (Accessed: 2nd August 2018)

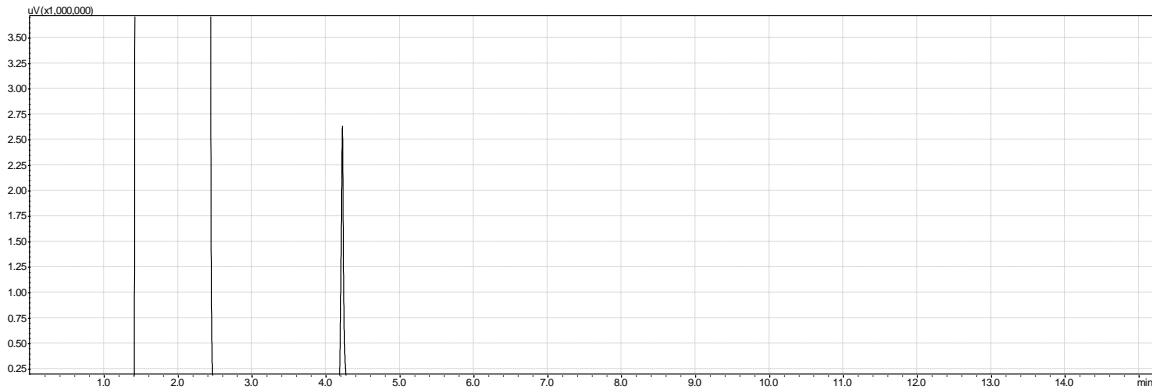
21. PubChem Search Beta - Borneol. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6552009>. (Accessed: 2nd August 2018)
22. ChemSpider - (S)-(-)- $\alpha$ -Terpineol. Available at: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.13850142.html?rid=2a445dcc-540c-489c-a098-0211c81f1a28>. (Accessed: 2nd August 2018)
23. PubChem Search Beta - (S)-(-)- $\alpha$ -Terpineol. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/17100#section=Top>. (Accessed: 2nd August 2018)
24. ChemSpider - Acetato Borneol. Available at: [http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.5323220.html?rid=1e641866-7d0c-4d19-8a63-a782a37f9fd2&page\\_num=0](http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.5323220.html?rid=1e641866-7d0c-4d19-8a63-a782a37f9fd2&page_num=0). (Accessed: 2nd August 2018)
25. Acetato Borneol. Available at: <http://www.thegoodscentscopy.com/data/rw1106081.html>. (Accessed: 2nd August 2018)
26. PubChem Search Beta - Pulegona. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/442495>. (Accessed: 2nd August 2018)
27. ChemSpider - Pulegona. Available at: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.390923.html?rid=7f74b8f1-6d9c-4760-8d1d-3f76d0ffbb11>. (Accessed: 2nd August 2018)
28. ChemSpider - Citronelol. Available at: [http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.13850135.html?rid=4450c48a-b6c3-4b4c-a8b5-d91d7efa989e&page\\_num=0](http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.13850135.html?rid=4450c48a-b6c3-4b4c-a8b5-d91d7efa989e&page_num=0). (Accessed: 2nd August 2018)
29. PubChem Search Beta - Citronelol. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/8842>. (Accessed: 2nd August 2018)
30. ChemSpider - Geraniol. Available at: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.13849989.html?rid=7e86628f-7638-4400-a5d0-a17aeab8870c>. (Accessed: 2nd August 2018)
31. PubChem Search Beta - Geraniol. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/637566>. (Accessed: 2nd August 2018)
32. ChemSpider - Acetato Geraniol. Available at: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.1266019.html?rid=691f972f-6862-4200-9b35-c7bdfda936f3>. (Accessed: 2nd August 2018)
33. PubChem Search Beta - Acetato Geraniol. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1549026>. (Accessed: 2nd August 2018)
34. ChemSpider - Eugenol. Available at: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.13876103.html?rid=780207a8-6562-43a9-8ea1-7f34e062a5a6>. (Accessed: 2nd August 2018)
35. PubChem Search Beta - Eugenol. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3314>. (Accessed: 2nd August 2018)
36. Jayant Shankar Rault; Sankunny Mohan Karuppyil. A status review on the medicinal properties of essential oils. (2014).
37. Rao, B. R. R., Kaul, P. N., Syamasundar, K. V. & Ramesh, S. Chemical profiles of primary and secondary essential oils of palmarosa (*Cymbopogon martinii* (Roxb.) Wats var. *motia* Burk.). *Ind. Crops Prod.* **21**, 121-127 (2005).
38. OEC - the Observatory of Economic Complexity - Óleos essenciais. Available at: <https://atlas.media.mit.edu/pt/profile/sitc/5513/>. (Accessed: 3rd August 2018)

39. União Europeia. Directive 2009/128/EC of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009 establishing a framework for Community action to achieve the sustainable use of pesticides. *J. Of. da União Eur.* 309, 71-86 (2009).
40. Contexto Nacional da Utilização de Produtos Fitofarmacêuticos Vol 3 (2013).
41. APA. Plano Nacional de Implementação da Convenção de Estocolmo Janeiro de 2010. 82 (2010).
42. Pavela, R. & Benelli, G. Essential Oils as Ecofriendly Biopesticides? Challenges and Constraints. *Trends Plant Sci.* 21, 1000-1007 (2016).
43. Óleo essencial de Mentha x piperita L. Available at: <http://www.oleosessenciais.org/oleo-essencial-de-menta-piperita-ou-hortela-pimenta/>. (Accessed: 27th August 2018)
44. Óleo essencial da concentração - Hortelã pimenta. Available at: <https://terraflor.com/blog/oleo-essencial-da-concentracao/>. (Accessed: 27th July 2018)
45. Óleo essencial de gerânio. Available at: <http://www.oleosessenciais.org/oleo-essencial-de-geranio/>. (Accessed: 28th August 2018)
46. Portal da acupuntura - Benefícios da hortelã pimenta. Available at: <http://portaldaacupuntura.com/geral-acupuntura/beneficios-da-hortela-pimenta/>. (Accessed: 27th July 2018)
47. Tarhan, S., Telci, I., Tuncay, M. T. & Polatci, H. Product quality and energy consumption when drying peppermint by rotary drum dryer. *Ind. Crops Prod.* 32, 420-427 (2010).
48. Beigi, M., Toriki-Harchegani, M. & Ghasemi Pirbalouti, A. Quantity and chemical composition of essential oil of peppermint (*Mentha x piperita* L.) leaves under different drying methods. *Int. J. Food Prop.* 21, 267-276 (2018).
49. Peterson, A. *et al.* Extraction of essential oil from geranium (*Pelargonium graveolens*) with supercritical carbon dioxide. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 81, 167-172 (2006).
50. Silveira C., Jeniffer; Bugato V., Nathália; Da Costa S.O., Andrea; Da Costa J. F., Esly. Levantamento e análise de métodos de extração de óleos essenciais. (novembro 2012).
51. Soxhlet Laboratório online. Available at: <https://www.fcencias.com/2015/01/15/soxhlet-laboratorio-online/>. (Accessed: 2nd August 2018)
52. Trindade, T., Silva, J. M., Palmeira, V. & Anastácio, P. Extração Líquido-Líquido. 1-40 (2004).
53. Teixeira, S., Mendes, A., Alves, A. & Santos, L. Simultaneous distillation-extraction of high-value volatile compounds from *Cistus ladanifer* L. *Anal. Chim. Acta* 584, 439-446 (2007).
54. Aplicações em laboratórios de análises - GC - FID. Available at: <http://www.airproducts.com.br/industries/Aalytical-Laboratories/analytical-lab-applications/product-list/gc-with-flame-ionization-detector-gc-fid-analytical-laboratories.aspx?itemId=D6D6641C668A47139A6F1960D9441B93>. (Accessed: 2nd August 2018)
55. HiQ. Gas Chromatography . Aga 5-6 (2017).
56. Skoog, Douglas A.; Holler, F. James; Crouch, S. R. *Principles of Instrumental Analysis - Flame Ionization Detector.* (02.08.2018).
57. Life Sciency Mass Spectrometry Facility - Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC/MS). Available at: <http://www.bris.ac.uk/nerclmsf/techniques/gcms.html>. (Accessed: 26th July 2018)
58. Block diagram for gas chromatography using electron ionization for collecting mass spectrum. Available at: [https://en.wikipedia.org/wiki/Gas\\_chromatography-mass\\_spectrometry#/media/File:Electron\\_ionization\\_GC-MS.png](https://en.wikipedia.org/wiki/Gas_chromatography-mass_spectrometry#/media/File:Electron_ionization_GC-MS.png). (Accessed: 25th July 2018)

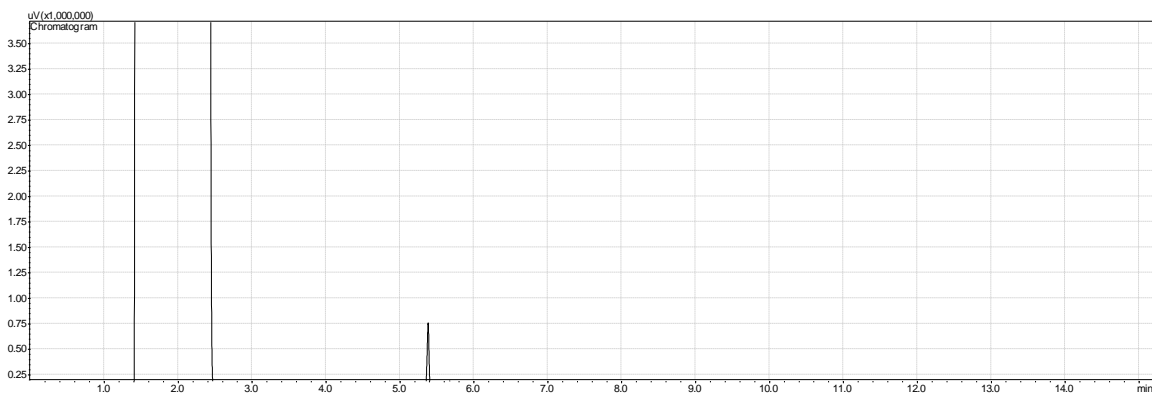
59. Marques, J. HPLC -Cromatografia líquida de alta eficiência. (1970).
60. High Performance Liquid Chromatography - HPLC. Available at: <https://www.chemguide.co.uk/analysis/chromatography/hplc.html>. (Accessed: 2nd August 2018)
61. Dos Santos Pereira, A. & De Aquino Neto, F. R. Estado da arte da cromatografia gasosa de alta resolução e alta temperatura. *Quim. Nova* 23, 370-379 (2000).
62. D.A. Skoog; J.J. Leary. *Principles of Instrumental Analysis*. (1994).
63. Regnault-Roger, C. The potential of botanical essential oils for insect pest control. *Integr. Pest Manag. Rev.* 2, 25-34 (1997).
64. Óleo essencial - Alecrim. Available at: <https://www.portalsaofrancisco.com.br/alimentos/alecrim>. (Accessed: 2nd August 2018)
65. Combates a doenças de Gerânios. Available at: <https://www.compojardineria.es/es/pt/plant-guide/howto/Geraniums.html>. (Accessed: 8th September 2018)
66. Óleo essencial da estabilidade - Manjeriçã. Available at: <https://terra-flor.com/blog/oleo-essencial-da-estabilidade/?post=132>. (Accessed: 2nd August 2018)
67. Óleo essencial - Salsa. Available at: <http://www.oleosessenciais.org/oleo-essencial-de-salsa/>. (Accessed: 2nd August 2018)
68. Óleo essencial do Coentro. Available at: <http://www.oleosessenciais.org/oleo-essencial-de-coentro/>. (Accessed: 2nd August 2018)
69. Perry, L. M. *et al.* Composição química e Atividade Acaricida do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* ( L . ) Merr . & sobre o ácaro rajado *tetranychus urticae* koch. 3-6
70. Moreira, H. J. da C. & Aragão, F. D. Manual de Pragas do Milho. *Man. Pragas do Milho* 1, 132 (2009).
71. Viana, P. A. Pragas da cultura do milho forrageiro. **59**, 45-50

## 8 Anexos

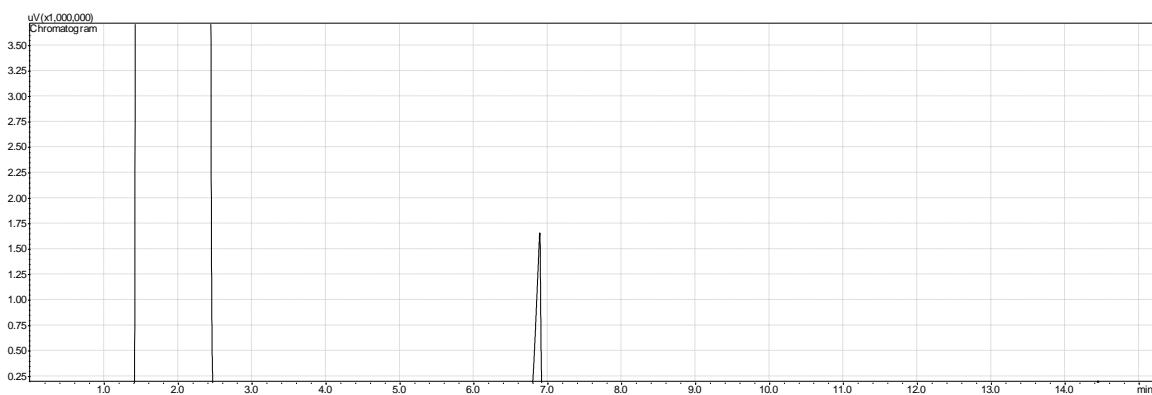
### 8.1 Anexo 1 - Identificação dos Compostos após Injeção Direta



**Figura A1** - Cromatograma resultante da injeção do padrão individual de 2,2-6 Trimetilciclohexanona



**Figura A2** - Cromatograma resultante da injeção do padrão individual da Mentona



**Figura A3** - Cromatograma resultante da injeção do padrão individual de Acetato Borneol

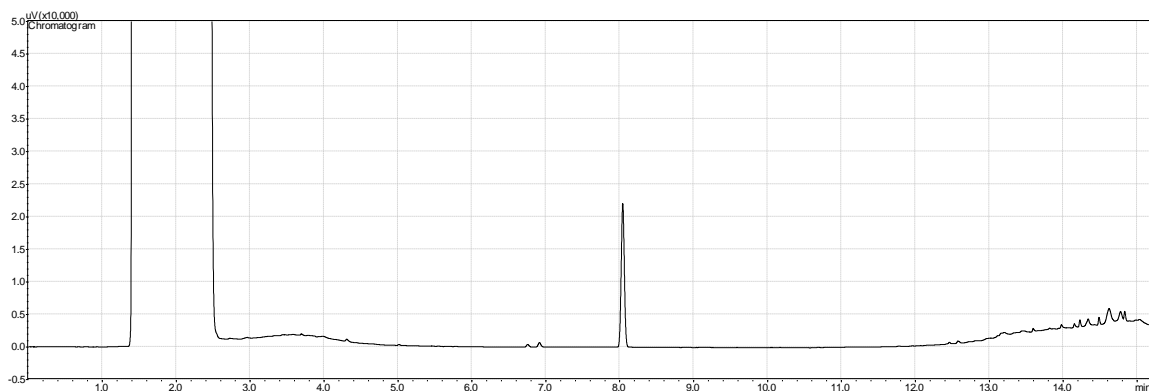


Figura A4 - Cromatograma resultante da injeção do padrão individual da Pulegona

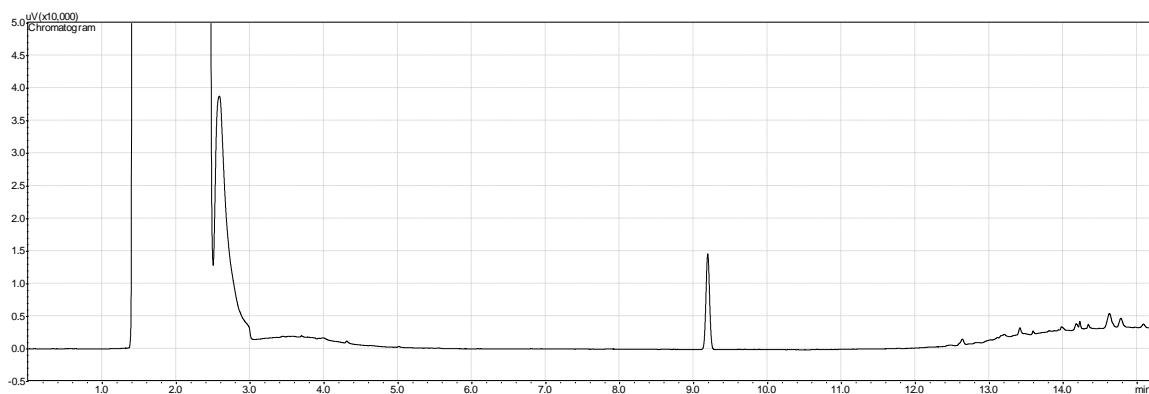


Figura A5 - Cromatograma resultante da injeção do padrão individual do (S)-(-)- $\alpha$ -Terpineol

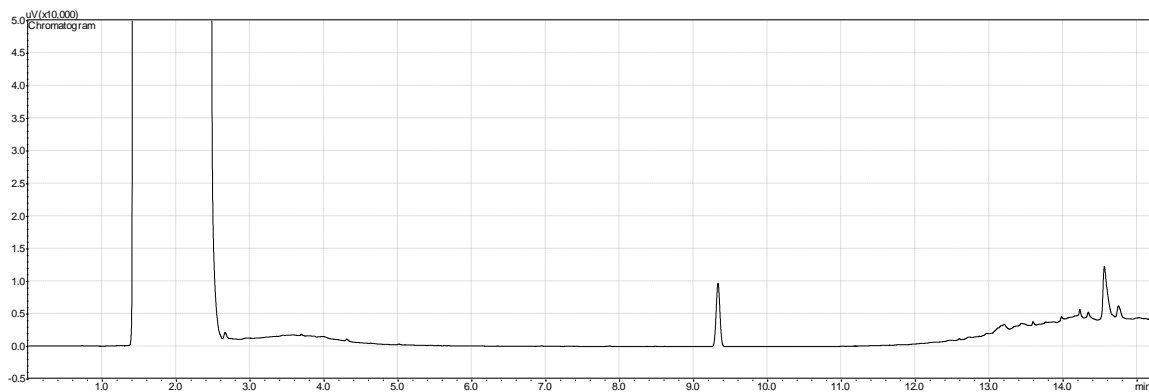


Figura A6 - Cromatograma resultante da injeção do padrão individual do Borneol

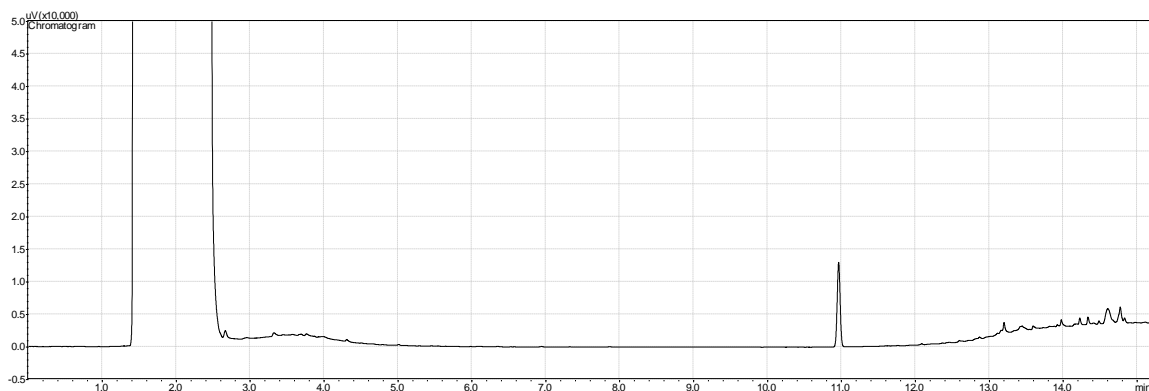


Figura A7 - Cromatograma resultante da injeção do padrão individual de Acetato de Geraniol

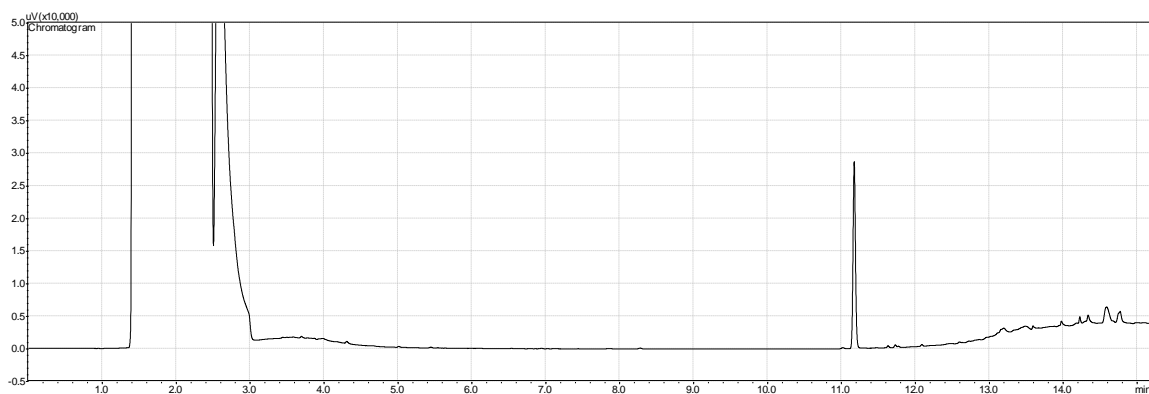


Figura A8 - Cromatograma resultante da injeção do padrão individual de Citronelol

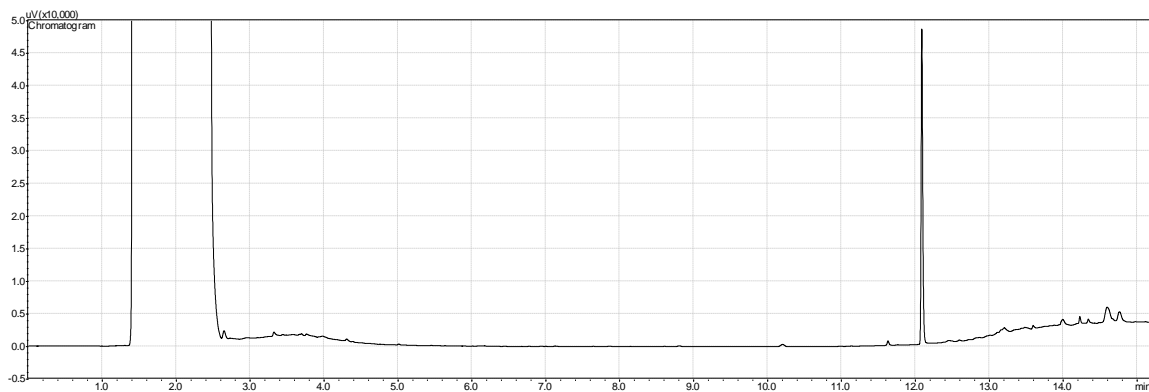


Figura A9 - Cromatograma resultante da injeção do padrão individual do Geraniol

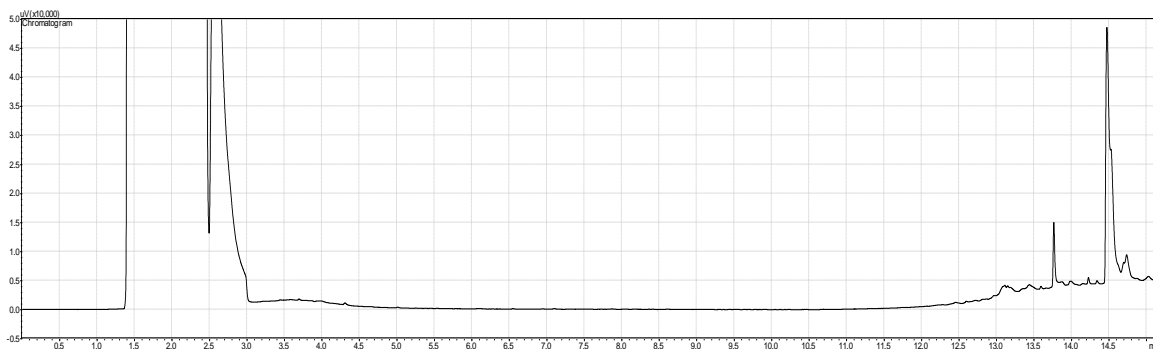


Figura A10 - Cromatograma resultante da injeção do padrão individual do Eugenol.

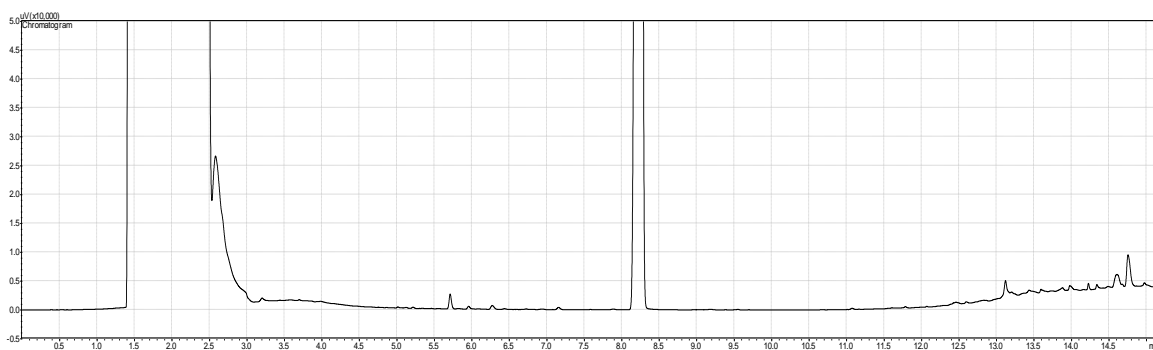


Figura A11 - Cromatograma resultante da injeção do padrão interno (Acetofenona)

## 8.2 Anexo 2 - Representação dos Gráficos dos Compostos Obtidos por GC - FID Usando Acetofenona como Padrão Interno

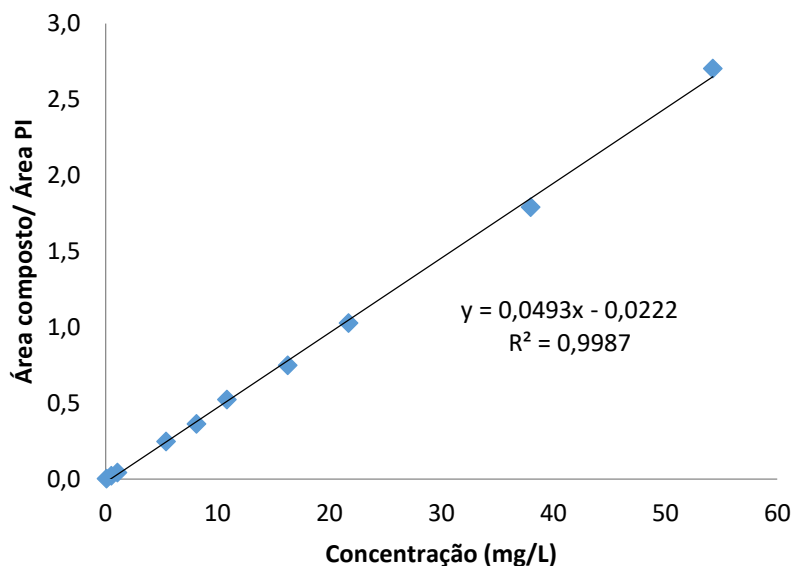


Figura A12 - Representação do gráfico da curva de calibração do 2,2-6 Trimetilciclohexanona

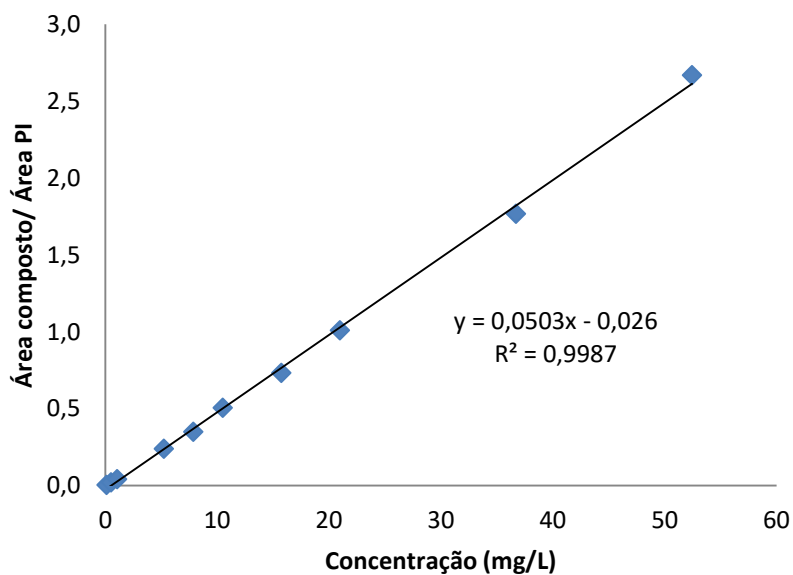


Figura A13 - Representação do gráfico da curva de calibração da Mentona

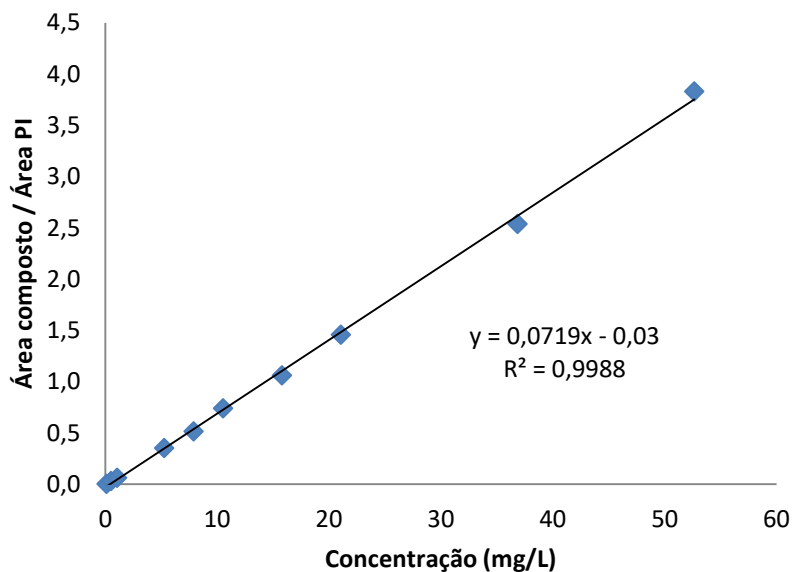


Figura A14 - Representação do gráfico da curva de calibração do Acetato Borneol

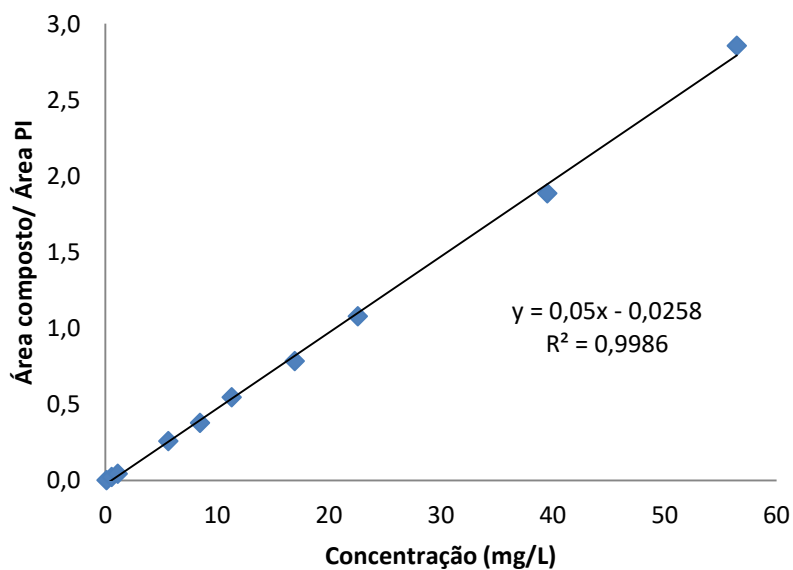


Figura A15 - Representação do gráfico da curva de calibração da Pulegona

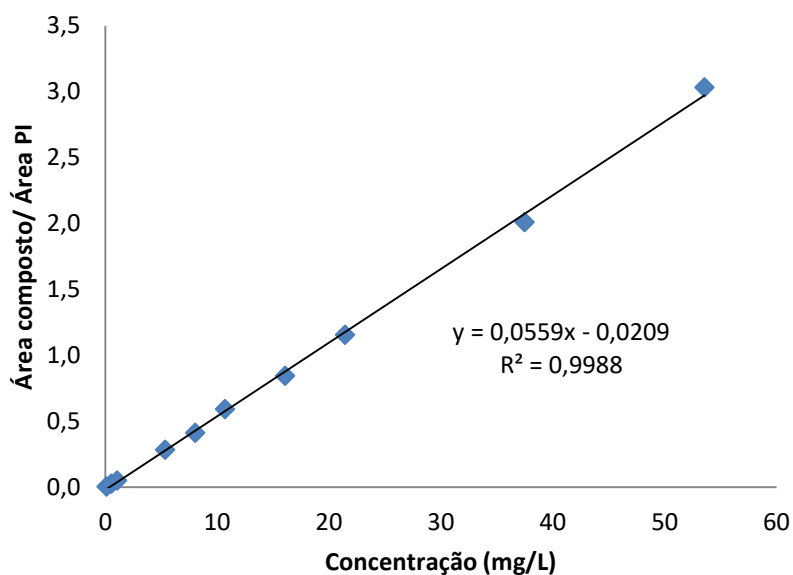


Figura A16 - Representação do gráfico da curva de calibração do (S)-(-)-α-Terpineol

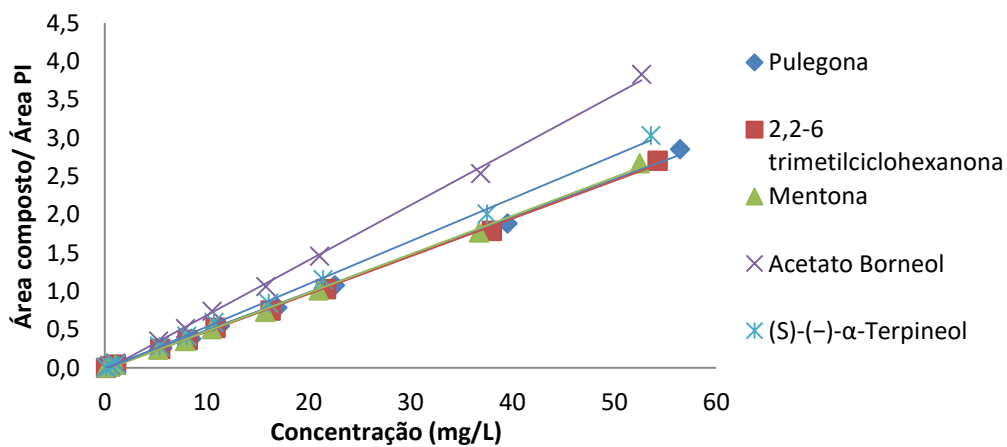


Figura 1417 - Curva de calibração dos compostos presentes nas soluções-stock e nas soluções padrão de calibração por a injeção direta (cinco primeiros compostos)

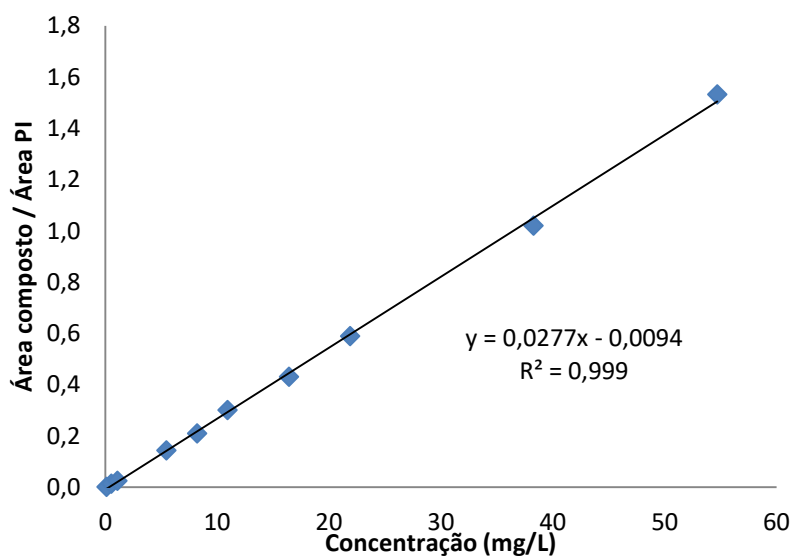


Figura A18 - Reapresentação do gráfico da curva de calibração do Borneol

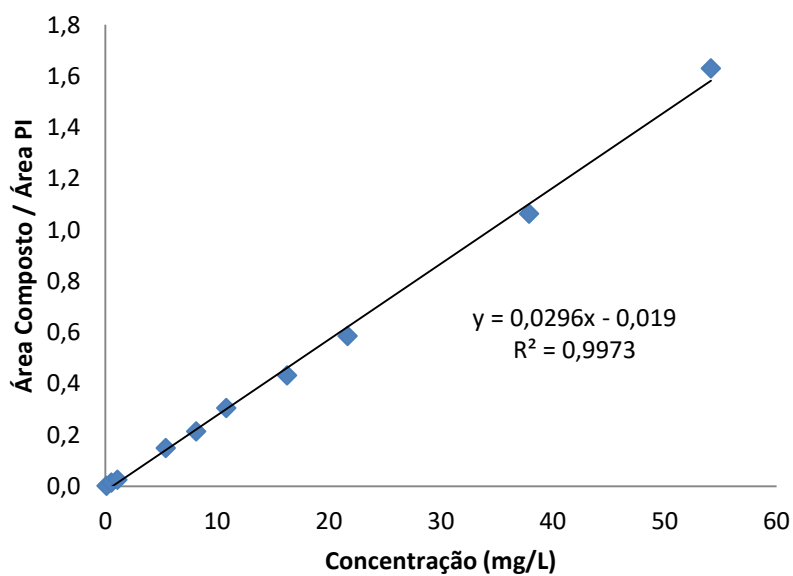


Figura A19 - Reapresentação do gráfico da curva de calibração do Acetato de Geraniol

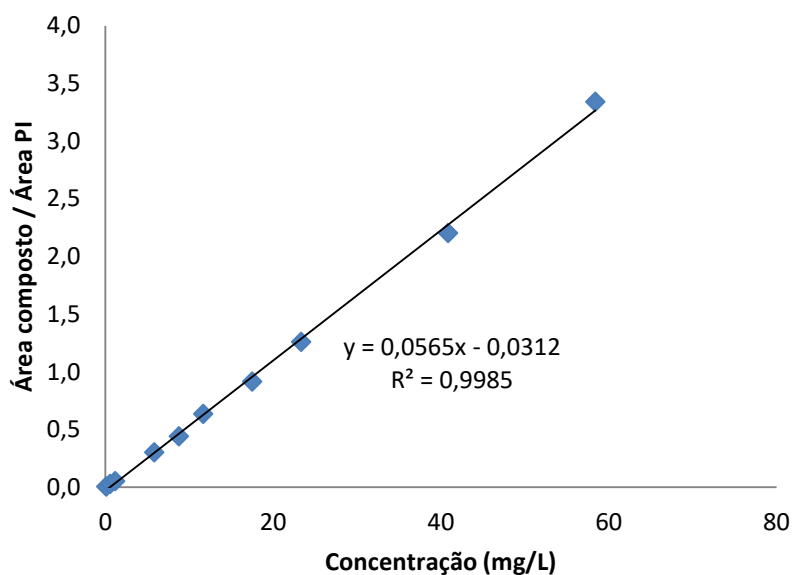


Figura A20 - Representação do gráfico da curva de calibração do Citronelol

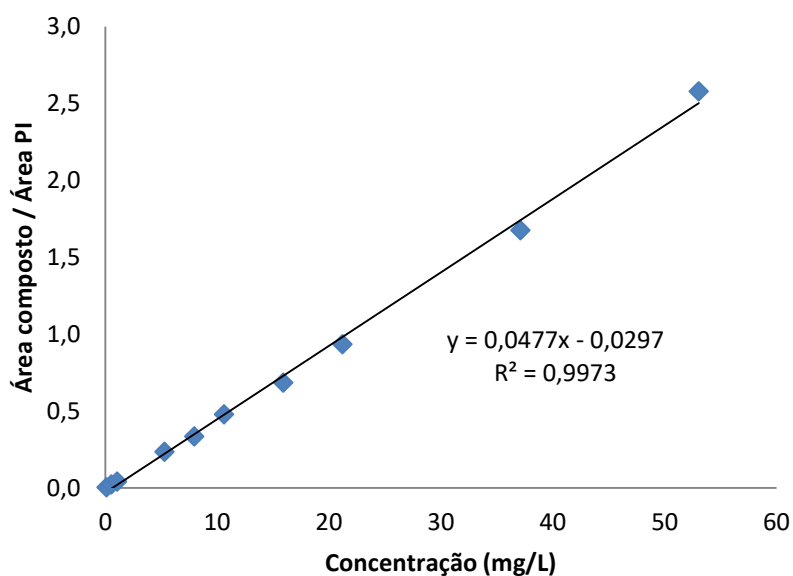


Figura A21 - Representação do gráfico da curva de calibração do Geraniol

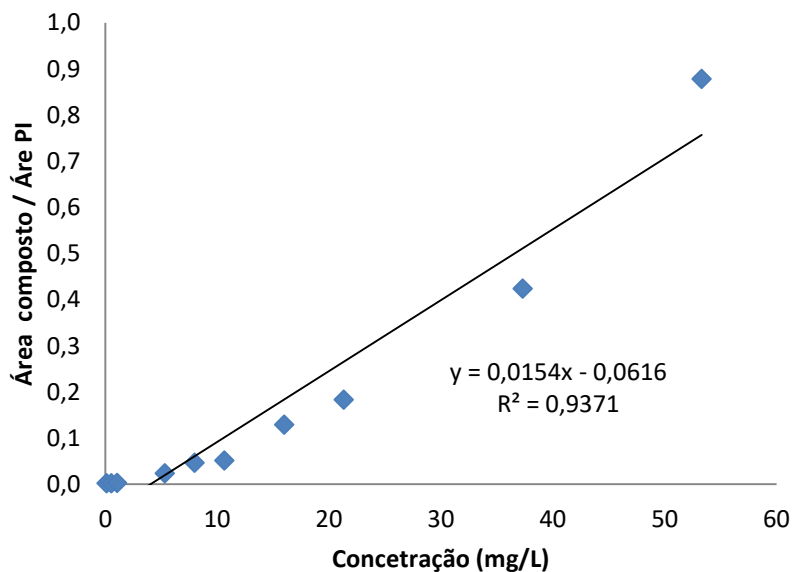


Figura A22 - Reapresentação do gráfico da curva de calibração do Eugenol

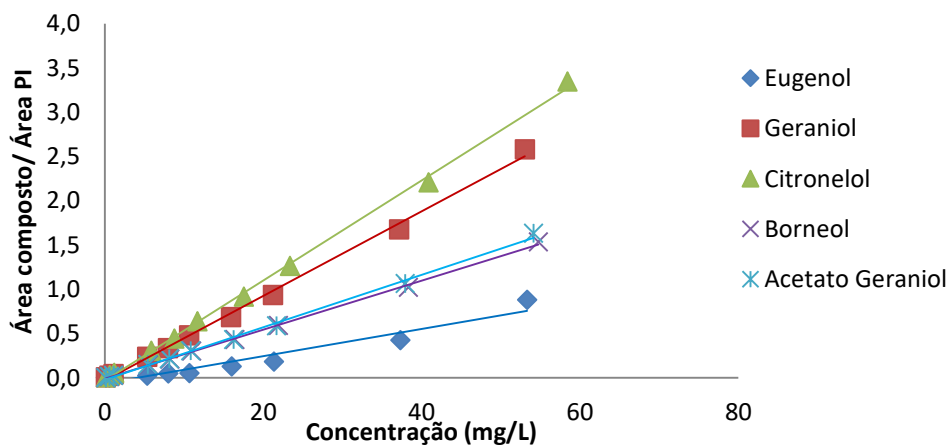
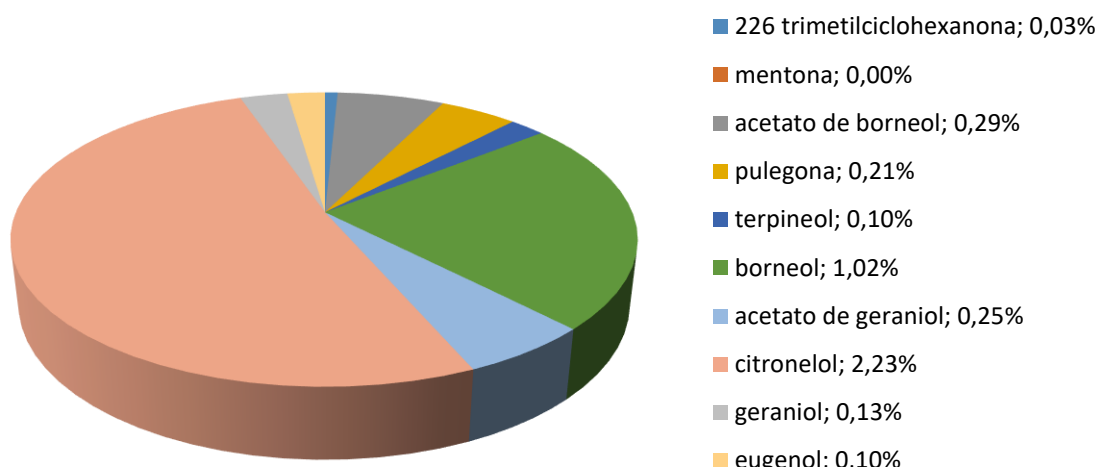
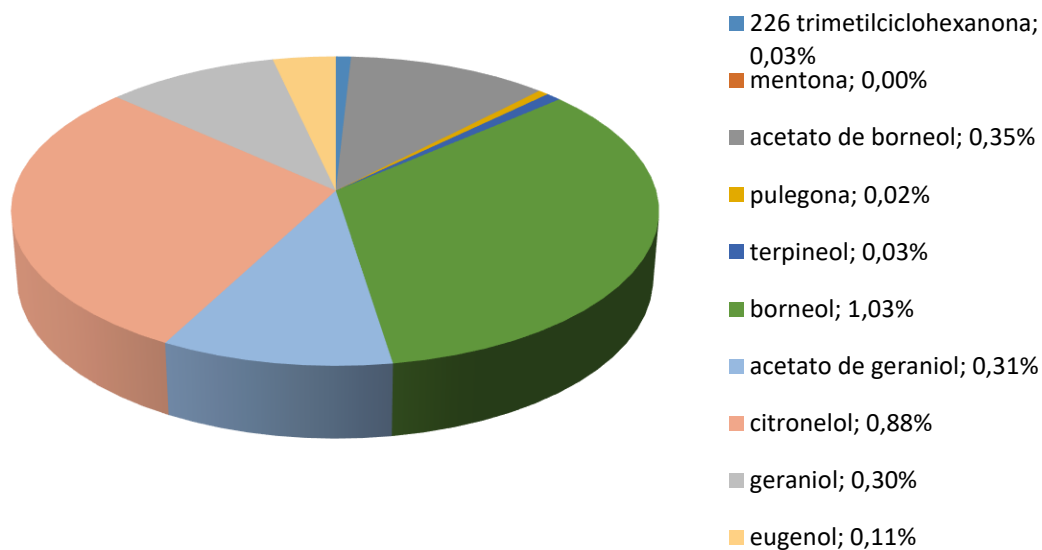


Figura A23 - Curva de calibração dos compostos presentes nas soluções-mãe e nas soluções padrão de calibração para a injeção direta (cinco últimos compostos)

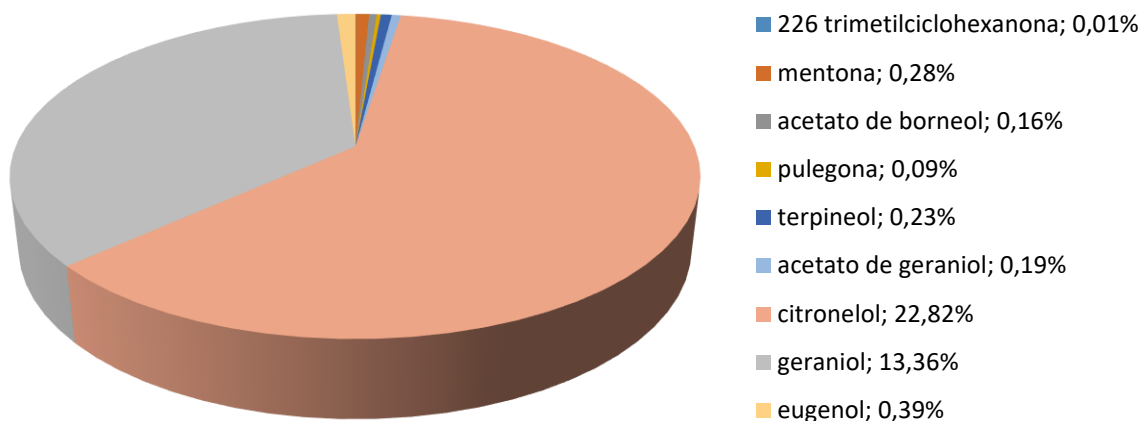
### 8.3 Anexo 3 - Análise Cromatográfica em GC-FID para os Óleos Essenciais das Plantas Presentes no Projeto



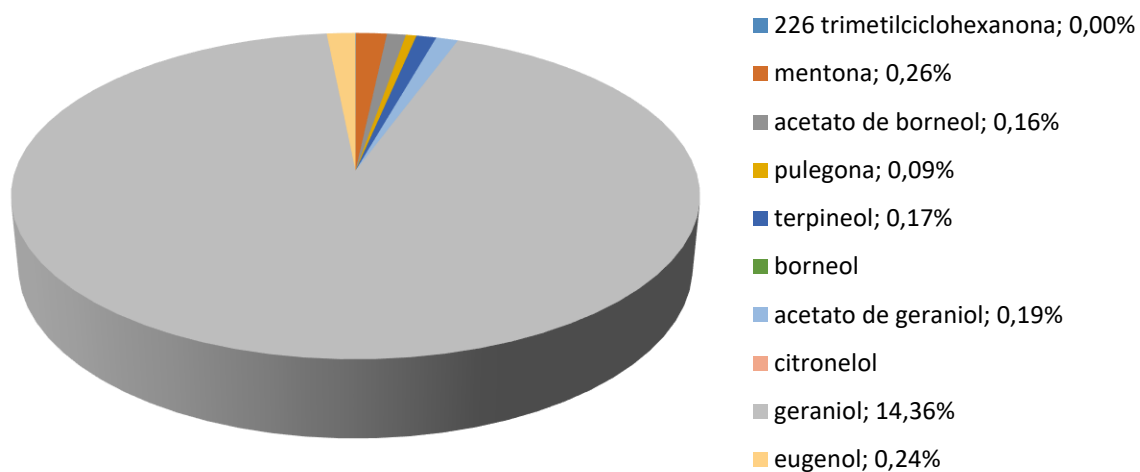
**Figura A24** - Análise cromatográfica em GC-FID para o óleo da *Mentha x piperita L.* extraído pelo SDE usando éter etílico como solvente durante 30 minutos (Compostos não identificados: 95,64%)



**Figura A25** - Análise cromatográfica em GC-FID para o óleo da *Mentha x piperita* extraído pelo SDE usando o solvente *n*-pentano durante 60 minutos (Compostos não identificados: 97,21%)



**Figura A26** - Análise cromatográfica em GC-FID para o óleo essencial do *Pelargonium graveolens* L. extraído pelo SDE usando o solvente éter etílico durante 30 minutos (Compostos não identificados: 61,07%)



**Figura A27** - Análise cromatográfica em GC-FID para o óleo do *Pelargonium graveolens* L. usando n-pentano como solvente durante 60 minutos (Compostos não identificados: 84,53%)

## 8.4 Anexo 4 - Legislação Aplicável, Instituições Intervenientes e Respetivas Responsabilidades

Tabela A1 - Legislação aplicável, instituições intervenientes e respetivas responsabilidades <sup>[42]</sup>

Tipo de documento nº e data	Descrição	Indicação resumida das principais disposições	Relação com o Direito Comunitário	Entidades Competentes	Regime sancionatório
<p><b>Decreto-Lei nº 121/2002, de 3 de Maio</b></p>	<p>Estabelece o regime jurídico da colocação no mercado dos produtos biocidas.</p>	<p>- Estabelece as Autoridades Competentes Nacionais para proceder à avaliação técnica dos produtos biocidas.</p>	<p>Transposição da Diretiva nº 98/8/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 16 de Fevereiro de 1998, relativa à colocação de produtos biocidas no mercado.</p>	<p>Direcção-Geral de Protecção de Culturas. Direcção-Geral de Veterinária Direcção-Geral da Saúde</p>	<p>Artigos 31º e 32º</p>
<p><b>Regulamento (CE) nº 1687/2002, da Comissão, de 25 de Setembro de 2002</b></p>	<p>Estabelece um período suplementar para a notificação de determinadas substâncias ativas já presentes no mercado para utilização como biocidas.</p>	<p>Legislação aplicável, instituições intervenientes e respetivas responsabilidades</p>			

*Tabela A1 (cont.) - Legislação aplicável, instituições intervenientes e respetivas responsabilidades*

Tipo de documento nº e data	Descrição	Indicação resumida das principais disposições	Relação com o Direito Comunitário	Entidades Competentes	Regime sancionatório
Portaria nº 17980, de 30 de Setembro de 1960	Estabelece normas relativas à atividade de importação, fabrico, preparação e venda de pesticidas e produtos correlativos				
Decreto-Lei nº 306/90, de 27 de Setembro	Estabelece as autoridades competentes para emissão de autorização de venda de produtos pesticidas.				
Decreto-Lei nº 33/2004, de 29 de Outubro	Aprova a Convenção de Roterdão relativa ao Procedimento de Prévia Informação e Consentimento para determinados produtos químicos e pesticidas perigosos no comércio internacional				

## 8.5 Anexo 5 - Pesquisas Bibliográficas sobre Plantas Aromáticas no Combate a Pragas

Tabela A2 - Plantas aromáticas e seus respectivos componentes no combate a pragas

Planta / Designação comum	Óleo essencial	Compostos químicos maioritários (%)	Praga(s) que combate	Principais resultados	Ref.
Tomilho	<i>Thymus serpyllum</i> L.	Timol (30,4); Carvacrol (28,9); p-Cimeno (10) ; Citra (4,2)	<i>Acanthoscelides obtectus</i>	C <sub>LC50</sub> (mg/L) elimina cerca de 2,0 ao fim de 24h e cerca de 1,5 ao fim de 48h	[63]
	<i>Thymus vulgaris</i> L.	Timol (47,5); p-cimeno (17,3) ; Cariofileno (6,1)	Larva da couve	C <sub>LC50</sub> (mg/L) elimina cerca de 7,0 ao fim de 24h e cerca de 2,2 ao fim de 48h	[63]
		Thymol (26,5); p-cimeno (18,4); Cariofileno (3,5)	Larva da couve	C <sub>LC50</sub> (mg/L) elimina cerca de 13,5 ao fim de 24h e cerca de 4,5 ao fim de 48h	[63]
Hortelã-pimenta	<i>Mentha piperita</i> L.	Mentol (18,8); Isomentona (12,8); Mentona (3,5)	Pulgões; Tripes ( <i>thysanoptera</i> ); Ácaros	C <sub>LC50</sub> (mg/L) elimina cerca de 22,4 ao fim de 24h e cerca de 8,7 ao fim de 48h	[44,63]
Alecrim	<i>Rosmarinus officianalis</i> L.	Cânfora (30,6); Borneol (22,1); Eucaliptol; Phellandrene (10,6)	Larva da couve; Mosca da cenoura	C <sub>LC50</sub> (mg/L) elimina cerca de 3,2 ao fim de 24h e cerca de 2,2 ao fim de 48h	[63,64]
Segurelha-das-hortas	<i>Satureia hortensis</i> L.	Carvacrol (39,9); Timol (13,4); Linalol (6,4)	Moscas; Mosquitos	C <sub>LC50</sub> (mg/L) elimina cerca de 5,7 ao fim de 24h e cerca de 2,7 ao fim de 48h	[63]

Tabela A2 (cont.) - Plantas aromáticas e seus respectivos componentes no combate a pragas

<i>Planta / Designação comum</i>	Óleo essencial	Compostos químicos maioritários (%)	Praga(s) que combate	Principais resultados	Ref.
Gerânio	<i>Pelargonium graveolens L.</i>	Geraniol (0,2 - 1,1); Citronelol; Linalol; Iso- mentona	<p style="text-align: center;"><b>Podridão cinzento</b></p> <p>Apodrecimento de cor cinzenta que afeta sobretudo as flores. Há que evitar o excesso de humidade e favorecer a ventilação e a exposição ao sol. Para curar a doença funciona usar um Fungicida.</p> <p style="text-align: center;"><b>Lagartas desfolhantes</b></p> <p>Larvas de diferentes insetos que comem as folhas da planta. Pulverizar bem toda a planta, ao entardecer, com COMPO Inseticida Ação Total.</p> <p style="text-align: center;"><b>Borboleta do gerânio</b></p> <p>Trata-se de uma borboleta desconhecida até há pouco na Europa e que constitui uma grave ameaça para os gerânios. Se a larva já se encontrar dentro do caule os inseticidas não conseguirão eliminá-la; haverá que cortar a parte afetada e eliminar fisicamente a praga.</p> <p style="text-align: center;"><b>Ferrugem</b></p> <p>Caracteriza-se por pequenos pontinhos de cor avermelhada nas folhas. As pústulas são a parte reprodutiva de um fungo interno que debilita a planta e pode provocar a queda das folhas. Tratar toda a planta com um Fungicida.</p>	s.i.	[65]

			<p><b>Mosca branca</b></p> <p>Pequenos insetos alados que se agrupam no avesso das folhas e que esvoaçam ao sacudi-las. São insetos sugadores, de cor branca, que debilitam a planta e produzem grande quantidade de melação.</p> <p><b>Aranha vermelha</b></p> <p>São pequenos insetos sugadores que se situam nas axilas das folhas, nos caules e no avesso das folhas e criam finas teias de aranha. Quando o ataque avança também se observam teias de aranha.</p>		
Lavanda, ou Alfazema ou Nardo	<i>Lavandula augustifolia</i> <i>P.Muller</i>	Acetato de Linalilol (34,2); Linalol (31,8); Cariofileno (11,1)	Traças; Pulgas; Moscas; Mosquitos	C <sub>LC50</sub> (mg/L) elimina cerca de 12,6 ao fim de 24h e cerca de 5,7 ao fim de 48h	[63]
Eucalipto-comum	<i>Eucalyptus globulus</i> L.	1,8-Cineole (86); α-pineno (3,9); p-Cimeno (2,4)	Cupins; Saúvas; Quenquéns Lagartas das folhas; Besouros de folhas; Brocas; Besouro de raiz	C <sub>LC50</sub> (mg/L) elimina cerca de 66,0 ao fim de 24h e cerca de 20,8 ao fim de 48h	[63]
Loureiro	<i>Laurus nobilis</i> L.	1,8-Cineole (48,6); Sabineno (9,1); Terpinilacetato (8,2); α-pineno (7,1)	Toupeiras	C <sub>LC50</sub> (mg/L) elimina cerca de 17,8 ao fim de 24h e cerca de 8,1 ao fim de 48h	[63]
Orégano	<i>Origanum vulgare</i> L.	Carvacrol (39,4) ; Timol (26,6); p-Cimeno (16,3)	Fungos; Formigas; alguns tipos de lagartas	C <sub>LC50</sub> (mg/L) elimina cerca de 10,0 ao fim de 24h e cerca de 3,3 ao fim de 48h	[63]

Tabela A2 (cont.) - Plantas aromáticas e seus respectivos componentes no combate a pragas

Planta / Designação comum	Óleo essencial	Compostos químicos maioritários (%)	Praga(s) que combate	Principais resultados	Ref.
Citronela	<i>Cymbopogon nardus</i> Wats	Citronela (33,8), Geraniol (21,6); Citronelol (9,2); Geranilacetato (3,4)	Moscas; Mosquitos; Formigas	C <sub>LC50</sub> (mg/L) elimina cerca de 60,4 ao fim de 24h e cerca de 24,0 ao fim de 48h	[63]
Sálvia-comum	<i>Salvia officinalis</i> L.	Tujona (28); Linalilacetato (21,4); Humuleno	Borboleta-branca da couve; Mariposa do repolho	C <sub>LC50</sub> (mg/L) elimina cerca de 7,1 ao fim de 24h e cerca de 4,9 ao fim de 48h	[63]
Manjerona	<i>Origanum majorana</i> L.	Terpineno-1-ol-4 (20,6); Linalol (15,3); Terpineno (10,3)	“ não são conhecidos”	C <sub>LC50</sub> (mg/L) elimina cerca de 1,9 ao fim de 24h e cerca de 1,5 ao fim de 48h	[63]
Manjeriço-de-folha-larga	<i>Ocimum basilicum</i> L.	Linalol (50); Limoneno (7,5); Eugenol (3,6), Estragole (3,2); alfa e beta-pineno(4); Cariofileno(9); Citronelol; Geraniol; Acetato de citronelina(3); Metilchavicol M.E.( 85) 1,8-cineol (3)	Moscas; Mosquitos	C <sub>LC50</sub> (mg/L) elimina cerca de 4,0 ao fim de 24h e cerca de 1,6 ao fim de 48h	[63,66]
Canela	<i>Cinnamomum verum</i> Presl	Cinamaldeído (90); Eugenol (3.6)	Tripes ( <i>Selenothrips rubrocintus</i> ) - ataca a gema apical; Lagarta minadora	C <sub>LC50</sub> (mg/L) elimina cerca de 2,1 ao fim de 24h e cerca de 1,7 ao fim de 48h	[63]
Salsa	<i>Petroselinum sativum</i> L.	Apiole (43); Timol (10,2)	Mosca da cenoura; Certos escaravelhos	C <sub>LC50</sub> (mg/L) elimina cerca de 1000 ao fim de 24h	[63,67]

Tabela A2 (cont.) - Plantas aromáticas e seus respectivos componentes no combate a pragas

Planta / Designação comum	Óleo essencial	Compostos químicos maioritários (%)	Praga(s) que combate	Principais resultados	Ref.
Cominho	<i>Cuminum cyminum</i> L.	Cinamaldeído (42,5); Pineno (11,8); Terpineno (11,4); Nerol (11,4)	Destroem quase por completo as larvas brancas	C <sub>LC50</sub> (mg/L) elimina cerca de 4,3 ao fim de 24h e cerca de 2,1 ao fim de 48h	[63]
Aipo	<i>Apium graveolens</i> Hout	Limoneno (73,2); Sequiterpeno (13)	Ácaro; Minador das folhas; Pulgão	C <sub>LC50</sub> (mg/L) elimina cerca de 302,0 ao fim de 24h e cerca de 263,0 ao fim de 48h	[63]
Noz-moscado	<i>Myristica fragrans</i> L.	Pineno (23,2); Sabineno (22,6); Miristicina (7,9)	Pulgão	C <sub>LC50</sub> (mg/L) elimina cerca de 125,8 ao fim de 24h e cerca de 112,2 ao fim de 48h	[63]
Endro	<i>Anethum graveolens</i>	Limoneno (35,9); Carvone (34,8); Miristicina (11,8)	Pulgão	C <sub>LC50</sub> (mg/L) elimina cerca de 50,0 ao fim de 24h e cerca de 22,4 ao fim de 48h	[63]
“Erva dos leprosos” ou “erva sagrada”	<i>Verbena officinalis</i> L.	Carvona (32,4); Limoneno (18,9); Citral (17,6)	<i>Sitophilus granarius</i> L. -besouro do milho	C <sub>LC50</sub> (mg/L) elimina cerca de 19,9 ao fim de 24h e cerca de 8,8 ao fim de 48h	[63]
Coentro	<i>Coriandrum sativum</i> L.	Linalol (68,2); Pineno (5,5); Terpineno (5,5)	Pulgão; Ácaros	C <sub>LC50</sub> (mg/L) elimina cerca de 19,9 ao fim de 24h e cerca de 8,8 ao fim de 48h	[63,68]
Cravo-da-índia	<i>Syzygium Aromaticum</i>	Eugenol (79,0); Cis-Cariofileno (12,6); α-Humleno (2,04); Acetato de eugenila (0,29)	Fungos do feijão maracujazeiro, tomateiro; Podridão do colmo ou das raízes.	Com uma concentração de LC 50 (µg/L), é capaz de eliminar cerca de 0,025	[69]

Tabela A2 (cont.) - Plantas aromáticas e seus respectivos componentes no combate a pragas

Planta/ Designação comum	Óleo essencial	Compostos químicos maioritários (%)	Praga(s) que combate	Principais resultados	Ref.
Milho	<i>Zea mays L.</i>	1,8- Cineol;  Limoneno;  Linalol;  Mentol;  Citronelal;  Citronelol;  $\alpha$ -Pinenol;  $\alpha$ - Terpineol ;  Anetol;  Citral;  Eugenol;	<p><b>Pragas da raiz do milho:</b></p> <p>Cigarrinha-das-raízes (<i>Mahanarva fimbriolata</i>); Coró-das-pastagens (<i>Diloboderus abderus</i>); Coró-da-soja (<i>Phyllophaga cuyabana</i>); Coró-do-trigo (<i>Phyllophaga triticophaga</i>); Cupim-de-montículo (<i>Cornitermes snyderi</i>); Cupim-Subterrâneo (<i>Procornitermes triacifer</i>); Cupim-Subterrâneo (<i>Procornitermes striatus</i>); Cupim-Subterrâneo (<i>Syntermes molestus</i>); Larva-alfinete (<i>Diabrotica speciosa</i>); Larva-angorá (<i>Astylus variegatus</i>); Larva-aramé (<i>Conoderus scalaris</i>);</p> <p><b>Pragas do colmo ou caule do milho:</b></p> <p>Broca-do-colmo (<i>Diatraea saccharalis</i>); Lagarta-elasma (<i>Elasmopalpus lignosellus</i>); Lagarta-rosca (<i>Agrotis ipsilon</i>); Percevejo-barriga-verde (<i>Dichelops furcatus</i>); Percevejo-barriga-verde (<i>Dichelops melacanthus</i>)</p> <p><b>Pragas das folhas do milho:</b></p> <p>Cigarrinha-das-pastagens (<i>Deois flavopicta</i>); Cigarrinha-do-milho (<i>Dalbulus maidis</i>); Curuquerê-dos-capinzais (<i>Mocis latipes</i>); Formiga-cortadeira (<i>Acromyrmex spp</i>); Formiga-cortadeira (<i>Atta sexdens rubropilosa</i>); Gafanhoto (<i>Rhammatocerus schistocercoides</i>); Grilo-pardo (<i>Anurogryllus muticus</i>); Lagarta-do-cartucho (<i>Spodoptera frugiperda</i>);</p>	s.i.	[70,71]

		<p>Timol;</p> <p>Dissulfeto dialílico;</p> <p>β-Cariofileno;</p> <p>Geraniol;</p> <p>Terpenos</p>	<p>Pulgão-do-milho (<i>Rhopalosiphum maidis</i>); Tripes (<i>Frankliniella williamsi</i>)</p> <p><b>Pragas da espiga do milho:</b></p> <p>Lagarta-da-espiga (<i>Helicoverpa zea</i>); Mosca-da-espiga (<i>Euxesta</i> spp.); Percevejo-do-milho (<i>Leptoglossus zonatus</i>); Fungos do campo (<i>Fusarium</i>, e <i>Helminthosporium</i>)</p> <p><b>Pragas do milho armazenado:</b></p> <p>Caruncho (<i>Sitophilus</i> spp); Traça (<i>Sitotroga cerealella</i>); Fungos de armazenamento (<i>Aspergillus</i> e <i>Penicillium</i>)</p>		
--	--	---	---	--	--

s.i. : sem informação

C<sub>LC50</sub> - Concentração letal médio