

Mestrado Integrado em Engenharia Química

***Estudos preliminares da
microencapsulação de extratos do poejo
(Mentha pulegium L.)***

Dissertação de Mestrado

de

Maria Inês Silva do Amaral

Desenvolvida no âmbito da unidade curricular de Dissertação

realizada no

Departamento de Engenharia Química

da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto

Orientadora: Professora Doutora Lúcia Santos



Fevereiro de 2020

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à Professora Lúcia Santos, minha orientadora, por me ter proporcionado a oportunidade de desenvolver este projeto, bem como pela disponibilidade, motivação e ajuda prestada ao longo dos últimos meses.

À Engenheira Filipa Paulo pela disponibilidade, ensinamentos e auxílio prestados ao longo do desenvolvimento do projeto.

A todos os colegas do laboratório E201, em particular ao Engenheiro Fábio Bernardo, pelo acolhimento, apoio e partilha de conhecimentos.

Ao Professor Adélio Mendes pela disponibilização de equipamentos utilizados em ensaios desta dissertação.

Aos técnicos de laboratório José Luís Moreira, Maria de Fátima Ferreira e Sónia Medeiros pela ajuda prontamente dispensada sempre que solicitados.

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) pelos recursos e meios disponibilizados.

À minha família — em particular ao meu pai, irmão e irmã — pelo acompanhamento e apoio ao longo da minha vida académica.

À Ana, Carolina, Inês, Raquel e Sofia por estarem sempre presentes, muitas vezes à distância, e por todas as palavras de incentivo.

À minha mãe, a quem dedico esta dissertação.

Este trabalho foi financiado por: Financiamento Base — UIDB/00511/2020 da Unidade de Investigação — Laboratório de Engenharia de Processos, Ambiente, Biotecnologia e Energia — LEPABE — financiada por fundos nacionais através da FCT/MCTES (PIDDAC).

Resumo

O uso excessivo de pesticidas para a proteção de plantas e culturas agrícolas tem despertado grande preocupação social, dado os seus possíveis efeitos a longo prazo na saúde e no ambiente. Deste modo, tem-se observado uma crescente procura por alternativas e estratégias de proteção de origem predominantemente natural. Diferentes plantas aromáticas sintetizam metabolitos secundários biodegradáveis com grande interesse económico, como os óleos essenciais. Alguns óleos essenciais com propriedades características de pesticidas têm sido considerados possíveis alternativas aos pesticidas convencionais, como é o caso do óleo essencial do poejo (*Mentha pulegium* L.).

Nesse sentido, este projeto consistiu no estudo da microencapsulação do óleo essencial do poejo e da sua possível aplicação como pesticida. Começou-se por extrair o óleo essencial da planta, recorrendo ao método de destilação e extração simultânea, obtendo-se um rendimento de extração entre 0,2 e 1,3 %. A identificação e quantificação dos compostos pulegona, mentona e geraniol — presentes no óleo essencial, segundo a literatura — foi realizada recorrendo à técnica de cromatografia gasosa com detetor de ionização de chama, tendo sido necessário desenvolver um método analítico e proceder à sua validação, recorrendo a parâmetros como linearidade, sensibilidade, limiares analíticos e precisão. Através da análise quantitativa dos extratos, verificou-se a presença maioritária da pulegona, com um valor percentual entre 57 e 66 %. A mentona, um dos compostos minoritários do óleo essencial, apresentou um valor percentual entre 1 e 4 %. Por outro lado, não foi possível detetar o geraniol.

Realizou-se, pelo método de múltipla emulsão com evaporação do solvente, a microencapsulação da mistura dos padrões dos três compostos de interesse e, posteriormente, do extrato do poejo. Embora o rendimento de microencapsulação do extrato tenha variado entre 64,3 e 75,2 %, obteve-se uma baixa eficiência de encapsulação, cerca de 3,1 % para a pulegona, pelo que se pode concluir que o método deverá ser melhorado. Ainda assim, o método de microencapsulação utilizado permitiu a formação de micropartículas com uma morfologia esférica e regular, e superfície porosa, o que poderá influenciar a cinética de libertação dos compostos. As micropartículas de extrato apresentaram um tamanho médio de 15,7 µm.

A possível aplicação das micropartículas como pesticida baseou-se numa análise preliminar da libertação em água dos compostos encapsulados. Os resultados não foram conclusivos, pelo que se devem desenvolver novos estudos que otimizem a técnica de encapsulação e o estudo de libertação.

Palavras Chave: *Mentha pulegium* L. (poejo), óleos essenciais, extração, cromatografia gasosa, microencapsulação, libertação controlada.

Abstract

The widespread use of pesticides to protect plants and agricultural crops has raised global concerns given its possible long-term effects on health and the environment. Therefore, there has been a growing demand for nature-based alternatives and protection strategies. Several aromatic plants synthesise biodegradable secondary metabolites of considerable economic interest such as essential oils. Certain essential oils with pesticidal properties — pennyroyal's (*Mentha pulegium* L.) being one of them — have been deemed as potential alternatives to conventional pesticides.

Consequently, this research has focused on the study of the microencapsulation of the *Mentha pulegium* L. essential oil and its potential application as a pesticide. Initially, the essential oil was extracted from the plant using the simultaneous distillation-extraction method —the extraction yield was found to be between 0,2 and 1,3 %. The identification and quantification of the pulegone, menthone, and geraniol compounds — which, as documented in the literature, can be found in the essential oil — was carried out using the gas chromatography with flame-ionisation detection technique and an analytical method was developed and validated using multiple parameters — linearity, sensitivity, analytical thresholds, and precision. Furthermore, a quantitative analysis of the extracts revealed pulegone to be the most common compound — between 57 and 66 % — while menthone had a percent composition of between 1 and 4 %. Conversely, geraniol could not be detected.

The multiple emulsion solvent evaporation technique was used to perform the microencapsulation of the analytical standards and, subsequently, the pennyroyal extract. Although the yield of the extract microencapsulation varied between 64,3 and 75,2 %, the encapsulation efficiency that was obtained was low — around 3,1 % for the pulegone compound — so it can be concluded that the technique to be used should be further refined. However, the microencapsulation method allowed for the formation of extract microparticles with a spherical and regular morphology and a porous surface, which may influence the release kinetics of the compounds. The average particle size of the extract microparticles was 15,7 μm .

The potential use of the microparticles as a pesticide was based on a preliminary analysis of the aqueous release of the encapsulated compounds. The results were not very conclusive, so further research should be carried out in order to optimise the encapsulation technique and the release study.

Keywords: *Mentha pulegium* L. (pennyroyal), essential oils, extraction, gas chromatography, microencapsulation, controlled release.

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.

Maria Inês Silva do Amaral

(*Maria Inês Silva do Amaral*)

10 de fevereiro de 2020

Índice

1	Introdução	1
1.1	Enquadramento e Apresentação do Projeto.....	2
1.2	Organização da Tese	3
2	Contexto e Estado da Arte.....	5
2.1	Óleos Essenciais	5
2.1.1	Poejo (<i>Mentha pulegium</i> L.)	6
2.2	Pesticidas.....	9
2.2.1	Libertação controlada	11
2.3	Extração de Óleos Essenciais	13
2.3.1	Destilação e extração simultânea	14
2.4	Microencapsulação de Óleos Essenciais	15
2.4.1	Múltipla emulsão com evaporação do solvente	17
3	Materiais e Métodos	19
3.1	Materiais	19
3.1.1	Material vegetal e reagentes.....	19
3.1.2	Equipamento	20
3.2	Métodos	20
3.2.1	Preparação dos padrões analíticos	20
3.2.2	Procedimento de extração do óleo essencial	20
3.2.3	Análise quantitativa por cromatografia gasosa (CG-DIC).....	22
3.2.4	Microencapsulação	24
3.2.5	Rendimento de encapsulação das micropartículas	26
3.2.6	Eficiência de encapsulação das micropartículas	26
3.2.7	Morfologia das micropartículas.....	27
3.2.8	Distribuição de tamanho das micropartículas.....	27
3.2.9	Estudo de libertação dos compostos retidos nas micropartículas de extrato	27

3.2.10	Gestão de resíduos	28
4	Resultados e Discussão.....	29
4.1	Validação do método analítico (CG-DIC)	29
4.1.1	Identificação e quantificação dos compostos	29
4.2	Extração.....	32
4.2.1	Extração dos óleos essenciais de <i>Mentha pulegium</i> L.....	33
4.2.2	Análise dos extratos de <i>Mentha pulegium</i> L.	34
4.3	Microencapsulação.....	36
4.3.1	Rendimento de encapsulação das micropartículas	36
4.3.2	Eficiência de encapsulação das micropartículas.....	37
4.3.3	Morfologia das micropartículas.....	38
4.3.4	Distribuição de tamanho das micropartículas.....	39
4.4	Estudo de liberação dos compostos retidos nas micropartículas de extrato	41
5	Conclusões.....	43
6	Avaliação do trabalho realizado	45
6.1	Objetivos Realizados	45
6.2	Trabalho Futuro	45
6.3	Apreciação Final.....	45
Anexo A	– Padrões de calibração	51
Anexo B	– Parâmetros estatísticos	53
Anexo C	- Análise Cromatográfica dos extratos de <i>Mentha pulegium</i> L.	55
Anexo D	– Eficiência de Encapsulação	57
Anexo E	– Estudo de liberação	59

Lista de Figuras

<i>Figura 1. Perfil de liberação controlada de um biopesticida (Maes et al., 2019)</i>	<i>10</i>
<i>Figura 2. Esquema do equipamento utilizado na técnica DES (Chaintreau, 2001)</i>	<i>14</i>
<i>Figura 3. Esquema representativo de micropartículas do tipo microcápsula e microesfera</i>	<i>16</i>
<i>Figura 4. Extração do óleo essencial pela técnica DES.....</i>	<i>21</i>
<i>Figura 5. Programa de temperaturas utilizado na análise por CG-DIC.....</i>	<i>23</i>
<i>Figura 6. Esquema representativo do procedimento de múltipla emulsão.....</i>	<i>25</i>
<i>Figura 7. Esquema representativo do procedimento do estudo da liberação controlada.....</i>	<i>28</i>
<i>Figura 8. Retas de calibração dos compostos em estudo obtidas por injeção dos padrões de calibração no CG-DIC</i>	<i>30</i>
<i>Figura 9. Coeficientes de variação médios obtidos para os padrões P1, P4 e P7</i>	<i>32</i>
<i>Figura 10. Cromatograma com identificação dos compostos em estudo obtido após injeção do quarto extrato no CG-DIC</i>	<i>34</i>
<i>Figura 11. Valores percentuais dos compostos de interesse presentes no quarto extrato, obtidos por análise cromatográfica.....</i>	<i>35</i>
<i>Figura 12. Microfotografias das micropartículas do extrato (a) ampliação de 1500x, b) ampliação de 2000x e c) ampliação de 2000x)</i>	<i>38</i>
<i>Figura 13. Microfotografias das micropartículas dos compostos padrão (a) loading de 5% (m/m), ampliação de 10000x, b) loading de 10 % (m/m), ampliação de 10000x e c) loading de 10% (m/m), ampliação de 5000x).....</i>	<i>39</i>
<i>Figura 14. Distribuição de tamanho das micropartículas de extrato e dos compostos padrão com loading de 10 %</i>	<i>40</i>
<i>Figura 15. Percentagem de liberação do composto pulegona ao longo do estudo de liberação</i>	<i>41</i>

Lista de Tabelas

<i>Tabela 1. Propriedades físico-químicas de alguns compostos do óleo essencial de Mentha pulegium L.</i>	8
<i>Tabela 2. Estudos de liberação em microcápsulas de pesticidas</i>	12
<i>Tabela 3. Exemplos de materiais poliméricos utilizados como matriz de revestimento</i>	16
<i>Tabela 4. Padrões analíticos e reagentes utilizados no estudo do óleo essencial de Mentha pulegium L.</i>	19
<i>Tabela 5. Condições analíticas do CG-DIC</i>	23
<i>Tabela 6. Composição das formulações</i>	26
<i>Tabela 7. Tempo de retenção dos padrões analíticos</i>	29
<i>Tabela 8. Equações das retas de calibração e respectivos parâmetros estatísticos</i>	30
<i>Tabela 9. Gama de linearidade e limites de detecção e quantificação das retas dos compostos em estudo</i>	31
<i>Tabela 10. Massa de planta utilizada e massa de extrato obtido</i>	33
<i>Tabela 11. Resultados obtidos após análise dos extratos de Mentha pulegium L. no CG-DIC</i>	35
<i>Tabela 12. Rendimento da microencapsulação dos padrões para um loading de 5 % (m/m) e 10 % (m/m)</i>	36
<i>Tabela 13. Rendimento da microencapsulação dos extratos de Mentha pulegium L.</i>	37
<i>Tabela 14. Eficiência de encapsulação (EE) dos compostos nas diferentes micropartículas</i>	37
<i>Tabela 15. Dados obtidos para a distribuição de tamanho das micropartículas de extrato</i>	39
<i>Tabela 16. Dados obtidos para a distribuição de tamanho das micropartículas dos compostos padrão com um loading de 10 % (m/m) por granulometria a laser.</i>	40

Notação e Glossário

a	Declive da regressão	
b	Interseção da regressão	
C	Concentração	mg/L
C_{APV}	Concentração de álcool polivinílico	mg/L
$C_{padrão}$	Concentração do padrão	mg/L
$C_{polímero}$	Concentração de polímero	mg/L
C_{SM}	Concentração da solução mistura	mg/L
F	Formulação	
K_{oa}	Coeficiente de partição óleo em água	
L	Loading	% (m/m)
M_t	Quantidade de ingrediente ativo libertado no tempo t	
M_{∞}	Quantidade de ingrediente ativo encapsulado	
$m_{inicial}$	Massa de compostos adicionada inicialmente	mg
m_{MPs}	Massa de micropartículas recuperadas após liofilização	mg
$m_{polímero}$	Massa de polímero	mg
m_{retida}	Massa de compostos bioativos retidos nas micropartículas	mg
R	Coeficiente de correlação da regressão	
s_a	Desvio-padrão do declive da regressão	
s_b	Desvio-padrão da interseção da regressão	
S/N	Razão sinal-ruído	

Lista de Siglas

APA	Ácido polilático
APV	Álcool polivinílico
AUP	Água ultrapura
CG	Cromatografia Gasosa
CTL	Conteúdo teórico de <i>loading</i>
CV	Coeficiente de variação
DCM	Diclorometano
DES	Destilação e extração simultânea
DIC	Detetor de Ionização de Chama

EAU	Extração assistida por ultrassom
EC	Etilcelulose
EE	Eficiência de encapsulação
EFSC	Extração com fluido supercrítico
EMSS	Extração assistida por micro-ondas sem solvente
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MP	Micropartícula
PALG	Poli(ácido lático-co-glicólico)
PI	Padrão Interno
RA	Razão entre a área do pico e a área do padrão interno
RP	Rendimento do produto
ROA	Razão água-óleo-água
SM	Solução mistura

1 Introdução

O uso de pesticidas para a proteção de plantas e culturas agrícolas contra pragas tem-se tornado indispensável dadas as limitações de produtividade das colheitas e a escassez de recursos naturais. Contudo, a presença dos seus resíduos nos solos, nos cursos de água e nas colheitas resultantes do seu uso excessivo e da sua reduzida biodegradabilidade tem causado preocupações. A sua elevada toxicidade, o aparecimento de pestes resistentes e a ação em organismos não alvo constituem outras consequências do uso desenfreado destas substâncias. Neste sentido, os pesticidas convencionais têm vindo a ser considerados uma ameaça à saúde pública e aos ecossistemas. A crescente preocupação com os possíveis efeitos a longo prazo na saúde e no ambiente tem motivado o estudo de novas estratégias e alternativas — em particular, produtos de origem biológica mais ecológicos e sustentáveis (Ibrahim, 2019; Koul *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2019).

Muitas plantas, para além de serem uma fonte de alimento, sintetizam e acumulam metabolitos secundários biodegradáveis com grande interesse económico, como óleos essenciais, devido às diferentes atividades biológicas e propriedades físico-químicas que caracterizam os seus constituintes bioativos. A sua utilização em diversas indústrias — alimentar, cosméticos, perfumaria, farmacêutica, pesticidas — tem vindo a crescer significativamente nos últimos anos, reforçando o seu papel na melhoria da qualidade de vida e de bem-estar (Asbahani *et al.*, 2015; Răileanu *et al.*, 2013; Sangwan *et al.*, 2001).

Alguns óleos essenciais com propriedades características de pesticidas têm sido considerados como possíveis alternativas aos pesticidas convencionais. Embora a sua aplicação direta seja altamente condicionada pela sua instabilidade, volatilidade, potencial de toxicidade e pelas condições ambientais, uma possível solução para este problema passa pela sua incorporação em formulações com libertação controlada (Maes *et al.*, 2019).

Segundo a literatura, diferentes formulações de pesticidas têm vindo a ser desenvolvidas como alternativa aos pesticidas convencionais, prometendo uma maior eficácia, uma libertação mais controlada, uma redução nos impactos na saúde e no ambiente, e um aumento na produtividade e rendimento das colheitas (Ibrahim, 2019). Desta forma, novas formulações com base em óleos essenciais podem vir a representar uma nova categoria de biopesticidas.

1.1 Enquadramento e Apresentação do Projeto

O foco no aumento de produção e qualidade de produtos a nível agroindustrial e a procura por produtos naturais alternativos aos pesticidas sintéticos convencionais tem levado ao estudo de diferentes óleos essenciais com propriedades semelhantes. Algumas características destas substâncias permitem a sua utilização como material de defesa e de proteção de colheitas e, portanto, como possível alternativa aos pesticidas convencionais (Koul *et al.*, 2008; Sangwan *et al.*, 2001).

A planta aromática *Mentha pulegium* da família *Lamiaceae*, oriunda da América e predominante em múltiplas regiões do globo — Europa, Norte de África e Médio Oriente —, tem vindo a despertar interesse em diversas áreas. Mais comumente denominada de poejo, caracteriza-se pelo seu aroma a menta e cresce em locais húmidos perto de água (Domingues & Santos, 2019). Para além das suas propriedades antibacterianas, antioxidantes e antimicrobianas, apresenta propriedades aromáticas e odoríferas potencialmente interessantes para outras indústrias (Domingues & Santos, 2019; Khayyat & Roselin, 2018).

Embora o estudo de formulações de libertação controlada a partir da microencapsulação do óleo essencial de *M. pulegium* não tenha sido desenvolvido com muita profundidade, a sua encapsulação em células de levedura já foi estudada (Kavetsou *et al.*, 2019).

Este projeto teve como objetivo o desenvolvimento de uma formulação do óleo essencial de *Mentha pulegium* L. com propriedades características de pesticidas. Inicialmente, começou-se por extrair o óleo essencial da planta recorrendo ao método de destilação e extração simultânea (DES). Após a obtenção dos extratos, foi realizada a quantificação dos seus principais componentes recorrendo à técnica de cromatografia gasosa com detetor de ionização de chama (CG-DIC).

Através da técnica de microencapsulação, recorrendo ao método de múltipla emulsão com evaporação do solvente, o extrato foi encapsulado. A eficiência de microencapsulação, distribuição do tamanho de partículas e morfologia foram determinadas. Para se estudar a possível aplicação de micropartículas como biopesticida foi realizado um estudo preliminar de libertação controlada em água dos compostos encapsulados.

1.2 Organização da Tese

Este trabalho de dissertação encontra-se dividido em seis capítulos. No primeiro capítulo, correspondente à introdução, é apresentado, de uma forma geral, o problema atual em torno do uso de pesticidas sintéticos e a crescente procura por alternativas mais ecológicas. No segundo capítulo faz-se uma breve exposição do conceito e das propriedades dos óleos essenciais, pesticidas e da planta em estudo, bem como uma explicação mais detalhada da tecnologia de libertação controlada e dos métodos e técnicas utilizadas ao longo do projeto. No terceiro capítulo encontram-se descritos os materiais e equipamentos utilizados e os procedimentos e passos realizados. No quarto capítulo são apresentados e discutidos os resultados obtidos, e ainda analisados possíveis problemas e dificuldades observadas na execução do trabalho. No quinto capítulo encontram-se os principais resultados obtidos e as conclusões a retirar do projeto. Por fim, no sexto capítulo, faz-se uma avaliação do trabalho realizado, destacando os objetivos cumpridos, as limitações e os possíveis trabalhos futuros.

2 Contexto e Estado da Arte

2.1 Óleos Essenciais

Apesar de os óleos essenciais constituírem uma das classes de substâncias mais antigas, apenas nos últimos anos têm registado uma maior procura. Até à data, foram identificados 3000 óleos essenciais, sendo que cerca de 300 são utilizados na indústria da perfumaria, constituindo os componentes básicos da aromaterapia (Bhavaniramya *et al.*, 2019; Dima & Dima, 2015; Khayyat & Roselin, 2018).

Os óleos essenciais, também designados por óleos etéreos ou óleos voláteis, consistem em misturas de metabolitos secundários provenientes de plantas aromáticas. Encontram-se armazenados em glândulas secretoras presentes em diferentes órgãos das plantas, sendo protegidos de fatores externos, e são geralmente incolores e apresentam um odor característico. Apesar do seu papel biológico ainda não estar bem definido, auxiliam a planta no controlo e regulação do seu meio e assumem um papel como mecanismo de defesa e de comunicação (Asbahani *et al.*, 2015; Bhavaniramya *et al.*, 2019; Kavetsou *et al.*, 2019).

A sua baixa estabilidade é resultado de diferentes fatores internos e externos que levam à ocorrência de diferentes reações químicas. A presença de oxigénio durante o seu armazenamento pode levar à sua oxidação, e a exposição à luz pode provocar mudanças consideráveis na sua composição e estrutura (Asbahani *et al.*, 2015; Khayyat & Roselin, 2018). Para além disso, a sua volatilidade e sensibilidade à exposição solar e ao calor diminuem a sua eficácia, levando a problemas na sua formulação e armazenamento. Por esta razão, o combate à sua rápida degradação e o aumento do seu período de bioatividade têm vindo a ser estudados (Kavetsou *et al.*, 2019).

Apresentam uma natureza hidrofóbica e são considerados lipofílicos. A sua densidade é geralmente inferior à da água e são solúveis em diferentes solventes orgânicos, como álcool, éter e óleos não voláteis de origem vegetal ou animal. Devido à sua natureza hidrofóbica, os óleos essenciais desempenham um papel importante na atividade antimicrobiana. Deslocam-se ao longo dos lípidos das membranas das células de bactérias, rompendo as paredes celulares, o que causa a libertação de iões e outros materiais celulares, promovendo a lise celular. Alguns óleos essenciais são também caracterizados pelas suas propriedades antibacterianas, antioxidantes e biocidas (Asbahani *et al.*, 2015; Bhavaniramya *et al.*, 2019; Kumar *et al.*, 2019).

As propriedades e composição química destas substâncias dependem das condições de crescimento da planta, das práticas de colheita e do órgão da planta de onde são extraídas. Por esta razão, para plantas da mesma espécie, podem ser extraídos óleos essenciais com diferentes

quimiotipos, resultado da sua adaptação. A complexidade da sua composição química e a existência de diferentes quimiotipos permitem a aplicação dos óleos essenciais em diferentes áreas (Maes *et al.*, 2019; Manion & Widder, 2017).

São constituídos por uma mistura complexa de compostos voláteis, principalmente terpenos e terpenóides. Os terpenos dividem-se em monoterpenos, que representam mais de 80 % da composição dos óleos essenciais, e sesquiterpenos. Os terpenóides, também designados de isoprenóides, consistem em derivados oxigenados dos terpenos, como álcoois, aldeídos, cetonas, ácidos, fenóis, éteres e ésteres (Asbahani *et al.*, 2015; Bhavaniramy *et al.*, 2019). Os terpenos são os metabolitos secundários mais importantes dos produtos naturais e podem ser utilizados no combate a doenças ou como inseticidas. A principal estrutura dos terpenos é o isopreno, representado pela fórmula estrutural $(C_5H_8)_n$, onde n representa o número de unidades de isopreno ligadas. A classificação dos terpenos baseia-se no número de unidades de isopreno, sendo que os monoterpenos consistem em dois isoprenos e são representados pela fórmula molecular $C_{10}H_{16}$. Os sesquiterpenos contêm três unidades de isopropeno e são representados pela fórmula molecular $C_{15}H_{24}$ (Asbahani *et al.*, 2015; Khayyat & Roselin, 2018).

O desenvolvimento de novas aplicações de óleos essenciais depende essencialmente do seu quimiotipo e da sua composição química. A procura por produtos alternativos mais naturais e sem a adição de qualquer tipo de aditivo ou conservante tem levado à investigação de novos compostos ativos com propriedades antimicrobianas e antioxidantes de fontes naturais. Segundo a literatura, diferentes óleos essenciais provenientes de plantas de famílias como *Asteraceae*, *Myrtaceae*, *Apiaceae*, *Lamiaceae* e *Rutaceae* são eficazes no combate a pestes (Ibrahim, 2019). Neste projeto foi realizado o estudo da possível aplicação dos extratos da planta *Mentha pulegium* L. como pesticida. Para isso, os extratos foram encapsulados e realizou-se um estudo de libertação controlada em água dos compostos retidos.

2.1.1 Poejo (*Mentha pulegium* L.)

Estudos realizados sobre plantas do género *Mentha*, incluindo a espécie *Mentha pulegium* L., demonstraram a sua atividade inseticida e repelente contra diferentes pestes alimentares (Heydarzade *et al.*, 2019). Comparativamente a outros óleos essenciais, o óleo de *M. pulegium* apresenta um espectro de atividade biocida mais largo, sendo capaz de atuar sobre uma maior variedade de espécies (M. Domingues & Santos, 2019).

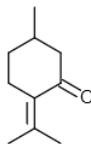
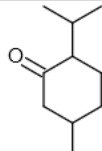
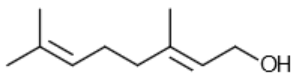
Tradicionalmente, partes da planta poejo e o seu óleo essencial têm sido utilizados em medicina, cosmética, aromaterapia e gastronomia, dadas as suas propriedades antissépticas,

antioxidantes, anti-inflamatórias, antimicrobianas, analgésicas e pesticidas. O seu aroma característico possibilita a sua utilização na indústria alimentar e de bebidas, e a sua fragância em áreas como as terapias alternativas (M. Domingues & Santos, 2019; Teixeira *et al.*, 2012).

A região de cultivo da planta e as suas condições influenciam os tipos de constituintes presentes no óleo essencial. A planta de poejo é cultivada essencialmente como planta de condimento e as suas folhas são ricas em mentol aromático (Abdelli *et al.*, 2016). As suas propriedades antibacterianas, antioxidantes e antimicrobianas resultam da presença de vários monoterpenos oxigenados, como a pulegona e a mentona, na sua composição (Ahmed *et al.*, 2018; Kavetsou *et al.*, 2019).

De acordo com a literatura, através de análises cromatográficas do óleo essencial, foram detetados 22 componentes para esta espécie, que totalizam cerca de 98,88 % do óleo. Sendo constituído principalmente por cetonas como a pulegona e a mentona, apresenta uma composição relativamente simples (Sarikurkcü *et al.*, 2012). Por outro lado, compostos como geraniol, piperitona, mentol, óxido de piperitona, entre outros, encontram-se em menor quantidade. Três tipos de quimiotipos foram estabelecidos para este óleo essencial — pulegona, piperitenona/piperitona e isomentona/neoisomentol —, sendo o primeiro o mais abundante (Domingues & Santos, 2019). Na Tabela 1 encontram-se descritas algumas propriedades físico-químicas dos principais compostos presentes no óleo essencial do poejo estudados neste projeto.

Tabela 1. Propriedades físico-químicas de alguns compostos do óleo essencial de *Mentha pulegium* L.

Composto Número CAS Fórmula Química	Estrutura Química	Massa Molar (g/mol)	Ponto de ebulição (°C)	Ponto de fusão (°C)	Log Koa	Solubilidade em água a 25 °C (mg/L)	Solubilidade em solventes orgânicos	Pressão de vapor a 25 °C (mmHg)
Pulegona 89-82-7 $C_{10}H_{16}O$		152,23	224	<25	3,08	276	Miscível com álcool, éter etílico, clorofórmio	0,123
Mentona 14073-97-3 $C_{10}H_{18}O$		154,25	207	-6,0	3,05	688	Solúvel em éter etílico, acetona, ácido acético e ligeiramente em água	0,28
Geraniol 106-24-1 $C_{10}H_{18}O$		154,25	228	-15	3,56	100	Solúvel em etanol, éter etílico, acetona, clorofórmio	0,03

2.2 Pesticidas

Os pesticidas são constituídos por substâncias capazes de erradicar e repelir pragas e desempenham um papel importante na produtividade das colheitas. De origem sintética ou natural, podem ser classificados com base no organismo alvo — inseticidas, herbicidas, fungicidas, entre outros —, na sua função — desfoliantes, desseccantes, fumegantes e reguladores de crescimento — ou no seu modo de ação (Singh *et al.*, 2019).

A preocupação com o uso excessivo de pesticidas sintéticos, os seus problemas associados e as possíveis consequências a longo prazo têm levado à procura de novas alternativas mais ecológicas. De forma a reduzir a dosagem de ingredientes ativos e a perda de pesticidas por lixiviação, volatilização e degradação, têm surgido novas formulações de pesticidas. A produção destas novas formulações é complexa, sendo necessário estudar o seu desenvolvimento, formas de armazenamento e a sua interação com as plantas, animais, solo, ar e água, podendo ser classificadas como soluções aquosas, concentrados, pós molháveis, de libertação controlada, entre outros. A sua formulação como sistemas líquidos, sólidos ou como sistemas de libertação controlada depende das suas propriedades físico-químicas e biológicas, do seu modo de ação, do tipo de colheita, do tipo de aplicação e da sua toxicidade em mamíferos. Considerações a nível económico, segurança e eficácia também devem ser analisadas (Markus, 2006; Moretti *et al.*, 2002; Sopeña *et al.*, 2009)

Nos pesticidas convencionais a concentração aplicada inicialmente é muito elevada, possivelmente tóxica, decrescendo rapidamente para níveis baixos e ineficientes, o que implica uma reaplicação frequente. (Roy *et al.*, 2014; Sopeña *et al.*, 2009). Através do desenvolvimento de formulações de pesticidas é possível controlar a eficácia e o modo de aplicação, bem como prolongar o efeito do ingrediente ativo no ambiente (Kumar *et al.*, 2019). O perfil de libertação destas formulações é lento, sendo que pequenas quantidades de pesticida são utilizadas de forma mais eficaz durante um determinado intervalo de tempo. Deste modo, a probabilidade de degradação, lixiviação ou evaporação no ambiente do ingrediente ativo — alguns dos principais obstáculos observados nos pesticidas convencionais — diminui (Markus, 2006).

Para além dos pesticidas de origem natural já desenvolvidos, o estudo da aplicação de óleos essenciais como pesticidas biológicos na procura de alternativas mais seletivas, eficazes e menos prejudiciais para o ambiente tem vindo a ser desenvolvido. Estes compostos bioativos são capazes de atuar como reguladores de crescimento e como repelentes e, dada a sua composição complexa, o desenvolvimento de resistência a estas substâncias será difícil. Apesar dos estudos já realizados, são poucos os produtos presentes no mercado para controlo de pragas baseados em óleos essenciais.

Devido à sua volatilidade, os óleos essenciais apresentam uma fraca persistência, sendo necessário reaplicação frequente (Koul *et al.*, 2008). A sua incorporação em formulações pode vir a solucionar problemas associados à sua volatilidade, baixa solubilidade e instabilidade (Domingues & Santos, 2019)

Reduzir a concentração do ingrediente ativo é imperativo para se ultrapassar a toxicidade em organismos não alvo e o risco de contaminações (Kumar *et al.*, 2019). Com o objetivo de diminuir a sua dosagem, mas aumentar a sua eficácia e modo de ação, surge a técnica de microencapsulação, que permite controlar a cinética de liberação do ingrediente ativo e múltiplas propriedades — seletividade, estabilidade, solubilidade e permeabilidade. Para além disso, diminui a degradação dos ingredientes ativos na presença de condições ambientais menos favoráveis. Comparativamente aos pesticidas convencionais, estas formulações apresentam uma maior eficácia contra os organismos alvo e uma menor necessidade de reaplicação (Ibrahim, 2019; Kumar *et al.*, 2019).

Uma vez que os óleos essenciais são misturas complexas de compostos, cada um com as suas características, é necessário controlar o perfil de liberação destas formulações. A liberação deve ser lenta, controlada, contínua e deve ter em atenção o limiar ideal no ambiente. Depende das propriedades e características físico-químicas do polímero e do ingrediente ativo, bem como das condições do meio de liberação. A taxa mínima de liberação deve ser determinada pela eficiência do ingrediente ativo, enquanto que a máxima pela sua escala de toxicidade. Inicialmente, a liberação é rápida até atingir uma concentração entre os valores de eficiência do ingrediente ativo e a sua toxicidade, seguindo-se uma liberação constante e prolongada (Figura 1). A sua liberação pode ocorrer por difusão simples, erosão da matriz ou por ação de fatores externos (Maes *et al.*, 2019).

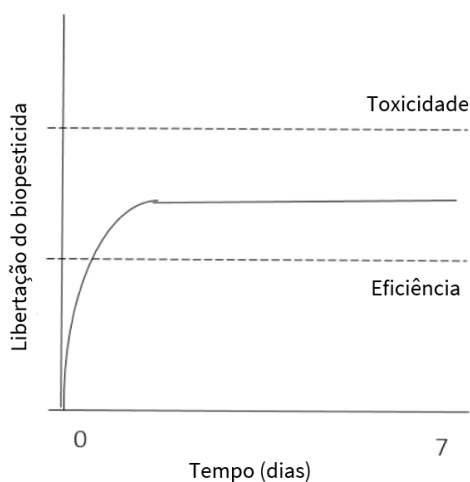


Figura 1. Perfil de liberação controlada de um biopesticida (Maes *et al.*, 2019)

Antes de qualquer aplicação, devem ser realizados estudos que avaliem o impacto dos óleos essenciais e das matrizes em organismos não alvo, a acumulação de produtos indesejados, a

decomposição dos produtos e a persistência no ambiente (Maes *et al.*, 2019). Os custos associados às avaliações toxicológicas e ambientais, a disponibilidade limitada de material vegetal, a dificuldade na padronização dos produtos devido aos diferentes quimiotipos e a aprovação regulatória representam alguns dos obstáculos ao desenvolvimento destas novas formulações (Koul *et al.*, 2008).

2.2.1 Liberação controlada

A percentagem de pesticida aplicado que acaba por atingir as pragas alvo é bastante reduzida — dado que grande parte é perdida por volatilização e lixiviação — pelo que a tecnologia de liberação controlada veio revolucionar esta indústria. Inicialmente desenvolvida pela indústria farmacêutica, apenas mais tarde foi descoberta pela indústria dos pesticidas com o objetivo de melhorar a proteção das colheitas e, ao mesmo tempo, diminuir a quantidade de ingrediente ativo e o número de aplicações (Muro-Suñé *et al.*, 2005).

Nos sistemas de liberação controlada, um ingrediente ativo é encapsulado ou incorporado dentro de uma membrana polimérica, pelo que a sua solubilidade no polímero e difusividade pela membrana são parâmetros importantes (Muro-Suñé *et al.*, 2005). A liberação controlada consiste na transferência do ingrediente ativo desde um reservatório até uma superfície alvo, a um determinado nível de concentração, durante um determinado período. A sua eficácia é observada pela repelência de organismos ou através de mecanismos de intoxicação crónica. Para este efeito, as formulações devem permitir a liberação de uma dosagem adequada para o controlo de pragas durante um período efetivo (Cardarelli, 1976).

O transporte do ingrediente ativo desde a sua posição inicial até ao exterior da matriz e a sua liberação controlada para o meio ambiente são resultado de diferentes mecanismos de transporte. A liberação pode ocorrer através da difusão do pesticida pelos poros ocupados por água, como resultado da pressão osmótica, como resposta a estímulos ou como consequência da degradação ou erosão do polímero (Singh *et al.*, 2019). Pode, também, ser estudada através da análise da atividade biológica da microcápsula, pela observação do efeito no crescimento de bactérias, ou através da quantificação por cromatografia gasosa do ingrediente ativo libertado durante um determinado período. A análise da atividade biológica pode ser realizada em espaço aberto ou fechado, sendo que em espaço aberto é possível observar a eficácia em condições reais. Por outro lado, fatores como temperatura, humidade, pH e concentração de compostos podem afetar os resultados obtidos, condicionando a comparação entre diferentes estudos de liberação (Maes *et al.*, 2019).

A liberação do pesticida por difusão depende da espessura e estrutura porosa da matriz de revestimento, da solubilidade em água e das condições ambiente. No caso de sistemas esféricos, o

ingrediente ativo encontra-se distribuído uniformemente e começa por ser libertado em grande quantidade, seguido de uma diminuição na taxa de libertação devido ao aumento da distância a percorrer até à superfície (Markus, 2006). Assim, em formulações de pesticidas com matrizes poliméricas, os primeiros 60 % do perfil de libertação do ingrediente podem ser explicados pelo modelo de Ritger-Peppas, baseado na Lei da Potência através da equação

$$\frac{M_t}{M_\infty} = Kt^n \quad (1.1)$$

onde M_t corresponde à quantidade de ingrediente ativo libertado no tempo t , M_∞ corresponde à quantidade de ingrediente ativo encapsulado, K é uma constante que incorpora características estruturais e geométricas do sistema e n corresponde ao expoente de libertação indicativo do mecanismo de libertação. No caso de sistemas esféricos controlados por intumescimento, para $n = 0,43$ o sistema segue o mecanismo de difusão Fickiano, para $0,43 < n < 0,85$ segue um transporte anómalo não-Fickiano e para $n = 0,85$ segue um transporte caso II. Para sistemas esféricos não controlados por intumescimento, para $n = 0,43$ o sistema segue o mecanismo de difusão Fickiano, para $0,43 < n < 1$ segue um transporte anómalo não-Fickiano e para $n = 1$ segue uma cinética de ordem zero (Ritger & Peppas, 1987a, 1987b; Sittipummongkol & Pechyen, 2018). Na Tabela 2 estão descritos alguns estudos de libertação de pesticidas ou óleos essenciais com características de pesticidas incorporados em microcápsulas.

Tabela 2. Estudos de libertação em microcápsulas de pesticidas

Ingrediente ativo	Matriz de revestimento	Meio de libertação	Referências
Óleo de <i>Neem</i>	Álcool polivinílico, goma arábica, proteína do soro do leite/maltodextrina	Saco de diálise; amostra imersa numa solução de 0,1 % <i>Tween</i> 80 em água desionizada	(Sittipummongkol & Pechyen, 2018)
Alacloro	Etilcelulose	Água desionizada a 25 °C com agitação a 50 rpm	(Sopeña <i>et al.</i> , 2007)
Metomil	Carboximetilquitosana	Saco de diálise; solução tampão fosfato	(Sun <i>et al.</i> , 2014)
<i>Norflurazon</i>	Etilcelulose	Água desionizada a 25 °C com agitação a 50 rpm	(Pérez-Martínez <i>et al.</i> , 2001)
Benzoato de etilo	Etilcelulose, acetato butirato de celulose	Água desionizada a 25 °C e pH 5,5 a 300 rpm	(El Bahri & Taverdet, 2007)
Atrazina	Etilcelulose	Água a 25 °C com agitação a 120 rpm	(Cea <i>et al.</i> , 2010)

2.3 Extração de Óleos Essenciais

Os óleos essenciais são geralmente isolados de uma fase aquosa através de processos físicos, não ocorrendo qualquer alteração significativa na sua composição química. Para a sua extração podem ser utilizadas técnicas com base na solubilidade ou na volatilidade dos compostos. Nas técnicas onde se considera a solubilidade, como extração por Soxhlet, extração líquido-líquido, extração com fluido supercrítico e extração em fase sólida, existe um contacto direto entre a amostra e o solvente/adsorvente, podendo ocorrer a co-extração de compostos pesados. Nas técnicas envolvendo a volatilidade dos compostos, como destilação a vapor e por *headspace*, por vezes são obtidos grandes volumes de água com baixa concentração de voláteis ou apenas a fração mais volátil. Técnicas como a destilação e extração simultânea (DES) baseiam-se tanto na solubilidade como na volatilidade dos compostos (Chaintreau, 2001).

A extração de óleos essenciais de plantas pode ser realizada recorrendo a métodos mais clássicos e convencionais ou através de métodos mais inovadores e eficientes. Para a escolha do método de extração mais adequado é necessário ter em atenção a natureza hidrofóbica e volátil dos compostos a extrair (Asbahani *et al.*, 2015). Entre os métodos clássicos, encontram-se os métodos mais simples e antigos como hidrodestilação, destilação a vapor, extração por solvente, *enfleurage*, prensagem a frio, entre outros (Dima & Dima, 2015; Khayyat & Roselin, 2018). Apesar da sua simplicidade, apresentam algumas desvantagens — longo tempo de extração, possíveis perdas ou alterações químicas das moléculas terpénicas devido ao contacto prolongado com água quente, co-extração de matéria não volátil, e sobreaquecimento com perda de moléculas polares na remoção de água. Contudo, a nível industrial, ainda são muito utilizados devido à simplicidade das instalações, à facilidade de implementação do método e à sua seletividade (Asbahani *et al.*, 2015).

Com a necessidade de obter extratos de melhor qualidade, reduzir o consumo de energia e o número de unidades de operação, e diminuir a emissão de CO₂ e formação de co-extratos indesejáveis, surgiram métodos mais inovadores, de onde se destacam a extração com fluido supercrítico (EFSC), extração assistida por ultrassom (EAU), extração assistida por micro-ondas sem solvente (EMSS), entre outros (Dima & Dima, 2015; Khayyat & Roselin, 2018).

Para a extração dos óleos essenciais de *Mentha pulegium* L., a hidrodestilação em aparelho de Clevenger continua a ser o método mais utilizado. No entanto, métodos como destilação e extração simultânea, destilação a vapor e hidrodestilação assistida por micro-ondas também são utilizados (Domingues & Santos, 2019). Neste estudo, para a extração do óleo essencial da espécie *Mentha pulegium* L. foi utilizada a técnica de destilação e extração simultânea, motivado pela disponibilidade

do equipamento, pelo facto de o método não ter sido estudado a nível prático no decorrer do curso e, também, dadas as vantagens proporcionadas relativamente a outros métodos.

2.3.1 Destilação e extração simultânea

A técnica de destilação e extração simultânea (DES) surgiu com base na solubilidade e volatilidade de compostos. Em 1964, Likens e Nickerson criaram um aparelho, esquematizado na Figura 2, capaz de concentrar e isolar os compostos de uma amostra num único passo, diminuindo o tempo de operação e o volume de líquidos devido à sua reciclagem contínua (Chaintreau, 2001; Likens & Nickerson, 1964; S. Teixeira *et al.*, 2007). Este sistema fechado impede a perda de compostos voláteis e permite a obtenção de altos rendimentos sem que ocorra qualquer degradação da amostra (Pollien & Chaintreau, 1997).

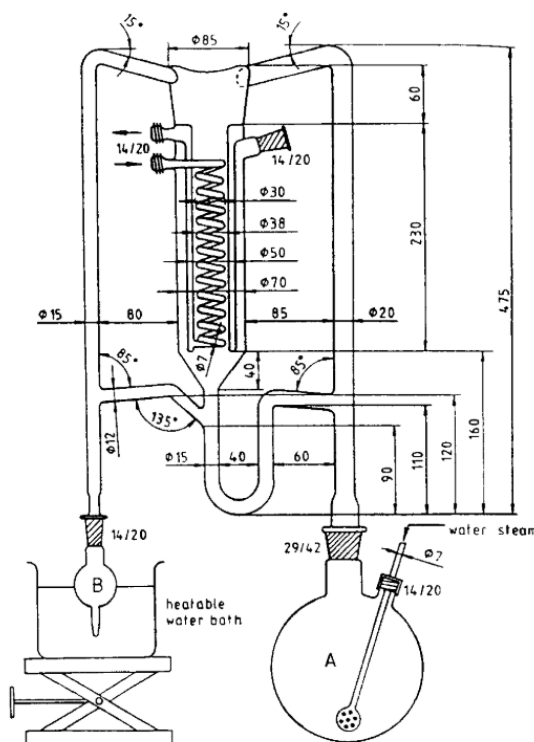


Figura 2. Esquema do equipamento utilizado na técnica DES (Chaintreau, 2001)

A técnica DES combina a destilação a vapor com a extração líquido-líquido contínua utilizando um solvente imiscível em água. Baseia-se nas diferenças de volatilidade e polaridade dos componentes presentes na matriz, e pode ser realizada em condições de pressão atmosférica e à temperatura ambiente. A escolha do solvente e tempo de extração influenciam a seletividade da técnica e os compostos extraídos, embora as temperaturas elevadas e o longo tempo de extração possam levar à perda de compostos de menor peso molecular. Por esta razão, apenas são extraídos

compostos com maior peso molecular e baixa volatilidade (Chaintreau, 2001; Pollien & Chaintreau, 1997).

O processo de destilação, no qual os compostos voláteis ascendem por um dos braços do aparelho, tem início quando a fase aquosa, onde se encontra a amostra, começa a entrar em ebulição. Simultaneamente, a destilação da fase orgânica, onde se encontra o solvente de extração, tem início e os seus vapores ascendem pelo outro braço. Os vapores das duas fases condensam quando atingem uma região arrefecida e o processo de extração inicia-se entre os dois filmes líquidos na superfície do condensador. As fases aquosa e orgânica são recolhidas e separadas facilmente por decantação devido à imiscibilidade dos óleos essenciais com a água, voltando aos balões respetivos (Chaintreau, 2001).

Apesar de todas as técnicas desenvolvidas até à data, segundo Chaintreau, a técnica de destilação e extração simultânea continua a ser a mais eficiente na recuperação de compostos voláteis de uma matriz (Chaintreau, 2001).

2.4 Microencapsulação de Óleos Essenciais

Na técnica de microencapsulação, o ingrediente ativo é envolvido e retido no interior de uma matriz de revestimento, melhorando a sua eficácia e estabilidade, aumentando o seu tempo de retenção e permitindo o controlo da sua libertação (Ibrahim, 2019; Maes *et al.*, 2019). A encapsulação impede a evaporação ou degradação dos compostos em situações favoráveis a oxidação e volatilização, aumenta a durabilidade de um determinado produto e facilita o seu manuseio, possibilitando a sua aplicação em várias indústrias (Domingues & Santos, 2019; Kumar *et al.*, 2019).

Em muitas situações, a configuração sólida de óleos essenciais é mais conveniente, pelo que a sua incorporação em microcápsulas pode ser vista como uma solução. Apesar das possíveis perdas de compostos durante a sua encapsulação, esta técnica permite a proteção dos óleos essenciais contra fatores externos que comprometem a sua atividade biológica e melhora a eficácia, segurança e conveniência do produto (Asbahani *et al.*, 2015; Martins *et al.*, 2014; Răileanu *et al.*, 2013).

As micropartículas podem ser consideradas microcápsulas ou microesferas (Figura 3). Uma microcápsula divide-se essencialmente num núcleo, onde se encontra o ingrediente ativo, e numa matriz de revestimento que atua como parede de proteção ao meio exterior. As microesferas são descritas como um sistema matriz, onde o ingrediente ativo se encontra disperso e/ou dissolvido na matriz (Martins *et al.*, 2014).

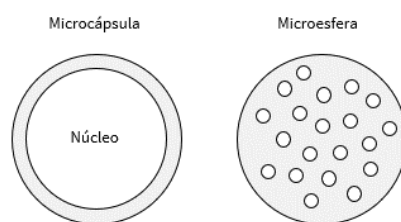


Figura 3. Esquema representativo de micropartículas do tipo microcápsula e microesfera

A matriz de revestimento utilizada depende das propriedades do ingrediente ativo e das características e aplicação final das micropartículas. A matriz deve proteger o ingrediente ativo das condições ambientais adversas e controlar o seu mecanismo de liberação para o meio exterior. Deve ainda ser resistente, estável, permeável e os produtos da sua degradação devem ser biodegradáveis (Sopeña *et al.*, 2009).

Os materiais poliméricos são os mais utilizados na encapsulação de óleos essenciais e podem ser de origem natural, semi-sintéticos ou sintéticos (Tabela 3) (Kumar *et al.*, 2019; Maes *et al.*, 2019; Singh *et al.*, 2019; Sopeña *et al.*, 2009).

A seleção do polímero mais adequado é um processo complexo e demorado. Neste projeto utilizou-se a etilcelulose como matriz de revestimento — um polímero hidrofóbico, não-intumesciente e solúvel em solventes orgânicos como acetona, isopropanol, etanol e diclorometano. Apesar de não ser biodegradável, é biocompatível, não-tóxico e não-irritante, sendo que a sua porosidade e compacidade desempenham um papel importante na liberação de compostos (Murtaza, 2012). Tem sido utilizada na preparação de formulações de diferentes herbicidas pela técnica de microencapsulação, dada a sua estabilidade em contacto com oxigénio, calor e luz (Paulo & Santos, 2018; Sopeña *et al.*, 2007).

Tabela 3. Exemplos de materiais poliméricos utilizados como matriz de revestimento

Naturais	Amido, polissacarídeos (celulose, quitosano, alginato, quitina, dextrano), proteínas (caseína, gelatina, albumina), materiais lipofílicos (borrachas e ceras), goma arábica, goma xantana, ciclodextrina
Sintéticos	Álcool polivinílico, polilactato, poliaminas, ácidos do tipo poliamida, poliácridamido, ácido polilático (APA), copolímeros de ácidos lácticos e glicólicos, poli(ácido láctico-co-glicólico) (PALG)
Semi-sintéticos	Etilcelulose, acetato butirato, hidroxipropilcelulose, polihidroxibutirato

A técnica de microencapsulação pode ser realizada recorrendo a processos químicos ou físicos (físico-químicos ou físico-mecânicos), dependendo da aplicação final das micropartículas, das propriedades físico-químicas do ingrediente ativo e do material de revestimento, e das condições de

encapsulação e de armazenamento. De entre as diferentes técnicas — emulsificação com evaporação de solvente, cristalização, polimerização, nanoprecipitação, coacervação, *spray-drying*, entre outros —, o método de coacervação é o mais utilizado na encapsulação de óleos essenciais (Martins *et al.*, 2014; Mishra, 2016; Singh *et al.*, 2019).

Relativamente à aplicação da técnica de microencapsulação para o desenvolvimento de pesticidas biológicos, têm vindo a ser desenvolvidos diferentes micro emulsões de óleo em água como sistemas de distribuição de pesticidas, de maneira a reduzir o uso de solventes orgânicos e a dosagem de ingrediente ativo (Koul *et al.*, 2008). As micropartículas dos compostos voláteis presentes nos extratos de *Mentha pulegium* L. foram preparadas utilizando a técnica de múltipla emulsão com evaporação de solvente, que surgiu como uma oportunidade de aprender uma nova técnica pouco explorada ao longo do curso.

2.4.1 Múltipla emulsão com evaporação do solvente

Uma emulsão consiste num sistema instável composto por duas ou mais fases líquidas imiscíveis, que se dispersam entre si. A estabilidade do sistema depende de forças físicas e interações químicas e pode ser melhorada através do aumento de repulsão entre a fase dispersa e a fase dispersante (Ben Jemaa *et al.*, 2016). As forças físicas reduzem o tamanho das gotículas da fase dispersa, enquanto que as interações químicas entre os diferentes compostos do meio interferem de forma a impedir a coalescência das partículas. A adição de um surfactante diminui a tensão superficial entre duas fases imiscíveis e, conseqüentemente, aumenta a sua estabilidade. A emulsificação física é um dos passos mais cruciais no processo de microencapsulação, uma vez que afeta a qualidade da emulsão final (Ben Jemaa *et al.*, 2016).

Uma emulsão com duas fases pode ser considerada óleo em água ou água em óleo. Quando o óleo se encontra disperso na fase aquosa, a emulsão é considerada óleo em água (o/w), sendo considerada água em óleo (w/o) caso o contrário se aplique. O interesse nas múltiplas emulsões tem vindo a aumentar, sendo que emulsões w/o ou o/w são dispersas noutra líquido imiscível. Embora as múltiplas emulsões melhorem o transporte e a proteção de ingredientes bioativos hidrofílicos e hidrofóbicos, apresentam algumas limitações devido à sua estrutura complexa e instabilidade termodinâmica (Ben Jemaa *et al.*, 2016). Em emulsões água em óleo em água (w/o/w), o ingrediente ativo é dissolvido na fase aquosa interna e, de seguida, disperso na fase orgânica onde se encontra o material de revestimento, formando uma primeira emulsão. A primeira emulsão é novamente emulsificada numa fase aquosa externa contendo um surfactante hidrofílico, formando uma segunda emulsão. Após evaporação do solvente, as micropartículas estão formadas (Paulo & Santos, 2018).

3 Materiais e Métodos

3.1 Materiais

3.1.1 Material vegetal e reagentes

Todas as plantas utilizadas na extração foram obtidas do viveiro de plantas Horto da Boavista, localizado na cidade do Porto, tendo sido recolhidas apenas as partes aéreas frescas e em bom estado.

Na Tabela 4 encontram-se descritos os padrões analíticos e solventes utilizados no estudo da composição do extrato da planta *Mentha pulegium* L. O geraniol, apesar de ser um dos compostos minoritários, foi utilizado no projeto devido à sua disponibilidade no laboratório. A escolha dos solventes utilizados foi feita de acordo com métodos descritos na literatura e informação relativa aos padrões.

Tabela 4. Padrões analíticos e reagentes utilizados no estudo do óleo essencial de *Mentha pulegium* L.

	Massa molar (g/mol)	Grau de pureza (%)	Marca	Função
Pulegona	152,23	97,0	Sigma Aldrich	Padrão analítico
Mentona	154,25	97,0	Sigma Aldrich	Padrão analítico
Geraniol	154,25	98,0	Sigma Aldrich	Padrão analítico
Éter etílico	74,12	100	Macron	Solvente de extração
n-Hexano	86,18	95,0	VWR	Solvente de análise
Sulfato de magnésio anidro	120,37	96,0	Panreac	Agente exsicante
Dodecano	170,33	99,0	Sigma Aldrich	Padrão interno

Para a técnica de microencapsulação, o álcool polivinílico (Ref: P8136-250G, hidrolisado 87-90 %, peso molecular médio de 30,000-70,000, CAS 9002-89-5) e a etilcelulose (Ref. 433837-250G, viscosidade de 46 cP, CAS 9004-57-3) foram adquiridos de Sigma Aldrich Chemical (St. Louis, MO, EUA). O diclorometano (Ref. ACRO433991000, CH₂Cl₂, CAS 1665-00-5), usado como solvente para a etilcelulose, foi adquirido de VWR International (Fontenay-sous-Bois, França). A água utilizada foi desionizada e destilada usando um sistema de purificação de água Millipore™ (Massachusetts, EUA) com 18.2 Ω de resistência elétrica.

3.1.2 Equipamento

Para a obtenção de extratos da planta *Mentha pulegium* L. recorreu-se à técnica DES com o auxílio de um banho de refrigeração Thermo Scientific™ A25, seguida de evaporação do solvente de extração num evaporador rotativo Büchi R-200.

A análise cromatográfica dos padrões analíticos e dos extratos obtidos foi realizada num cromatógrafo gasoso CG – 2010 SHIMADZU com uma coluna BR-1MS (15 m × 0,25 mm × 0,25 µm de filme) e detetor de ionização de chama (DIC).

As pesagens foram realizadas numa balança analítica Mettler Toledo AG245 (Columbus, OH, EUA). Para a microencapsulação, usou-se um banho ultrasónico (P Selecta, Barcelona, Espanha), um agitador *vortex* (IKA VORTEX GENIUS 3, Staufen, Alemanha), um homogeneizador de alta performance (IKA T18 Digital ULTRA-TURRAX®, Staufen, Alemanha), uma placa de agitação (AREX Digital, VELP Scientifica, Monza, Itália) e um liofilizador (SP Scientific, NY, EUA) foram utilizados.

A morfologia das micropartículas foi analisada recorrendo a um microscópio eletrónico de varrimento PHENOM XL (Eindhoven, Países Baixos). A distribuição de tamanho das micropartículas foi avaliada recorrendo a granulometria de laser utilizando o equipamento Coulter Counter-LS 230 Particle Size Analyzer (Miami, FL, EUA).

3.2 Métodos

3.2.1 Preparação dos padrões analíticos

Para a preparação das soluções individuais dos padrões analíticos começou-se por pipetar cerca de 125 gramas de cada um dos padrões comerciais para balões volumétricos individuais de 25 mL e perfez-se o volume com n-hexano. A partir das soluções individuais dos três compostos, preparou-se uma solução mistura com uma concentração de 100 mg/L em n-hexano de todos os padrões (MIX 100 mg/L) num balão volumétrico de 10 mL. Partindo de uma solução de dodecano ($\rho = 750 \text{ kg/m}^3$) com 99,0 % de pureza, foi preparada uma solução com uma concentração de 12 g/L. A partir de uma diluição, preparou-se uma solução de concentração 100 mg/L num balão de 10 mL. As soluções foram seladas com *parafilm*, protegidas e refrigeradas.

3.2.2 Procedimento de extração do óleo essencial

A extração do óleo essencial da planta *Mentha pulegium* L. foi realizada pela técnica DES, representada na Figura 4. O tempo de extração de 60 minutos e o solvente de extração éter etílico

foram definidos através de ensaios preliminares onde foram otimizadas as condições de extração para esta espécie.



Figura 4. Extração do óleo essencial pela técnica DES

Em todas as extrações, apenas foram utilizadas as partes aéreas da planta. As duas primeiras extrações foram realizadas a partir da mesma planta, embora a amostra utilizada na segunda fosse majoritariamente composta por caule. As amostras foram cortadas em pedaços mais pequenos, com o auxílio de uma tesoura, antes de serem adicionadas ao balão com água destilada.

Para as duas últimas extrações foram recolhidas amostras a partir de outras duas plantas. Uma das extrações foi realizada no dia de preparação da amostra, enquanto que a outra foi realizada no dia seguinte, após conservação no frio. Ambas as amostras foram trituradas em água destilada, ainda que a amostra da penúltima extração tenha sido sujeita a uma maior trituração.

Inicialmente pesaram-se as partes aéreas das plantas. As amostras foram cortadas e/ou trituradas e introduzidas num balão de fundo redondo de 500 mL com cerca de 250 mL de água destilada (fase aquosa). O balão da fase aquosa foi ligado a um dos braços do aparelho e, em seguida, foi ligada a manta de aquecimento. Adicionou-se cerca de 50 mL de éter etílico a um balão de fundo redondo de 100 mL (fase orgânica) e, posteriormente, ligou-se o balão ao outro braço do aparelho. A manta de aquecimento do balão da fase orgânica ligou-se momentos antes da fase aquosa entrar em ebulição. As mantas de aquecimento da fase aquosa e da fase orgânica foram mantidas a temperaturas constantes que favorecessem a extração. Para evitar variações de temperatura durante o tempo extração, os braços do condensador foram isolados. O sistema de condensação foi ligado a um banho de água refrigerada a 5 °C.

Com o processo de destilação da fase aquosa, os compostos voláteis da fase aquosa começaram por atravessar um dos braços do aparelho. Os vapores do solvente de extração atravessaram o outro braço até à parte superior do aparelho e, no condensador, deu-se a extração dos compostos voláteis pelo solvente. Abaixo do condensador, na zona de separação, começou-se por observar o condensado da fase aquosa, sem nunca ultrapassar a marca de referência. Após o início da condensação do solvente de extração, observou-se a formação de duas fases.

Passados os 60 minutos, desligaram-se as mantas de aquecimento e deixaram-se arrefecer os dois balões, sendo a fase orgânica presente na zona de separação recuperada para o balão da fase orgânica. Adicionou-se sulfato de magnésio anidro à fase orgânica, de forma a remover quaisquer vestígios de água, e realizou-se a filtração da fase orgânica por gravidade na *hotte*. De seguida, o solvente de extração foi removido por evaporação, num evaporador rotativo, com um banho a 40 °C. O extrato obtido foi transferido para um frasco de vidro, selado com *parafilm* e refrigerado.

3.2.3 Análise quantitativa por cromatografia gasosa (CG-DIC)

A análise quantitativa dos padrões analíticos e dos extratos obtidos pela técnica DES foi realizada por cromatografia gasosa com detetor de ionização de chama (CG-DIC). O tempo de retenção foi o parâmetro utilizado na identificação de cada composto, por comparação com os tempos de retenção dos padrões analíticos.

Para utilização do cromatógrafo gasoso foi necessário abrir as correntes do gás de arraste — hélio (pureza de 99,9 %) —, de hidrogénio (pureza de 99,9 %) e de ar comprimido. De seguida, ligou-se o estabilizador de corrente e, finalmente, o cromatógrafo. As condições de análise são definidas no Software — CG Solution — 1 instrument.

O processamento de dados foi realizado de forma automática e todas as injeções foram realizadas por injeção automática. Para isso, as amostras foram preparadas em *vials* de 1,5 mL e inseridas num *rack* de injeção automática.

O controlo da temperatura da coluna é um dos métodos mais simples e eficazes de influenciar a separação, pelo que a utilização de um programa de temperaturas, onde ocorre um aumento linear da temperatura da coluna com o tempo, é bastante eficiente em misturas de amostras.

O programa de temperaturas definido (Figura 5) encontra-se descrito de seguida:

- Temperatura inicial: 45 °C durante 5 minutos;
- Rampa de temperatura a 8 °C/min até 100 °C;
- Rampa de temperatura a 20 °C/min até 180 °C, constante nos 5 minutos seguintes.

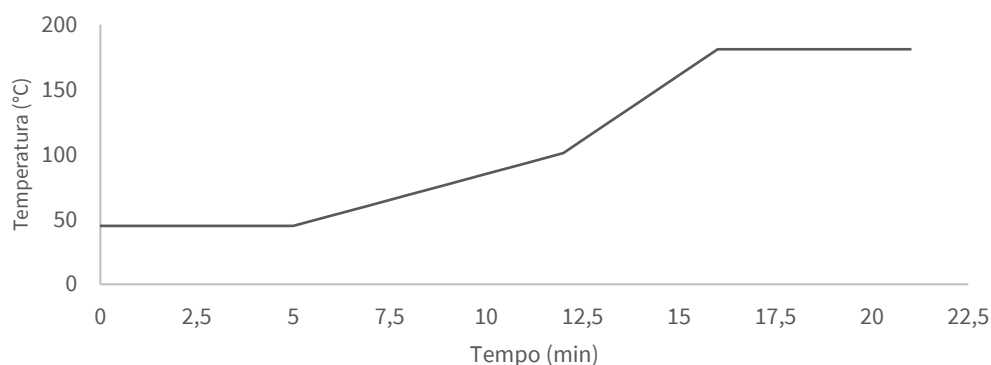


Figura 5. Programa de temperaturas utilizado na análise por CG-DIC

As condições analíticas utilizadas para análise dos extratos encontram-se na Tabela 5:

Tabela 5. Condições analíticas do CG-DIC

Temperatura do injetor	250 °C
Temperatura do detetor	250 °C
Modo de injeção	Split
Volume de injeção	1,0 µL
Velocidade linear	35,0 cm/s
Tempo total de corrida	20,88 min
Gás de arraste	Hélio (30 mL/min)
Pressão	56,3 kPa
Caudal da purga	3,0 mL/min
Caudal de H ₂	40,0 mL/min
Caudal de ar	400,0 mL/min
Caudal da coluna	1,25 mL/min

3.2.3.1 Identificação e quantificação dos compostos presentes nos extratos

Inicialmente, para efetuar a determinação dos tempos de retenção dos padrões analíticos e do padrão interno, prepararam-se amostras individuais a partir das respectivas soluções individuais. A partir da solução MIX 100 mg/L e da solução de padrão interno, foram preparados 7 padrões de calibração (Tabela A 1, Anexo A) e, posteriormente, foi possível determinar as retas de calibração de cada um dos compostos em estudo.

A quantificação dos compostos em estudo foi realizada recorrendo ao método do padrão interno, diminuindo assim os possíveis erros associados ao método e ao equipamento. Com a informação relativa aos tempos de retenção desenvolveu-se um método analítico capaz de identificar e quantificar os compostos de interesse presentes nos extratos da planta. Através da razão

entre a área do pico de cada um dos compostos e a área do pico do padrão interno foi possível determinar as retas de calibração e quantificar cada um dos compostos de interesse.

O padrão interno deve ser quimicamente semelhante aos compostos presentes nas amostras, bem como inerte e apresentar uma elevada pureza. Para além disso, deve eluir próximo dos compostos de interesse, ainda que deva ser possível distingui-lo dos restantes picos da amostra. Para a determinação das retas de calibração, a cada um dos padrões de calibração foi adicionada uma concentração fixa conhecida de padrão interno que favorecesse todos os compostos de interesse (5 mg/L). As injeções dos padrões de calibração foram realizadas em triplicado.

Os compostos de interesse presentes nos extratos foram identificados e, a partir da razão entre a área do pico de cada um dos compostos e a área do pico do padrão interno, foi feita a quantificação dos compostos recorrendo às retas de calibração.

3.2.4 Microencapsulação

Para o estudo da microencapsulação de extratos de *Mentha pulegium* L. começou-se por realizar um estudo que consistiu na microencapsulação de três dos principais compostos presentes na composição química da planta usando os seus padrões analíticos. De seguida, realizou-se a microencapsulação dos extratos provenientes da planta e os resultados obtidos foram analisados. A técnica de múltipla emulsão com evaporação de solvente foi utilizada para a formulação das micropartículas dos compostos padrão e dos extratos.

3.2.4.1 Microencapsulação dos compostos padrão

Pesaram-se individualmente, em balões volumétricos de 25 mL, cerca de 375 mg de cada um dos compostos e adicionou-se éter etílico até perfazer o volume de 25 mL. As soluções foram homogeneizadas no *vortex*, envolvidas em papel de alumínio e refrigeradas até ao dia seguinte. A partir de cada uma das soluções foram preparadas soluções intermédias e, posteriormente, soluções individuais com uma concentração de 5,263 mg/mL e de 11,111 mg/mL, correspondentes a um *loading* teórico de 5 % (m/m) (formulação F-1) e 10 % (m/m) (formulação F-2) respetivamente, para cada um dos três compostos.

Para a preparação da fase aquosa externa (W₂) pesou-se cerca de 1 g do polímero álcool polivinílico (APV), utilizado como surfactante, e cerca de 99 mg de água ultrapura (AUP), obtendo-se uma solução com concentração de 1 % (m/m). A solução foi colocada numa placa de agitação a 120-180 °C até ocorrer solubilização total.

Para a preparação da fase orgânica (O_2) pesou-se cerca de 100 mg do polímero etilcelulose e, no instante da microencapsulação e no interior da *hotte*, foram adicionados 10 mL do solvente orgânico diclorometano, obtendo-se assim uma solução polimérica com concentração de 10 mg/mL. Para ocorrer solubilização total do polímero, os frascos foram sonicados durante 5 minutos e homogeneizados no *vortex* durante 1 minuto.

Foi adicionado 1 mL de cada uma das três soluções individuais a um frasco com 7 mL de fase aquosa externa (W_2). As soluções foram homogeneizadas no *vortex* durante 3 minutos e a primeira emulsão de óleo em água (O_1/W_2) formou-se. Rapidamente, a primeira emulsão foi adicionada à fase orgânica (O_2) e promoveu-se a sua homogeneização novamente durante 3 minutos no *vortex*, formando a segunda emulsão ($O_1/W_2/O_2$). A segunda emulsão foi adicionada à fase aquosa externa (W_2) e emulsificada usando um homogeneizador de alta performance durante 5 minutos a 5000 rpm. Ao fim deste tempo, a emulsão $O_1/W_2/O_2/W_2$ formou-se. Na Figura 6 encontra-se representado o procedimento de múltipla emulsão.



Figura 6. Esquema representativo do procedimento de múltipla emulsão

Para evaporação dos solventes orgânicos e endurecimento das micropartículas, a emulsão $O_1/W_2/O_2/W_2$ foi colocada numa placa de agitação a 700 rpm durante três horas no interior da *hotte* a temperatura ambiente e com exaustão ligada. De seguida, as micropartículas foram recuperadas recorrendo à técnica de filtração por vácuo, utilizando papel de filtro *Whatman™* de nylon com 0,45 µm de espessura e lavadas com cerca de 300 mL de água destilada para remoção de possíveis resíduos de APV. As micropartículas foram congeladas a -4 °C e liofilizadas durante 72 horas.

Na Tabela 6 encontra-se a razão água-óleo-água (ROA), em que se considera a razão entre o volume da solução mistura com os três padrões e a solução polimérica utilizada na formação da primeira emulsão. O conteúdo teórico de *loading* (CTL %) consiste na razão entre a massa dos compostos bioativos e a massa total das micropartículas. Todas as experiências foram realizadas em triplicado.

Tabela 6. Composição das formulações

F	Volume de DCM (mL)	Volume da SM (mL)	C _{SM} (mg/mL)	C _{polímero} (mg/mL)	ROA (v/v)	C _{APV} (% m/v)	Volume da solução de APV (mL)	CTL (% m/m)
F-1	10	10	0,526	10	1	1	100	5
F-2			1,111					10

F – Formulação; DCM – diclorometano; SM – solução mistura; ROA – razão óleo em água; APV – álcool polivinílico

3.2.4.2 Microencapsulação de extratos da planta *Mentha Pulegium* L.

Para a microencapsulação dos extratos de *M. pulegium* começou-se por definir um *loading* teórico de 5 % (m/m). A partir dos extratos obtidos por DES preparou-se uma solução com uma concentração de 5,263 mg/mL. O procedimento realizado foi idêntico ao descrito no ponto 3.2.4.1. Todos os ensaios foram realizados em triplicado.

3.2.5 Rendimento de encapsulação das micropartículas

O rendimento de encapsulação de micropartículas é definido como

$$RP (\%) = \frac{m_{MPs}}{m_{inicial} + m_{polímero}} \times 100 \quad (3.1)$$

onde $m_{inicial}$ corresponde à massa de compostos adicionada inicialmente para microencapsulação, $m_{polímero}$ corresponde à massa de polímero utilizado no processo de microencapsulação e m_{MPs} corresponde à massa de micropartículas recuperada após o processo de liofilização.

3.2.6 Eficiência de encapsulação das micropartículas

A eficiência de encapsulação dos compostos (EE) é definida como

$$EE (\%) = \frac{m_{retida}}{m_{inicial}} \times 100 \quad (3.2)$$

onde m_{retida} corresponde à massa de compostos bioativos retidos nas micropartículas e $m_{inicial}$ corresponde à massa de compostos bioativos adicionada inicialmente para microencapsulação.

Adicionou-se 10 mL de diclorometano a 10 mg de cada uma das amostras de micropartículas e, após dissolução do polímero etilcelulose, removeu-se o solvente diclorometano por evaporação num evaporador rotativo. Para análise cromatográfica, a cada uma das amostras foram adicionados 3 mL de n-hexano, capaz de extrair os compostos retidos pelo método de microencapsulação. Em seguida, 1 mL das amostras foi filtrado utilizando um filtro PTFE de 0,2 µm, de forma a remover quaisquer resíduos de polímero, e injetado no cromatógrafo. O procedimento foi realizado em

triplicado para cada um dos tipos de microcápsulas (extrato, compostos padrão com *loading* de 5% (m/m) e *loading* de 10% (m/m)).

3.2.7 Morfologia das micropartículas

A avaliação da morfologia externa e a polidispersividade das micropartículas foi realizada num microscópio eletrónico de varrimento PHENOM XL (Eindhoven, Países Baixos) a uma voltagem de 10 kV. As micropartículas foram colocadas num *stub* de alumínio com fita de dupla face de carbono e pulverizadas com ouro durante 20 segundos, usando um pulverizador a vácuo. Foram obtidas microfotografias a diferentes ampliações para cada um dos tipos de micropartículas.

3.2.8 Distribuição de tamanho das micropartículas

A distribuição de tamanho das micropartículas foi avaliada recorrendo a granulometria de laser usando Coulter Counter-LS 230 Particle Size Analyzer (Miami, FL, EUA), considerando a distribuição diferencial de volumes. Uma amostra foi suspensa em água destilada e a distribuição de tamanho das micropartículas foi registada três vezes durante 60 segundos.

A polidispersividade da distribuição de tamanho das partículas foi analisada através da equação SPAN, definida como

$$\text{SPAN} = \frac{D_{v,90} - D_{v,10}}{D_{v,50}} \quad (3.3)$$

onde $D_{v,10}$, $D_{v,50}$ e $D_{v,90}$ representam, respetivamente, os diâmetros do volume característico a 10 %, 50 % e 90 % do volume cumulativo.

3.2.9 Estudo de libertação dos compostos retidos nas micropartículas de extrato

Para estudar a libertação dos compostos encapsulados nas micropartículas realizou-se um estudo ao longo de 4 dias. Começou-se por pesar cerca de 10 mg de micropartículas de extrato em 12 frascos e adicionou-se a cada um cerca de 10 mL de água ultrapura. Os 12 frascos foram colocados a agitar num agitador orbital a 240 rpm e, ao fim de 24h, 48h, 72h e 96h, foram recolhidos os frascos correspondentes. A cada frasco adicionou-se com o auxílio de uma seringa, de maneira a minimizar as perdas dos compostos de interesse, cerca de 10 mL de n-hexano no sentido de extrair os compostos libertados. As amostras foram submetidas a ultrassons durante 15 minutos, seguindo-se de um repouso de 15 minutos, levando à formação de duas fases. Cerca de 90 % da fase rica em n-hexano (9 mL) de cada amostra foi extraída para novos frascos. Na Figura 7 encontra-se representado o procedimento realizado do estudo de libertação controlada.

Previamente à realização da análise cromatográfica, as amostras foram filtradas utilizando um filtro PTFE de 0,2 μm de forma a remover quaisquer resíduos. Em seguida, 1 mL de cada uma das amostras foi injetado no CG-DIC e procedeu-se à sua quantificação. O procedimento foi realizado em triplicado.

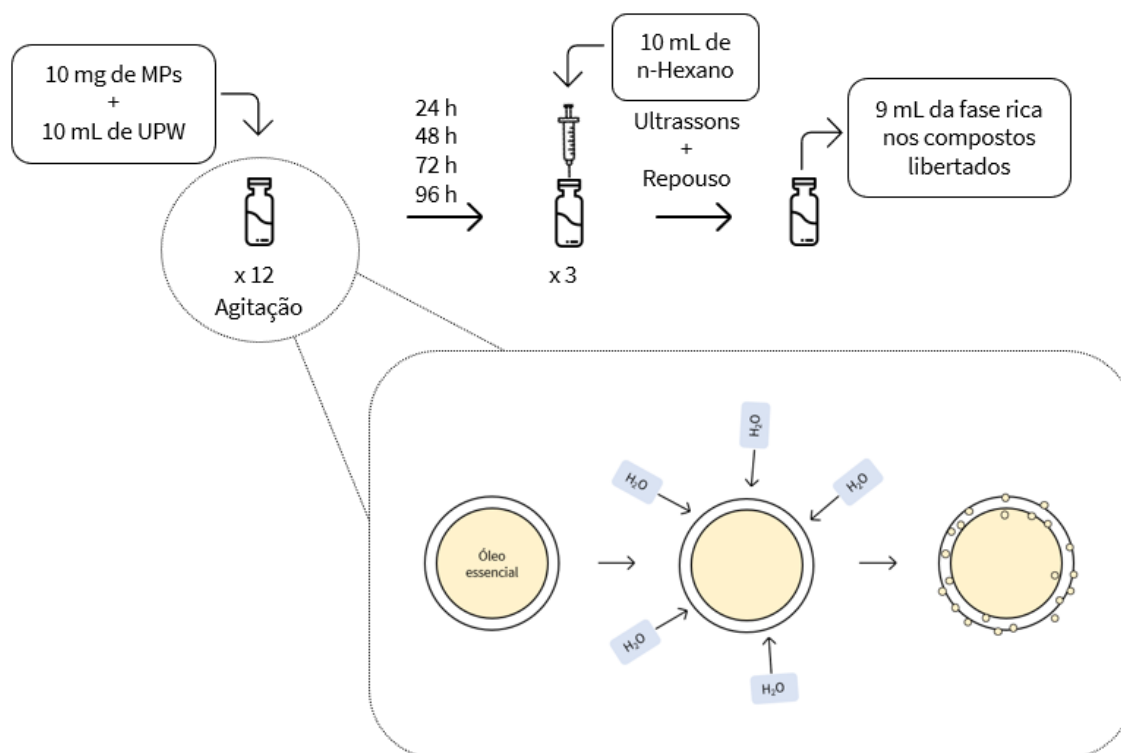


Figura 7. Esquema representativo do procedimento do estudo da liberação controlada

3.2.10 Gestão de resíduos

Todos os resíduos produzidos ao longo deste projeto foram devidamente armazenados e etiquetados em frascos e recipientes adequados até ao seu tratamento pelo Sistema de Gestão Ambiental da FEUP — Eco FEUP, unidade especializada em gestão de resíduos da faculdade.

4 Resultados e Discussão

4.1 Validação do método analítico (CG-DIC)

A composição do óleo essencial obtido após extração por DES foi quantificada por CG-DIC pelo método de padrão interno. Para a validação do método, analisaram-se parâmetros quantitativos como a linearidade das retas de calibração, limites de detecção e quantificação, sensibilidade e precisão. Começou-se por determinar o tempo de retenção correspondente a cada um dos padrões analíticos, apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Tempo de retenção dos padrões analíticos

Composto	Mentona	Pulegona	Geraniol
Tempo de retenção (min)	11,529	12,943	13,285

4.1.1 Identificação e quantificação dos compostos

A natureza química da fase estacionária (polaridade) contribui para a separação cromatográfica da amostra, e a recuperação de um determinado composto pode ser determinada a partir da sua pressão de vapor e do seu coeficiente de partição. Quanto maior o valor da pressão de vapor de um composto, menor é o seu ponto de ebulição e, consequentemente, menor o seu tempo de retenção na coluna cromatográfica. Quanto maior a polaridade de um determinado composto, maior a sua afinidade à fase estacionária e, consequentemente, maior o seu tempo de retenção.

As informações referentes às propriedades físico-químicas necessárias para a análise dos resultados obtidos encontram-se na Tabela 1, apresentada no capítulo de Contexto e Estado de Arte.

De entre os três compostos em estudo, a mentona apresenta o menor ponto de ebulição (207 °C), seguido da pulegona (224 °C) e, por fim, do geraniol (228 °C). Os valores de coeficiente de partição óleo-água dos três compostos — 3,05 para a mentona, 3,08 para a pulegona, 3,56 para o geraniol —, encontram-se bastante próximos, pelo que a afinidade não é um fator tão determinante como o ponto de ebulição na separação destes compostos na coluna cromatográfica. Tal como esperado, a mentona apresentou um menor tempo de retenção, seguida da pulegona e do geraniol.

Após identificação dos compostos em estudo, procedeu-se ao desenvolvimento das retas de calibração recorrendo ao método do padrão interno. As retas de calibração para cada um dos três compostos foram obtidas por injeção em triplicado dos 7 padrões de calibração e encontram-se representadas na Figura 8.

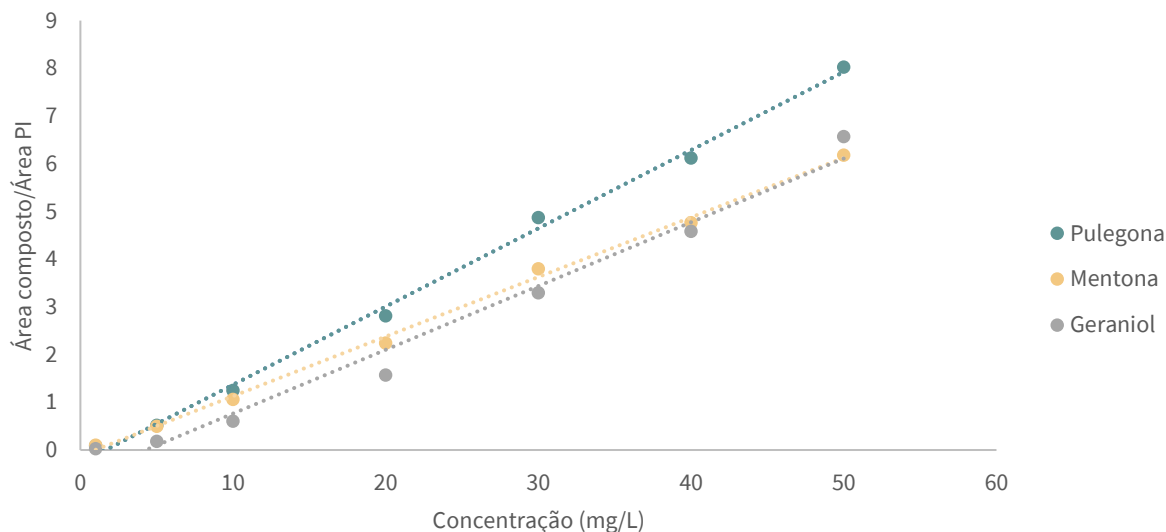


Figura 8. Retas de calibração dos compostos em estudo obtidas por injeção dos padrões de calibração no CG-DIC

As análises quantitativas estão sempre sujeitas a erros, pelo que a validação do método é uma parte importante do processo. Para se validar um determinado método analítico é necessário analisar as retas de calibração obtidas, os limiares analíticos do método utilizado e a sua sensibilidade. No caso de modelos lineares, devem ser utilizados pelo menos cinco pontos na construção da reta de calibração e a gama de concentrações deve ser superior a um fator de 10. Como se pode observar, todas as retas cumpriram estes critérios. O estudo da linearidade das retas, necessário para a validação do método analítico, foi realizado com base em alguns parâmetros estatísticos. Os resultados obtidos encontram-se descritos na Tabela 8.

Tabela 8. Equações das retas de calibração e respetivos parâmetros estatísticos

Composto	Equação da Reta de Calibração $Y=(a\pm ts_a)x+(b\pm ts_b)$	R (>0,995)	s_a/a (%) (<5 %)	$b-s_b$ (<0)	$b+s_b$ (>0)
Mentona	$RA=(0,125\pm 0,008)C-(0,120\pm 0,236)$	0,999 ✓	2,6 ✓	0,029 ✗	0,212 ✓
Pulegona	$RA=(0,164\pm 0,011)C-(0,271\pm 0,301)$	0,998 ✓	2,5 ✓	0,154 ✗	0,388 ✓
Geraniol	$RA=(0,134\pm 0,023)C-(0,572\pm 0,637)$	0,989 ✗	6,6 ✗	0,324 ✗	0,819 ✓

A sensibilidade de um método analítico corresponde à razão entre a resposta instrumental e a concentração do analito. No caso de um modelo linear, corresponde ao declive da reta de calibração e é constante ao longo da gama de trabalho. Quanto maior o valor de declive, mais sensível e apto é o método para distinguir pequenas diferenças de concentração de um analito. De entre as retas obtidas, conclui-se que o método é mais sensível para o composto pulegona.

Para a determinação do coeficiente de correlação da reta e respectivos parâmetros estatísticos (Anexo B) foi aplicado o método dos mínimos quadrados. Através da análise do coeficiente de correlação (R) é possível verificar a linearidade das retas de calibração, cujo valor deve ser igual ou superior a 0,995. Tendo em conta a informação descrita na Tabela 8, apenas o geraniol não cumpriu esse critério.

O parâmetro s_a/a (%) < 5 % foi cumprido por todas as retas, exceto a do geraniol. Por outro lado, o parâmetro $b-s_b < 0 < b+s_b$ apresentou-se mais difícil de validar, possivelmente pela presença de interferentes nos padrões de calibração ou da condição da coluna. De acordo com os resultados obtidos, o parâmetro não foi cumprido por nenhuma reta.

Dado que a presença do geraniol — um dos componentes minoritários da planta — não era esperada nos extratos, não se considerou fundamental validar a sua reta, pelo que não houve necessidade de repetir os ensaios.

Os limiares analíticos são constituídos pelos limites de deteção e de quantificação. O limite de deteção (LD) corresponde à concentração mínima de analito capaz de ser detetada, mas não necessariamente quantificada. O limite de quantificação (LQ) consiste na menor concentração de analito possível de quantificar com a precisão e exatidão pretendidas. Os limites de deteção e de quantificação foram determinados através das equações 4.1 e 4.2, e os valores encontram-se na Tabela 9.

O valor de S/N foi calculado através da altura do pico do composto e da altura do pico do ruído para o padrão de concentração mais baixa (P1).

$$LD = \frac{3C_{\text{padrão}}}{\frac{s}{N}} \quad (4.1)$$

$$LQ = \frac{10C_{\text{padrão}}}{\frac{s}{N}} \quad (4.2)$$

onde $\frac{s}{N} = 2^{\frac{\text{altura do pico do composto}}{\text{altura do pico de ruído}}}$.

Tabela 9. Gama de linearidade e limites de deteção e quantificação das retas dos compostos em estudo

Composto	Gama de linearidade (mg/L)	R ²	LD (mg/L)	LQ (mg/L)
Mentona	1-50	0,998	0,155	0,517
Pulegona	1-50	0,997	0,106	0,354
Geraniol	1-50	0,979	0,187	0,622

A precisão permite verificar a concordância dos resultados obtidos entre ensaios independentes repetidos sobre uma mesma amostra nas mesmas condições e é avaliada pelo coeficiente de variação. Para avaliar a precisão do método analítico realizaram-se seis determinações do mesmo padrão analítico para três concentrações diferentes, usando as mesmas soluções, o mesmo equipamento, as mesmas condições operatórias e no mais curto intervalo de tempo. A precisão foi avaliada em triplicado e os resultados obtidos estão apresentados na Figura 9.

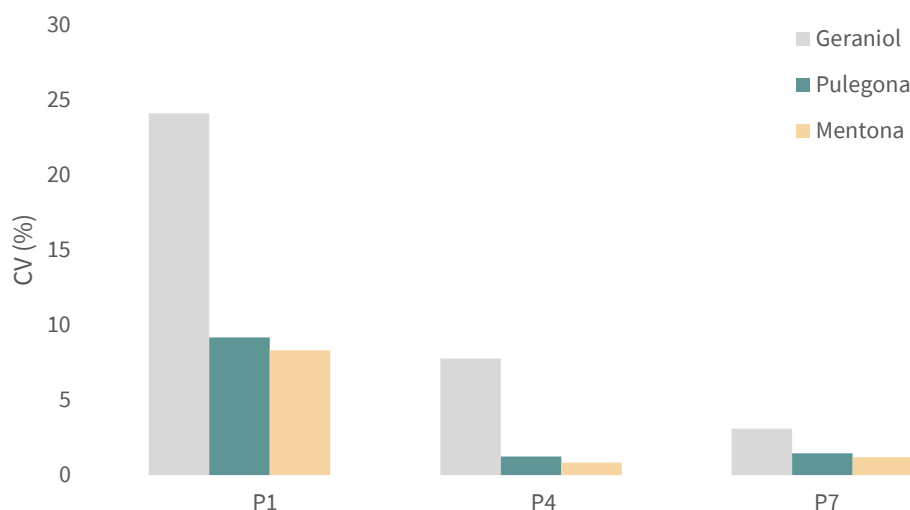


Figura 9. Coeficientes de variação médios obtidos para os padrões P1, P4 e P7

Os valores de CV obtidos para o padrão P1, correspondente ao de concentração mais baixa, foram superiores aos valores obtidos para os padrões P4 e P7, padrões de concentração intermédia e de concentração mais alta, respetivamente. É possível concluir que, para concentrações mais baixas, o método não é tão preciso — a precisão do método aumenta com o aumento de concentração. Para os compostos pulegona e mentona, os valores de coeficiente de variação obtidos foram iguais ou inferiores a 10 %, pelo que os resultados foram satisfatórios, contrariamente ao observado com o geraniol.

4.2 Extração

Seguindo o procedimento descrito no ponto 3.2.2, foram realizadas extrações para obtenção de extratos da planta *Mentha pulegium* L. As amostras foram cortadas ou trituradas em 250 mL de água destilada, sendo as extrações realizadas durante 60 minutos utilizando éter etílico como solvente de extração.

4.2.1 Extração dos óleos essenciais de *Mentha pulegium* L.

No sentido de obter extratos para posterior encapsulação, procedeu-se à sua extração a partir de quatro amostras da planta.

Tabela 10. Massa de planta utilizada e massa de extrato obtido

Número de extração	Massa de planta (g)	Massa de extrato (mg)	Rendimento de extração (%)
1	5,17	67,20	1,3
2	5,23	25,70	0,5
3	19,51	39,50	0,2
4	10,42	45,40	0,4

Tendo em consideração os resultados descritos na Tabela 10, ao comparar a primeira e a segunda extração, observa-se uma diminuição significativa do valor da massa de extrato obtida. Dado que a amostra utilizada na primeira extração era mais rica em folhas e o valor da massa de extrato obtido correspondente ter sido o mais elevado, pode-se assumir a existência de uma relação entre a quantidade de folhas e a quantidade de óleo essencial passível de extração. Consequentemente, em relação à segunda extração, assume-se que o facto de a amostra ter uma maior proporção de caule em detrimento de folhas contribua para que a quantidade de óleo essencial extraída seja menor.

Relativamente à terceira e à quarta extrações, as amostras de planta apresentavam quantidades mais uniformes entre caule e folhas. De uma maneira geral, tendo em conta a massa de planta utilizada nas duas últimas extrações, seria de esperar maiores quantidades de massa de extrato quando comparadas às obtidas nas duas primeiras extrações. Mais concretamente, comparando os resultados obtidos para a terceira e quarta extrações com os resultados da primeira extração, a massa de extrato obtida foi inferior, contrariamente ao que seria de esperar. Comparando com os resultados da segunda extração, as massas de extrato obtidas foram superiores — neste caso, como a massa de planta utilizada foi superior, foi possível extrair mais quantidade.

Note-se que a utilização de diferentes plantas e diferentes condições de operação impossibilita uma comparação bem sustentada. No entanto, o principal objetivo desta extração consistia na obtenção de óleo essencial — especialmente rico em pulegona — com o fim de ser microencapsulado.

4.2.2 Análise dos extratos de *Mentha pulegium* L.

Para proceder à análise quantitativa, os extratos foram preparados com uma concentração conhecida de padrão interno e com solvente de injeção n-hexano, tendo sido analisados em duplicado no CG-DIC. Um dos cromatogramas obtidos para o quarto extrato encontra-se representado na Figura 10, estando os restantes no Anexo C. A análise cromatográfica dos extratos foi realizada comparando os tempos de retenção de cada um dos picos com os tempos de retenção dos compostos em estudo.

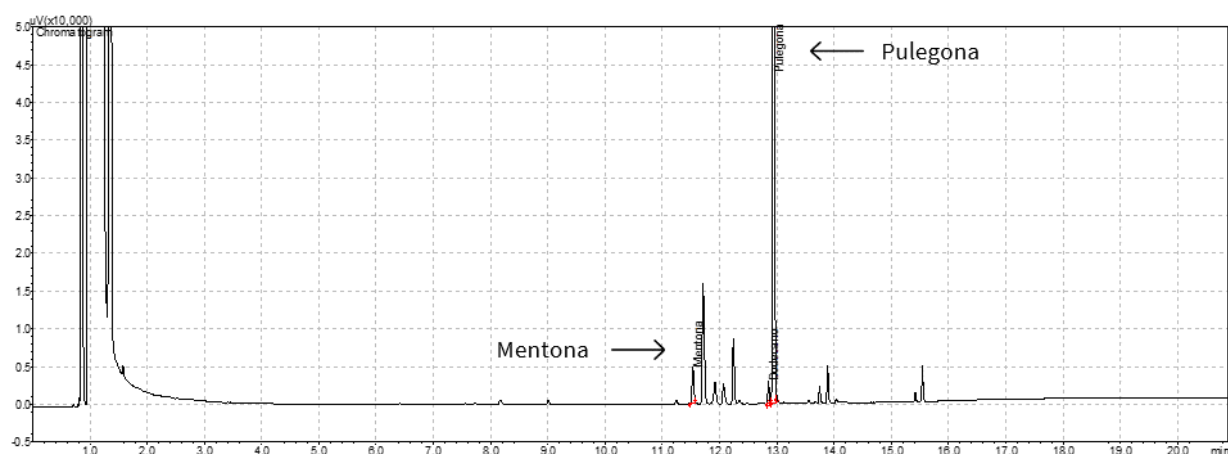


Figura 10. Cromatograma com identificação dos compostos em estudo obtido após injeção do quarto extrato no CG-DIC

Segundo a análise dos cromatogramas, os compostos pulegona e mentona encontram-se presentes em todos os extratos, contrariamente ao geraniol. Segundo a literatura, o geraniol corresponde a um dos compostos minoritários, daí que não tenha sido extraída uma quantidade que permitisse a sua deteção. Tal como era de esperar, o pico correspondente ao composto pulegona corresponde ao pico com maior área, sendo, por isso, considerado o composto maioritário.

Dado que nos cromatogramas correspondentes ao terceiro e quarto extratos é possível observar a presença de um maior número de picos — isto é, uma maior percentagem de compostos identificáveis —, e a área do pico correspondente ao composto pulegona é superior, conclui-se que a extração das amostras preparadas por trituração permitiu obter uma maior quantidade de extrato e, portanto, foi mais eficaz.

Recorrendo às retas de calibração foi possível quantificar os compostos a partir da razão entre a área do pico de cada composto e a área do pico do padrão interno. A média da concentração de cada composto em estudo identificado no extrato, tendo em consideração as diluições realizadas e os respetivos coeficientes de variação encontram-se na Tabela 11.

Tabela 11. Resultados obtidos após análise dos extratos de *Mentha pulegium* L. no CG-DIC

Extrato	Pulegona		Mentona	
	C _{extrato} (mg/L)	CV (%)	C _{extrato} (mg/L)	CV (%)
1	175,54	2,3	18,56	5,0
2	200,55	4,6	6,98	6,4
3	1423,67	4,0	104,47	4,1
4	2374,64	1,8	163,16	0,8

Analisando a tabela é possível concluir que os resultados são precisos, dado que os coeficientes de variação se encontram abaixo de 10 %. Os valores de concentração da pulegona e da mentona obtidos na terceira e quarta extrações — onde as amostras foram trituradas — revelam uma maior eficácia do método. Novamente, é possível concluir que a preparação da amostra por trituração permite obter melhores resultados, dado que tende a proporcionar uma menor perda de compostos.

Através da análise cromatográfica foi possível analisar a distribuição dos compostos em estudo nos extratos. Com a informação da Figura 11 e das Figuras C 2, C 4 e C 6, presentes no Anexo C, é possível concluir que a pulegona é o composto maioritário, com um valor percentual entre 57 e 66 %. O composto mentona apresenta um valor percentual mais baixo, entre 1 e 4 %. Os valores obtidos são comparáveis com o descrito na literatura, onde o composto pulegona representa o composto maioritário e a mentona um dos compostos minoritários.

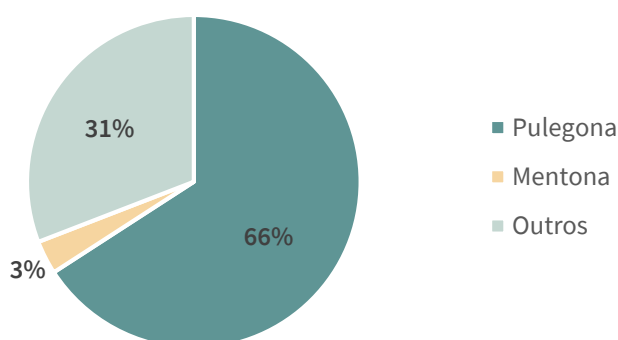


Figura 11. Valores percentuais dos compostos de interesse presentes no quarto extrato, obtidos por análise cromatográfica

4.3 Microencapsulação

O rendimento e eficiência de encapsulação das micropartículas foram determinados. As microcápsulas foram caracterizadas tendo em conta a sua morfologia e distribuição de tamanho.

4.3.1 Rendimento de encapsulação das micropartículas

Os valores necessários para o cálculo do rendimento das micropartículas dos padrões com *loading* teórico de 5 % (m/m) e 10 % (m/m) estão apresentados na Tabela 12. Através da análise dos resultados obtidos, observa-se que o rendimento variou entre 62,1 e 81,8 %. O valor médio de rendimento foi 81,0 % para a formulação com *loading* de 5 % (m/m) e de 64,4 % para a formulação com *loading* de 10 % (m/m).

Tabela 12. Rendimento da microencapsulação dos padrões para um *loading* de 5 % (m/m) e 10 % (m/m)

	L= 5 % (m/m)			L= 10 % (m/m)		
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3
Massa de polímero (mg)	102,80	102,60	103,10	100,30	101,00	100,20
Massa de padrões (mg)	15,79	15,79	15,79	33,33	33,33	33,33
Massa de MPs (mg)	95,63	96,80	95,64	87,40	88,10	82,90
Rendimento (%)	80,6	81,8	80,4	65,4	65,6	62,1

Utilizou-se a análise de variância (ANOVA) para determinar diferenças significativas ($p < 0,05$). Uma vez que o valor p obtido é inferior a 0,05, verifica-se uma dependência do rendimento de produção em função do *loading*. Para a mesma quantidade de etilcelulose, a diminuição do rendimento de produção com o aumento do *loading* sugere que a quantidade de polímero utilizado para a formulação de 10 % (m/m) foi insuficiente. Ou seja, o rendimento do produto depende da concentração de polímero utilizado no processo de microencapsulação. A quantidade de polímero pode condicionar o aprisionamento de compostos imiscíveis com água na matriz polimérica durante a evaporação do solvente.

A microencapsulação de extratos foi feita para um *loading* teórico de 5 % (m/m), uma vez que o valor do rendimento obtido para as micropartículas dos padrões com *loading* teórico de 5 % (m/m) foi superior. Analisando a Tabela 13 concluiu-se que o rendimento variou entre 64,3 e 75,2 %, sendo 70,1 % o valor médio.

Tabela 13. Rendimento da microencapsulação dos extratos de *Mentha pulegium* L.

	L=5 % (m/m)		
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3
Massa de polímero (mg)	101,20	99,60	104,40
Massa de extrato (mg)	5,26	5,26	5,26
Massa de MPs (mg)	80,10	67,40	77,70
Rendimento (%)	75,2	64,3	70,9

4.3.2 Eficiência de encapsulação das micropartículas

Após a análise quantitativa das amostras das micropartículas, determinou-se a eficiência de encapsulação. Na Tabela 14 encontram-se descritos os resultados obtidos.

Tabela 14. Eficiência de encapsulação (EE) dos compostos nas diferentes micropartículas

	Pulegona			Mentona			Geraniol		
	C _{média} (mg/L)	CV (%)	EE (%)	C _{média} (mg/L)	CV (%)	EE (%)	C _{média} (mg/L)	CV (%)	EE (%)
MPs extrato L = 5 %	14,24	14,6	3,1	n.d.	-	-	n.d.	-	-
MPs padrão L = 5%	43,23	4,8	2,5	57,42	5,9	3,3	147,49	1,6	8,4
MPs padrão L = 10 %	17,32	5,3	0,5	10,54	-	0,3	181,22	10,3	4,9

MPs – micropartículas; CV – coeficiente de variação; n.d. – não detetado

De um modo geral, os valores obtidos encontram-se acima do limite de quantificação e apontam para uma baixa eficiência de encapsulação tanto para o extrato como para os compostos padrão. A miscibilidade dos solventes utilizados na solução dos compostos padrão — n-Hexano e éter etílico, no caso do extrato e dos compostos padrão, respetivamente — usada na preparação da fase O₁, com o solvente utilizado na preparação da fase O₂ — diclorometano — pode ter impedido a retenção dos compostos no interior da matriz polimérica. O aumento da concentração do polímero pode ser uma possível solução pois, quando muito concentrado, a sua taxa de precipitação é mais alta e, consequentemente, a difusão dos compostos para a fase aquosa externa torna-se mais lenta. A velocidade da placa de agitação na etapa de evaporação dos solventes orgânicos e endurecimento das micropartículas, bem como a relativa elevada pressão de vapor dos compostos, são outros fatores que podem ter contribuído para estes resultados. Por fim, a dificuldade em distinguir os picos dos compostos do ruído do cromatógrafo pode ter influenciado a interpretação dos resultados (Anexo D).

Dado que o geraniol apresenta uma pressão de vapor inferior à dos restantes compostos em estudo, a sua taxa de evaporação é mais baixa. Tal pode justificar a maior eficiência de encapsulação do geraniol observada nas micropartículas dos compostos padrão.

Os resultados obtidos sugerem a repetição da experiência, alterando alguns parâmetros, como velocidade e tempo de agitação, solventes, e técnica utilizada.

4.3.3 Morfologia das micropartículas

Para se estudar a morfologia das micropartículas recorreu-se a um microscópio eletrónico de varrimento. De uma maneira geral, por observação das microfotografias representadas na Figura 12, as micropartículas do extrato apresentam uma morfologia esférica e regular, sendo possível observar uma superfície lisa e porosa, o que pode favorecer a libertação controlada dos compostos. No entanto, o facto de a distribuição dos poros não ser uniforme pode influenciar a cinética de libertação.

A técnica de microencapsulação utilizada permitiu obter uma elevada quantidade de micropartículas com alguma polidispersividade, que possivelmente resultou da etapa de formação da emulsão $O_1/W_2/O_2/W_2$.

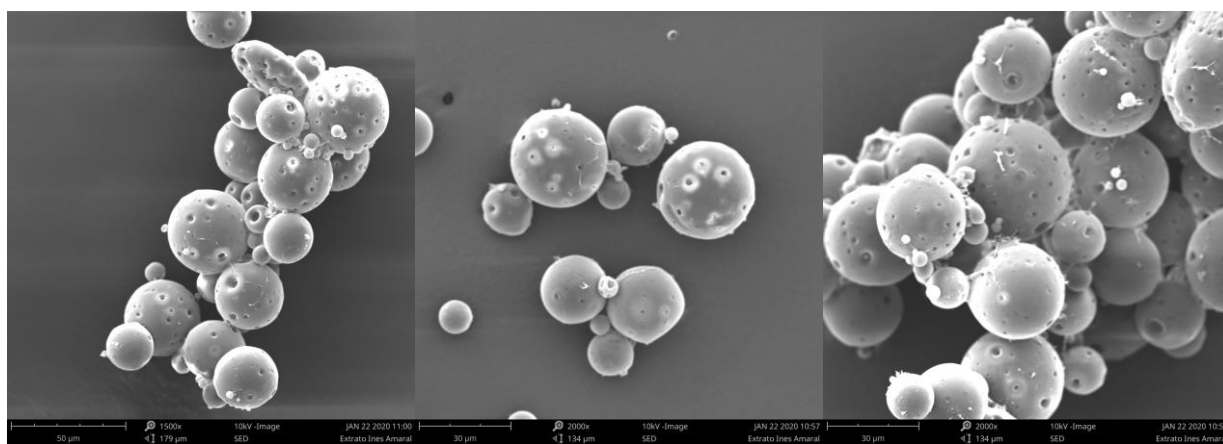


Figura 12. Microfotografias das micropartículas do extrato (a) ampliação de 1500x, b) ampliação de 2000x e c) ampliação de 2000x)

As micropartículas dos compostos padrão apresentam, também, de uma forma geral, uma morfologia esférica e regular. No entanto, como se pode observar na Figura 13, a sua superfície é pouco porosa e apresenta alguma rugosidade, sendo que algumas das micropartículas de maiores dimensões apresentam deformações. Comparando a morfologia das micropartículas para uma mesma ampliação em função do *loading*, não se observam grandes diferenças na polidispersividade.

Comparando os resultados obtidos, verifica-se que as micropartículas de extrato apresentam melhores características morfológicas do que as micropartículas dos compostos padrão.

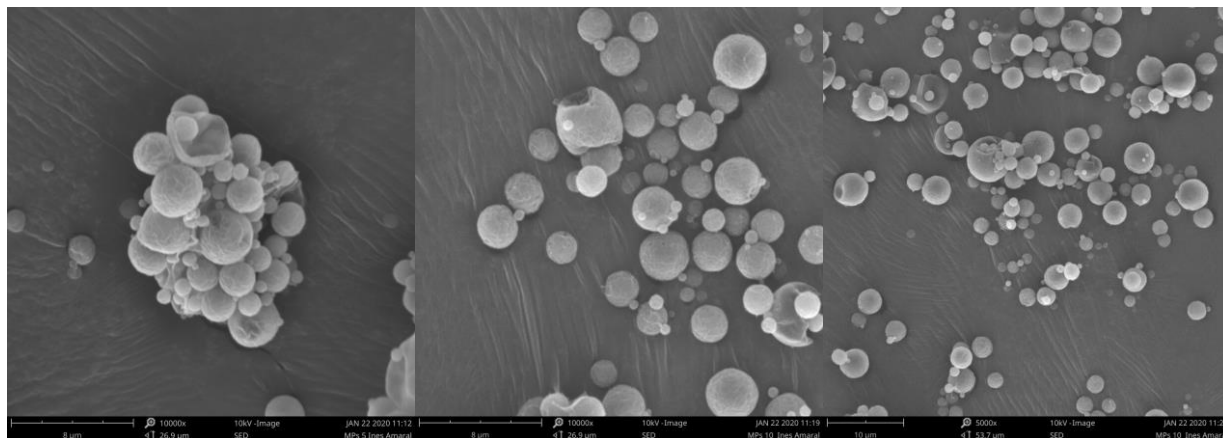


Figura 13. Microfotografias das micropartículas dos compostos padrão (a) loading de 5% (m/m), ampliação de 10000x, b) loading de 10 % (m/m), ampliação de 10000x e c) loading de 10% (m/m), ampliação de 5000x)

4.3.4 Distribuição de tamanho das micropartículas

A distribuição de tamanho das micropartículas pode ser afetada por diversos parâmetros, como a velocidade de agitação, *loading* e a concentração de polímero e surfactante. Esta distribuição e a polidispersividade das micropartículas foram avaliadas por granulometria a laser e os resultados obtidos para as micropartículas de extrato e dos compostos padrão com *loading* de 10 % (m/m) encontram-se representados nas Tabelas 15 e 16, respectivamente. Não foi possível analisar as micropartículas dos compostos padrão com *loading* de 5 % (m/m), uma vez que se encontravam aglomeradas.

Tabela 15. Dados obtidos para a distribuição de tamanho das micropartículas de extrato

	Média (μm)	CV (%)	D ₁₀ (μm)	D ₅₀ (μm)	D ₉₀ (μm)	SPAN
1	15,86	59,2	3,504	15,15	27,29	1,57
2	15,6	58,6	3,434	15	26,87	1,56
3	15,51	58,7	3,413	14,92	26,68	1,56

O tamanho médio obtido para as micropartículas de extrato foi 15,7 μm, enquanto que para as micropartículas dos compostos padrão com *loading* de 10 % (m/m) se obteve um valor de 4,6 μm. Tal pode ser justificado pela presença no extrato de outros componentes não identificados, atendendo

que se quantificaram apenas os compostos em estudo. De qualquer forma, os valores obtidos demonstram que as micropartículas obtidas apresentaram dimensões razoáveis na escala micro.

Tabela 16. Dados obtidos para a distribuição de tamanho das micropartículas dos compostos padrão com um *loading* de 10 % (m/m) por granulometria a laser

	Média (μm)	CV (%)	D ₁₀ (μm)	D ₅₀ (μm)	D ₉₀ (μm)	SPAN
1	4,888	91,1	1,553	3,269	11,6	3,07
2	4,489	82,9	1,539	3,197	10,75	2,88
3	4,542	83,9	1,545	3,211	10,85	2,90

Relativamente aos valores obtidos pela equação SPAN, contrariamente ao que seria de esperar, as micropartículas de extrato apresentaram um valor de polidispersividade média de 1,56 e as micropartículas dos compostos padrão com *loading* de 10 % (m/m) um valor de 2,95. Ou seja, as micropartículas dos compostos padrão apresentaram-se, aproximadamente, duas vezes mais polidispersas que as micropartículas de extrato e, portanto, resultaram numa formulação menos homogênea. Era esperado que as micropartículas dos compostos padrão apresentassem uma distribuição de tamanho mais uniforme comparativamente às do extrato, dado que o último é constituído por compostos com diferentes propriedades físico-químicas que podem condicionar a formação de micropartículas. Por outro lado, a presença de aglomerados pode ter influenciado os resultados.

Relativamente à distribuição de tamanho das partículas, os resultados estão representados na Figura 14. No caso das micropartículas de extrato, obteve-se uma distribuição normal, enquanto que para as micropartículas dos compostos padrão se obteve uma distribuição multimodal.

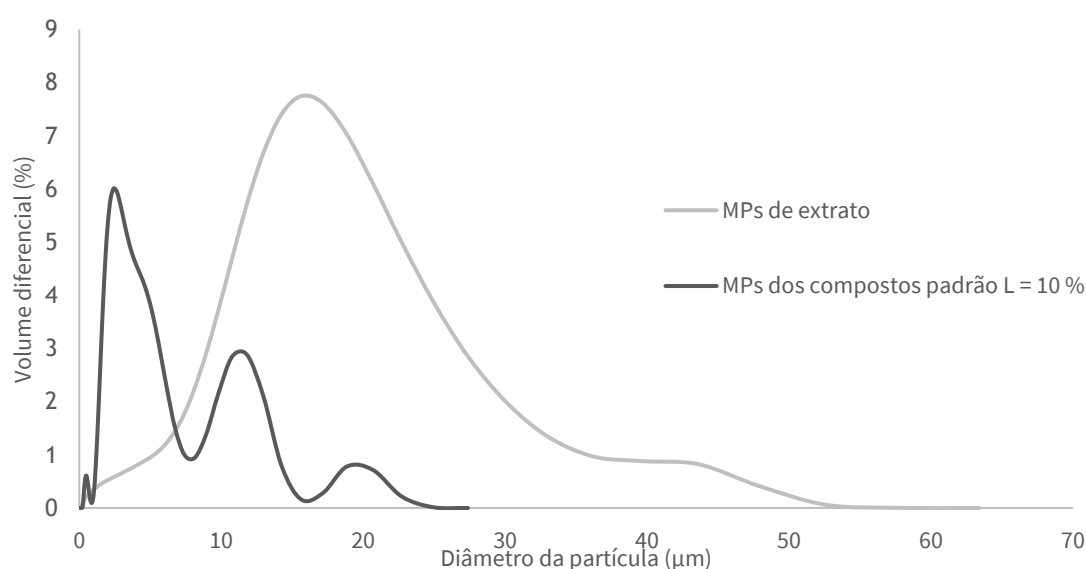


Figura 14. Distribuição de tamanho das micropartículas de extrato e dos compostos padrão com *loading* de 10 %

4.4 Estudo de liberação dos compostos retidos nas micropartículas de extrato

Os estudos de liberação foram realizados em triplicado, mas apenas se analisou a pulegona, por ser o componente maioritário do extrato. No Anexo D estão representados os cromatogramas e resultados obtidos por análise cromatográfica das amostras. A percentagem de liberação da pulegona em função do tempo encontra-se representada na Figura 15.

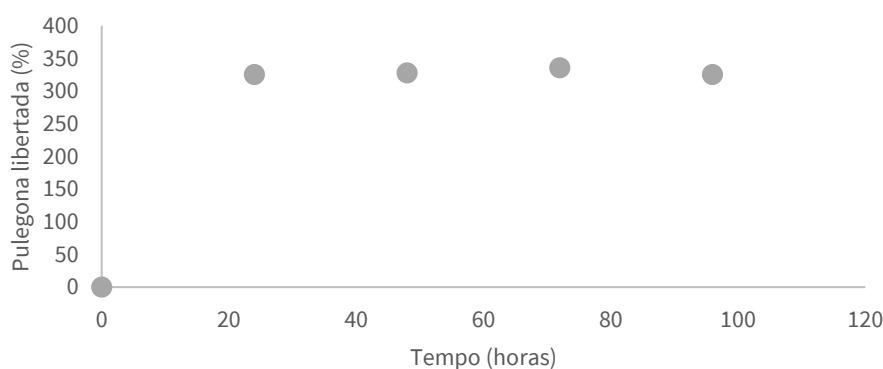


Figura 15. Percentagem de liberação do composto pulegona ao longo do estudo de liberação

Tendo em conta os limites de deteção e quantificação determinados anteriormente, os valores de concentração obtidos encontram-se acima do limite de quantificação, pelo que parece possível quantificá-los. No entanto, tendo em conta os valores obtidos, é possível concluir que os resultados não têm qualquer valor analítico, uma vez que a percentagem de pulegona libertada excede os 100 %. Dado que os valores de concentração determinados se encontram numa zona crítica — uma vez que são muito baixos —, a interpretação dos cromatogramas pode ter sido condicionada pela dificuldade em distinguir os picos dos compostos do ruído do cromatógrafo. Para além disto, os valores obtidos na determinação da eficiência de encapsulação também influenciaram os resultados.

5 Conclusões

Com esta dissertação pretendeu-se estudar a possibilidade da aplicação de micropartículas do óleo essencial de *Mentha pulegium* L. como biopesticida. Em primeira instância, realizou-se a extração do óleo essencial recorrendo ao método de destilação e extração simultânea. Para a análise quantitativa dos extratos, desenvolveu-se e validou-se um método analítico por CG-DIC com base no estudo das retas de calibração obtidas, nos limiares analíticos e na sua sensibilidade. O método revelou-se eficaz para a identificação e quantificação dos compostos pulegona e mentona, ainda que não tenha sido possível validar a reta de calibração do composto geraniol.

Através da análise quantitativa dos extratos, foi possível comprovar que a pulegona corresponde ao composto maioritário, com um valor percentual entre 57 e 66 %. A mentona, por outro lado, apresentou um valor entre 1 e 4 %, sendo um dos compostos minoritários.

A microencapsulação do óleo essencial foi realizada recorrendo ao método de múltipla emulsão com evaporação do solvente. O rendimento de produção das micropartículas variou entre 64,3 e 75,2 %, contudo a eficiência de encapsulação foi bastante baixa. Por esta razão, é possível concluir que o método de microencapsulação utilizado não foi o mais adequado. O facto de os compostos em estudo apresentarem alguma volatilidade pode ter contribuído para estes resultados.

As micropartículas de extrato apresentaram uma morfologia esférica e regular, bem como uma superfície porosa. Para as micropartículas dos compostos padrão, não se observou influência do *loading* na polidispersividade. Por outro lado, as micropartículas apresentaram alguma rugosidade e deformações. As micropartículas de extrato apresentaram um tamanho médio de 15,7 μm , enquanto que as micropartículas dos compostos padrão com *loading* de 10 % (m/m) apresentaram um tamanho médio inferior, de 4,6 μm .

Foi realizado um estudo de libertação controlada, no entanto os resultados obtidos foram condicionados pela baixa eficiência de encapsulação. Uma vez que os resultados da microencapsulação e libertação de compostos não foram conclusivos, novos estudos devem ser desenvolvidos de forma a otimizar a técnica de encapsulação e o estudo de libertação.

6 Avaliação do trabalho realizado

6.1 Objetivos Realizados

O trabalho desenvolvido ao longo desta dissertação cumpriu todos os objetivos inicialmente propostos. O estudo do método de extração e destilação simultânea e a análise quantitativa por cromatografia gasosa com detetor de ionização de chama permitiram obter resultados bastante satisfatórios. Relativamente à técnica de microencapsulação utilizada — múltipla emulsão com evaporação de solvente —, observaram-se resultados menos favoráveis, o que condicionou o estudo de libertação.

6.2 Trabalho Futuro

A nível de trabalho futuro, dever-se-á otimizar a técnica de microencapsulação e realizar novos estudos de libertação controlada, experimentando novas matrizes de libertação, por exemplo em solos, de forma a avaliar a possível aplicação das microcápsulas como pesticidas.

É necessário aferir a utilidade e viabilidade dos sistemas de libertação estudados através da realização de análises que permitam a sua comparação, em condições reais, com pesticidas convencionais.

Os riscos associados à aplicação das microcápsulas na saúde e no ambiente devem, também, ser avaliados. Apesar das vantagens aparentes, antes da sua aplicação, é necessário realizar múltiplos estudos, tanto ao nível da toxicidade — em humanos e em organismos não alvo —, como da durabilidade e da bioacumulação. Adicionalmente, devem ser realizados testes de lixiviação e testes de eficácia em pestes alvo. A pegada ecológica, a perceção social, as preocupações regulatórias e a viabilidade económica são outras questões a ter em conta.

6.3 Apreciação Final

O estudo realizado pode ser considerado uma introdução ao desenvolvimento de alternativas de pesticidas mais sustentáveis e ecológicas, pelo que a otimização e procura de novos métodos de microencapsulação mais eficientes pode potenciar o desenvolvimento de novos produtos.

Apesar dos resultados obtidos não terem sido os desejados, o projeto proporcionou a aprendizagem e maturação de diversas técnicas, algumas das quais não haviam sido exploradas ao longo do curso.

Referências

- Abdelli, M., Moghrani, H., Aboun, A., & Maachi, R. (2016). Algerian *Mentha pulegium* L. leaves essential oil: Chemical composition, antimicrobial, insecticidal and antioxidant activities. *Industrial Crops and Products*, 94, 197–205. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.08.042>
- Ahmed, A., Ayoub, K., Chaima, A. J., Hanaa, L., & Abdelaziz, C. (2018). Effect of drying methods on yield, chemical composition and bioactivities of essential oil obtained from Moroccan *Mentha pulegium* L. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 16(June), 638–643. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.10.016>
- Asbahani, A. El, Miladi, K., Badri, W., Sala, M., Addi, E. H. Aï., Casabianca, H., Mousadik, A. El, Hartmann, D., Jilale, A., Renaud, F. N. R., & Elaissari, A. (2015). Essential oils: From extraction to encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics*, 483(1–2), 220–243. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.12.069>
- Ben Jemaa, M., Falleh, H., & Ksouri, R. (2016). Encapsulation of Natural Bioactive Compounds: Nanoemulsion Formulation to Enhance Essential Oils Activities. *Intech, i(tourism)*, 13. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/57353>
- Bhavaniramy, S., Vishnupriya, S., Al-aboody, M. S., Vijayakumar, R., & Baskaran, D. (2019). Role of essential oils in food safety: Antimicrobial and antioxidant applications. *Grain & Oil Science and Technology*, 2(2), 49–55. <https://doi.org/10.1016/j.gaost.2019.03.001>
- Cardarelli, N. (1976). *Controlled Release Pesticides Formulations*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781351070881>
- Cea, M., Cartes, P., Palma, G., & Mora, M. L. (2010). Atrazine efficiency in an andisol as affected by clays and nanoclays in ethylcellulose controlled release formulations. *Revista de La Ciencia Del Suelo y Nutricion Vegetal*, 10(1), 62–77. <https://doi.org/10.4067/S0718-27912010000100007>
- Chaintreau, A. (2001). Simultaneous distillation – extraction: from birth to maturity — review. *Flavour and Fragrance Journal*, 16, 136–148.
- Dima, C., & Dima, S. (2015). Essential oils in foods: Extraction, stabilization, and toxicity. *Current Opinion in Food Science*, 5, 29–35. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.07.003>
- Domingues, P. M., & Santos, L. (2019). Essential oil of pennyroyal (*Mentha pulegium*): Composition and applications as alternatives to pesticides—New tendencies. *Industrial Crops and Products*, 139(May), 111534. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111534>

- El Bahri, Z., & Taverdet, J. L. (2007). Elaboration and characterisation of microparticles loaded by pesticide model. *Powder Technology*, 172(1), 30–40. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2006.10.036>
- Heydarzade, A., Valizadegan, O., Negahban, M., & Mehrkhou, F. (2019). *Efficacy of Mentha spicata and Mentha pulegium essential oil nanoformulation on mortality and physiology of Tribolium castaneum (Col.: Tenebrionidae)*. 8(4), 501–520.
- Ibrahim, S. S. (2019). Essential Oil Nanoformulations as a Novel Method for Insect Pest Control in Horticulture. *IntechOpen*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.80747>
- Kavetsou, E., Koutsoukos, S., Daferera, D., Polissiou, M. G., Karagiannis, Di., Perdikis, D. C., & Detsi, A. (2019). Encapsulation of Mentha pulegium Essential Oil in Yeast Cell Microcarriers: An Approach to Environmentally Friendly Pesticides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(17), 4746–4753. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b05149>
- Khayyat, S. A., & Roselin, L. S. (2018). Recent progress in photochemical reaction on main components of some essential oils. *Journal of Saudi Chemical Society*, 22(7), 855–875. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2018.01.008>
- Koul, O., Walia, S., & Dhaliwal, G. S. (2008). Essential oils as green pesticides: Potential and Constraints. *Biopestic Int*, 4(1), 63–84.
- Kumar, S., Nehra, M., Dilbaghi, N., Marrazza, G., Hassan, A. A., & Kim, K. H. (2019). Nano-based smart pesticide formulations: Emerging opportunities for agriculture. *Journal of Controlled Release*, 294(December 2018), 131–153. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.12.012>
- Likens, S. T., & Nickerson, G. B. (1964). Detection of Certain Hop Oil Constituents in Brewing Products. *Journal of the ASBC*. <https://doi.org/10.1080/00960845.1964.12006730>
- Maes, C., Bouquillon, S., & Fauconnier, M. L. (2019). Encapsulation of essential oils for the development of biosourced pesticides with controlled release: A review. *Molecules*, 24(14), 1–15. <https://doi.org/10.3390/molecules24142539>
- Manion, C. R., & Widder, R. M. (2017). Essentials of essential oils. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 74(9), e153–e162. <https://doi.org/10.2146/ajhp151043>
- Markus, Arie. (2006). *Advances in the Technology for Controlled-Release Pesticide Formulations*. In: Benita, S, ed. *Drugs and the Pharmaceutical Sciences, Microencapsulation: Methods and Industrial Applications* (Vol. 158).
- Martins, I. M., Barreiro, M. F., Coelho, M., & Rodrigues, A. E. (2014). Microencapsulation of essential oils with biodegradable polymeric carriers for cosmetic applications. *Chemical Engineering Journal*, 245,

191–200. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.02.024>

Mishra, M. (2016). *Handbook of Encapsulation and Controlled Release*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b19038>

Moretti, M. D. L., Sanna-Passino, G., Demontis, S., & Bazzoni, E. (2002). Essential oil formulations useful as a new tool for insect pest control. *AAPS PharmSciTech*, 3(2). <https://doi.org/10.1208/pt030213>

Muro-Suñé, N., Gani, R., Bell, G., & Shirley, I. (2005). Predictive property models for use in design of controlled release of pesticides. *Fluid Phase Equilibria*, 228–229, 127–133. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2004.08.007>

Murtaza, G. (2012). Ethylcellulose microparticles: a review. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 69(1), 11–22.

Paulo, F., & Santos, L. (2018). Double emulsion solvent evaporation approach as a novel eugenol delivery system – Optimization by response surface methodology. *Industrial Crops and Products*, 126(May), 287–301. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.10.027>

Pérez-Martínez, J. I., Morillo, E., Maqueda, C., & Ginés, J. M. (2001). Ethyl cellulose polymer microspheres for controlled release of norfluazon. *Pest Management Science*, 57(8), 688–694. <https://doi.org/10.1002/ps.339>

Pollien, P., & Chaintreau, A. (1997). Simultaneous Distillation-Extraction: Theoretical Model and Development of a Preparative Unit. *Analytical Chemistry*, 69(16), 3285–3292. <https://doi.org/10.1021/ac9701905>

Răileanu, M., Todan, L., Voicescu, M., Ciuculescu, C., & Maganu, M. (2013). A way for improving the stability of the essential oils in an environmental friendly formulation. *Materials Science and Engineering C*, 33(6), 3281–3288. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.04.012>

Ritger, P. L., & Peppas, N. A. (1987a). A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-Fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. *Journal of Controlled Release*, 5, 23–36.

Ritger, P. L., & Peppas, N. A. (1987b). A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices. *Journal of Controlled Release*, 5, 37–42.

Roy, A., Singh, S. K., Bajpai, J., & Bajpai, A. K. (2014). *Controlled pesticide release from biodegradable polymers*. 12(4), 453–469. <https://doi.org/10.2478/s11532-013-0405-2>

Sangwan, N. S., Farooqi, A. H. A., Shabih, F., & Sangwan, R. S. (2001). Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regulation*, 34(1), 3–21. <https://doi.org/10.1023/A:1013386921596>

- Sarikurkcü, Cengiz, Eryigit, Feryat, Cengiz, Mustafa, Tepe, Bektas, Cakir, Ahmet, & Mete, Ebru. (2012). Screening of the antioxidant activity of the essential oil and methanol extract of mentha pulegium L. from Turkey. *Spectroscopy Letters*, 45(5), 352–358. <https://doi.org/10.1080/00387010.2012.666701>
- Singh, A., Dhiman, N., Kar, A. K., Singh, D., Purohit, M. P., Ghosh, D., & Patnaik, S. (2019). Advances in controlled release pesticide formulations: Prospects to safer integrated pest management and sustainable agriculture. *Journal of Hazardous Materials*, October, 121525. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121525>
- Sittipummongkol, K., & Pechyen, C. (2018). Production, characterization and controlled release studies of biodegradable polymer microcapsules incorporating neem seed oil by spray drying. *Food Packaging and Shelf Life*, 18(December 2017), 131–139. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2018.09.001>
- Sopeña, F., Cabrera, A., Maqueda, C., & Morillo, E. (2007). Ethylcellulose formulations for controlled release of the herbicide alachlor in a sandy soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(20), 8200–8205. <https://doi.org/10.1021/jf071459g>
- Sopeña, F., Maqueda, C., & Morillo, E. (2009). Controlled release formulations of herbicides based on micro-encapsulation. *Ciencia e Investigacion Agraria*, 36(1), 27–42. <https://doi.org/10.4067/S0718-16202009000100002>
- Sun, C., Shu, K., Wang, W., Ye, Z., Liu, T., Gao, Y., Zheng, H., He, G., & Yin, Y. (2014). Encapsulation and controlled release of hydrophilic pesticide in shell cross-linked nanocapsules containing aqueous core. *International Journal of Pharmaceutics*, 463(1), 108–114. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.12.050>
- Teixeira, B., Marques, A., Ramos, C., Batista, I., Serrano, C., Matos, O., Neng, N. R., Nogueira, J. M. F., Saraiva, J. A., & Nunes, Maria Leonor. (2012). European pennyroyal (*Mentha pulegium*) from Portugal: Chemical composition of essential oil and antioxidant and antimicrobial properties of extracts and essential oil. *Industrial Crops and Products*, 36(1), 81–87. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.08.011>
- Teixeira, S., Mendes, A., Alves, A., & Santos, L. (2007). Simultaneous distillation-extraction of high-value volatile compounds from *Cistus ladanifer* L. *Analytica Chimica Acta*, 584(2), 439–446. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.11.054>

Anexo A – Padrões de calibração

Tabela A 1. Preparação dos padrões de calibração

Padrão	C (mg/L)	V _{MIX} 100 mg/L (μL)	V _{PI} 100 mg/L (μL)	V _{n-Hexano} (μL)
P1	1	10	50	940
P2	5	50	50	900
P3	10	100	50	850
P4	20	200	50	750
P5	30	300	50	650
P6	40	400	50	550
P7	50	500	50	450

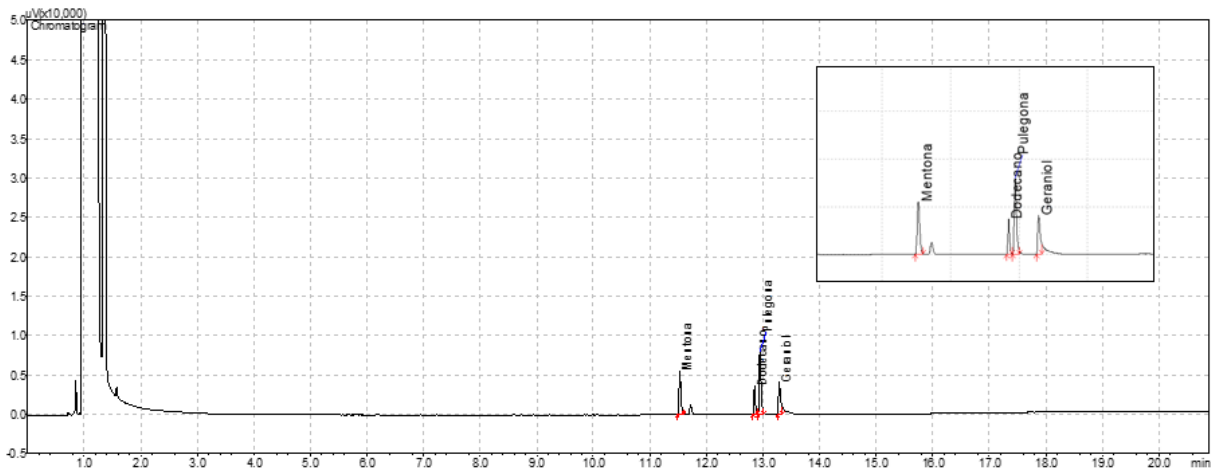


Figura A 1. Cromatograma obtido por injeção do padrão P4 no CG-DIC

Anexo B – Parâmetros estatísticos

A dispersão dos valores das retas de calibração obtidas para cada um dos compostos foi determinada através do desvio padrão dos resíduos da linearização de y sobre x ($s_{y/x}$) e é representada da seguinte forma

$$s_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}} \quad (\text{B.1})$$

onde y_i corresponde aos valores das áreas obtidas experimentalmente, $\hat{y}_i$ aos valores das áreas calculadas com base no ajuste linear para cada valor de x e n ao número de pontos experimentais.

As variâncias do declive (s_a^2) e da ordenada na origem (s_b^2) foram determinadas através das seguintes expressões, respetivamente,

$$s_a^2 = \frac{\frac{s_y^2}{x}}{\sum (x_i - \bar{x}_i)^2} \quad (\text{B.2})$$

$$s_b^2 = \frac{s_{y/x}^2 \sum x_i^2}{n \sum (x_i - \bar{x}_i)^2} \quad (\text{B.3})$$

em que x_i corresponde aos valores das concentrações, $\bar{x}_i$ ao valor médio das concentrações e n ao número de pontos experimentais.

Anexo C - Análise Cromatográfica dos extratos de *Mentha pulegium* L.

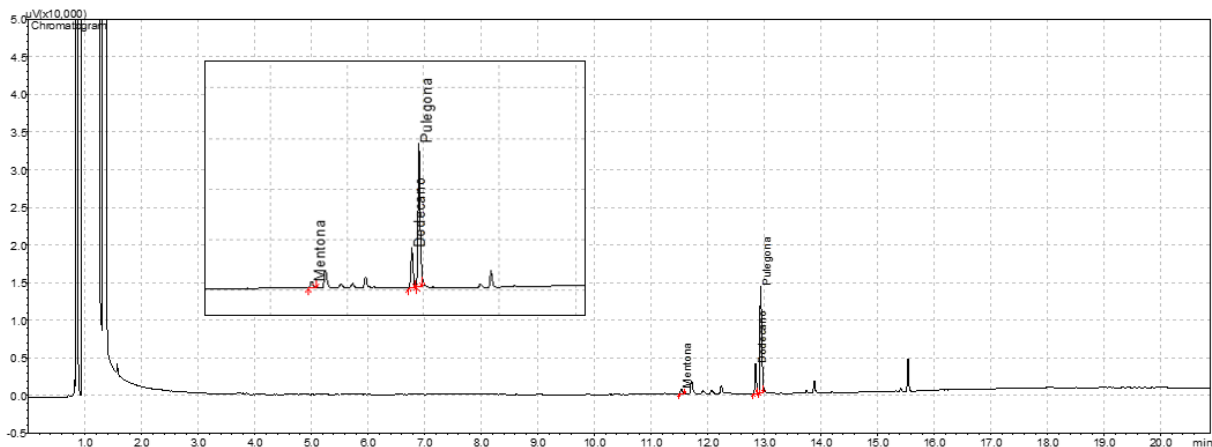


Figura C 1. Cromatograma com identificação dos compostos em estudo obtido após injeção do primeiro extrato no CG-DIC

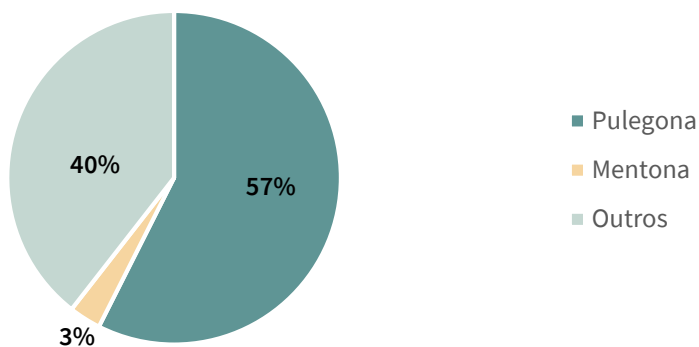


Figura C 2. Valores percentuais dos compostos de interesse presentes no primeiro extrato, obtidos por análise cromatográfica

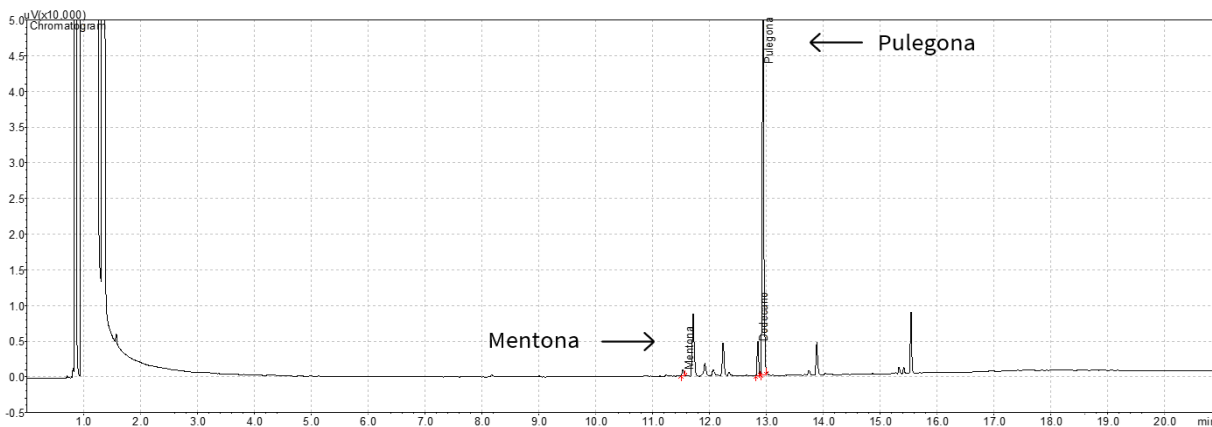


Figura C 3. Cromatograma com identificação dos compostos em estudo obtido após injeção do segundo extrato no CG-DIC

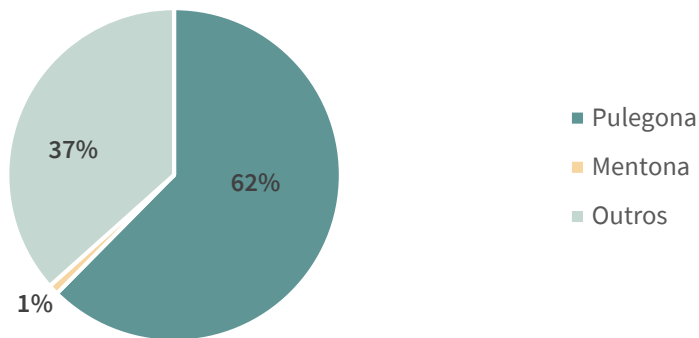


Figura C 4. Valores percentuais dos compostos de interesse presentes no segundo extrato, obtidos por análise cromatográfica

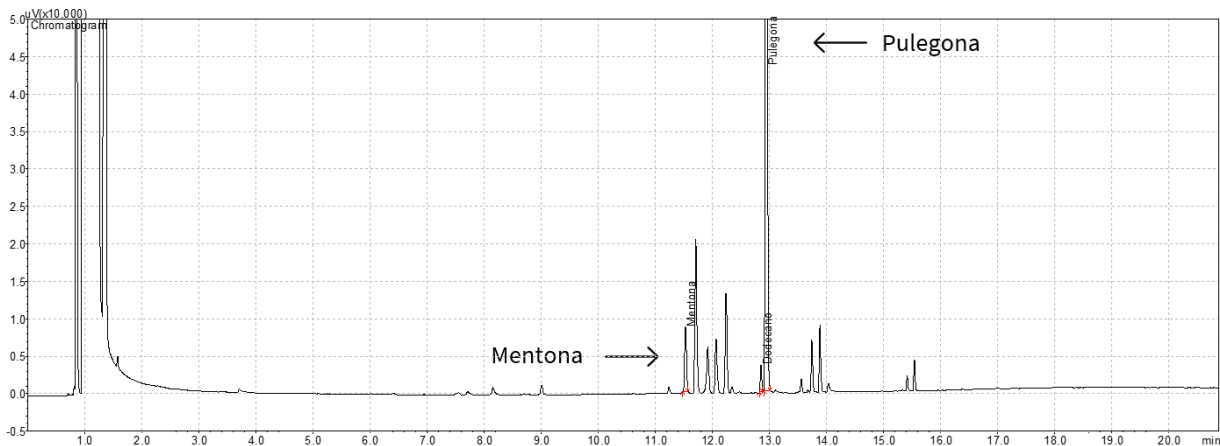


Figura C 5. Cromatograma com identificação dos compostos em estudo obtido após injeção do terceiro extrato no CG-DIC

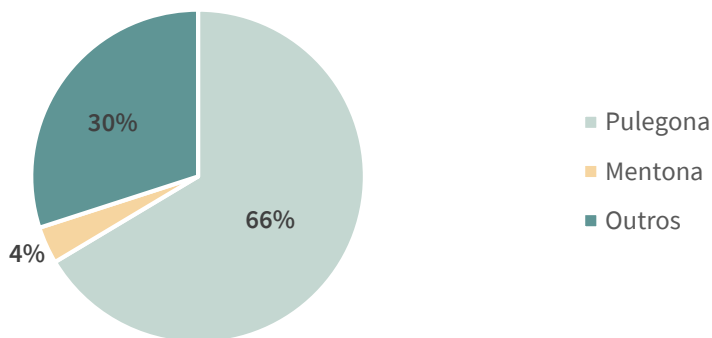


Figura C 6. Valores percentuais dos compostos de interesse presentes no terceiro extrato, obtidos por análise cromatográfica

Anexo D – Eficiência de Encapsulação

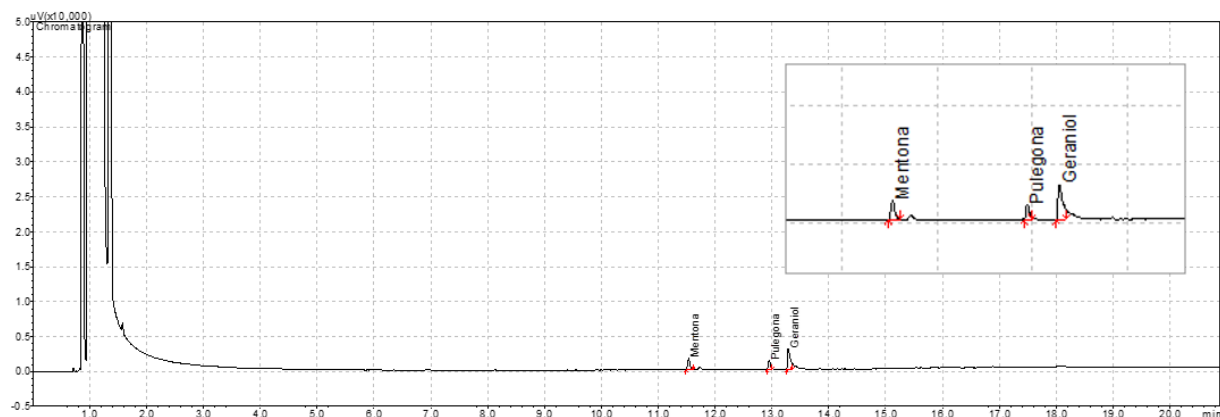


Figura D 1. Análise quantitativa obtida por CG-DIC dos compostos retidos nas micropartículas dos compostos padrão para um loading de 5 % (m/m)

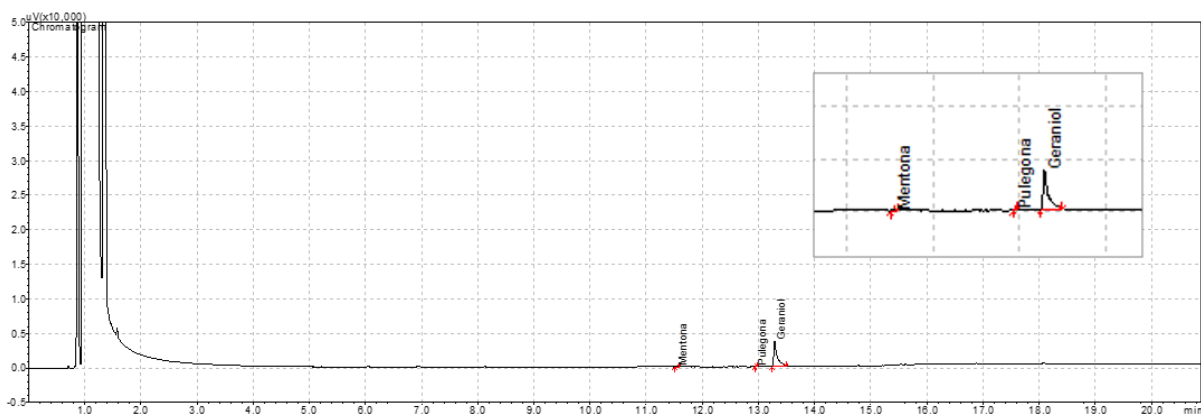


Figura D 2. Análise quantitativa obtida por CG-DIC dos compostos retidos nas micropartículas dos compostos padrão para um loading de 10 % (m/m)

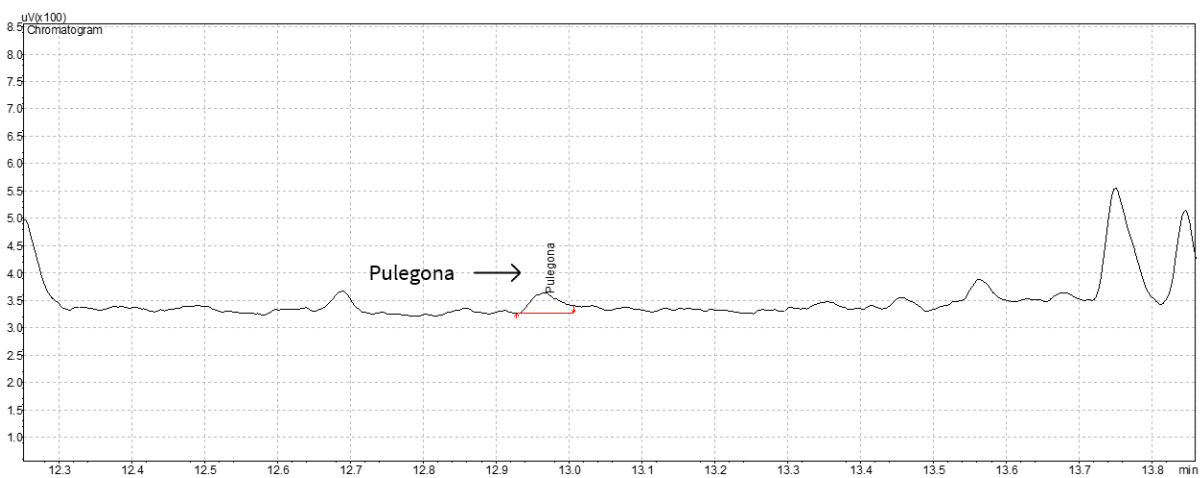


Figura D 3. Análise quantitativa obtida por CG-DIC dos compostos retidos nas micropartículas de extrato

Anexo E – Estudo de libertação

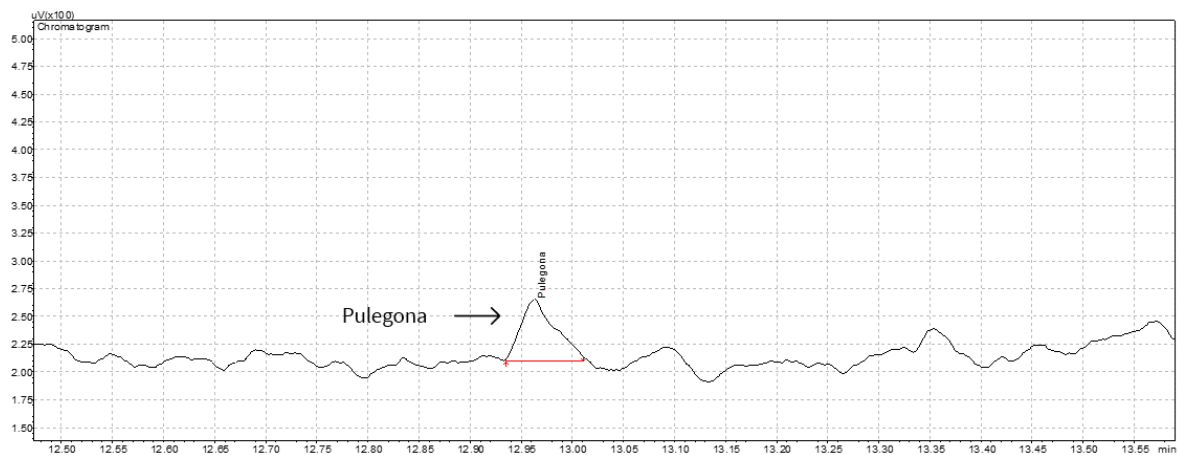


Figura E 1. Cromatograma obtido por injeção de um dos triplicados recolhidos após 24h do início do estudo de libertação

Tabela E 1. Resultados do estudo de libertação da pulegona obtidos por análise cromatográfica das amostras no CG-DIC

Horas (h)	C _{média} (mg/L)	CV (%)	Libertação (%)
24	13,89	1,2	325,3
48	13,99	0,6	327,6
72	14,34	1,8	335,6
96	13,90	0,3	325,4