

Mestrado Integrado em Engenharia Química

Estudos preliminares da microencapsulação do extrato do gerânio (*Pelargonium graveolens*)

Dissertação de Mestrado

de

Carolina Maria Machado Gomes Dias

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 2019

“There are no elevators to success.

You have to take the stairs”

Agradecimentos

Antes de mais, gostaria de agradecer à minha orientadora, a Professora Lúcia Santos, por me proporcionar a oportunidade de explorar este tema tão interessante, por me ter orientado sempre na direção correta e pela disponibilidade que sempre demonstrou em todos os momentos e em todas as dúvidas que foram surgindo durante o projeto.

À Doutora Patrícia Domingues por todo o apoio, por toda a ajuda prestada, por todo o conhecimento transmitido e por toda a orientação ao longo destes meses.

À Engenheira Filipa Paulo pela forma incansável e paciente e pela forma como contornou todos os obstáculos que foram aparecendo, por ter dispensado do seu tempo para me orientar neste projeto e por tê-lo conduzido a bom porto.

A todo o grupo do laboratório do 201 do Departamento de Engenharia Química, por todo o carinho e por toda a boa disposição, por me ter acolhido de uma forma tão calorosa e tão genuína e por terem tornado estes meses de trabalho ainda mais felizes e com mais garra para trabalhar mais e mais.

À Faculdade de Engenharia e ao Departamento de Engenharia Química por terem disponibilizado todos os recursos e todos os meios para a realização desta tese. Ao engenheiro José Luís e à Fátima que nunca negaram ajuda e estiveram sempre prontamente disponíveis para ajudar quando era necessário.

À minha grande amiga Mariana Pinheiro por toda a paciência para os meus desabaços, por todo o carinho que sempre me deu ao longo destes meses, por toda a boa disposição em todos os dias e sobretudo pela amizade que fomos construindo ao longo dos anos e que nos permitiu esta ligação carinhosa e de entre ajuda. À minha grande amiga Rafaela Costa que embora não estivesse presente pessoalmente todos os dias, sempre me deu uma palavra de incentivo, de amizade, de carinho para que eu sempre me mantivesse firme neste projeto.

Por último, e não menos importante, quero agradecer ao meu marido e à minha família por me terem acompanhado nesta jornada e por todas as palavras de incentivo, mantendo-me sempre focada e de corpo e alma nesta tese. Sem o apoio incondicional deles, nada disto seria tão fácil.

Este trabalho foi financiado por: Unidade de Investigação UID/EQU/00511/2019 - Laboratório de Engenharia de Processos, Ambiente, Biotecnologia e Energia - LEPABE - financiado por fundos nacionais através da FCT/MCTES (PIDDAC); Projeto “LEPABE-2-ECO-INNOVATION”, com a referência NORTE-01-0145-FEDER-000005, cofinanciado pelo Programa Operacional Regional do Norte (NORTE 2020), através do Portugal 2020 e do Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER).



Resumo

Atualmente, o consumo de produtos de origem sintética tem aumentado, assim como a preocupação da humanidade em relação aos seus efeitos nocivos para o meio ambiente e para o ser humano. Assim, a procura de alternativas naturais em detrimento dos compostos sintéticos resultou num elevado interesse pelos óleos essenciais de plantas. Os óleos essenciais têm sido constantemente aplicados nos diversos setores da indústria, sendo ajustadas as técnicas de extração ao propósito a que estes se destinam. Embora se tratem de produtos naturais e com características relevantes como a biodegradabilidade e biocompatibilidade, estes também possuem desvantagens a contornar na sua aplicação. É neste sentido que a microencapsulação de óleos essenciais tem sido cada vez mais estudada, documentada e aplicada, estando, por isso, em constante evolução. Nesta dissertação o objetivo principal foi realizar a microencapsulação do óleo essencial de gerânio previamente extraído recorrendo ao método de extração e destilação em simultâneo (SDE).

Neste estudo, realizou-se a extração do OE do gerânio pelo método de extração e destilação em simultâneo (SDE) e posterior microencapsulação. Após extração, efetuou-se a quantificação de alguns compostos de interesse por cromatografia gasosa com detetor de ionização de chama (GC-FID) tendo-se validado o método, obtendo-se as retas de calibração dos compostos em estudo: citrionelol, geraniol, terpineol, pulegona e eugenol. A validação do método analítico cumpriu todos os critérios. Verificou-se que os compostos que existiam maioritariamente no extrato obtido eram o citrionelol e o geraniol, sendo a eficiência de extração de 67,5% e 60,0%, respetivamente. Na microencapsulação foram efetuados alguns estudos preliminares utilizando os compostos maioritários do gerânio, recorrendo a diferentes técnicas para a seleção da mais promissora. Deste modo foram efetuadas as técnicas de coacervação e a múltipla emulsão, após as quais as micropartículas foram caracterizadas ao nível da morfologia (*scanning electron microscopy*) e da distribuição de tamanho (granulometria a laser). Assim, a análise da distribuição de tamanho revelou um tamanho médio das micropartículas de 65 μm . Para além disso, a análise da morfologia permitiu verificar a formação de micropartículas no procedimento da múltipla emulsão, ao contrário da coacervação, na qual se verificaram apenas estruturas em forma de placa bastante porosas, sem formação de micropartículas.

Assim, concluiu-se que foi possível a obtenção de extratos que poderão ser incorporados em matrizes poliméricas.

Palavras Chave (Tema): Gerânio (*Pelargonium graveolens*), óleos essenciais, extração SDE, microencapsulação, múltipla emulsão

Abstract

Currently, the use of synthetic products has increased, as well as the humanity concern in relation to its harmful effects for the environment and human beings. Thus, the search for natural alternatives besides of synthetic compounds resulted in an increased interest for essential oils of the plants. Essential oils have been constantly applied in diverse industrial sectors, with extraction techniques being adjusted depending on its application. Although they are natural products with promising characteristics, such as, being biodegradable and biocompatible, like other substances they also possess disadvantages in their applications that need to be overcome. It is in this direction that the microencapsulation of essential oils has been increasingly more studied, documented and applied, being, therefore, in constant evolution. In this dissertation the main objective was to perform the microencapsulation of the previously extracted essential oil using the simultaneous extraction and distillation method (SDE).

In this study extraction of geranium essential oil was performed using the simultaneous distillation and extraction method (SDE), after which, the oil was microencapsulated. Following the extraction, quantification of some compounds of interest was performed by gaseous chromatography with a flame ionization detector (GC-FID). The quantification method was validated, by determining the calibration curves of the studied compounds: citronelol, geraniol, terpineol, pulegone and eugenol. The validation of the analytical method fulfilled all the criteria. It was verified that the predominant compounds in the essential oil were citronelol and geraniol, achieving extraction efficiencies of 67,5% and 60,0%, respectively. Preliminary studies for microencapsulation were performed using the two most predominant compounds found in geranium to assess which was the most promising microencapsulation technique. As such, the coacervation and multiple emulsion techniques were used, after which the microparticles were characterized regarding their morphology (scanning electron microscopy) and size distribution (laser diffraction granulometry). Thus, the analysis of the size distribution revealed a mean microparticle size of 65 μm . In addition, multiple emulsion procedure resulted in microparticles formation, in contrast to coacervation, in which only plate porous structures were observed, without formation of microparticles.

Thus, it was concluded that it was possible to obtain extracts that could be incorporated into polymer matrices.

Key words (Theme): Geranium (*Pelargonium graveolens*), essential oils, SDE extraction, microencapsulation, multiple emulsion

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.

(Carolina Maria Machado Gomes Dias)

11 de fevereiro de 2019

Índice

1	Introdução.....	1
1.1	Enquadramento	1
1.2	Objetivos da tese	5
1.3	Organização e estrutura da tese	6
2	Contexto e Estado da Arte	9
2.1	Técnicas De Extração de Óleos Essenciais	10
2.1.1	Hidrodestilação	10
2.1.2	Extração por fluido supercrítico (SFE).....	11
2.1.3	Destilação a vapor	11
2.1.4	Destilação e extração simultânea (SDE)	11
2.2	Microencapsulação de OEs	17
2.2.1	Técnicas de microencapsulação	18
2.2.2	Agentes encapsulantes	19
2.2.3	Técnicas de caracterização das micropartículas	21
3	Materiais e Métodos	23
3.1	Materiais.....	23
3.1.1	Material vegetal e reagentes.....	23
3.1.2	Equipamento	24
3.2	Métodos	25
3.2.1	Preparação de padrões analíticos.....	25
3.2.2	Extração do óleo essencial	25
3.2.3	Análise do óleo essencial	26
3.2.4	Microencapsulação.....	26
3.2.5	Gestão de resíduos.....	28
4	Resultados e Discussão.....	29
4.1	Validação do método analítico	29
4.2	Extração por SDE do padrão analítico.....	31

4.3	Extração do gerânio pelo método SDE	32
4.4	Microencapsulação.....	34
4.4.1	Rendimento de produção das micropartículas.....	34
4.4.2	Morfologia das micropartículas	35
4.4.3	Distribuição de tamanho das micropartículas.....	37
5	Conclusões	39
6	Avaliação do trabalho realizado.....	41
6.1	Objetivos Realizados	41
6.2	Limitações e Trabalho Futuro	41
6.3	Apreciação Final	41
Anexo A.....	49
Anexo B.....	53

Índice de Figuras

<i>Figura 1: Número de publicações de extração de OEs acessíveis em Web of Science (critério de pesquisa: extraction* and essential oil*). Dados obtidos em 1/02/2019</i>	<i>1</i>
<i>Figura 2: Gerânio (Pelargonium graveolens).....</i>	<i>4</i>
<i>Figura 3: Principais áreas de aplicações do óleo essencial do gerânio</i>	<i>5</i>
<i>Figura 4: PRISMA obtido a partir das bases de dados Web of Science e Scopus(critério de pesquisa: Extract* and oil* and nome da espécie (Mentha Pulegium L. ou Mentha Spicata ou Pelargonium graveolens).....</i>	<i>9</i>
<i>Figura 5: Métodos de extração mais descritos na literatura para as três espécies da pesquisa.....</i>	<i>10</i>
<i>Figura 6: (1)- Representação do processo SDE (A: Condensador, B e G: Braço; C: Balão com fase orgânica, D: Zona de separação de fases, E: Manta de aquecimento, F: Balão com fase aquosa; (2)- Imagem real do equipamento.....</i>	<i>12</i>
<i>Figura 7: Esquema das micropartículas. A-Microcápsula; B-Microesfera.....</i>	<i>18</i>
<i>Figura 8: Principais técnicas de microencapsulação</i>	<i>19</i>
<i>Figura 9: Esquema representativo do processo de coacervação: A- Formação da emulsão óleo em água; B- Emulsificação; C- Coacervação; D- Endurecimento</i>	<i>19</i>
<i>Figura 10: Equipamento para análise da morfologia das micropartículas: Scanning electron microscopy (SEM).....</i>	<i>22</i>
<i>Figura 11: Equipamento para análise da distribuição de tamanho das micropartículas - Coulter Counter-LS 230 Particle Size Analyzer (granulometria laser)</i>	<i>22</i>
<i>Figura 12: Esquema representativa do procedimento da coacervação</i>	<i>27</i>
<i>Figura 13: Esquema representativo do procedimento de coacervação com surfactante</i>	<i>27</i>
<i>Figura 14: Esquema representativo do procedimento da múltipla emulsão.....</i>	<i>28</i>
<i>Figura 15: Cromatograma obtido pelo GC-FID do padrão P5 (composição/concentrações apresentada na tabela A1).....</i>	<i>29</i>
<i>Figura 16: Valores de coeficientes de variação (CV%) e das eficiências de extração (EE%) para todos os compostos.....</i>	<i>32</i>
<i>Figura 17: Cromatograma obtido por GC-FID de extrato de gerânio</i>	<i>33</i>
<i>Figura 18: Valores percentuais de cada composto no extrato. Resultados obtidos a partir de três extrações de gerânio e análise em duplicado por GC-FID.....</i>	<i>33</i>
<i>Figura 19: Micropartículas obtidas a partir do método da múltipla emulsão).....</i>	<i>36</i>
<i>Figura 20: : Micropartículas obtidas a partir da técnica de coacervação</i>	<i>37</i>
<i>Figura 21: Distribuição em volume das micropartículas</i>	<i>38</i>

Índice de Tabelas

<i>Tabela 1: Características dos principais compostos do gerânio (Pelargonium graveolens)</i>	<i>7</i>
<i>Tabela 2: Sumário de alguns estudos do Pelargonium graveolens reportados na literatura</i>	<i>15</i>
<i>Tabela 3: Exemplos de agentes encapsulantes.....</i>	<i>20</i>
<i>Tabela 4: Características dos reagentes e compostos utilizados</i>	<i>23</i>
<i>Tabela 5: Especificações das condições usadas no GC-FID</i>	<i>24</i>
<i>Tabela 6: Parâmetros para validação do método analítico.....</i>	<i>30</i>
<i>Tabela 7: Gama de linearidade e limites de detecção de quantificação para cada composto</i>	<i>30</i>
<i>Tabela 8: Compostos voláteis encontrados no extrato de gerânio</i>	<i>34</i>
<i>Tabela 9: Massas dos polímeros, do óleo essencial e das micropartículas após liofilização (mg)</i>	<i>35</i>
<i>Tabela 10: Dados da distribuição média de tamanho obtidos a partir da granulometria a laser</i>	<i>37</i>

Glossário

Letras Romanas

a	Sensibilidade	
b	Interseção da regressão	
C	Concentração	mg L ⁻¹
$C_{injetada}$	Concentração injetada	mg L ⁻¹
$C_{Padrão}$	Concentração do composto no padrão	mg L ⁻¹
$C_{sem PI}$	Concentração sem padrão interno	mg L ⁻¹
m	Massa	mg
M	Média	µm
S_a	Desvio padrão do declive	
$\frac{S_a}{a}$	Desvio padrão relativo do declive	
S_b	Desvio padrão da interseção da regressão	
tS_a	Intervalo de confiança do parâmetro a	
tS_b	Intervalo de confiança do parâmetro b	
$V_{diluído}$	Volume de extrato diluído	mL
V_F	Volume final do vial para injeção no GC-FID	mL
W_M	Massa das micropartículas após liofilização	mg
W_I	Massa do óleo essencial	mg
W_P	Massa dos polímeros utilizados na microencapsulação	mg

Abreviaturas

CMC	Carboximetilcelulose	
CV	Coeficiente de variação	%
DS	Desvio padrão	
EC	Etilcelulose	
EE	Eficiência de extração	%
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>	
FID	Detetor por ionização de chama	
GC	Cromatografia Gasosa	
GE	Gelatina	
LD	Limite de deteção	mg L ⁻¹

LQ	Limite de quantificação	mg L ⁻¹
MHG	<i>Microwave hydrodiffusion and gravity</i>	
MWHD	<i>Microwave-assisted hydrodistillation</i>	
MS	Espectrometria de massa	
N/D	Não disponível	
NaCMC	Carboximetilcelulose de sódio	
OEs	Óleos essenciais	
PEO	Poli(óxido de etileno)	
PDI	<i>Poly dispersive index</i>	
PLGA	Poli(ácido láctico-co-glicólico)	
PRISMA	<i>Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses</i>	
PVA	Álcool polivinílico	
R	Coeficiente de correlação	
R ²	Coeficiente de correlação quadrático	
RA	Razão entre a área do pico do composto e a área do pico do padrão interno	
R _{média}	Média dos RA	
RSD	<i>Relative standard deviation</i>	
RP	Rendimento do produto	%
rpm	Rotações por minuto	
SDE	Processo de Destilação e Extração Simultânea	
SEM	<i>Scanning Electron Microscopy</i>	
SFE	Extração com fluido supercrítico	
S/N	<i>Signal-to-noise ratio</i>	
SPME	Microextração em fase sólida	
TOF	<i>Time-of-flight</i>	
UPW	Água Ultrapura	

1 Introdução

1.1 Enquadramento

Atualmente, a degradação do meio ambiente, com o conseqüente aumento do aquecimento global, e o aumento da mortalidade associada às doenças do século XXI como o cancro, a diabetes, entre outras, tem despertado a atenção da sociedade. Em busca de possíveis alternativas para erradicar ou atenuar estas problemáticas, a investigação tem centrado o seu interesse na diminuição do uso de produtos químicos nocivos para o ambiente e seres vivos, apostando em substâncias naturais, biodegradáveis e com propriedades menos prejudiciais para o ser humano. Assim, surgem os óleos essenciais (OEs) como uma fonte natural, biodegradável, biocompatível e com baixa toxicidade em detrimento dos compostos sintéticos. Os OEs têm ganho um renovado interesse nas mais diversas áreas, devido à sua origem natural e às suas características físico-químicas, que lhes tem conferido uma elevada importância nas diferentes indústrias (Asbahani *et al.*, 2015).

Deste modo, a investigação científica nesta área de estudo tem sido pautada no sentido do estudo da composição dos OEs bem como das suas propriedades e respetivas aplicações (B. Teixeira *et al.*, 2012). Como se pode verificar pela análise da Figura 1 sobre as publicações submetidas desde o ano 2000, os OEs têm despertado um crescente interesse, como é comprovado pelo aumento das publicações submetidas relativas à sua extração.



Figura 1: Número de publicações de extração de OEs acessíveis em Web of Science (critério de pesquisa: *extraction* and essential oil**). Dados obtidos em 1/02/2019

Os OEs, também conhecidos como óleos voláteis, consistem em misturas líquidas oleosas (com características tipicamente lipofílicas) com aroma, pertencentes ao grupo dos óleos naturais voláteis e odoríferos e geralmente derivados de compostos como o terpeno e o benzeno (Cammack, Richard; Attwood, Teresa K.; Campbell, Peter N.; Parish, J. Howard; Smith, Anthony D.; Stirling, John L.; Vella, 2006). Estes podem ser biossintetizados em diferentes órgãos da planta como metabolitos secundários, sendo produzidos e armazenados em tecidos secretores especializados nas plantas. Esses tecidos são divididos em 2 tipos, resultando assim em 2 tipos de secreção: secreção exógena e secreção endógena. Na secreção exógena, estes tecidos ocorrem nas superfícies das plantas e geralmente segredam os OEs diretamente para o exterior da planta enquanto que na secreção endógena, os tecidos segredam para espaços intercelulares especializados (Svoboda & Greenaway, 2003). Deste modo, esta mistura de substâncias pode ser obtida a partir de qualquer secção da planta como flores, folhas, caules, casca de troncos, raízes, entre outras (Burt, 2004).

Aprovados pela FDA (*Food and Drug Administration*) como substâncias seguras, os OEs têm conquistado cada vez mais indústrias, salientando as suas características em cada produto no qual se encontra inserido. Dada à sua composição química complexa, composta muitas vezes por mais de 100 compostos terpênicos, os OEs têm um amplo espectro de atividade antimicrobiana e biológica e, por esse motivo, é que a área da medicina tem tirado partido das atividades bactericidas, viricidas, fungicidas e biocidas dos OEs. Para além disso, estudos revelaram um avanço no que diz respeito às bactérias multirresistentes, fruto do uso excessivo de antibióticos e medicamentos como terapêutica anti-inflamatória e anti-microbiana (Asbahani *et al.*, 2015; Mayaud, Carricajo, Zhiri, & Aubert, 2008). Na indústria farmacêutica, os OEs estão incluídos em muitas formulações tais como cápsulas (nomeadamente em medicamentos), cremes, aerossóis, *sprays*, entre outros. Contudo, a indústria alimentar é uma das áreas com uma maior procura e exigência, consequência dos desafios desta área. Assim, os OEs não só se aplicam como conservantes dos alimentos, como também na ajuda ao combate de microrganismos patogénicos que podem gerar intoxicações alimentares graves (Asbahani *et al.*, 2015; Burt, 2004). Por esse motivo, a alimentação dos animais também suscitou preocupação dada a possibilidade da transmissão de bactérias resistentes dos animais para o ser humano. Os OEs surgem como uma alternativa, bem conhecida e documentada, na alimentação dos animais em detrimento dos aditivos e antibióticos sintéticos promotores do crescimento, uma vez que a utilização destes se encontra proibida desde 2006 na União Europeia (Castanon, 2007). Assim, como se pode verificar através de diversos estudos, são cada vez mais as áreas da indústria que têm apostado nesta alternativa, evoluindo constantemente o modo e o objetivo da aplicação em questão.

Desde as técnicas convencionais às mais evoluídas, a seleção da técnica mais adequada para a extração dos OEs deve ter em conta a secção da planta utilizada. Assim, existe disponível uma elevada diversidade de técnicas de extração tais como a expressão e a enfloragem, entre muitas outras. A escolha da técnica de extração dos OEs baseia-se nas principais características desejadas do OE, por exemplo: são requeridas técnicas diferentes se for pretendido um extrato com maior teor de compostos com baixos pontos de ebulição *versus* a obtenção de extratos com compostos de elevado ponto de ebulição, ou ainda se o critério for obter OEs com solubilidade em óleo ou água diferentes (mais ou menos lipofílicos).

De entre as técnicas supra-mencionadas, a técnica de expressão tem deixado de ser amplamente utilizada tanto a nível laboratorial como industrial e outras técnicas de extração têm recebido maior atenção na área da extração de OEs. Assim, são técnicas como a hidrodestilação, a destilação a vapor, a extração por fluido supercrítico (SFE), a extração por Soxhlet, a extração com solvente, a extração assistida por micro-ondas, a extração de destilação e a extração simultânea (SDE), que são utilizadas para a obtenção de OEs (Burt, 2004).

Apesar de todas as características benéficas dos OEs nas mais diversas vertentes, estes são compostos instáveis e, conseqüentemente, podem ser facilmente degradáveis fruto da oxidação, da volatilização, da luz e do aquecimento. Assim, para contornar algumas destas desvantagens, torna-se necessário a sua proteção destes fatores externos, aumentando, por conseqüente, a sua estabilidade. Deste modo, a microencapsulação apresenta-se como uma alternativa para estes compostos hidrofóbicos, permitindo encapsular os OEs através da utilização de um agente encapsulante, geralmente polimérico, criando uma barreira às condições extremas do meio. Portanto, surgem melhorias na atividade, na estabilidade e durabilidade perante as condições externas (Asbahani *et al.*, 2015; Hong & Park, 1999).

Os OEs são constituídos por compostos de natureza fitoquímica que estão amplamente presentes nas plantas. Existem diversas espécies de plantas cujos OEs podem ser aplicados nas mais vastas áreas da indústria nomeadamente alimentar, farmacêutica, médica, cosmética, entre outras. O *Pelargonium Graveolens* (Figura 2), também conhecido como gerânio ou gerânio rosa (terminologia devida à cor das suas flores e ao seu aroma rosado) é uma espécie de fácil obtenção e com interessantes características não só a nível do aroma, mas também das suas propriedades antioxidantes, antimicrobianas, entre outras. Esta foi a espécie escolhida para estudar neste projeto, nomeadamente a obtenção de extratos e posterior microencapsulação dos mesmos.

O *Pelargonium graveolens*, é uma planta das cerca de 270 espécies do género *Pelargonium*, pertencente à família *Geraniaceae*. Embora a região do sul de África seja a predominante deste género, nem todas as espécies se encontram lá e, por esse motivo, é que o gerânio pode ser

encontrado em várias regiões, tal como em Portugal. No início do século XVII, o gerânio foi introduzido na Europa através do mercado de especiarias e de plantas medicinais (Ćavar & Maksimović, 2012).



Figura 2: Gerânio (*Pelargonium graveolens*)

Apesar do seu odor ser a característica mais amplamente apreciada, o OE do gerânio tem despertado cada vez mais interesse derivado aos diversos benefícios, tais como, o seu potencial antimicrobiano e antioxidante. O gerânio é conhecido como uma das plantas medicinais com mais atividade antioxidante e a sua utilização tem-se expandido para as mais diversas áreas. O seu OE tem sido utilizado, desde tempos remotos, como terapia alternativa, complementar e coadjuvante de algumas doenças e problemas fisiológicos nomeadamente o tratamento de hemorroidas, inflamações, fluxos menstruais intensos e até mesmo o cancro. Com o decorrer dos anos, diversas comunidades medico-científicas, tem apostado cada vez mais nesta alternativa natural como terapia alternativa para diversos problemas de saúde tais como úlceras gástricas, diarreia, problemas hepáticos, pedras nos rins, esterilidade e diabetes (Ben Slima *et al.*, 2013).

De facto, atualmente, o ser humano tem-se debatido com doenças como a diabetes, a esterilidade e o cancro e foi no sentido de combater estas doenças típicas do século XXI que foram surgindo cada vez mais estudos do OE de gerânio e das suas potencialidades a nível antimicrobiano e antioxidante. Assim, esses estudos vieram comprovar que de facto o gerânio pode ser uma alternativa terapêutica completamente segura para o tratamento da diabetes, uma vez que provoca efeitos hipoglicémicos, e pode ser útil na prevenção de complicações associadas ao stress oxidativo em pacientes diabéticos (Boukhris *et al.*, 2012). Segundo estudos publicados em 2013 na plataforma digital da Direção-Geral da Saúde, o cancro é uma das doenças incluídas nos programas de saúde prioritários e com previsão de acréscimo de novos casos na próxima década em cerca de 12,6% em Portugal, pelo que é uma doença que precisa de ser travada rapidamente, recorrendo a um maior número de rastreios precoces e de possíveis soluções para erradicar ou atenuar esta doença. Assim, e à semelhança da diabetes, também

foi explorado o OE do gerânio no sentido de travar esta doença cada vez mais expandida. Sendo assim, estudos revelaram que os seus componentes maioritários, o citronelol e o geraniol, podem ter propriedades anti-inflamatórias e anti cancerígenas (Fayed, 2009).

Embora os componentes presentes no OE do gerânio possam diferir tendo em conta o método de extração utilizado, a maioria dos compostos são a isomentona, linalol, formato de citronelol, formato de geraniol, sendo os maioritários o citronelol e o geraniol (Pandith *et al.*, 2017; Peterson *et al.*, 2006). Na Tabela 1 estão apresentadas algumas características dos principais compostos presentes no OE do gerânio.

Atualmente, a utilização do OE do gerânio tem-se expandido por diversas áreas, como se pode visualizar na Figura 3. Embora se encontre várias indústrias a utilizar o OE, é na indústria médica que se encontra uma maior aplicabilidade seguida das indústrias da perfumaria e cosmética, o que se traduz num crescente interesse por parte destas.

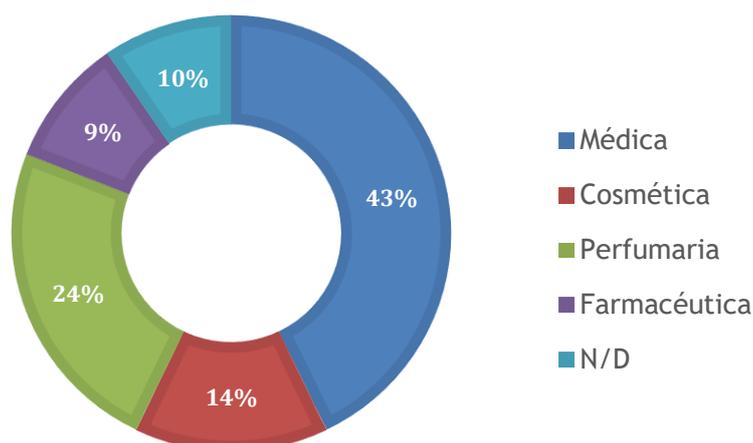


Figura 3: Principais áreas de aplicações do óleo essencial do gerânio

(N/D: não disponível)

1.2 Objetivos da tese

Os principais objetivos deste projeto foi a extração do OE da planta em estudo, o *Pelargonium graveolens*, pelo método de destilação e extração simultânea (SDE) e a quantificação dos principais componentes do extrato obtido por cromatografia gasosa com detetor de ionização de chama (GC-FID). Para além disso, será calculada a eficiência de extração de cada composto presente no OE, de modo a concluir se de facto o método de extração escolhido era adequado.

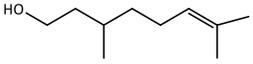
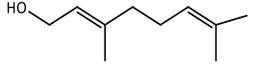
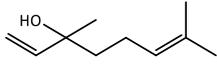
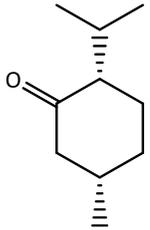
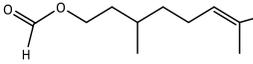
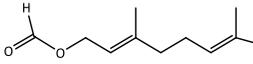
Numa fase posterior efetuar-se-á a microencapsulação do extrato obtido, atendendo às vantagens da técnica da microencapsulação na “preservação” dos OEs, iniciando a técnica de

microencapsulação pelo estudo das melhores condições experimentais, recorrendo aos padrões dos dois componentes maioritários existentes no extrato. Posteriormente efetuar-se-á a microencapsulação destes dois compostos e efetuou-se a caracterização das micropartículas: distribuição de tamanho das micropartículas e a respetiva morfologia.

1.3 Organização e estrutura da tese

Esta dissertação está dividida em 6 capítulos. No capítulo 1 é feito um breve enquadramento, no qual é apresentada a importância e o crescente interesse pela temática dos OEs bem como da planta em estudo e as respetivas características e aplicações do seu OE. No capítulo 2 é feita, numa primeira fase, a exposição da evolução dos métodos de extração do óleo essencial, bem como a explicação mais detalhada dos métodos mais utilizados e que posteriormente conduziram ao método escolhido para a extração do OE da planta em estudo. Numa segunda fase, e ainda parte integrante do capítulo 2, é apresentada informação relativa à técnica de microencapsulação: diferentes tipos de técnicas de microencapsulação; agentes encapsulantes e ainda caracterização das micropartículas obtidas. O capítulo 3 contém a listagem de todo o material necessário para a execução do projeto desta tese, bem como os métodos e os respetivos procedimentos. No capítulo 4 são apresentados os resultados obtidos e a discussão dos mesmos, permitindo assim retirar as conclusões de todos os procedimentos efetuados, conclusões essas que estão apresentadas no capítulo 5. Por último, no capítulo 6 é feita uma avaliação geral no que diz respeito aos objetivos a que esta tese se propôs e o seu cumprimento, são propostos alguns trabalhos futuros e estão ainda apresentadas as limitações presentes nesta tese. Este capítulo termina com uma apreciação final de todo o trabalho realizado.

Tabela 1: Características dos principais compostos do gerânio (*Pelargonium graveolens*)

Composto	Citronelol	Geraniol	Linalol	Isomentona	Formato de citronelol	Formato de geraniol
Estrutura Química						
Fórmula Química	C ₁₀ H ₂₀ O	C ₁₀ H ₁₈ O	C ₁₀ H ₁₈ O	C ₁₀ H ₁₈ O	C ₁₁ H ₂₀ O ₂	C ₁₁ H ₁₈ O ₂
Número CAS	106-22-9	106-24-1	78-70-6	18309-28-9	105-85-1	105-86-2
Peso molecular (g mol ⁻¹)	156,27	154,25	154,25	154,25	184,28	182,26
Ponto de ebulição (°C)	224	230	198	207	235	216
Solubilidade (mg L ⁻¹)	200	100	1590	180,5	N/D	N/D
Log Kow	3,91	3,56	2,97	2,87	N/D	N/D

N/D: não definido

2 Contexto e Estado da Arte

Para selecionar a espécie vegetal a estudar neste projeto, foi realizada uma pesquisa bibliográfica sobre três plantas, nomeadamente o gerânio, *Pelargonium graveolens*, o poejo, *Mentha Pulegium* e a hortelã, *Mentha Spicata*. Assim, para a realização desta pesquisa bibliográfica foram utilizadas duas bases de dados: *Web of Science* e *Scopus*, resultando numa vasta gama de publicações. Para tal, realizou-se a construção de um PRISMA (*Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses*), de modo a facilitar a compreensão do procedimento da pesquisa bibliográfica. Assim, foram apenas consideradas as publicações posteriores a 2000, sendo retirados os duplicados pela análise das duas bases de dados, resultando assim em apenas 36 artigos utilizados após uma análise minuciosa da relevância de todas as publicações. A Figura 4 apresenta detalhadamente o procedimento da pesquisa nas duas bases de dados utilizadas, bem como as publicações existentes.

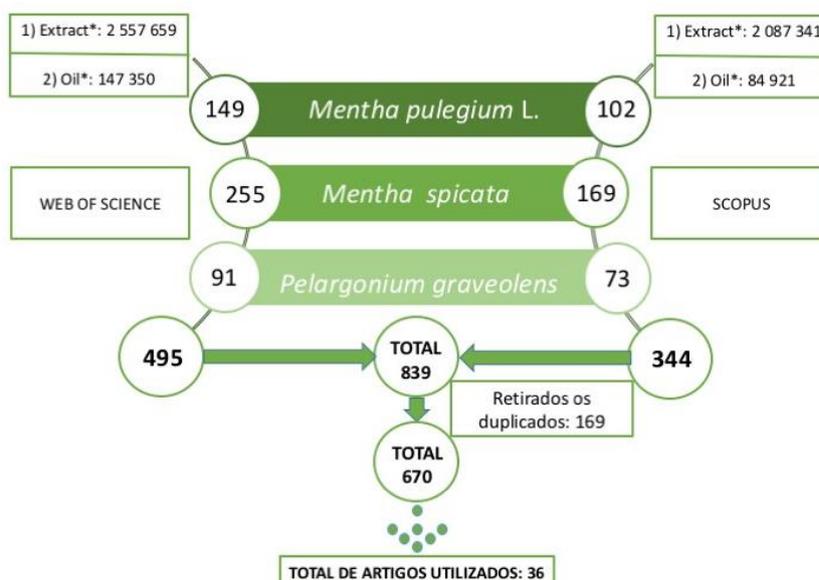


Figura 4: PRISMA obtido a partir das bases de dados Web of Science e Scopus (critério de pesquisa: Extract* and oil* and nome da espécie (*Mentha Pulegium L.* ou *Mentha Spicata* ou *Pelargonium graveolens*))

Pela pesquisa exhaustiva à cerca das 3 plantas conclui-se que todas apresentavam características interessantes como propriedades antioxidantes, antibacterianas, entre outras, para as diversas indústrias. Contudo e atendendo ao curto período de tempo para a realização da dissertação, à facilidade de obtenção das amostras e às suas características, só foi efetuado o estudo do gerânio.

2.1 Técnicas De Extração de Óleos Essenciais

Ao longo dos anos, as técnicas de extração de OEs foram aperfeiçoando-se a fim de otimizar o rendimento de extração, permitindo assim obter-se uma maior quantidade de extrato, extrair um maior número de compostos de interesse, sendo, por isso, mais seletivos. A hidrodestilação, a destilação a vapor e a extração por solvente eram os métodos mais utilizados numa fase inicial. Com a evolução da tecnologia e de modo a combater algumas desvantagens que esses métodos apresentavam tais como a degradação de compostos sensíveis a elevadas temperaturas, foram surgindo novos métodos de extração como a extração por fluido supercrítico (SFE), o processo de destilação e extração simultânea (SDE), extração assistida por micro-ondas, microextração em fase sólida (SPME), entre outros (Reis-Vasco, Coelho, & Palavra, 1999). Recorrendo a um estudo bibliográfico, quando comparadas três plantas relativamente parecidas e tendo em conta o mesmo propósito a que destinam, extração dos respetivos OEs, conclui-se que o método mais utilizado era a hidrodestilação para as três plantas em estudo como podemos verificar pela Figura 5.

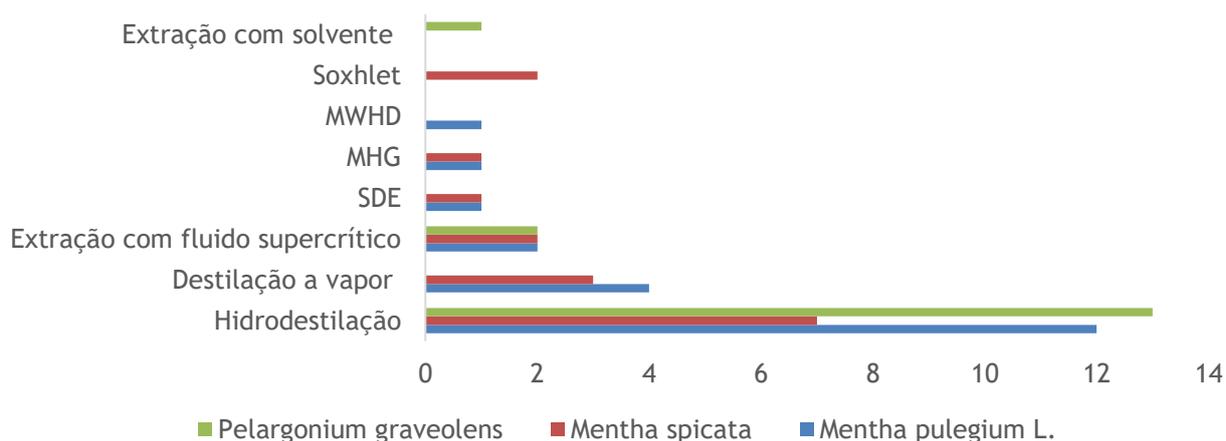


Figura 5: Métodos de extração mais descritos na literatura para as três espécies da pesquisa

2.1.1 Hidrodestilação

A hidrodestilação é um dos métodos mais antigos e simples para o processo de extração de OEs. Este método baseia-se numa mistura de água com a amostra da planta que é aquecida. Através do aquecimento desta mistura, ocorre a evaporação dos OEs que são liquefeitos num condensador. Como os OEs e a água são imiscíveis, surgem duas fases, as quais necessitam de ser separadas e por esse motivo é que a configuração engloba um condensador e um decantador, de modo a recolher o condensado e separar assim os OEs da água (Rassem, Nour, & Yunus, 2016).

Embora a hidrodestilação seja o método mais utilizado, este apresenta algumas desvantagens como o elevado tempo de extração, o que pode contribuir para a degradação de compostos termolábeis bem como a sua hidrólise e, conseqüentemente, comprometer a qualidade do OE (Coelho *et al.*, 2012).

2.1.2 Extração por fluido supercrítico (SFE)

Apesar de não ser a mais utilizada, atualmente a extração por fluido supercrítico tem vindo a posicionar-se na vanguarda das técnicas de extração devido às suas vantagens. Neste processo podem usar-se diferentes gases como solvente de extração, no entanto, o mais utilizado tem sido o dióxido de carbono, uma vez que ele apresenta propriedades muito importantes, como o facto de ser inerte, não ser inflamável e o seu custo não ser muito elevado. A extração por fluido supercrítico permite que o processo seja efetuado a temperaturas de operação baixas, o que é adequado para extrações de substâncias naturais, evitando-se, assim, as desvantagens que a hidrodestilação apresenta. Para além disso, como os solventes utilizados são gasosos permite que sejam removidos facilmente. Por estes motivos, é que este método é amplamente usado em extrações de aromas e fragâncias, dado que nestes setores da indústria são colocadas várias restrições às quantidades vestigiais de resíduos de solventes orgânicos. Contudo, esta técnica de extração é relativamente cara devido ao elevado custo do equipamento e manutenção do mesmo, e, por esse motivo, só é aplicada a produtos de elevado valor acrescentado para obtenção de produtos ultrapuros ou que tenham impostas restrições rigorosas a nível de resíduos (Gomes, Mata, & Rodrigues, 2007; Maul, Wasicky, & Bacchi, 1996).

2.1.3 Destilação a vapor

A destilação a vapor, à semelhança da hidrodestilação, é um dos processos mais utilizados que tem em conta a separação de materiais a uma temperatura abaixo do ponto de ebulição normal do líquido a ser destilado. A utilização de vapor reduz a pressão de vapor parcial do líquido, permitindo que a destilação seja realizada a uma temperatura mais baixa. No caso de material vegetal, as folhas da planta são esmagadas ou picadas, de modo que as células vegetais que contém o óleo fiquem abertas. O material resultante pode ser misturado com água ou então colocado sob uma placa com furos acima da água. O calor é introduzido provocando a ebulição da água e, conseqüentemente, a volatilização dos OEs. Os óleos são transportados pelo vapor de água até ao condensador, obtendo-se um condensado constituído por água e pelo óleo, que será posteriormente separado (Bralla, 2007).

2.1.4 Destilação e extração simultânea (SDE)

A ideia de associar destilação a vapor com extração contínua em simultâneo nunca foi muito clara e, na realidade, embora tenha sido investigada alguns anos antes, só em 1964 é que este

processo foi aceite com a proposta de equipamento do processo de destilação e extração simultânea (SDE) de Likens and Nickerson para a extração do óleo de lúpulo, apresentada na Figura 6 (Chaintreau, 2001).

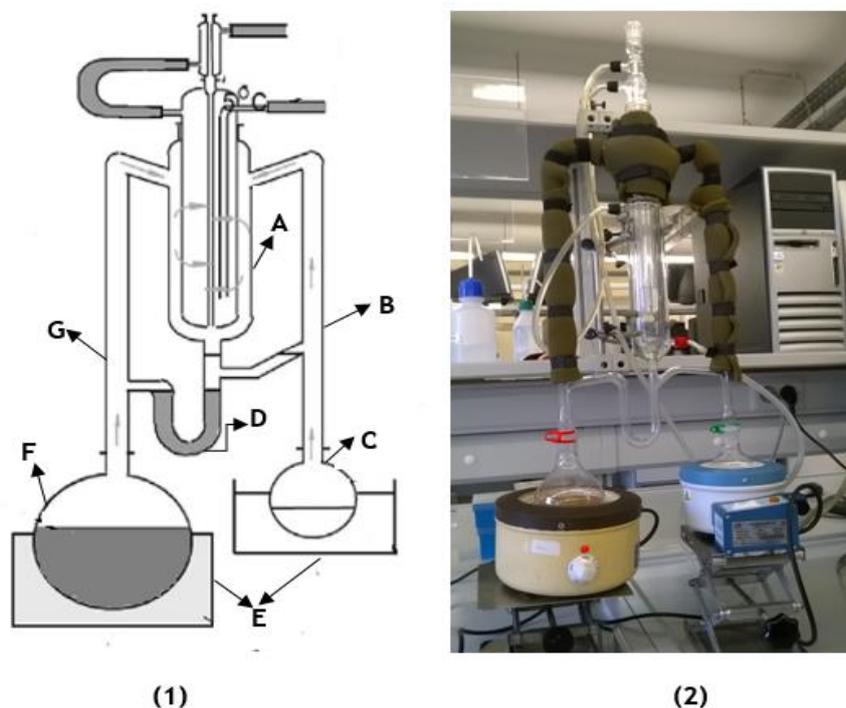


Figura 6: (1)- Representação do processo SDE (A: Condensador, B e G: Braço; C: Balão com fase orgânica, D: Zona de separação de fases, E: Manta de aquecimento, F: Balão com fase aquosa; (2)- Imagem real do equipamento

Neste processo, existem duas fases: a fase orgânica, constituída pelo solvente, e a fase aquosa constituída pela matriz a extrair e água. As duas fases são aquecidas e os respetivos vapores, contendo os voláteis, entram em contacto na parte superior do equipamento, onde são depois condensadas em simultâneo ao entrar em contacto com o condensador. Assim, as fases são separadas na parte inferior do equipamento, retornando aos respetivos balões. A posição dos balões das duas fases deve ter em conta a densidade do solvente em relação à água, pelo que no caso do solvente ter uma densidade inferior à da água, a fase orgânica deve estar na posição C e a fase aquosa na posição F. Assim, este método para além de contornar as desvantagens dos outros métodos como a degradação de compostos termolábeis, permite a extração de OEs a partir de uma pequena quantidade de composto. Para além disso, esta técnica diminui o tempo de extração e o volume de solvente utilizado e permite uma completa extração sem qualquer etapa de limpeza. Devido às suas elevadas eficiências de extração associadas à elevada reprodutibilidade, o SDE também tem sido utilizado para quantificar compostos em várias matrizes. Contudo, a recuperação é dependente das condições de operação, pelo que devem ser estudadas e aperfeiçoadas (Teixeira, Mendes, Alves, & Santos, 2007).

Recorrendo a uma pesquisa bibliográfica e tendo em conta apenas publicações posteriores ao ano de 2000, conclui-se que não existem muitas publicações referentes ao processo de destilação e extração simultânea (SDE) pelo que será de elevada relevância explorar este método para a extração de OEs nesta dissertação.

Na Tabela 2 estão resumidos os processos de extração para a planta em estudo, dados esses recolhidos na base de dados *Web of Science*, seguindo as palavras chave “*microencap**”, “*extraction*” e “*Pelargonium graveolens*”. Como podemos verificar através da análise da Tabela 2, para o processo de destilação e extração simultânea para a planta em estudo não existem publicações, pelo que vem confirmar o carácter inovador e interessante desta técnica de extração. Para além disso, também é possível concluir, juntamente com o PRISMA anteriormente apresentado, que o gerânio, em comparação com as duas plantas para as quais foi efetuada a pesquisa bibliográfica, é a planta que apresenta menor número de publicações a nível de extração do respetivo OE, o que vem reforçar o seu carácter interessante para o desenvolvimento deste projeto.

Tabela 2: Sumário de alguns estudos do *Pelargonium graveolens* reportados na literatura

Método de extração	Método Analítico	Composição (%)	Aplicações	Referências
Extração com solvente (hexano)	GC/MS	Citronelol (21,3); Geraniol (10,8); Formato de citronelol (6,0); Isomentona (2,1); Formato de geraniol (4,7)	Cosmética e Perfumaria	Gomes <i>et al.</i> , (2007)
Extração com fluido supercrítico	GC/MS e GC/FID em paralelo	Citronelol (24,8); Geraniol (8,5); Formato de citronelol (10,2); Isomentona (3,5); Formato de geraniol (7,9)	Perfumaria	Gomes <i>et al.</i> , (2007)
	GC/MS	Citronelol (43,20); Geraniol (13,90); Formato de citronelol (6,05); Butirato de citronelol (8,10); Isomentona (6,50); Linalol (3,94)	N/D	Ponomareva & Molohova, (2017)
Hidrodestilação	GC/MS	Citronelol (33,99); Geraniol (18,39); Formato de citronelol (8,69); Formato de geraniol (3,48); Linalol (5,31)	Perfumaria	Pandith <i>et al.</i> , (2017)
	GC/MS	Citronelol (24,14); Geraniol (16,45); Formato de citronelol (11,75); Linalol (7,99)	Perfumaria, cosmética e médica	Boukhris, Ben Nasri-Ayachi, <i>et al.</i> , (2013)
	GC/MS	Alfa-Citronelol (18,17); Citronelol (14,37); 3-Metilpentan (11,96); Isomentona (10,64); Linalol (6,40); Formato de geraniol (4,90)	Farmacéutica e médica	Al-Sagheer, Mahmoud, Reda, Mahgoub, & Ayyat, (2018)
	GC/MS	Citronelol (21,93); Formato de citronelol (13,24); Geraniol (11,07); Formato de geraniol (6,22); Linalol (5,6)	Médica	Boukhris, Simmonds, Sayadi, & Bouaziz, (2013)

Tabela 2: Sumário de alguns estudos do *Pelargonium graveolens* reportados na literatura (cont.)

Hidrodestilação	GC/FID GC-TOF MS	Citronelol (23,43); Geraniol (16,85); Formato de citronelol (12,29); Linalol (10,79); Isomentona (7,06)	Médica	Ralambondrainy <i>et al.</i> , (2018)
	GC/MS	Citronelol (32,8); Formato de citronelol (10,0); Geraniol (4,5); Isomentona (6,3)	Médica	Rosato <i>et al.</i> , (2018)
	GC/MS	Citronelol (28,9); Formato de citronelol (11,7); Geraniol (2,4); Mentona (2,4)	Médica	Lin, Jwo, & Chang, (2016)
	GC/MS	Geraniol (31,02); Citronelol (18,26); Isomentona (4,73); Linalol (1,80)	Médica	Bach & S, (2016)
	GC/MS	Citronelol (24,75); Geraniol (13,99); Formato de citronelol (8,37); Isomentona (6,82); Linalol (2,65)	Médica	Essid <i>et al.</i> , (2015)
	GC/MS	Citronelol (39,3); Geraniol (23,6); Mentona (2,7)	N/D	Mahboubi, Kazempour, & Mahboubi, (2014)
	GC/MS	Citronelol (35,92); trans-geraniol (11,66); Formato de citronelol (11,40)	Alimentar e farmacéutica	Mohareb & Badawy, (2013)
	GC/MS	Citronelol (27,53); Geraniol (25,85); Linalol (6,54); Mentona (6,22)	Médica	Hsouna & Hamdi, (2012)
	GC/MS	Citronelol (26,9); Geraniol (8,1); Formato de citronelol (13,2); Isomentona (5,6); Formato de geraniol (5,5)	Cosmética e Perfumaria	Gomes <i>et al.</i> , (2007)

GC: cromatografia gasosa; MS: espectrometria de massa; FID: Detetor de ionização de chama; TOF: *time-of-flight*

Nota: Pesquisa referente a publicações desde 2000 até 2019.

2.2 Microencapsulação de OEs

Atualmente, o interesse por compostos ativos naturais tem aumentado significativamente em detrimento das substâncias funcionais sintéticas. Cada vez mais, os consumidores preocupam-se com a saúde e com os danos que parte das substâncias ou misturas sintéticas provocam. Esta preocupação crescente engloba todas as indústrias, nomeadamente a indústria cosmética que cada vez mais se debruça na procura de alternativas eficazes e inovadoras que combatam os danos na pele provocados pela oxidação, resultante das radiações, pesticidas, fumos, entre outros (Paulo & Santos, 2018b).

Assim, cada vez mais indústrias centram o seu interesse nos OEs como uma potencial alternativa a substâncias sintéticas, proporcionando características semelhantes ou até melhoradas a alguns produtos de interesse ao consumidor.

Aliado à procura constante das indústrias, principalmente, cosmética, farmacêutica e alimentar por produtos inovadores com elevado interesse comercial e de valor acrescentado, No entanto, os OEs são sensíveis à degradação oxidativa pelo oxigénio atmosférico, luz, humidade, elevadas temperaturas. Deste modo, a microencapsulação destes compostos permite contornar os constrangimentos inerentes à inclusão de extratos de OEs em matrizes cosméticas, alimentares e farmacêuticas(Lai, Wissing, Müller, & Fadda, 2006).

No entanto, não é só a indústria cosmética que tem tentado apostar em substâncias naturais, mas também é na agricultura que a preocupação e a procura por alternativas, tem-se tornado crescente, englobando, conseqüentemente, a indústria alimentar. O uso de pesticidas sintéticos tornou-se cada vez mais frequente e esse uso excessivo tem contribuído para diversos problemas, tais como a presença, nos alimentos, de resíduos dos pesticidas utilizados com concentrações acima dos níveis recomendados, prejudicando assim a saúde humana e facilitando o desenvolvimento de resistência dos microrganismos patogénicos aos vários pesticidas, fruto da sua utilização em demasia. Assim, a procura por alternativas naturais aos pesticidas também tem apostado em fontes naturais, como os OEs, provenientes dos metabolitos das plantas (Pavela & Benelli, 2016).

Com o objetivo de melhorar ainda mais a aplicação dos produtos naturais, a microencapsulação dos OEs na área agroalimentar, permite uma libertação controlada, evitando, assim, a utilização de uma quantidade tão elevada de biopesticida para o mesmo período de atividade, contornando a problemática da utilização excessiva de pesticidas de origem não natural e garantindo uma maior segurança para o meio ambiente e o ser humano (Lai *et al.*, 2006).

A técnica de microencapsulação permite encapsular materiais sólidos, líquidos ou gasosos, que constituem o agente encapsulado, com um revestimento polimérico, conhecido como agente encapsulante, produzindo micropartículas, como se pode visualizar pela Figura 7 (adaptada de (Paulo & Santos, 2017)).

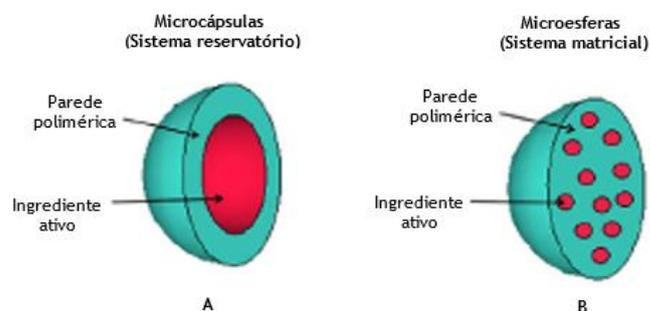


Figura 7: Esquema das micropartículas. A-Microcápsula; B-Microesfera

Produto desta técnica resultam as designadas micropartículas que incluem as microesferas e as microcápsulas, que se diferenciam pela sua morfologia e estrutura interna (Jyothi *et al.*, 2010; Patravale & Mandawgade, 2008). Assim, as micropartículas consistem em partículas sólidas poliméricas, com uma gama de diâmetro de 1-1000 μm , enquanto que as microesferas são, normalmente, descritas como um sistema matriz no qual o ingrediente ativo é dissolvido na matriz transportadora. As microcápsulas consistem num agente encapsulante que envolve e protege o agente ativo contra exposições inadequadas (Carvalho, Estevinho, & Santos, 2016).

2.2.1 Técnicas de microencapsulação

A microencapsulação permite a manutenção das características e propriedades das substâncias ativas a encapsular, neste caso, os OEs (Bakry *et al.*, 2016). Existem diversas técnicas de microencapsulação que devem ser escolhidas e apropriadas de acordo com o material a encapsular, bem como ter em conta o agente encapsulante e o propósito das microcápsulas obtidas. As técnicas de microencapsulação podem ser divididas em métodos químicos, físico-químicos e físico-mecânicos (Ghosh, 2006; Madene, Jacquot, Scher, & Desobry, 2006; Singh, Hemant, Ram, & Shivakumar, 2010). Assim, existem vários métodos que se inserem nestas 3 categorias, como se pode observar pela Figura 8. De entre todas as técnicas de microencapsulação, a coacervação é uma das técnicas mais utilizadas para microencapsular substâncias hidrofóbicas, onde se inserem os OEs, e é baseada na interação entre polímeros diferentes com oposição de cargas, a qual conduz à formação de complexos insolúveis, promovendo, assim, a separação de fases (Alvim & Grosso, 2010). A coacervação pode ser simples ou complexa, tendo em conta se são utilizados um ou dois polímeros, respetivamente (Madene *et al.*, 2006).



Figura 8: Principais técnicas de microencapsulação

Na coacervação simples, para que ocorra a separação das fases, é necessário a adição de solventes não miscíveis em água ou sais inorgânicos, enquanto que na coacervação complexa, os polímeros de carga oposta são misturados em solução para formar o revestimento do agente a encapsular, sob o efeito de alterações de pH ou de temperatura (Dias, Botrel, Fernandes, & Borges, 2017). A coacervação complexa consiste em três passos fundamentais: emulsificação, coacervação e endurecimento (Yan & Zhang, 2014). O primeiro passo deste processo envolve a emulsificação do óleo numa solução aquosa que contém os dois polímeros, na qual, normalmente, a temperatura está acima do ponto de gelificação e o pH acima do ponto isoelétrico dos polímeros utilizados. Após a emulsificação, dá-se o início da coacervação, ocorrendo a separação entre a fase líquida e a fase rica no polímero insolúvel como resultado da atração eletrostática entre as cargas opostas dos polímeros devido à redução do pH abaixo do ponto isoelétrico. No último passo, ocorre o endurecimento da parede da micropartícula através da adição de agentes de *crosslinking* (Bakry *et al.*, 2016; Carvalho *et al.*, 2016). Na Figura 9 está apresentada uma esquematização das várias etapas do processo de coacervação.

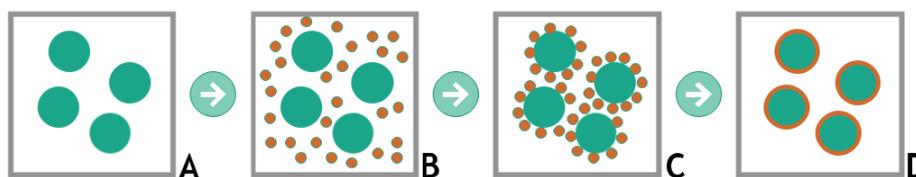


Figura 9: Esquema representativo do processo de coacervação: A- Formação da emulsão óleo em água; B- Emulsificação; C- Coacervação; D- Endurecimento

2.2.2 Agentes encapsulantes

Com a função de proteção da substância a encapsular, o agente encapsulante deve ser selecionado tendo em conta diversos parâmetros, pelo que a sua seleção é um passo muito importante no sucesso do processo de microencapsulação. Assim, os agentes encapsulantes dependem do material encapsulado e das características finais do produto, nunca desvalorizando o propósito a que se destina. Um exemplo é o setor alimentar que, como seria

expetável, é extremamente rigoroso no uso dos agentes encapsulantes para a microencapsulação, sendo os polímeros aprovados de número limitado (Gharsallaoui, Roudaut, Chambin, Voilley, & Saurel, 2007). Os polímeros, com a função de agentes encapsulantes, podem ser de origem natural, sintética ou semi-sintética. Os polímeros naturais ocorrem naturalmente na natureza e a sua biodegradabilidade, baixa toxicidade e larga abundância, são as suas principais características. Contrariamente, os polímeros sintéticos não estão prontamente disponíveis de forma natural. No entanto, a sua disponibilidade compreende uma gama alargada de composições e moléculas com propriedades ajustadas, facilitando, assim, a otimização das propriedades das micropartículas. Contudo, a falta de biocompatibilidade da maioria destes polímeros torna-se uma desvantagem, embora existam algumas exceções dentro desta classe, como por exemplo o poli (ácido láctico-co-glicólico), PLGA, e o poli (óxido de etileno), PEO. Na classe dos polímeros semi-sintéticos estão incluídas principalmente as celuloses modificadas (Huang, Yuan, & Chen, 2008). Na Tabela 3 estão apresentados vários exemplos de polímeros naturais, sintéticos e semi-sintéticos.

Tabela 3: Exemplos de agentes encapsulantes

Polímeros		
Naturais	Sintéticos	Semi-sintéticos
Agar, agarose, quitosano, gelatina, dextrano, goma arábica, goma xantana, albumina, colagénio	Poli(etilenoglicol, poli(óxido de etileno) (PEO), ácido polilático, alginato, ácido poliacrílico, poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA)	Etilcelulose (EC), carboximetilcelulose (CMC), carboximetilcelulose de sódio (NaCMC)

Para um melhor conhecimento das características dos polímeros utilizados nesta dissertação, a gelatina (GE), a carboximetilcelulose (CMC) e o PLGA serão explicados com mais profundidade.

A GE é uma proteína anfotérica, que se encontra em relativa abundância na natureza, devido à presença de grupos carboxílicos e amino guanidinos, e que está carregada positivamente abaixo do seu ponto isoelétrico (Devi & Maji, 2014; Xiao, Liu, Zhu, Zhou, & Niu, 2013). Este polímero apresenta propriedades distintas em ambientes distintos, pelo que expõe propriedades catiónicas sob condições ácidas e propriedades aniónicas em condições alcalinas (Xiao *et al.*, 2013). Embora a GE seja um agente encapsulante de origem natural e de elevada importância na substituição dos polímeros sintéticos, este, devido à sua diminuída resistência mecânica, poderá implicar a utilização de agentes de *crosslinking* tais como o glutaraldeído, formaldeído, transglutaminase, entre outros. Estes últimos são responsáveis pelo

endurecimento do polímero natural e permitem uma melhoria na libertação controlada do ingrediente ativo que se encontra encapsulado. Embora, seja um passo fundamental na microencapsulação através de agentes encapsulantes naturais, deve ser tido em conta a toxicidade dos agentes de *crosslinking* utilizados e da legislação inerente aos mesmos (Se, 2004; Xiao *et al.*, 2013).

A CMC é um polímero pertencente à classe dos semi-sintéticos, resultante da substituição parcial dos grupos 2, 3 e 6-hidroximetil da celulose por grupos carboximetil hidrofóbicos. Assim, fruto da interação destes grupos, resulta a formação de coacervados. No caso da utilização da CMC e da GE para a formação das micropartículas, como a densidade de carga da CMC é muito mais forte que a da GE, a adsorção da CMC na interfase óleo-água é dificultada, pelo que a adição de um surfactante pode vir solucionar este entrave e, assim, aumentar a quantidade de CMC que é adsorvida e que pode interagir hidrofobicamente com este polímero (Xiao *et al.*, 2013).

O PLGA é um polímero pertencente à classe dos polímeros sintéticos e apresenta-se como um dos integrantes da família dos polímeros biodegradáveis aprovados pela FDA. Este polímero possui uma elevada resistência física e é altamente biocompatível, o que constitui uma exceção à classe no qual se encontra inserido (Huang *et al.*, 2008). O PLGA é um dos polímeros mais utilizados devido às suas características favoráveis de degradação e para mecanismos de libertação prolongada de compostos, o que tem sido comprovado por alguns estudos (Makadia & Siegel, 2011).

2.2.3 Técnicas de caracterização das micropartículas

A caracterização das micropartículas engloba a análise da morfologia e da distribuição de tamanho das micropartículas. Para tal, recorreu-se a granulometria laser e *scanning electron microscopy* (SEM), equipamentos que permitiram a análise e a compreensão da distribuição de tamanho e da morfologia das micropartículas, respetivamente.

O equipamento *scanning electron microscopy* (SEM), representado na Figura 10, permite a visualização da morfologia da superfície, forma do cristal e das micropartículas dispersas e aglomeradas, permitindo, assim, a análise de cada micropartícula, incluindo os seus agregados. Desta forma, este método é considerado uma medida absoluta do tamanho das micropartículas e pode ter acoplado a si, um computador de análise de imagem de modo a visualizar todos os campos para a distribuição das micropartículas (Spectrometry, 2016).



Figura 10: Equipamento para análise da morfologia das micropartículas: Scanning electron microscopy (SEM)

Embora a morfologia seja um parâmetro muito importante que nos permite concluir se o método de microencapsulação foi eficiente a este nível, a distribuição de tamanho das micropartículas também ocupa um lugar de destaque. Assim, utilizando a granulometria laser através do equipamento *Coulter Counter-LS 230 Particle Size Analyzer*, o tamanho médio das micropartículas é determinado com base no número e na distribuição de volume de cada amostra. A existência de diferenças entre o tamanho médio deve ser explicado pela existência de alguns aglomerados de micropartículas (Estevinho, Lopes, Sousa, Rocha, & Nunes, 2017). Neste método, o feixe de laser atravessa as micropartículas e os fótons são dispersos, difratados, refletidos ou transmitidos. A luz difratada é detetada numa gama de ângulos na direção direta, cujos ângulos estão relacionados inversamente com o tamanho da micropartícula. Assim, a granulometria laser apresenta algumas vantagens como a análise não ser intrusiva, o tempo de ensaio ser rápido e ser um método preciso e versátil. No entanto, é um método de análise caro e as suas medições são baseadas na medição do volume considerando micropartículas esféricas (Spectrometry, 2016). Na Figura 11 está representado o equipamento responsável pela determinação da distribuição de tamanho das micropartículas.



Figura 11: Equipamento para análise da distribuição de tamanho das micropartículas - Coulter Counter-LS 230 Particle Size Analyzer (granulometria laser)

3 Materiais e Métodos

3.1 Materiais

3.1.1 Material vegetal e reagentes

Para a realização da extração foi necessário o material vegetal, nomeadamente amostras de *Pelargonium graveolens*, recolhidas da planta no dia anterior ao da extração e conservadas no frigorífico. Para o estudo do OE do gerânio foram utilizados os reagentes e compostos presentes na Tabela 4.

Tabela 4: Características dos reagentes e compostos utilizados

Reagente	CAS	Grau de Pureza (%)	Marca	Função
Eugenol	97-53-0	99	Sigma Aldrick	Preparação de padrões
Terpineol	10458-14-7	98	Merck	
Citronelol	106-22-9	95	Sigma Aldrick	
Geraniol	106-24-1	98	Sigma Aldrick	
Pulegona	89-82-7	97	Sigma Aldrick	
Éter dietílico	60-29-7	99,5	Riedel-de-Haen	Solvente de extração
Sulfato de magnésio anidro	7487-88-9	96	Panreac	Agente excicante
Hexano	110-54-3	95	VWR	Solvente
n-Dodecano	112-40-3	99	Merck	Padrão interno

Para a preparação das micropartículas utilizou-se CMC, GE, span 80 (adquirido a partir da Sigma Aldrich Chemical, CAS 1338-43-8), polímero álcool polivinílico usado como surfactante na emulsão múltipla (Ref: 341584, hidrolizado 87-90%, peso molecular médio de 30,000 - 70,000, viscosidade entre 11,6 - 15,4 cP, CAS 9002-89-5) e PLGA (Ref. 719870, viscosidade de 0,16 - 0,24 cP, CAS 26780-50-7) foram adquiridos a partir de Sigma Aldrich Chemical (St. Louis, MO, EUA). O solvente utilizado foi o diclorometano (Ref. 1.06054.1000, CH₂Cl₂, CAS 75-09-2) foram adquiridos a partir de VWR Internacional (Fontenay-sous-Bois, França). A água utilizada neste projeto foi desionizada e ultrapura usando um sistema de purificação de água Millipore™ (Massachusetts, EUA) tendo 18,2 Ω de resistência elétrica.

3.1.2 Equipamento

Para o processo de extração utilizou-se o método de SDE (destilação e extração simultânea), com o equipamento correspondente, duas mantas de aquecimento e um banho de água (Figura 6 (2)).

Para a análise quantitativa dos compostos de interesse presentes na amostra de gerânio, recorreu-se a um cromatógrafo gasoso (GC) equipado com um detetor de ionização de chama (FID), com as especificações apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5: Especificações das condições usadas no GC-FID

Coluna TRB-WAX	Comprimento: 30,0 m
	Diâmetro interno: 0,32 mm
	Espessura do filme: 0,25 μm
Temperatura inicial da coluna	40 °C
Temperatura máxima da coluna	270 °C
Modo de injeção	Splitless
Temperatura do detetor	280 °C
Caudal He	30 mL min ⁻¹
Caudal H₂	40 mL min ⁻¹
Caudal de ar	400 mL min ⁻¹

Para além destes equipamentos, ainda foram utilizados: um agitador vórtex (IKA VORTEX GENIUS 3, Staufen, Alemanha), um homogenizador de alta performance (IKA T18 Digital ULTRA-TURRAX®, Staufen, Alemanha), uma placa de agitação (AREX Digital, VELP Scientifica, Monza, Itália), um liofilizador (SP Scientific, Nova Iorque, EUA) e um evaporador rotativo.

Para a caracterização das micropartículas, a sua morfologia foi avaliada usando um microscópio eletrónico de varrimento PHENOM XL (Eindhoven, Holanda), sendo pulverizadas com ouro durante 20 segundos usando um pulverizador a vácuo (Leica, EM SCD 500, Wetzlar, Alemanha). A distribuição do tamanho de partículas foi avaliada por granulometria laser usando o equipamento Coulter Counter-LS 230 Particle Size Analyzer (Miami, FL, EUA).

3.2 Métodos

3.2.1 Preparação de padrões analíticos

Para a preparação dos padrões analíticos, pesaram-se 100 mg de cada padrão individual (presentes na Tabela 4 anteriormente apresentada) em balões volumétricos de 25 mL. No caso do dodecano, padrão interno, pesaram-se 200 mg deste composto num balão volumétrico de 10 mL, para posterior diluição num balão volumétrico de 25 mL. Após esta pesagem, fez-se o volume de cada balão volumétrico com hexano, que foi o solvente utilizado para a preparação dos padrões analíticos.

Para a preparação da solução mãe foram retirados 5 mL de cada padrão individual preparado para um balão volumétrico 50 mL, perfazendo o volume com hexano. A partir da solução mãe, designada por padrão 10, foram preparados os restantes 9 padrões, consistindo em diluições da solução mãe. Após todos os padrões terem sido preparados rigorosamente, foram guardados em frascos de vidro de 30 mL e envolvidos em papel de alumínio, uma vez que os compostos presentes apresentam sensibilidade à luz. No anexo A, encontram-se, na Tabela A1, as concentrações de cada composto nos padrões preparados.

3.2.2 Extração do óleo essencial

Para a extração do OE do gerânio utilizou-se o método SDE. Assim, primeiramente montou-se o aparelho de vidro do SDE e procedeu-se à ligação do banho ao equipamento, aguardando que o banho atinja os 5 °C. Enquanto se aguardava que esta temperatura fosse atingida, juntou-se 10 g das partes aéreas da planta com 250 mL de água destilada e triturou-se, recorrendo a uma varinha mágica, passando para um balão de fundo redondo de 500 mL, o que constituiu a fase aquosa. Num outro balão de fundo redondo de 100 mL colocou-se 50 mL de solvente orgânico, éter etílico, medido previamente numa proveta, constituindo assim a fase orgânica. Assim, com as duas fases prontas a serem utilizadas, colocou-se a fase aquosa numa manta de aquecimento e ligou-se na posição F (Figura 6) do equipamento, esperando que esta atingisse a ebulição. Após a ebulição, colocou-se a fase orgânica numa manta de aquecimento e ligou-se na posição C (Figura 6) do equipamento. A partir desse momento, a extração permaneceu em curso durante 60 minutos. Após o tempo de extração, desligaram-se as mantas de aquecimento. Assim que o condensador deixou de pingar transferiu-se a fase orgânica presente na zona de separação das fases, identificada pela letra D (Figura 6), para o respetivo balão. Seguidamente, adicionou-se sulfato de magnésio anidro à fase orgânica, de modo a evitar a mínima quantidade de água que pudesse estar presente. De seguida procedeu-se à filtração a vácuo recorrendo-se a um funil de placa porosa, ficando com a fase orgânica isenta de água. Sem a presença de água, foi possível evaporar a maior parte do solvente recorrendo ao evaporador rotativo. Por fim, o

extrato obtido foi transferido para um frasco de 30 mL, procedendo-se a lavagens do balão com éter etílico, de modo a garantir que não haja perdas do extrato. O restante extrato foi levado à linha de azoto para evaporação lenta do solvente, ficando assim apenas com o pretendido OE.

3.2.3 Análise do óleo essencial

Após a extração do OE, procedeu-se à determinação e quantificação dos compostos presentes no OE. Para tal, recorreu-se à análise por cromatografia gasosa com detetor de ionização de chama. Assim, foi necessário preparar a solução do OE obtido e transferiu-se para um balão volumétrico de 5 mL, perfazendo o volume com hexano. De seguida, colocou-se 500 µL da solução de OE juntamente com 50 µL de uma solução de dodecano com uma concentração de 205 mg mL⁻¹ no vial para o GC/FID. O dodecano constitui o padrão interno, e, por esse motivo, serve de referência para os outros picos, posteriormente identificados. Após todos os vials estarem prontos, procedeu-se à introdução no injetor automático do GC/FID para posterior análise.

3.2.4 Microencapsulação

Para a microencapsulação do OE, foi necessário a preparação das soluções aquosas de GE, CMC e o padrão de mistura constituído pelos dois compostos maioritários, citrionelol e geraniol. Para a preparação das soluções aquosas de GE e CMC, pesou-se 100 mg de cada composto e dissolveu-se separadamente em 10 mL de água ultrapura (UPW), recorrendo a uma placa de agitação com aquecimento, sendo T= 40 °C. Estas soluções aquosas foram preparadas no instante do procedimento da microencapsulação. Para a preparação do padrão de mistura dos dois compostos, pesou-se uma massa previamente calculada (cumprindo a concentração de 0,5 mg mL⁻¹) e perpez-se o volume com hexano num balão volumétrico de 10 mL.

É importante referir que no processo de coacervação procedeu-se à realização de um outro procedimento, na qual a quantidade de CMC foi reduzida para metade, de modo a perceber a influência da CMC no processo de obtenção de micropartículas.

3.2.4.1 Coacervação

Após preparação da solução aquosa de GE, adicionou-se o padrão de mistura dos dois compstos maioritários, mantendo-se agitação constante. Seguidamente, recorreu-se ao homogenizador de alta performance durante 5 minutos a 5000 rpm, permitindo a formação da emulsão. Adicionou-se lentamente a CMC e ajustou-se o pH para 4,0 através da adição de uma solução de ácido acético 2M. Após o ajuste de pH, a solução permaneceu em agitação durante 30 minutos. No final, recorreu-se a um banho de gelo de modo a facilitar a precipitação das

micropartículas e permaneceu no congelador durante toda a noite. As micropartículas foram filtradas usando um papel de filtro Whatman™ de 0,45 µm e congeladas durante 24 horas a -4 °C, para posterior liofilização durante 72 horas. Após liofilização, as micropartículas foram caracterizadas. Este processo encontra-se representado pelo esquema presente na Figura 12.

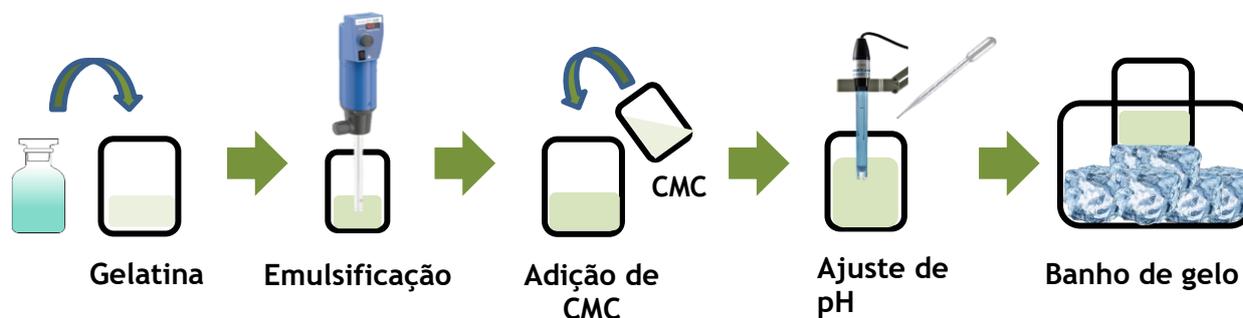


Figura 12: Esquema representativa do procedimento da coacervação

3.2.4.2 Coacervação com surfactante

Para a microencapsulação através de um processo de coacervação com a utilização de um surfactante, utilizou-se o Span 80 como surfactante. A solução de Span 80 foi preparada dissolvendo 5 mL em 100 mL de diclorometano. Após a preparação da solução aquosa de GE, adicionou-se o padrão de mistura, mantendo-se agitação constante. Seguidamente recorreu-se ao homogenizador de alta performance a 5000 rpm durante 5 minutos, permitindo-se assim a formação da emulsão. De seguida adicionou-se lentamente a solução aquosa de CMC, mantendo a agitação. A emulsão foi vertida na solução de Span 80, previamente preparada e deixou-se sob agitação constante durante 3 horas, permanecendo no interior da hotte com a exaustão ligada, permitindo a evaporação do solvente. As micropartículas foram filtradas usando um papel de filtro Whatman™ de 0,45 µm e congeladas durante 24 horas a -4 °C, para posterior liofilização durante 72 horas. Após liofilização, as micropartículas foram caracterizadas. Este processo encontra-se representado pelo esquema presente na Figura 13.

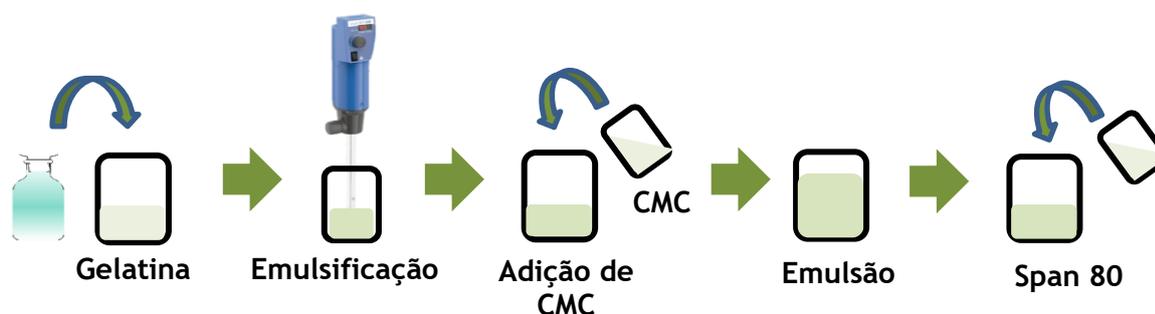


Figura 13: Esquema representativo do procedimento de coacervação com surfactante

3.2.4.3 Múltipla Emulsão com evaporação de solvente

Na técnica de múltipla emulsão o padrão da mistura dos dois compostos (citronelol e geraniol) constitui a fase óleo (O_1). Como fase aquosa W_1 temos a CMC dissolvida em UPW. Numa primeira fase, adicionou-se a fase O_1 na fase W_1 e recorreu-se ao vórtex durante 3 minutos, levando à formação da emulsão O_1/W_1 . Para a fase oleosa (O_2), foi dissolvida uma massa de 500 mg de PLGA em 50 mL de diclorometano (10 g L^{-1}), formando uma solução polimérica. A emulsão O_1/W_1 foi adicionada à fase oleosa O_2 , emulsificando com o auxílio de um homogeneizador de alta performance a 5000 rpm durante 5 minutos. Estas emulsões foram adicionadas a 100 mL de solução de álcool polivinílico a 1 m/m% (W_2) e emulsificadas usando um homogeneizador de alta performance a 5000 rpm durante 5 minutos. A evaporação do solvente, permitindo o endurecimento das micropartículas, foi realizada por agitação contínua da múltipla emulsão numa placa de agitação a 700 rpm durante três horas numa hotte à temperatura ambiente, com exaustão ligada. As micropartículas formadas foram recuperadas através de filtração usando um papel de filtro Whatman™ de $0,45 \mu\text{m}$ e lavadas com 150 mL de água destilada para remover os resíduos de álcool polivinílico. As micropartículas recuperadas foram congeladas durante 24 horas a $-4 \text{ }^\circ\text{C}$ e liofilizadas durante 72 horas. Este processo encontra-se representado pelo esquema presente na Figura 14.

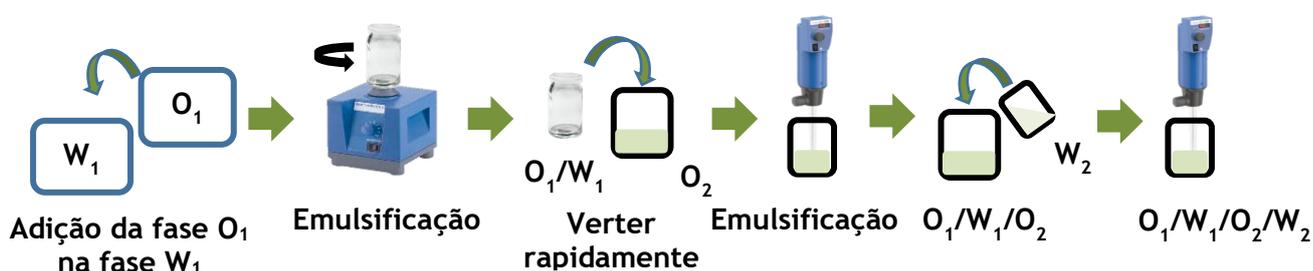


Figura 14: Esquema representativo do procedimento da múltipla emulsão

3.2.5 Gestão de resíduos

Durante este projeto, a maioria dos resíduos produzidos consistiam em padrões individuais (citronelol, geraniol, pulegona, terpeniol e eugenol) em solução de hexano e soluções aquosas contendo o material vegetal de gerânio numa fase inicial. Outros resíduos gerados incluíram soluções aquosas de carboximetilcelulose e gelatina. Todos os resíduos foram armazenados em frascos de vidro apropriados para esta finalidade, devidamente etiquetados, até serem tratados pela unidade especializada em gestão de resíduos da universidade: Sistema de Gestão Ambiental da FEUP - EcoFEUP.

4 Resultados e Discussão

4.1 Validação do método analítico

Após a injeção dos padrões no cromatógrafo gasoso, foi possível obter um cromatograma como está representado na Figura 15, permitindo assim a análise dos compostos presentes em cada padrão.

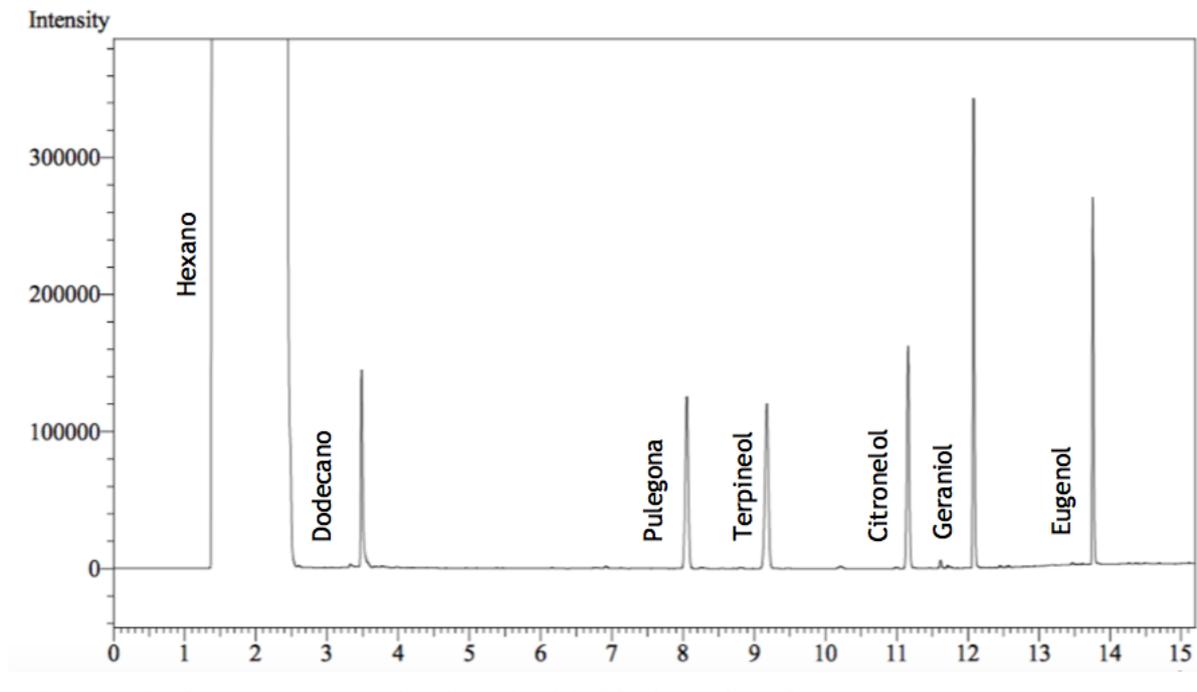


Figura 15: Cromatograma obtido pelo GC-FID do padrão P5 (composição/concentrações apresentada na tabela A1)

Após a análise dos padrões no GC/FID, foi possível a construção das retas de calibração para cada composição e a posterior validação das mesmas (Anexo A: Figuras A1 a A5). A validação do método tem em conta os seguintes critérios:

- A reta tem de ter pelo menos 5 pontos
- Gama de concentrações tem de diferir no mínimo num fator de 10
- $R > 0,995$
- $b - s_b < 0 < b + s_b$
- $s_a/a \times 100 < 5\%$

Assim, se a reta obedecer a estes 5 parâmetros pode concluir-se que é válida. Na Tabela 6, estão apresentados os valores obtidos para cada reta de cada composto para posterior validação (Alves, 2013).

Tabela 6: Parâmetros para validação do método analítico

Composto	Equação da reta	R	$\frac{S_a}{a}$	b-s _b	b+s _b	Validação
Eugenol	RA=(0,042±0,002)C +(0,039±0,277)	0,998	2,187	-0,110	0,188	✓
Terpineol	RA=(0,048±0,002)C +(0,067±0,345)	0,998	2,460	-0,118	0,253	✓
Citronelol	RA=(0,042±0,002)C +(0,047±0,274)	0,998	2,168	-0,100	0,194	✓
Geraniol	RA=(0,045±0,002)C +(0,095±0,442)	0,997	2,555	-0,143	0,332	✓
Pulegona	RA=(0,046±0,002)C +(0,058±0,301)	0,998	2,386	-0,104	0,220	✓

RA: razão entre a área do pico do composto e a área do pico do padrão interno (dodecano); C: concentração do composto (mg L⁻¹); R: Coeficiente de correlação

Como se pode observar pela Tabela 6, todas as retas cumprem os critérios de validação do método analítico. A partir das retas de calibração foi possível calcular os limites de detecção e de quantificação para cada composto. O limite de detecção (LD) corresponde à concentração mínima a partir da qual é possível detetar a presença do composto (Equação 2). O limite de quantificação (LQ) é a concentração mais baixa do composto que é possível medir com o grau de precisão e de exatidão definidos no método (Equação 3). Assim, na Tabela 7, está apresentada a gama de linearidade bem como os respetivos valores dos limites de detecção e de quantificação para cada composto.

Tabela 7: Gama de linearidade e limites de detecção de quantificação para cada composto

Composto	Gama de linearidade (mg L ⁻¹)	R ²	LD (mg L ⁻¹)	LQ (mg L ⁻¹)
Eugenol	0,078-387,720	0,996	0,128	0,426
Terpineol	0,074-372,044	0,995	0,077	0,257
Citronelol	0,077-384,836	0,996	0,152	0,505
Geraniol	0,097-485,724	0,995	0,145	0,485
Pulegona	0,071-353,080	0,996	0,069	0,229

R²: coeficiente de correlação quadrático; LD: limite de detecção; LQ: limite de quantificação

O LD e o LQ foram calculados tendo em conta a altura do pico do composto e a altura do pico de ruído. Assim, para este cálculo foram utilizados 3 padrões, o padrão com concentração mais baixa (padrão 1), o padrão de concentração intermédia (padrão 5) e o padrão de concentração mais elevada (padrão 10). Para cada um foi feita a média das alturas tanto do pico do composto como do pico do ruído e posteriormente foi calculado o S/N pela Equação (1) (Shrivastava, Alankar;Gupta, 2011).

$$\frac{S}{N} = 2 \frac{\text{altura do pico do composto}}{\text{altura do pico de ruído}} \quad (1)$$

A partir da Equação (1), é possível calcular o limite de deteção e de quantificação através das equações (2) e (3), respetivamente, nas quais $C_{\text{padrão}}$ corresponde à concentração do composto no padrão em questão.

$$LD = \frac{3C_{\text{padrão}}}{\frac{S}{N}} \quad (2)$$

$$LQ = \frac{10C_{\text{padrão}}}{\frac{S}{N}} \quad (3)$$

Analisando a Tabela 7, pode concluir-se que é possível detetar todos os compostos à excepção da pulegona e do terpineol para a concentração mais baixa, uma vez que o limite de deteção está abaixo da concentração dos compostos no padrão 1. Relativamente ao limite de quantificação, à semelhança do que acontece com o limite de deteção, não é possível quantificar todos os compostos no padrão 1.

4.2 Extração por SDE do padrão analítico

Para os estudos de precisão, foram efetuadas extrações do padrão analítico 8. Assim, foram calculados os coeficientes de variação e as eficiências de extração para cada composto (ver Anexo B). De modo a efetuar estes cálculos, realizaram-se 3 extrações de 2 mL do padrão 8 recorrendo ao método SDE e, posteriormente, foi feita a análise do extrato no cromatógrafo gasoso com detetor de ionização de chama. Na Figura 16, estão apresentados os respetivos valores dos coeficientes de variação e das eficiências de extração. Analisando a Figura 16, conclui-se que os coeficientes de variação estão acima do esperado, principalmente para a pulegona e o terpineol. No entanto, avaliando em termos gerais, os valores são aceitáveis. Relativamente aos valores das eficiências de extração, conclui-se que o maior valor da eficiência de extração pertence ao citrionelol. Este valor era esperado, uma vez que o citrionelol é o composto que possui um dos pontos de ebulição mais baixos, pelo que tem uma volatilidade superior aos outros compostos.

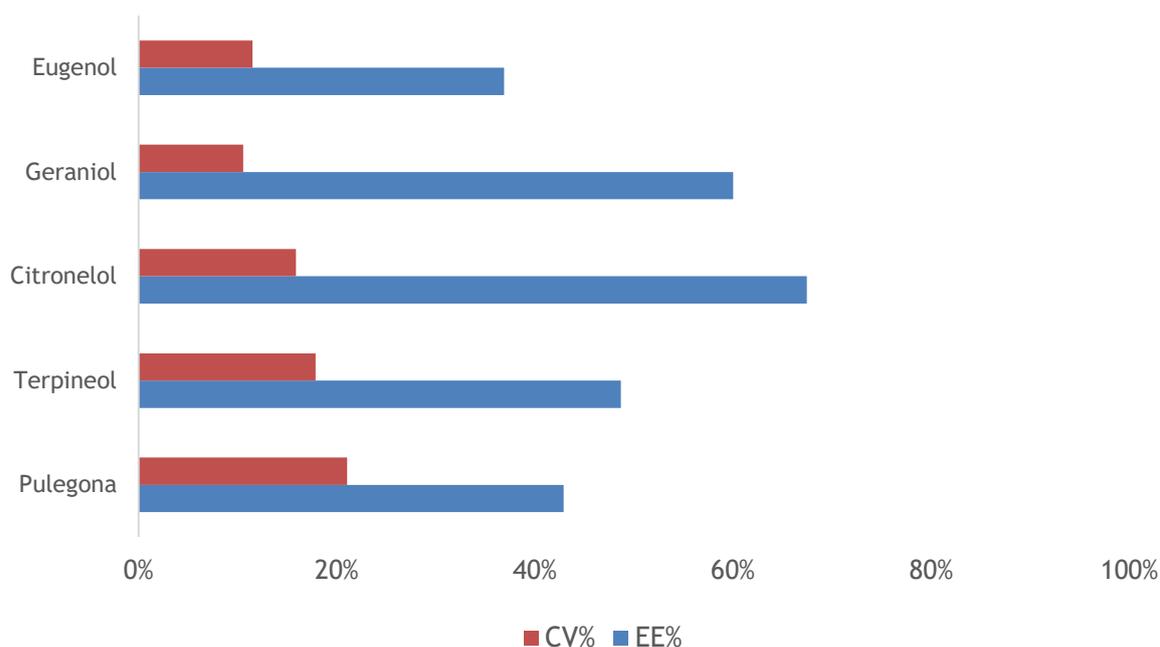


Figura 16: Valores de coeficientes de variação (CV%) e das eficiências de extração (EE%) para todos os compostos

No entanto, estes resultados ainda são complementados pela solubilidade dos compostos no solvente utilizado, pelo que, embora todos sejam solúveis no éter, o citronelol e o geraniol apresentam uma maior solubilidade, resultando na diminuição da volatilidade destes compostos, e, conseqüentemente, no aumento das eficiências de extração destes. Para os restantes compostos, obtiveram-se eficiências de extração superiores a 40% o que é considerado aceitável.

4.3 Extração do gerânio pelo método SDE

Para a extração do gerânio, foram efetuadas 3 extrações e posteriormente analisados os extratos no GC-FID, no qual as injeções foram efetuadas em duplicado. Na Figura 17, está apresentado um exemplo de um cromatograma obtido pelo GC-FID do extrato de gerânio.

Pela análise do cromatograma, pode verificar-se que os picos que apresentam uma maior área são o do citronelol e do geraniol, sendo por isso os compostos em maior quantidade. Após a análise dos resultados de injeção (em duplicado) por cada uma das três extrações efetuadas do gerânio, foi possível calcular os valores percentuais de cada composto no extrato, como está apresentado na Figura 18.

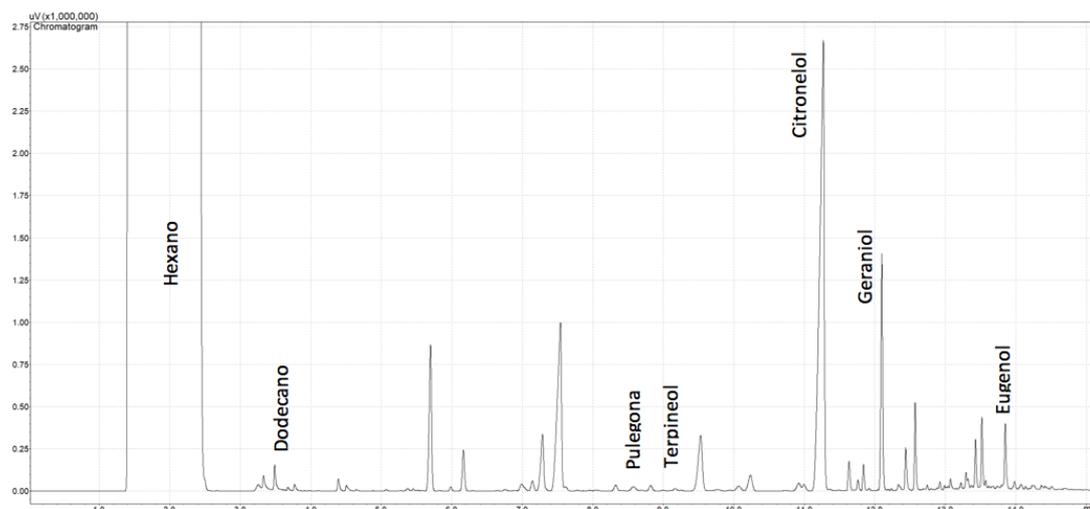


Figura 18: Cromatograma obtido por GC-FID de extrato de gerânio

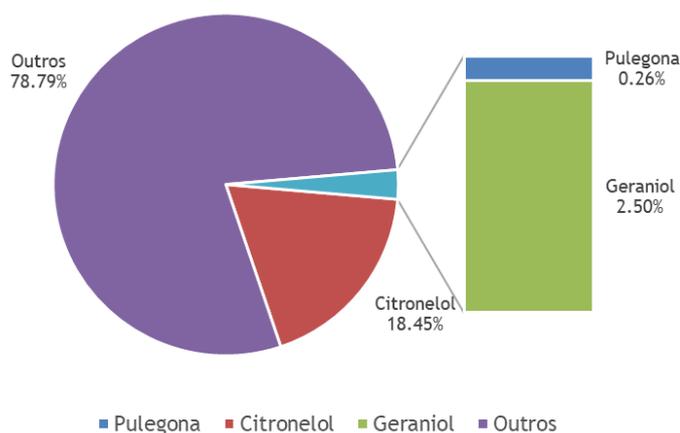


Figura 17: Valores percentuais de cada composto no extrato. Resultados obtidos a partir de três extrações de gerânio e análise em duplicado por GC-FID

Pela análise da Figura 18, conclui-se que os compostos com valor percentual mais elevado são o citronelol e o geraniol, constituindo os compostos maioritários do OE do gerânio, comprovando o descrito na literatura. Para além destes, também a pulegona está presente no extrato, embora com um valor percentual relativamente baixo. Relativamente ao terpeneol e ao eugenol são compostos que têm valor percentual desprezível, o que era esperado, uma vez que pela pesquisa bibliográfica efetuada são compostos que por norma não estão presentes no OE do gerânio.

Para além desta análise dos compostos presentes no extrato, ainda foi possível calcular a concentração dos compostos no OE e os respetivos coeficientes de variação, valores esses que estão presentes na Tabela 8.

Tabela 8: Compostos voláteis encontrados no extrato de gerânio

Composto	Concentração (mg L ⁻¹)	CV(%)
Eugenol	1,09	11,82
Terpineol	0,07*	14,76
Citronelol	823,62	0,66
Geraniol	99,38	12,58
Pulegona	7,45	9,58

CV(%): Coeficiente de variação em porcentagem. Resultados obtidos a partir de três análises dos extratos do gerânio por GC-FID. *concentração do composto abaixo do LD (calculado a partir das equações 1, 2 e 3)

Analisando a Tabela 8, conclui-se que os valores dos coeficientes de variação encontram-se a baixo de 15% para todos os compostos, sendo considerados aceitáveis, por esse motivo, os resultados são considerados precisos. Tendo em conta os limites de detecção e quantificação anteriormente calculados e os valores das concentrações de cada composto, conclui-se que o terpineol não é detetado, uma vez que a concentração deste composto é mais baixa que o limite de detecção e confirmando que este composto não está descrito na literatura como constituinte comum do gerânio. Quanto ao eugenol, a sua concentração é relativamente baixa, concluindo-se, assim, que existem quantidades vestigiais de eugenol no extrato do gerânio em estudo. Para os restantes compostos, são todos detetados e quantificados, sendo os componentes os maioritários do OE, o citronelol e o geraniol. Analisando o limite de quantificação, concluímos que todos os compostos são quantificados, uma vez que as concentrações destes são todas superiores aos valores do limite de quantificação.

4.4 Microencapsulação

4.4.1 Rendimento de produção das micropartículas

Para o cálculo do rendimento de produção das micropartículas, recorreu-se à equação (4).

$$RP \% = \frac{W_M}{W_I + W_P} \quad (4)$$

onde W_M é a massa das micropartículas recuperadas após o processo de liofilização, W_I é a massa de OE utilizado inicialmente no processo de microencapsulação e W_P é a massa dos polímeros utilizados para a microencapsulação dos compostos maioritários do OE do gerânio. Os valores das massas necessárias para o cálculo do rendimento de produção das micropartículas estão apresentados na Tabela 9. Segundo a técnica $O_1/W_1/O_2/W_2$, foi preparada uma fase oleosa, O_1 . Esta solução corresponde a uma solução padrão de mistura de citronelol

e geraniol em hexano, com uma concentração de 0,5 mg/mL, de cada composto. Deste modo, considerando um volume de encapsulação de O_1 de 10 mL, pretendeu-se encapsular 5 mg de cada um dos compostos, correspondendo a uma massa final de compostos de 10 mg. Deste modo, e tal como está apresentado na tabela 9, o rendimento do produto foi de 25.6%. Apesar de este valor poder ser considerado relativamente baixo quando comparado com outros valores de rendimento de produto encontrados na literatura, considera-se que este valor foi aceitável tendo em conta os objetivos principais desta tese. Paulo & Santos (2018a) reportaram valores de rendimento de produto superiores a 90%, num processo otimizado à escala laboratorial. No entanto, note-se que esta foi a primeira vez que este tipo de emulsão foi experimentalmente testada e que o processo não foi otimizado.

Tabela 9: Massas dos polímeros, do óleo essencial e das micropartículas após liofilização (mg)

m (PLGA) (mg)	500,50
m (CMC) (mg)	100,90
m (OE) (mg)	10
m (micropartículas após liofilização)	154,99
RP(%)	25.6%

Assim, tendo em conta a equação (4), obteve-se um rendimento de 25.6%. É importante referir que este rendimento só foi calculado para as micropartículas obtidas pela técnica da múltipla emulsão, uma vez que a partir da coacervação não foi possível obter micropartículas (apenas se obteve um aglomerado polimérico).

4.4.2 Morfologia das micropartículas

Após a realização dos diferentes procedimentos para a obtenção de micropartículas utilizando um padrão de mistura constituído pelos dois compostos maioritários, recorreu-se ao SEM para a análise da morfologia das micropartículas, de modo a compreender as suas respetivas características. Assim, na Figura 19 estão representadas as micropartículas obtidas a partir do procedimento da múltipla emulsão. Analisando a Figura 19 pode concluir-se que este método permitiu a obtenção de uma elevada quantidade de micropartículas que apresentam uma elevada polidispersividade, caracterizada por uma distinta gama de dimensões das micropartículas. Embora as micropartículas apresentem uma forma esférica em todos os casos, estas são de tamanho variável e com características na morfologia bastante distintas, como se pode analisar pela Figura 19A. Na Figura 19B, obteve-se uma visão completa de uma das muitas micropartículas obtidas, na qual se pode verificar que estas apresentam várias cavidades, podendo ser confundidas com poros, no entanto, verificou-se que estas cavidades não correspondem a poros mas sim alterações superficiais, cujo o estudo recomenda-se que seja efetuado em trabalhos posteriores.

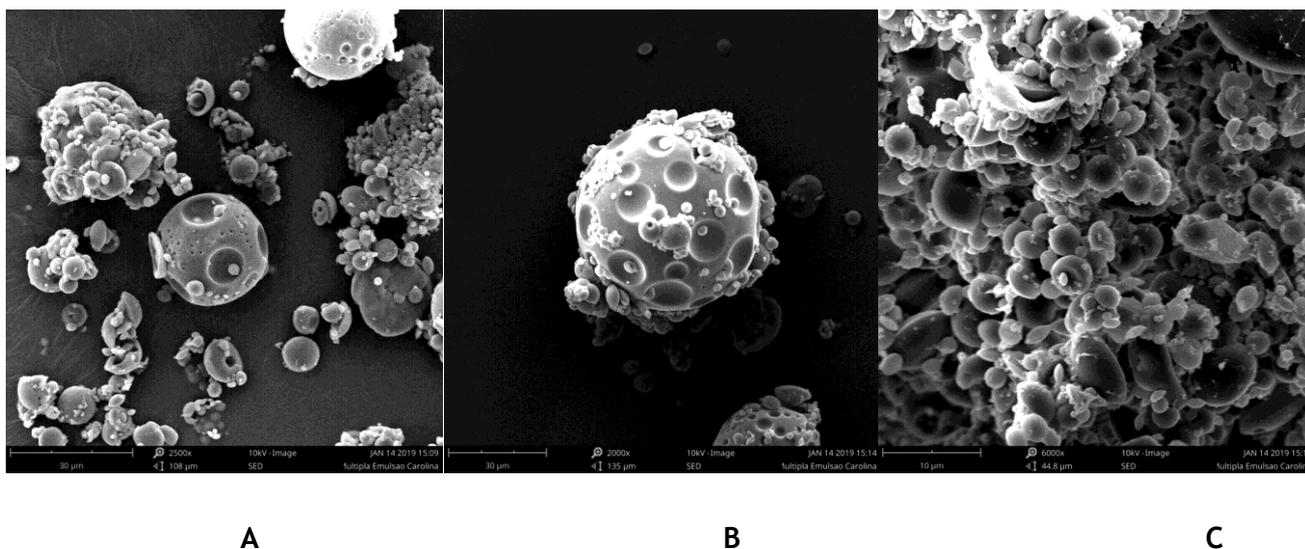


Figura 19: Micropartículas obtidas a partir do método da múltipla emulsão (uma ampliação de 2500x é apresentada em A, uma ampliação de 2000x é apresentada em B e uma ampliação de 6000x é apresentada em C); intensidade 10.00kV)

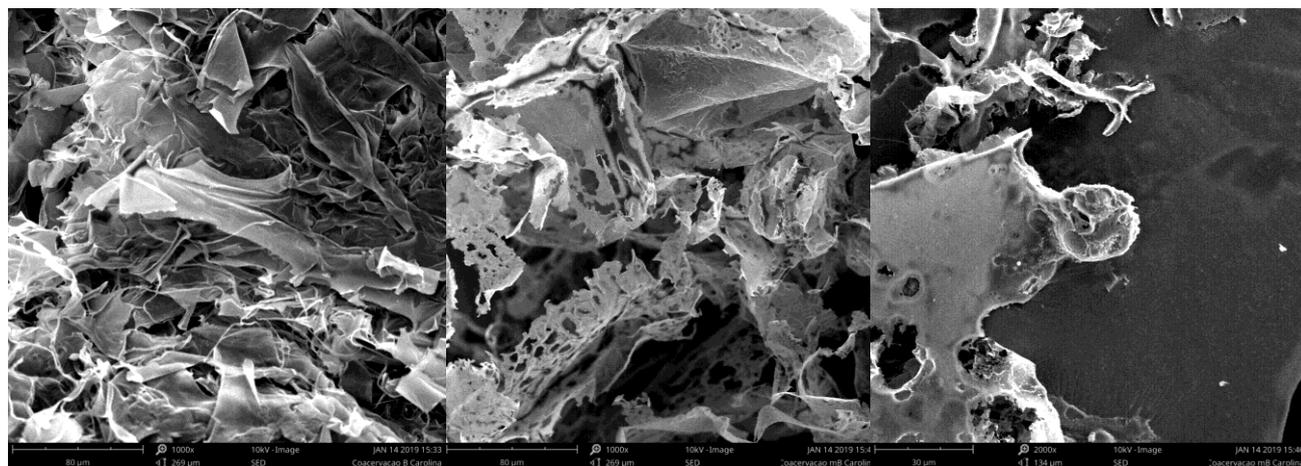
Para além disso, foi possível verificar que micropartículas de tamanho inferior formaram aglomerados, nos quais estas apresentam pouca rugosidade e um menor número de cavidades, ao contrário do que acontece com as micropartículas de tamanho superior, como se pode verificar pela Figura 19C.

Deste modo, e de forma inovadora, verificou-se a possibilidade da inclusão de OEs em matrizes poliméricas, recorrendo a uma múltipla emulsão ($O_1/W_1/O_2/W_2$), tal como está descrito na secção 3 deste documento. Resultados comparativos relativos à morfologia obtida não foram encontrados na literatura, uma vez que esta foi a primeira vez que se efetuou a análise morfológica a micropartículas obtidas por esta técnica. Estes resultados são inovadores e de grande importância científica.

Relativamente ao processo de coacervação, foram efetuados dois procedimentos em que num deles foi efetuada uma alteração ao procedimento descrito, no que diz respeito à quantidade de CMC utilizada. Assim, na Figura 20 estão apresentadas as micropartículas com a quantidade pretendida (A) e outras com uma quantidade inferior (B e C).

Pela análise da Figura 20A pode concluir-se que a morfologia é amorfa, pelo que não há qualquer micropartícula definida. Na Figura 20B pode observar-se estruturas em forma de placa, com uma porosidade muito elevada. Dado que nestas micropartículas foi efetuada uma alteração ao procedimento e, por esse motivo, a concentração de CMC é inferior à de gelatina, o que pode ser o motivo da dificuldade na formação de micropartículas. Contudo, como se

verifica pela Figura 20C, há, de facto, uma tentativa de formação de micropartículas, mas que não foi efetuada com sucesso.



A

B

C

Figura 20: : Micropartículas obtidas a partir da técnica de coacervação (uma ampliação de 1000x é apresentada em A e B e uma ampliação de 2000x é apresentada em C); intensidade 10.00kV)

Relativamente ao processo de coacervação com surfactante, não foi possível analisar a morfologia recorrendo ao SEM, uma vez que a amostra, após liofilização, apresentava, ainda, alguma oleosidade característica dos compostos a microencapsular e os processos de análise por SEM requerem que as amostras se encontrem totalmente secas.

4.4.3 Distribuição de tamanho das micropartículas

Para a determinação do tamanho das micropartículas recorreu-se à metodologia de granulometria a laser, o que permitiu a análise da variabilidade de tamanho das micropartículas. Uma vez que a análise a partir do SEM permitiu concluir que apenas ocorreu a formação de micropartículas para a técnica da múltipla emulsão, apenas estas micropartículas foram sujeitas à granulometria a laser. Assim, obtiveram-se os dados apresentados na Tabela 10.

Tabela 10: Dados da distribuição média de tamanho obtidos a partir da granulometria a laser

Experiência	M (μm)	DS (μm)	CV (%)	D ₁₀	D ₅₀	D ₉₀	PDI
1	71,4	138,1	193,2	2,6	20,7	182,9	8,7
2	69,8	135,7	194,4	2,7	20,4	177,3	8,6
3	54,1	91,7	169,5	2,70	19,3	145,0	7,4

M: Média em μm ; DS: Desvio padrão; CV: coeficiente de variação; PDI: poli dispersive index

Os valores de polidispersividade foram calculados a partir da equação (5).

$$PDI = \frac{D_{90} - D_{10}}{D_{50}} \quad (5)$$

Em que D_{90} , D_{50} e D_{10} , representam os valores de diâmetro característicos a 90%, 50% e 10% do volume de amostra analisado.

Deste modo pode concluir-se que o tamanho médio de partícula foi de $65.1 \pm 26 \mu\text{m}$, e a polidispersividade média foi de 8.2 ± 0.7 . O tamanho médio de partícula foi relativamente baixo, aproximando-se de valores nanométricos, o que revela uma característica muito importante deste estudo: foi possível encapsular compostos presentes em OEs utilizando uma técnica de múltipla emulsão sem a obtenção de partículas com tamanhos característicos grandes. De facto, as forças intermoleculares que se estabeleceram, bem como a grande estabilidade das emulsões formadas devem ter contribuído positivamente para o valor apresentado. Tal como seria de esperar pelos estudos de SEM, as micropartículas são muito polidispersas: a diferença entre os diâmetros nos volumes característicos de 90% e 10% foi cerca de 8 vezes maior que a mediana do tamanho de partícula.

Para além dos resultados apresentados na Tabela 10, foi possível a construção dos gráficos relativos à distribuição em volume, em área e em número. Contudo, a análise será efetuada apenas para o gráfico com distribuição em volume, apresentado na Figura 21, resultado das três leituras efetuadas das micropartículas. Pela análise da Figura 21, pode verificar-se a inexistência de um único pico, havendo, portanto, a presença de vários picos. Deste modo conclui-se que a distribuição foi multimodal, sendo essencialmente unimodal para diâmetros superiores de $450 \mu\text{m}$. Assim, a presença de aglomerados de micropartículas pode ser a justificação para estes diversos picos, reforçados pelos valores elevados de PDI. Os resultados de granulometria a laser suportam os resultados obtidos da análise morfológica bem como da distribuição de tamanho de partícula: a maioria do volume de partículas analisada apresenta tamanhos baixos, no entanto muito polidispersos, aqui representados pela presença de uma curva multimodal.

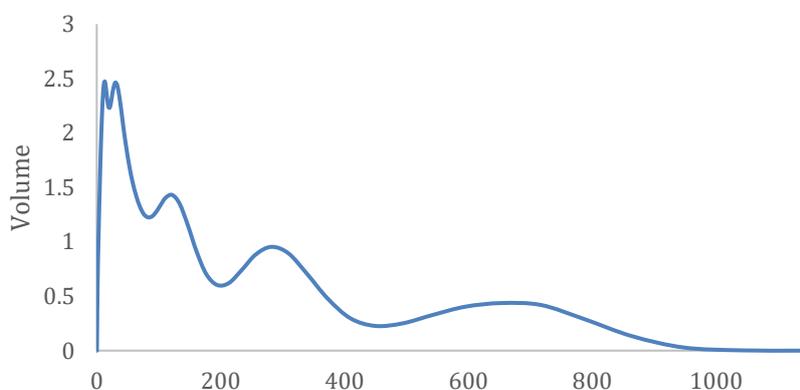


Figura 21: Distribuição em volume das micropartículas

5 Conclusões

Nesta dissertação foi efetuada a extração do OE de gerânio e, posteriormente, a sua quantificação pelo GC-FID. Para tal, foi necessário proceder à validação do método analítico, que permitiu concluir que o método era válido e que as retas de calibração cumpriam todos os parâmetros.

Relativamente ao método de extração, o SDE permitiu extrair com sucesso o OE do gerânio com eficiências de extração consideráveis para todos os compostos, variando entre 36,9% - 67,5%, sendo o citronelol e o geraniol os compostos com as eficiências de extração mais elevadas. O eugenol, a pulegona e o terpineol apresentam as eficiências de extração mais baixas, o que permite concluir que sendo os compostos mais voláteis e devido ao tempo de extração utilizado podem ocorrer perdas por volatilidade. Para além disto, após a extração do OE procedeu-se à respetiva quantificação dos compostos recorrendo ao GC-FID. Assim, pode concluir-se e comprovar que os compostos maioritários são o citronelol e o geraniol, compostos esses que foram extraídos com as maiores eficiências de extração.

Após a extração do OE, efetuaram-se três procedimentos distintos para a microencapsulação dos dois compostos maioritários: coacervação, coacervação com surfactante e múltipla emulsão. Contudo, os resultados obtidos permitiram concluir que embora a coacervação seja o método mais descrito na literatura para a microencapsulação de compostos hidrofóbicos, este não apresentou formação de micropartículas, pelo que apenas se obtiveram estruturas em forma de placas. Pelo contrário, o método da múltipla emulsão, embora não esteja descrito na literatura para este tipo de compostos, permitiu a formação de micropartículas de forma esférica, embora com uma elevada polidispersividade e rugosidade.

Assim, a partir destes resultados, conclui-se que de facto foi possível obter micropartículas de OE do gerânio. No entanto, é importante que se efetuem mais estudos de modo a ajustar todos os parâmetros para a obtenção de resultados mais conclusivos.

6 Avaliação do trabalho realizado

6.1 Objetivos Realizados

Apesar de todos os obstáculos que foram surgindo, os objetivos propostos foram todos concretizados com sucesso. No entanto, se o tempo não fosse uma condicionante poder-se-ia ter testado outros procedimentos de microencapsulação e efetuado uma caracterização das micropartículas mais a fundo, complementando assim os resultados obtidos nesta dissertação.

6.2 Limitações e Trabalho Futuro

Ao longo desta dissertação ocorreram algumas limitações que condicionaram o período de tempo para a execução de alguns procedimentos tais como a partilha do liofilizador por vários investigadores e a indisponibilidade de alguns equipamentos tais como o SEM e o Coulter.

A nível de trabalho futuro, seria interessante a realização da microencapsulação do extrato obtido, uma vez que apenas foi efetuada para os dois compostos maioritários do gerânio. Para além disso, seria interessante otimizar a técnica da múltipla emulsão, preparando micropartículas com alterações ao procedimento apresentado, de modo a perceber as concentrações mais favoráveis dos polímeros utilizados e de que modo será possível obter micropartículas uniformes, com baixa polidispersibilidade e menor formação de aglomerados e analisar as alterações superficiais das micropartículas que não correspondem a poros. Para além disso, ainda seria importante determinar a capacidade antioxidante das micropartículas, uma vez que o gerânio é considerado uma das plantas medicinais com mais características antioxidantes. Por último, realizar os estudos de libertação controlada seria o auge deste trabalho futuro, dado que constitui uma das partes mais importantes da microencapsulação e que permite a compreensão do modo como se podem incorporar estas micropartículas para as mais diversas finalidades e indústrias.

6.3 Apreciação Final

De uma forma geral, o balanço desta dissertação é positivo. Contudo, os resultados ainda podem ser considerados preliminares, principalmente ao nível da microencapsulação, sendo necessário serem desenvolvidos e aprimorados para obter resultados ainda melhores.

Referências

- Al-Sagheer, A. A., Mahmoud, H. K., Reda, F. M., Mahgoub, S. A., & Ayyat, M. S. (2018). Supplementation of diets for *Oreochromis niloticus* with essential oil extracts from lemongrass (*Cymbopogon citratus*) and geranium (*Pelargonium graveolens*) and effects on growth, intestinal microbiota, antioxidant and immune activities. *Aquaculture Nutrition*, 24(3), 1006-1014.
- Alves, A. (2013). *Apontamentos de MÉTODOS INSTRUMENTAIS DE ANÁLISE*.
- Alvim, I. D., & Grosso, C. R. F. (2010). Microparticles obtained by complex coacervation: influence of the type of reticulation and the drying process on the release of the core material. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 30(4), 1069-1076.
- Asbahani, A. El, Miladi, K., Badri, W., Sala, M., Addi, E. H. A., Casabianca, H., ... Elaissari, A. (2015). Essential oils: From extraction to encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics*, 483(1-2), 220-243.
- Bach, H., & S, E. (2016). Protective antifungal activity of essential oils extracted from *Buddleja perfoliata* and *Pelargonium graveolens* against fungi isolated from stored grains, (Kew 2013).
- Bakry, A. M., Abbas, S., Ali, B., Majeed, H., Abouelwafa, M. Y., Mousa, A., & Liang, L. (2016). Microencapsulation of Oils: A Comprehensive Review of Benefits , Techniques , and Applications, 15.
- Ben Slima, A., Ali, M. Ben, Barkallah, M., Traore, A. I., Boudawara, T., Allouche, N., & Gdoura, R. (2013). Antioxidant properties of *Pelargonium graveolens* L'Her essential oil on the reproductive damage induced by deltamethrin in mice as compared to alpha-tocopherol. *Lipids in Health and Disease*, 12(1), 1-9.
- Boukhris, M., Ben Nasri-Ayachi, M., Mezghani, I., Bouaziz, M., Boukhris, M., & Sayadi, S. (2013). Trichomes morphology, structure and essential oils of *Pelargonium graveolens* L'Hér. (Geraniaceae). *Industrial Crops and Products*, 50, 604-610.
- Boukhris, M., Bouaziz, M., Feki, I., Jemai, H., El Feki, A., & Sayadi, S. (2012). Hypoglycemic and antioxidant effects of leaf essential oil of *Pelargonium graveolens* LHér. in alloxan induced diabetic rats. *Lipids in Health and Disease*, 11, 1-10.
- Boukhris, M., Simmonds, M. S. J., Sayadi, S., & Bouaziz, M. (2013). Chemical composition and biological activities of polar extracts and essential oil of rose-scented geranium, *pelargonium graveolens*. *Phytotherapy Research*, 27(8), 1206-1213.
- Bralla, J. G. (2007). Chapter 11 - Chemical Processes. In *Handbook of Manufacturing Processes-*

How Products, Components and Materials are Made. Industrial Press. Retrieved from <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt006HSMJ1/handbook-manufacturing/continuous-processes>

Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223-253.

Cammack, Richard; Attwood, Teresa K.; Campbell, Peter N.; Parish, J. Howard; Smith, Anthony D.; Stirling, John L.; Vella, F. (2006). *Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology (2nd Edition) - Knovel* (Second Edi). Oxford University Press.

Carvalho, I. T., Estevinho, B. N., & Santos, L. (2016). Application of microencapsulated essential oils in cosmetic and personal healthcare products - A review. *International Journal of Cosmetic Science*, 38(2), 109-119.

Castanon, J. I. R. (2007). History of the use of antibiotic as growth promoters in European poultry feeds. *Poultry Science*, 86(11), 2466-2471.

Ćavar, S., & Maksimović, M. (2012). Antioxidant activity of essential oil and aqueous extract of *Pelargonium graveolens* L'Her. *Food Control*, 23(1), 263-267.

Chaintreau, A. (2001). Simultaneous distillation - extraction : from birth to maturity — review. *Flavour and Fragrance Journal*, 16, 136-148.

Coelho, J. P., Cristino, A. F., Matos, P. G., Rauter, A. P., Nobre, B. P., Mendes, R. L., ... Palavra, A. F. (2012). Extraction of volatile oil from aromatic plants with supercritical carbon dioxide: Experiments and modeling. *Molecules*, 17(9), 10550-10573.

Devi, N., & Maji, T. K. (n.d.). International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials Study of Complex Coacervation of Gelatin A with Sodium Carboxymethyl Cellulose : Microencapsulation of Neem (*Azadirachta indica* A . Juss .) Seed Oil, (May 2014), 37-41.

Dias, D. R., Botrel, D. A., Fernandes, R. V. D. B., & Borges, S. V. (2017). Encapsulation as a tool for bioprocessing of functional foods. *Current Opinion in Food Science*, 13, 31-37.

Essid, R., Zahra, F., Msaada, K., Sghair, I., Hammami, M., Bouratbine, A., ... Limam, F. (2015). Antileishmanial and cytotoxic potential of essential oils from medicinal plants in Northern Tunisia. *Industrial Crops & Products*, 77, 795-802.

Estevinho, B. N., Lopes, A. R., Sousa, V., Rocha, F., & Nunes, O. C. (2017). Microencapsulation of *Gulosibacter molinivorax* ON4 T cells by a spray-drying process using different biopolymers. *Journal of Hazardous Materials*, 338, 85-92.

Fayed, S. A. (2009). Antioxidant and anticancer activities of *Citrus reticulata* (petitgrain

mandarin) and *Pelargonium graveolens* (geranium) essential oils. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 5(January 2013), 740-747.

Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., & Saurel, R. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*, 40(9), 1107-1121.

Ghosh, S. (2006). An Overview of Coatings and Paints. *Functional Coatings: By Polymer Microencapsulation*. Retrieved from https://books.google.co.za/books?hl=en&lr=&id=F_apa7hPEVIC&oi=fnd&pg=PR5&dq=Ghosh+emulsions&ots=R0ZwGYDhZA&sig=Bx_vt_WSzCo4KqSOGole8tOVH0k

Gomes, P. B., Mata, V. G., & Rodrigues, A. E. (2007). Production of rose geranium oil using supercritical fluid extraction. *Journal of Supercritical Fluids*, 41(1), 50-60.

Hong, K., & Park, S. (1999). Melamine resin microcapsules containing fragrant oil: Synthesis and characterization. *Materials Chemistry and Physics*, 58(2), 128-131.

Hsouna, A. Ben, & Hamdi, N. (2012). Phytochemical composition and antimicrobial activities of the essential oils and organic extracts from pelargonium graveolens growing in Tunisia, 1-7.

Huang, H.-J., Yuan, W.-K., & Chen, X. D. (2008). Microencapsulation Based on Emulsification for Producing Pharmaceutical Products: A Literature Review. *Developments in Chemical Engineering and Mineral Processing*, 14(3-4), 515-544.

Jyothi, N. V. N., Prasanna, P. M., Sakarkar, S. N., Prabha, K. S., Ramaiah, P. S., & Srawan, G. Y. (2010). Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency. *Journal of Microencapsulation*, 27(3), 187-197.

Lai, F., Wissing, S. A., Müller, R. H., & Fadda, A. M. (2006). *Artemisia arborescens* L Essential Oil - Loaded Solid Lipid Nanoparticles for Potential Agricultural Application : Preparation and Characterization. *AAPS PharmSciTech*, 7(1), E1-E9. Retrieved from file:///D:/work/literature/mendeley/10.1208_pt070102.pdf

Lin, P., Jwo, J., & Chang, I. (2016). Essential oils from Taiwan : Chemical composition and antibacterial activity against Escherichia coli. *Journal of Food and Drug Analysis*, 1-7.

Madene, A., Jacquot, M., Scher, J., & Desobry, S. (2006). Flavour encapsulation and controlled release - A review. *International Journal of Food Science and Technology*, 41(1), 1-21.

Mahboubi, M., Kazempour, N., & Mahboubi, A. (2014). The Efficacy of Essential Oils as Natural Preservatives in Vegetable Oil, 11(October 2013), 334-346.

Makadia, H. K., & Siegel, S. J. (2011). Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. *Polymers*, 3(3), 1377-1397.

- Maul, A. A., Wasicky, R., & Bacchi, E. M. (1996). Extração por fluido supercrítico. *Revista Brasileira de Farmacognosia*.
- Mayaud, L., Carricajo, A., Zhiri, A., & Aubert, G. (2008). Comparison of bacteriostatic and bactericidal activity of 13 essential oils against strains with varying sensitivity to antibiotics. *Letters in Applied Microbiology*, 47(3), 167-173.
- Mohareb, A. S. O., & Badawy, M. E. I. (2013). Antifungal activity of essential oils isolated from Egyptian plants against wood decay fungi, 499-505.
- Pandith, S. A., Dhar, N., Wani, T. A., Razdan, S., Bhat, W. W., Rana, S., ... Lattoo, S. K. (2017). Production dynamics in relation to ontogenetic development and induction of genetic instability through in vitro approaches in *Pelargonium graveolens*: A potential essential oil crop of commercial significance. *Flavour and Fragrance Journal*, 32(5), 376-387.
- Patravale, V. B., & Mandawgade, S. D. (2008). Novel cosmetic delivery systems: An application update. *International Journal of Cosmetic Science*, 30(1), 19-33.
- Paulo, F., & Santos, L. (2017). Design of experiments for microencapsulation applications: A review. *Materials Science and Engineering C*, 77, 1327-1340.
- Paulo, F., & Santos, L. (2018a). Inclusion of hydroxytyrosol in ethyl cellulose microparticles: In vitro release studies under digestion conditions. *Food Hydrocolloids*, 84(June), 104-116.
- Paulo, F., & Santos, L. (2018b). Microencapsulation of caffeic acid and its release using a w / o / w double emulsion method: Assessment of formulation parameters. *Drying Technology*, 0(0), 1-12.
- Pavela, R., & Benelli, G. (2016). Essential Oils as Ecofriendly Biopesticides? Challenges and Constraints. *Trends in Plant Science*, 21(12), 1000-1007.
- Peterson, A., Machmudah, S., Roy, B. C., Goto, M., Sasaki, M., & Hirose, T. (2006). Extraction of essential oil from geranium (*Pelargonium graveolens*) with supercritical carbon dioxide. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 81(2), 167-172.
- Ponomareva, E. I., & Molohova, E. I. (2017). Evaluation of the Efficiency of Supercritical Carbon Dioxide Extraction for *Pelargonium graveolens* L'Her Essential Oil Production. *Russian Journal of Physical Chemistry B*, 11(8), 1270-1275.
- Ralambondrainy, M., Belarbi, E., Viranaicken, W., Baranauskien, R., Venskutonis, P. R., Despr, P., ... El, C. (2018). In vitro comparison of three common essential oils mosquito repellents as inhibitors of the Ross River virus, 1-14.
- Rassem, H. H. A., Nour, A. H., & Yunus, R. M. (2016). Techniques For Extraction of Essential

Oils From Plants : A Review. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 10(16), 117-127.

Reis-Vasco, E. M. C., Coelho, J. A. P., & Palavra, A. M. F. (1999). Comparison of pennyroyal oils obtained by supercritical CO₂ extraction and hydrodistillation. *Flavour and Fragrance Journal*, 14(3), 156-160.

Rosato, A., Maggi, F., Cianfaglione, K., Conti, F., Rakotosaona, R., Fracchiolla, G., ... Corbo, F. (2018). Chemical composition and antibacterial activity of seven uncommon essential oils. *Journal of Essential Oil Research*, 2905, 1-11.

Se, G. (2004). Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends, 15, 330-347.

Shrivastava, Alankar; Gupta, V. B. (2011). Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods, 2(1), 21-25.

Singh, M. N., Hemant, K. S. Y., Ram, M., & Shivakumar, H. G. (2010). Microencapsulation: A promising technique for controlled drug delivery. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 5(2), 65-77. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21589795>

Spectrometry, S. M. (2016). *Experimental Methodologies for the Characterization of Nanoparticles*.

Svoboda, K. P., & Greenaway, R. I. (2003). Investigation of volatile oil glands of *Satureja hortensis* L. (summer savory) and phytochemical comparison of different varieties. *International Journal of Aromatherapy*, 13(4), 196-202.

Teixeira, B., Marques, A., Ramos, C., Batista, I., Serrano, C., Matos, O., ... Nunes, M. L. (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.

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.

Xiao, Z., Liu, W., Zhu, G., Zhou, R., & Niu, Y. (2013). A review of the preparation and application of flavour and essential oils microcapsules based on complex coacervation technology, (October).

Yan, C., & Zhang, W. (2014). *Coacervation Processes. Microencapsulation in the Food Industry*. Elsevier Inc.

Anexo A

Na tabela A1 estão apresentados os valores das concentrações de cada composto nos 10 padrões de mistura preparados.

Tabela A 1: Concentrações de cada compostos nos diferentes padrões

	Concentração (mg L ⁻¹)				
	Eugenol	(S)-(-)- α -Terpineol	Citronelol	Geraniol	Pulegona
P10	387,72	372,04	384,84	485,72	353,08
P9	271,40	260,39	269,39	340,01	247,16
P8	155,09	148,82	153,93	194,29	141,23
P7	116,32	111,61	115,45	145,72	105,92
P6	77,54	74,41	76,97	97,14	70,62
P5	38,77	37,20	38,48	48,57	35,31
P4	7,75	7,44	7,70	9,71	7,06
P3	3,88	3,72	3,85	4,86	3,53
P2	0,78	0,74	0,77	0,97	0,71
P1	0,08	0,07	0,08	0,10	0,07

Assim, após a injeção dos padrões no cromatógrafo gasoso com detetor por ionização de chama e utilizando os valores das concentrações de cada composto nos padrões, obtivemos as retas de calibração para cada composto que se encontram apresentadas nas figuras seguintes.

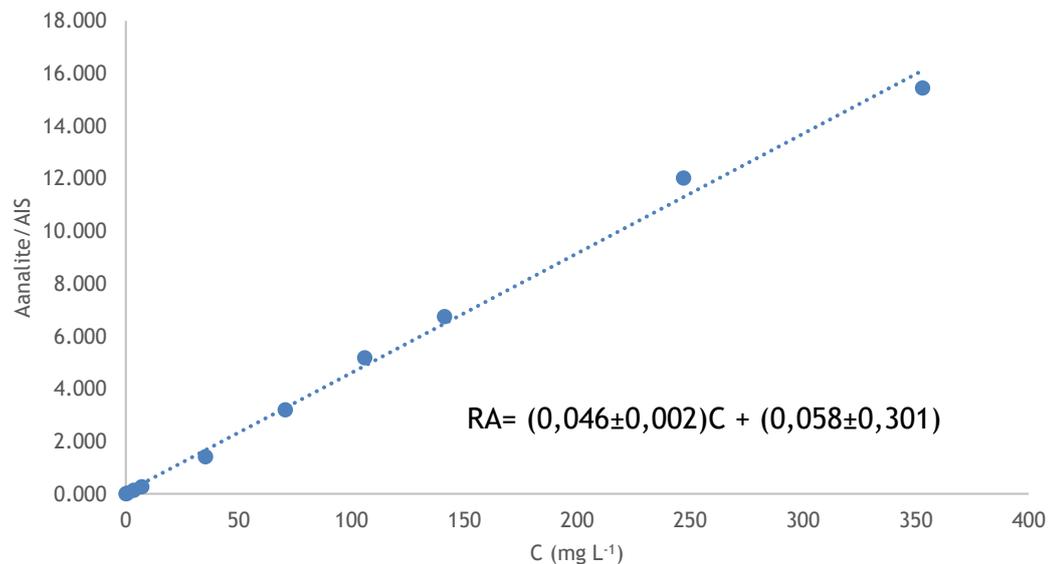


Figura A1: Reta de calibração da pulegona

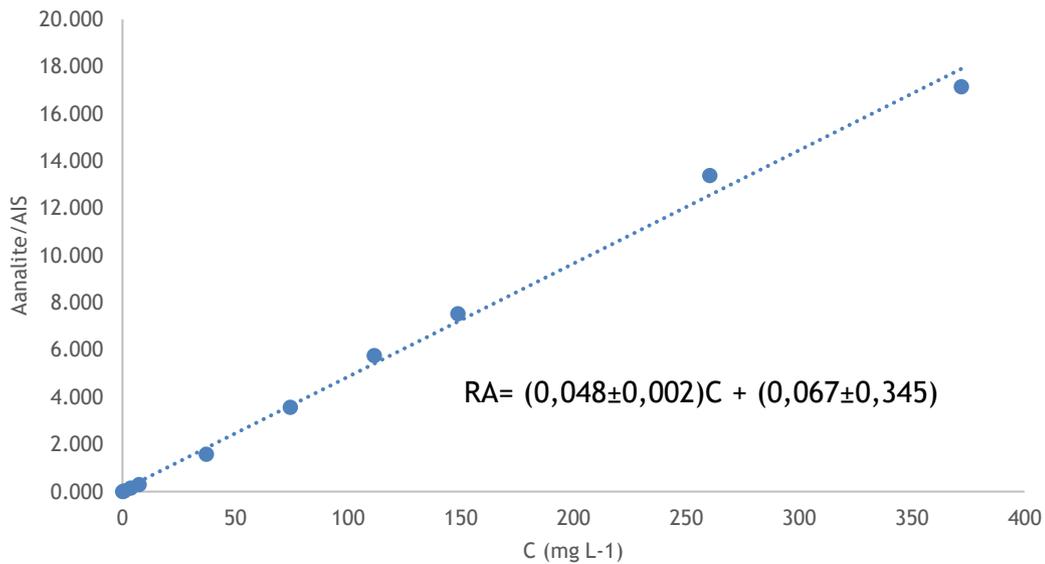


Figura A2: Retas de calibração do terpineol

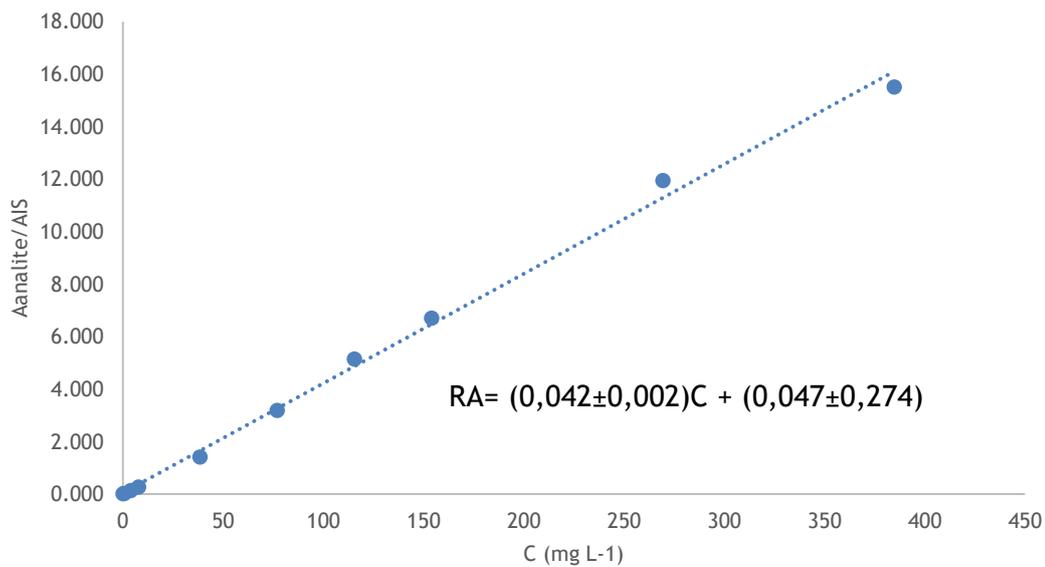


Figura A3: Retas de calibração do citronelol

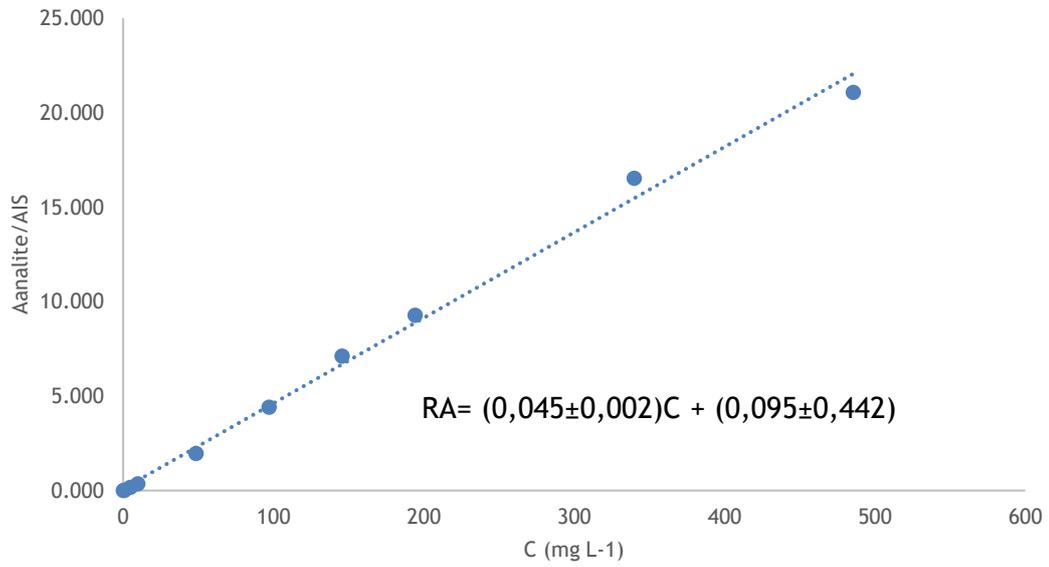


Figura A4: Reta de calibração do geraniol

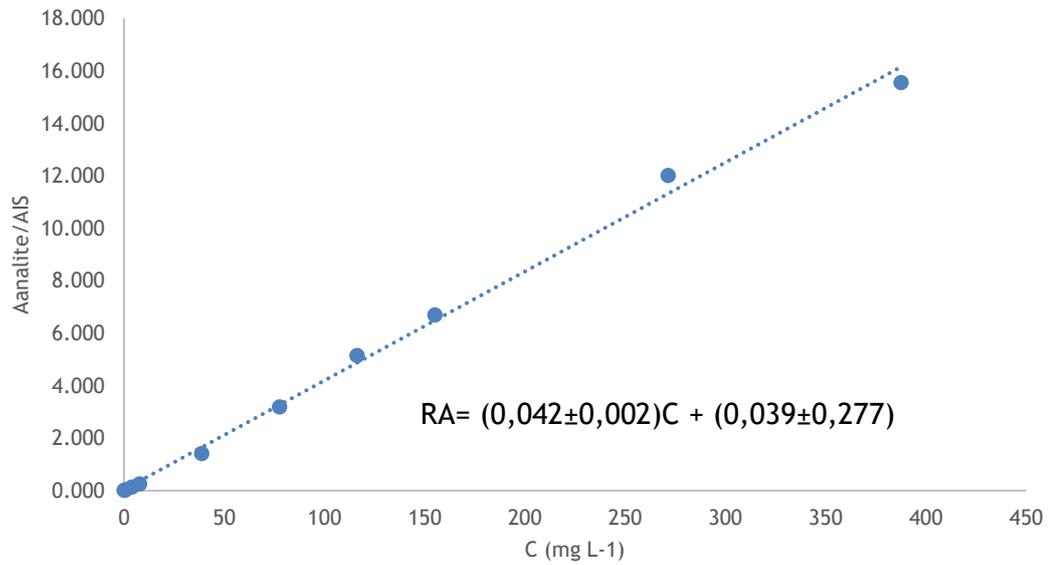


Figura A5: Reta de calibração do eugenol

Anexo B

Para o cálculo da eficiência de extração foram utilizadas as equações apresentadas.

$$C_{injetada} = \frac{R_{médio-b}}{a} \quad (B1)$$

na qual a razão média corresponde à média entre a razão da área do composto e a área do padrão interno (dodecano).

Uma vez calculada a concentração injetada a partir da equação B1, calculou-se a concentração sem padrão interno, a partir da equação B2.

$$C_{sem PI} = \frac{C_{injetada} V_F}{V_{diluído}} \quad (B2)$$

na qual VF corresponde ao volume final do vial para injeção no GC-FID e Vdiluído corresponde ao volume do extrato diluído.

Assim, depois dos dois cálculos efetuados, calculou-se a eficiência de extração a partir da equação B3.

$$EE\% = \frac{0,005 C_{sem PI}}{0,002 C_{padrão}} \quad (B3)$$

