



**INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA**  
**INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DE LISBOA**  
**ÁREA DEPARTAMENTAL DE ENGENHARIA QUÍMICA**

**Extração supercrítica do *Agastache foeniculum* (Lamiaceae)**  
**Caracterização dos Extratos e Modelação**

**Andreia Alexandra Santos Cardoso**

Licenciada em Engenharia Química e Biológica

Trabalho Final de Mestrado para obtenção do Grau

Mestre em Engenharia Química e Biológica

Orientadores:

Professor Doutor José Coelho  
Professor Doutor António Palavra

Júri:

Presidente: Doutora Rita Pacheco  
Vogal (Arguente): Doutora Cecília Calado  
Vogal (Orientador): Doutor José Coelho

Lisboa, Dezembro de 2017



## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador, Dr. José Coelho devo o maior dos agradecimentos por toda a partilha de conhecimentos, pelo nível de exigência, por me motivar a fazer mais e melhor e pelo bom ambiente vivido no laboratório, foi sem dúvida mais fácil a realização deste trabalho sob a alçada da sua orientação e boa disposição. Aprendi que sou mais capaz do que julgava e que um bom trabalho não deixa de o ser, apenas por não se obterem os melhores resultados. Agradeço ao meu orientador, Dr. António Palavra, pela partilha de orientação neste trabalho.

À Fundação para a Ciência e Tecnologia e ao Centro de Química Estrutural do Instituto Superior Técnico, agradeço a Bolsa de Iniciação Científica atribuída.

À Dra. Paula Robalo e Dra. Catarina Sousa agradeço o apoio e simpatia dados no Laboratório de Química Inorgânica, nas várias deslocações ao mesmo.

À Dra. Cecília Calado agradeço o apoio e simpatia no Laboratório de Biomédica, pelo uso do equipamento de espectrofotometria.

Agradeço aos meus amigos, André Afonso, Margarida Simões, Mariana Silva, Sara Baptista, Nicole Jesus, Rodolfo Matos, Marta Catarino, Patrícia Castro, Ana Sofia Almeida e Jerson Veiga pelo apoio dado nos dias mais difíceis e por todas as aventuras e bons momentos passados.

Agradeço aos meus avós, e ao meu padrinho por me terem ajudado em todo o meu percurso, nos bons e nos maus momentos.

Agradeço ao João, por estar sempre do meu lado, por me motivar a fazer mais e melhor, por acreditar em mim desde o início do meu percurso académico. Sem ele, toda esta caminhada teria sido mais difícil e demorada.

Por fim, devo agradecer às pessoas mais importantes da minha vida, aos meus pais e à minha irmã, por acreditarem em mim, por me aturarem nos dias menos bons e por fazerem de mim a pessoa que sou eu. Ser-lhes-ei eternamente grata. Nada que eu possa fazer será algum dia suficiente para agradecer tudo o que fizeram por mim.



## RESUMO

O crescente conhecimento das potencialidades dos compostos de origem tem promovido a procura por plantas com propriedades antioxidantes, antimicrobianas e capazes de substituir compostos sintéticos.

Procedeu-se ao estudo da planta *Agastache foeniculum*, efetuando-se extrações para se obter diversos componentes, por métodos convencionais e não convencionais. No primeiro grupo realizou-se a hidrodestilação e a extração em Soxhlet com metanol, onde se obteve rendimentos para o óleo essencial de 1,03% e 30,97% para o extrato. Através dos métodos não convencionais foi realizada a extração supercrítica com CO<sub>2</sub> a 400 bar e 40 °C, obtendo-se um rendimento de 1,54%. Nestas condições adicionaram-se dois co-solventes (metanol e etanol a 10%), obtendo-se um rendimento de 3,37 e 3,67%, respetivamente. Verificou-se que a adição de co-solventes aumenta a eficiência da extração. O óleo volátil foi obtido por extração supercrítica com CO<sub>2</sub> e separação fracionada nas condições de pressão (90 e 110 bar) e temperatura (40 e 50 °C) mais favoráveis, tendo-se obtido um rendimento de 1%. A análise dos óleos obtidos (essencial e volátil) foi efetuada por CG-MS e GC-FID sendo quantificados os 15 principais compostos presentes nas amostras.

Avaliou-se a atividade antioxidante dos diversos extratos e óleos através de três métodos distintos: DPPH, do radical ABTS e do poder de redução do ferro, observando-se que em todos o extrato obtido por Soxhlet apresentou maior atividade antioxidante. Determinou-se o teor de polifenóis e flavonóides dos diversos extratos e óleos através do método de Folin-Ciocalteu e do método do cloreto de alumínio, respetivamente. Verificou-se que o extrato obtido por Soxhlet apresenta maior teor em polifenóis, e que os extratos obtidos por extração supercrítica com a adição de co-solvente apresentam maior teor de polifenóis. O extrato supercrítico com adição de co-solventes apresenta igualmente maior teor de flavonóides.

Efetuuou-se a modelação matemática dos dados experimentais obtidos da extração supercrítica, por dois métodos baseados no sistema de fluxo pistão de Sovová 1994 e Sovová 2005, tendo-se verificado uma melhor capacidade de ajuste para a modelação do óleo volátil, face à dos extratos supercrítico.

Foi apresentada a importância das propriedades do *Agastache foeniculum* que podem fomentar trabalhos futuros nesta área.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Agastache foeniculum*, óleo essencial, óleo volátil, atividade antioxidante, polifenóis, flavonóides, extração supercrítica, modelação matemática

## ABSTRACT

Increasing knowledge of the potential of naturally occurring compounds increases the demand for plants with antioxidant properties, microbial and capable of replacing synthesized compounds.

The plant *Agastache foeniculum* was studied, extractions were made for several components, by conventional and unconventional methods. In the first group, hydrodistillation and Soxhlet extraction with methanol were performed, yielding 1.03% and 30.97% for the extract. By unconventional methods, a supercritical extraction with CO<sub>2</sub> at 400 bar and 40 °C was performed, with a yield of 1.54%. Under these conditions two co-solvents (10% of methanol and ethanol) were added giving a yield of 3.37 and 3.67%, respectively. It has been found that the addition of co-solvents increases the extraction efficiency. The volatile oil was obtained by supercritical CO<sub>2</sub> extraction and fractional separation under the most favorable pressure conditions (90 and 110 bar) and temperature (40 and 50 °C), with a yield of 1%. An analysis of the oils obtained (essential and volatile) for CG-MS and GC-FID quantified the main 15 compounds present.

The antioxidant activity of the various extracts and oils was study by different methods: DPPH, the ABTS radical and the iron reducing power, it was observed in all the opponents that Soxhlet presented better antioxidant activity. The polyphenol and flavonoid content of the various extracts and oils were determined by the Folin-Ciocalteau method and the aluminum chloride method, respectively. It was verified that the extract obtained by Soxhlet presents higher content of polyphenols, and that extracts obtained by supercritical extraction with a co-solvent addition showed a higher content of polyphenols. The supercritical extract with addition of co-solvents has a higher content of flavonoids, as well.

It was performed the mathematical modeling of the experimental data obtained from supercritical extraction according two methods based on Lack's plug flow model by Sovová 1994 and Sovová 2005, with a better adjustment capacity for volatile oil modeling supercritical extracts.

The importance of the good of *Agastache foeniculum* has been presented, which may foster future work in the area.

**KEYWORDS:** *Agastache foeniculum*, essential oil, volatile oil, antioxidant activity, polyphenols, flavonoids, supercritical extraction, mathematical modeling

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ABTS</b>	2,2'-azino-bis(3-etilbenzenotiazolina-6-sulfónico)
<b>ANOVA</b>	Teste de análise da variância
<b>BHT</b>	Butil-hidroxitolueno
<b>DPPH</b>	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
<b>EAG</b>	Equivalentes de ácido gálico
<b>EC</b>	Equivalentes de catequina
<b>ESC</b>	Extração supercrítica
<b>EtOH</b>	Etanol
<b>GC - FID</b>	Cromatografia gasosa com detetor de ionização de chama
<b>GC - MS</b>	Cromatografia gasosa com detetor de espectrometria de massa
<b>HD</b>	Hidrodestilação
<b>HPLC</b>	Cromatografia líquida de alta eficiência
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentração que inibe 50%
<b>LOD</b>	Limite de deteção
<b>LOQ</b>	Limite de quantificação
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>P<sub>c</sub></b>	Pressão crítica
<b>ROS</b>	Espécies reativas de oxigénio
<b>TEAC</b>	Capacidade antioxidante equivalente ao trolox
<b>T<sub>c</sub></b>	Temperatura crítica
<b>Trolox</b>	Ácido 2-carboxílico-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano



## LISTA DE NOMENCLATURA

$a$  – superfície do volume unitário de partículas,  $m^{-1}$

$C$  – concentração do soluto na fase fluida,  $kg.kg^{-1}$

$C_0$  – concentração do soluto na fase fluida, em  $t = 0$ ,  $kg.kg^{-1}$

$C_1$  – constante do modelo 1 e do modelo 2

$C_2$  – constante do modelo 1 e do modelo 2

$e$  – rendimento da extração,  $kg.kg^{-1}$

$e_{calc}$  – rendimento calculado pelos modelos,  $kg.kg^{-1}$

$e_{exp}$  – rendimento experimental,  $kg.kg^{-1}$

$h$  – coordenada axial,  $m$

$H$  – altura do leito da extração,  $m$

$k$  – parâmetro de extensão do modelo de fluxo pistão de Lack

$K$  – coeficiente de partição entre a concentração do soluto na fase sólida e gasosa

$k_f$  – coeficiente externo de transferência de massa,  $m.s^{-1}$

$k_s$  – coeficiente interno de transferência de massa,  $m.s^{-1}$

$M_p$  – massa inicial de planta dentro do extrator,  $kg$

$q$  – concentração de soluto na fase sólida,  $kg.kg^{-1}$

$q^*$  – concentração interfacial do soluto,  $kg.kg^{-1}$

$q_0$  – concentração de soluto na fase sólida, em  $t = 0$ ,  $kg.kg^{-1}$

$q_k$  – conteúdo inicial de soluto de difícil acesso no sólido,  $kg.kg^{-1}$

$Q$  – taxa de caudal fluido,  $kg.s^{-1}$

$Q_c$  – coordenada do ponto de passagem entre a extração rápida e lenta,  $kg.kg^{-1}$

$r$  – fração inicial de soluto nas células fragmentadas

$r_0$  – fração inicial de soluto total e soluto nas células intactas

$t$  – tempo, s

$u$  – velocidade superficial do fluido supercrítico,  $m. s^{-1}$

$Z$  – proporção dos parâmetros adimensionais do coeficiente externo de transf. de massa

$z_w$  – coordenada axial adimensional entre a extração rápida e lenta

Letras Gregas:

$\varepsilon$  – fração de leito vazio

$\gamma$  – razão entre a massa de solvente na matriz e no leito,  $kg. kg^{-1}$

$\rho_s$  – densidade sólida,  $kg. m^{-3}$

$\rho_f$  – densidade fluida,  $kg. m^{-3}$

$\tau$  – tempo adimensional

$\tau_m$  – tempo adimensional – onde inicia o segundo período

$\tau_n$  – tempo adimensional – onde inicia o terceiro período

## Índice

AGRADECIMENTOS.....	i
RESUMO .....	iii
ABSTRACT .....	v
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	vii
LISTA DE NOMENCLATURA.....	ix
1. OBJECTIVO .....	1
2. INTRODUÇÃO .....	3
2.1. Plantas aromáticas.....	3
2.2. Família Lamiaceae e género agastache .....	3
2.3. <i>Agastache foeniculum</i> .....	4
2.3.1. Óleo essencial.....	5
2.3.2. Propriedades .....	7
2.4. Métodos de extração.....	8
2.4.1. Hidrodestilação .....	9
2.4.2. Extração em Soxhlet.....	10
2.4.3. Extração Supercrítica com CO <sub>2</sub> .....	11
2.5. Métodos de quantificação e caracterização dos extratos .....	14
2.5.1. Cromatografia gasosa – GC-FID.....	14
2.5.2. Atividade antioxidante .....	16
2.5.2.1. Método de DPPHH .....	16
2.5.2.2. Método do radical ABTS .....	18
2.5.2.3. Poder de redução do ferro.....	19
2.5.3. Determinação do teor de polifenóis .....	19
2.5.4. Determinação do teor de flavonóides .....	20

2.5.5.	Tratamento de resultados e análises estatísticas .....	22
2.6.	Modelação matemática da transferência de massa em extração supercrítica .....	23
2.6.1.	Modelo 1 - Modelo de Sovová 1994 .....	25
2.6.2.	Modelo 2 - Modelo de Sovová 2005 .....	28
3.	PARTE EXPERIMENTAL .....	31
3.1.	Preparação da amostra. Determinação do tamanho de partícula e densidade .....	31
3.2.	Extração de <i>Agastache foeniculum</i> .....	32
3.2.1.	Hidrodestilação .....	32
3.2.2.	Extração em Soxhlet .....	33
3.2.3.	Extração Supercrítica .....	34
3.3.	Determinação dos compostos dos óleos por GC-FID .....	37
3.4.	Quantificação e Caracterização dos extratos de <i>A. foeniculum</i> .....	38
3.4.1.	Método do Radical Livre DPPH .....	38
3.4.2.	Método Radical Catião ABTS .....	39
3.4.3.	Método do Poder de Redução do ião $Fe^{3+}$ .....	39
3.4.4.	Determinação do teor de polifenóis .....	40
3.4.5.	Determinação do teor em flavonóides .....	41
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	43
4.1.	Determinação do tamanho de partícula e densidade de <i>Agastache foeniculum</i> .....	43
4.2.	Obtenção do extrato e óleo essencial de <i>Agastache foeniculum</i> através dos métodos convencionais: Extração em Soxhlet e hidrodestilação .....	44
4.3.	Obtenção do extrato e óleo volátil de <i>Agastache foeniculum</i> através dos métodos não-convencionais com $CO_2$ supercrítico .....	45
4.4.	Determinação dos compostos dos óleos por GC-FID .....	48
4.5.	Quantificação e Caracterização do <i>A. foeniculum</i> .....	50
4.5.1.	Determinação do poder antioxidante pelo método do DPPH .....	50
4.5.2.	Determinação do poder antioxidante pelo método do ABTS .....	54

4.5.3.	Determinação do poder antioxidante pelo método da redução do Ferro .....	57
4.5.4.	Determinação do teor de polifenóis .....	61
4.5.5.	Determinação do teor de flavonóides .....	64
4.6.	Modelação .....	68
4.6.1.	Modelação do processo de obtenção dos óleos voláteis de <i>Agastache foeniculum</i> .....	68
4.6.2.	Modelação do processo de obtenção dos extratos supercríticos de <i>Agastache foeniculum</i> .....	70
5.	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS .....	73
6.	BIBLIOGRAFIA.....	75
7.	ANEXOS .....	83
	ANEXO A – Distribuição do tamanho de partícula e determinação do diâmetro médio da mesma .....	83
	ANEXO B – Determinação da densidade do <i>Agastache foeniculum</i> .....	83
	ANEXO C – Medições efectuadas para a obtenção do extrato e do óleo supercrítico .....	84
	ANEXO D – Principais compostos identificados no GC-FID .....	85
	ANEXO E – Medições efectuadas na caracterização dos extratos e óleos de <i>Agastache foeniculum</i> .....	86
	ANEXO F – Divulgação de trabalho realizado para a comunidade científica .....	88



## Índice de Figuras

Figura 1 – <i>Agastache foeniculum</i> [5].....	4
Figura 2 - Insectos onde o óleo de <i>A.foeniculum</i> apresenta uma elevada toxicidade: a) <i>Rhizopertha dominica</i> b) <i>Lasioderma serricorne</i> [13] .....	8
Figura 3 - Representação esquemática da técnica de extração: Hidrodestilação [17].....	9
Figura 4 - Representação esquemática da técnica de extração em Soxhlet [20]. .....	10
Figura 5 - Diagrama de fases de uma substância pura. Identificação do seu ponto crítico [25]. .....	12
Figura 6 - Esquema representativo de um sistema cromatográfico [31] .....	15
Figura 7 - Principais estruturas de flavonóides[26] .....	21
Figura 8 - Separação das folhas e flores de <i>Agastache foeniculum</i> seco.....	31
Figura 9 - Montagem laboratorial da extração por hidrodestilação.....	32
Figura 10 - Montagem laboratorial da extração em soxhlet .....	33
Figura 11 - Instalação de fluidos supercríticos no ISEL [61] G – Garrafa de Gás que contém o CO <sub>2</sub> ; C – Compressor; E – Extrator; S - Separador; PT – Manómetro; BP – Regulador de Pressão; TI – Medidor de Temperatura; MM – Válvula Micrométrica; MV – Caudalímetro; Tot – Totalizador.....	34
Figura 12 - Extrator Supercrítico utilizado. Applied Separations .....	34
Figura 13 - Instalação de fluidos supercríticos no IST. S1 – Arrefecimento; F – Filtro; CP – Bomba de Circulação; BP- Regulador de Pressão; M1-M4 – Manómetros; S2 – Permutador de Calor; V – Vaso de Extração; SP1, SP2 – Separadores; V1, V2 – Válvulas; FL – Rotametro; DTM – Contador de gás seco .....	36
Figura 14 - Extrato de <i>Agastache foeniculum</i> obtido através da extração em Soxhlet.....	45
Figura 15 - Rendimento da extração supercrítica do extrato de <i>A. foeniculum</i> em função do tempo .....	46
Figura 16 - Óleos obtidos por a) hidrodestilação e b) extração supercrítica com CO <sub>2</sub> .....	47
Figura 17 – Rendimento da extração supercrítica do óleo volátil de <i>A. foeniculum</i> em função do tempo.....	48
Figura 18 - Curvas de calibração e respectiva repressão linear para os antioxidantes trolox e ácido ascórbico, pelo método de DPPH .....	51

Figura 19 - Curvas de inibição e respectivas retas de linearidade dos extratos supercríticos, pelo método de DPPH .....	52
Figura 20 - Curva de inibição e respectiva reta de linearidade do extrato soxhlet, pelo método de DPPH .....	53
Figura 21 - Curvas de calibração e respectiva regressão linear para os antioxidantes trolox e ácido ascórbico, pelo método do ABTS.....	55
Figura 22 - Curvas de inibição e respectivas retas de linearidade dos extratos supercríticos e soxhlet, pelo método do ABTS .....	56
Figura 23 - Curva de calibração e respetiva regressão linear para o trolox, pelo método de redução do ferro .....	57
Figura 24 - Poder de redução do ferro para os extratos supercríticos de <i>A. foeniculum</i> .....	58
Figura 25 - Poder de redução do ferro para os extratos soxhlet de <i>A. foeniculum</i> .....	59
Figura 26 - Poder de redução do ferro para o óleo essencial e volátil de <i>A. foeniculum</i> .....	60
Figura 27 - Curva de calibração e respetiva regressão linear para o ácido gálico, para determinação do teor em polifenóis .....	61
Figura 28 – Teor de polifenóis do extrato de <i>A. foeniculum</i> , obtido por extração em Soxhlet .....	62
Figura 29 - Teor de polifenóis do extrato e óleo de <i>A. foeniculum</i> .....	63
Figura 30 - Curva de calibração e respetiva regressão linear utilizando-se catequina, para determinação do teor em flavonóides.....	64
Figura 31 - Representação gráfica do teor em flavonóides dos extratos de <i>A. foeniculum</i> ....	65
Figura 32 - Representação gráfica do teor em flavonóides dos óleos de <i>A. foeniculum</i> .....	66
Figura 33 – Modelação dos resultados experimentais pelo Modelo 1, Sovová 1994, para os três ensaios efetuados .....	68
Figura 34 - Modelação dos resultados experimentais pelo modelo 2, Sovová 2005, para os três ensaios efetuados .....	69
Figura 35 - Modelação dos resultados experimentais pelo modelo 2, Sovová 2005, para os três ensaios efetuados, com e sem adição de co-solventes.....	71
Figura 36 - Principais compostos identificados no óleo essencial e óleo volátil de <i>A. foeniculum</i> , por GC-FID .....	85

## Índice de Tabelas

Tabela 1 - Classificação Científica do <i>Agastache foeniculum</i> [7].	5
Tabela 2 - Compostos presentes no óleo de <i>A. foeniculum</i> e respectiva percentagem e índice de retenção. Coluna Capital pH-5, 10 m [10]	6
Tabela 3 - Distribuição quantitativa da amostra, nos diferentes peneiros	43
Tabela 4 - Rendimento global e condições operatórias das extrações supercríticas realizadas	46
Tabela 5 - Composição do óleo essencial e óleo volátil de <i>A. foeniculum</i>	49
Tabela 6 - Parâmetros de regressão ANOVA para os antioxidantes de referência, pelo método de DPPH	52
Tabela 7 - Determinação do IC50, pelo método de DPPH, dos extratos supercríticos, soxhlet e antioxidantes de referência	53
Tabela 8 - Parâmetros de regressão ANOVA para os antioxidantes de referência, pelo método do ABTS	55
Tabela 9 - Determinação do IC50, pelo método do ABTS, dos extratos supercríticos, soxhlet e antioxidantes de referência	56
Tabela 10 - Parâmetros de regressão ANOVA, para a curva de calibração do método de redução do ferro utilizando trolox	58
Tabela 11 - Parâmetros de regressão ANOVA, para o ácido gálico, para determinação do teor em polifenóis	61
Tabela 12 - Parâmetros de regressão ANOVA, para a catequina, para determinação do teor em flavonóides	65
Tabela 13 - Coeficientes de transferência de massa e desvio para a extração do óleo volátil de <i>Agastache foeniculum</i>	69
Tabela 14 - Coeficientes de transferência de massa e desvio para o extrato supercrítico de <i>Agastache foeniculum</i> , obtido a 400 bar e 40 °C	71
Tabela 15 - Distribuição do tamanho de partícula e respectivo cálculo do diâmetro médio	83
Tabela 16 - Determinação da densidade do <i>A. foeniculum</i> e respectivos ensaios	83
Tabela 17 - Medições efetuadas e rendimento obtido do extrato supercrítico com CO <sub>2</sub>	84

Tabela 18 - Medições efetuadas e rendimentos obtidos na Extração Supercrítica com CO <sub>2</sub> + 10% metanol e 10% etanol, para obtenção do extrato de <i>Agastache foeniculum</i> .....	84
Tabela 19 - Medições efetuadas e rendimentos obtidos na Extração com CO <sub>2</sub> Supercrítico, para obtenção do óleo volátil de <i>A. foeniculum</i> .....	85
Tabela 20 - Medições efectuadas para a determinação do poder de redução do ferro nos diferentes extratos e óleos .....	86
Tabela 21 - Medições efectuadas para a quantificação do teor de polifenóis nos diferentes extratos e óleos .....	86
Tabela 22 - Medições efectuadas para a quantificação do teor de flavonóides nos diferentes extratos e óleos .....	87

## 1. OBJECTIVO

Os principais objetivos do presente trabalho são o aprofundar dos conhecimentos da planta *Agastache foeniculum*, nomeadamente:

- Análise de diferentes métodos de extração (convencionais e não convencionais);
- Determinação do rendimento das extrações, bem como vantagens e desvantagens das mesmas;
- Avaliação de diferentes parâmetros da extração supercrítica;
- Identificação e quantificação dos diferentes constituintes do óleo de *Agastache foeniculum*;
- Caracterização dos óleos e extratos obtidos quanto ao seu poder antioxidante e conteúdo em polifenóis e flavonóides;
- Modelação do processo de extração com CO<sub>2</sub> supercrítico.



## **2. INTRODUÇÃO**

### **2.1. Plantas aromáticas**

Atualmente, as plantas aromáticas e medicinais têm um importante papel na indústria cosmética, alimentar e farmacêutica. As propriedades antioxidantes, antimicrobianas, e outras, oferecem diversas aplicações na área dos compostos naturais, pois são capazes de contornar as limitações legislativas e a resistência dos consumidores face aos aditivos sintéticos. De facto, este tipo de plantas está a ser usado e testado devido às suas cores, sabores e propriedades nutracêuticas e fitoquímicas [1].

As especiarias são parte integrante das plantas aromáticas e podem ser definidas como “produtos vegetais usados para aromatizar, temperar e transmitir aroma aos alimentos”. Estas podem derivar de diferentes partes das plantas, como sendo cascas, brotos, flores, frutas, folhas, rizomas, raízes, sementes e dos estigmas [1].

Os óleos essenciais das plantas aromáticas contêm componentes voláteis que se encontram presentes na matriz da mesma, estes são os principais responsáveis pelo seu aroma característico. Enquanto as oleorresinas contêm constituintes voláteis e não voláteis, que podem ser obtidos através de extrações com solventes não aquosos [1].

### **2.2. Família Lamiaceae e género agastache**

Centenas de espécies Lamiaceae (família Mint) são usadas em todo o mundo, como plantas medicinais e aromáticas, sendo que as mais populares são o manjeriço e a hortelã. O género a tratar neste trabalho - *Agastache* – inclui 29 espécies com propriedades semelhantes. As plantas deste género são conhecidas sob o nome "hissopo gigante" e são utilizadas como fonte de óleos essenciais, plantas medicinais, especiarias, plantas nectaríferas na apicultura ou como plantas ornamentais. O seu uso ornamental é o mais comum, fazendo com que as hissopos gigantes sejam um dos

poucos exemplos na família da hortelã, onde o valor decorativo parece ofuscar o seu elevado potencial como planta medicinal [2].

O perfil fitoquímico de todas as espécies de Agastache estudadas até à data é bastante semelhante, dividindo-se os seus componentes em duas classes metabólicas principais, fenilpropanoides e terpenoides. Os principais metabolitos não voláteis pertencem a compostos fenólicos, como os derivados de ácido cafeico, especialmente o ácido rosmarínico, bem como várias flavonas e glicosídeos de flavona como acetinina, tilianina e uma malonil flavona dimérica rara [2], [3].

### 2.3. *Agastache foeniculum*

O *Agastache foeniculum* pertence à família Lamiaceae, é uma planta perene, medicinal e usada como especiaria. Atualmente é cultivada na região mediterrânea e no centro e no norte da Europa e é usada como tempero, em misturas de chás e licores aromatizantes. O seu caule apresenta um tamanho que pode variar entre 50 a 150 cm, é bastante ramificado e apresenta quatro gumes, sendo esta uma das características da família a que pertence. As folhas são ovais e densamente revestidas por pequenos pelos esbranquiçados. O seu óleo essencial é maioritariamente sintetizado nas folhas e flores, sendo importante pelas suas propriedades antifúngicas e antimicrobianas [4].



Figura 1 – *Agastache foeniculum*[5]

As plantas medicinais, como o *Agastache foeniculum*, são conhecidas por serem ricas em metabolitos secundários e apresentam um elevado potencial na área farmacêutica, como medicamentos. São os metabolitos secundários que conferem ao óleo diferentes propriedades antioxidantes, antimicrobianas e outras propriedades biológicas.

Os compostos presentes no seu óleo essencial podem variar significativamente devido a diversos fatores, tais como ambientais e alterações climáticas, localização geográfica, forma de cultivo e colheita, maturidades da planta, uso de fertilizantes, irrigação dos solos e condições de armazenamento da mesma [4], [6].

**Tabela 1** - Classificação Científica do *Agastache foeniculum* [7].

<b>Reino</b>	Plantae
<b>Sub-Reino</b>	Tracheobionta
<b>Divisão</b>	Magnoliophyta
<b>Classe</b>	Magnoliopsida
<b>Sub-Classe</b>	Asteridae
<b>Ordem</b>	Lamiales
<b>Família</b>	Lamiaceae
<b>Gênero</b>	Agastache
<b>Espécie</b>	<i>Agastache foeniculum</i>
<b>Nome comum</b>	Hissopo Azul Gigante

### 2.3.1. Óleo essencial

Os principais compostos dos óleos essenciais das plantas são os terpenos, igualmente conhecidos por isoprenos, derivados da estrutura do isopreno (C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>). Os principais terpenos de hidrocarbonetos presentes nos óleos essenciais são monoterpenos (C<sub>10</sub>), que constituem mais de 80% do óleo essencial e sesquiterpenos (C<sub>15</sub>) [8].

A composição do óleo essencial de *A. foeniculum* é pouco conhecida, no entanto foram identificados 39 compostos, através de GC-MS e por comparação de espectros de massa, bem como índices de retenção. Assim, na parte aérea da planta é possível quantificar apenas 0.1 – 0.3% de óleo essencial. O principal composto identificado, e presente em maior percentagem é o metil chavicol, e os restantes encontram-se descritos na tabela seguinte [9].

**Tabela 2** - Compostos presentes no óleo de *A. foeniculum* e respectiva percentagem e índice de retenção. Coluna Capital pH-5, 10 m [10]

<b>Composto</b>	<b>Índice de Retenção</b>	<b>Percentagem (%)</b>
Metil Chavicol	1200	94,003
1,8-Cineol	1058	3,334
1-Octen-3-ol	977	0,461
Germacreno D	1485	0,430
3-Octanona	985	0,407
Acetato octan-3-il	1108	0,386
$\beta$ -Boarboneno	1386	0,084
E-Cariofileno	1418	0,058
Espatuleno	1570	0,039
$\alpha$ -Copaeno	1375	0,029
Biciclogermacreno	1500	0,020
$\beta$ -Eudesmol	1650	0,015
<b>Total</b>		<b>99,266</b>

O *A. foeniculum* é uma potencial fonte de produção de metil chavicol, sendo o mesmo, um líquido incolor que possui um odor aromático, e por essa razão muito usado em perfumes e como adoçante de alimentos e licores. Este constituinte tem uma especial importância devido à possibilidade de originar outros compostos aromáticos, como sendo o anetol e o anisalaldeído [11], [12].

### 2.3.2. Propriedades

A evolução do conhecimento sobre as potencialidades dos antioxidantes no combate a diversas doenças tem sido notória, estando particularmente provado que uma dieta com elevada ingestão de antioxidantes ajuda na prevenção de doenças como a diabetes, cancro, Alzheimer, Parkinson, doenças cardiovasculares e complicações gastrointestinais. Por outro lado, dado que os antioxidantes têm a capacidade de reduzir espécies reativas, a mesma (capacidade) pode ser benéfica na prevenção da deterioração dos alimentos, visto que resulta da oxidação de lípidos. Aliado ao facto de que, no processamento e armazenamento dos alimentos alguns antioxidantes endógenos acabam por se perder.

Verifica-se também um crescente uso incorreto de antibióticos que gera uma enorme preocupação à Organização Mundial de Saúde, devido ao emergente aumento de resistência das bactérias, face aos antibióticos [1], [6]. Estudos indicam que a maioria das aplicações medicinais refere-se tanto às partes aéreas como às raízes do *A. foeniculum* como um remédio eficaz contra tosse, febre, doenças cardíacas e no tratamento de queimaduras. Ao nível da atividade fúngica, o óleo possui uma boa capacidade contra fungos patogénicos que afetam fortemente o ser humano, nomeadamente *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus niger*. São igualmente descritas propriedades antibacterianas – as bactérias de *E.coli* e *S.typhimurium* apresentam uma elevada sensibilidade quando testadas contra o óleo essencial de *Agastache foeniculum* (através do teste de difusão de disco) [2], [6].

A área agrícola é uma das que mais pode beneficiar com o óleo de *Agastache foeniculum*. Este, devido à sua elevada constituição em metil chavicol, apresenta várias propriedades inseticidas, nomeadamente de espécies que atacam sementes de grão, farelo de soja, farinha de trigo, arroz, aveia e caju. Identificou-se uma forte toxicidade contra as seguintes espécies: *Tribolium castaneum*, *Rhyzopertha dominica* e *Lasioderma serricorne*, que se encontram representadas na figura seguinte [2], [10].



**Figura 2** - Insetos onde o óleo de *A.foeniculum* apresenta uma elevada toxicidade: a) *Rhyzopertha dominica* b) *Lasioderma serricorne* [13]

Assim, a procura por antioxidantes naturais e compostos antimicrobianos que possam substituir ou ajudar medicamentos existentes, tem vindo a aumentar nos últimos anos. A obtenção destes compostos naturais é efetuada por diversos métodos de extração, dos quais a extração supercrítica é uma importante alternativa face aos métodos de separação tradicionais para obter antioxidantes naturais e compostos antibacterianos [1], [6].

Torna-se essencial e imperativo, que a recuperação de compostos bioativos das plantas seja conseguida de uma forma mais ambientalista, e menos prejudicial para o ambiente, onde a extração supercrítica se encontra como método alternativo capaz de satisfazer as necessidades presentes, substituindo ou reduzindo o uso de solventes orgânicos [14].

## **2.4. Métodos de extração**

A extração é o primeiro passo a realizar em qualquer estudo de plantas aromáticas, pois tem um crucial e importante papel na obtenção dos resultados finais em termos de composição. Estes são influenciados pelos fatores mais comuns, sendo eles: propriedades da matriz da planta, solvente utilizado, pressão, temperatura e tempo [15].

Os métodos de extração classificam-se em dois grandes grupos, os métodos convencionais e não convencionais. Os métodos convencionais baseiam-se genericamente no poder de extração dos diferentes solventes utilizados e no uso de calor e agitação. As técnicas mais recorrentes são a extração em Soxhlet e a hidrodestilação. Enquanto os métodos não convencionais são mais recentes, desenvolvidos e estudados nos últimos 50 anos, são menos prejudiciais para o meio ambiente. Têm com vantagem o menor uso de solventes orgânicos, menor tempo de operação e obtenção de melhores resultados face ao rendimento e à qualidade do extrato [1], [15].

### 2.4.1. Hidrodestilação

A hidrodestilação é um método tradicional para obtenção de compostos bioativos a partir óleos essenciais de plantas e não envolvendo qualquer solvente orgânico. Inicialmente a parte da planta a extrair (que podem ser várias, como já foi especificado anteriormente) é acondicionada num recipiente e adicionada água em quantidade suficiente. Assim, a mistura é aquecida até a água entrar em ebulição. Desta forma, a água quente e o vapor atuam como os principais fatores para a libertação do óleo. Por fim o óleo e compostos bioativos separam-se usualmente por condensação e diferença de densidades [15], [16].

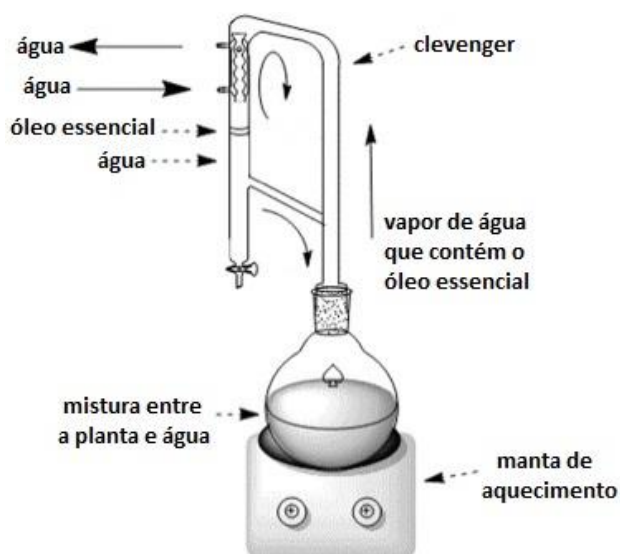
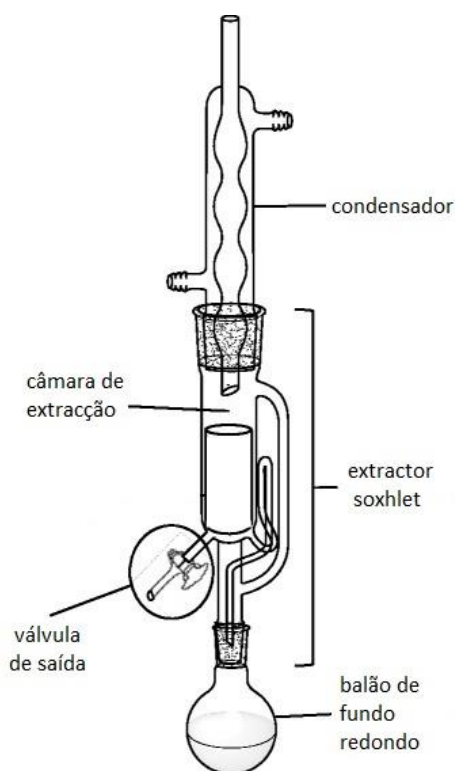


Figura 3 - Representação esquemática da técnica de extração: Hidrodestilação [17].

As principais desvantagens desta técnica são o facto de serem atingidas temperaturas elevadas e certos compostos serem sensíveis a este facto, podendo levar à sua destruição e conseqüente diminuição da qualidade do óleo, assim como a possibilidade de ocorrência de reações de hidrólise [18], [19].

#### 2.4.2. Extração em Soxhlet

A extração de Soxhlet é muito utilizada para extrair compostos bioativos de várias fontes naturais, e não apenas de plantas. Serve de modelo para a comparação com novas técnicas de extração. Tecnicamente, uma pequena quantidade de amostra seca é colocada num cartuxo, usualmente de celulose. Este cartuxo é então colocado num extrator de Soxhlet, ligado a um balão de vidro de destilação que contém o solvente de particular interesse. Depois de atingir um determinado nível que obriga a solução a transbordar, a mesma que se encontra dentro do cartuxo é aspirada, descarregando-se a solução de volta para o balão de destilação [15].



**Figura 4** - Representação esquemática da técnica de extração em Soxhlet [20].

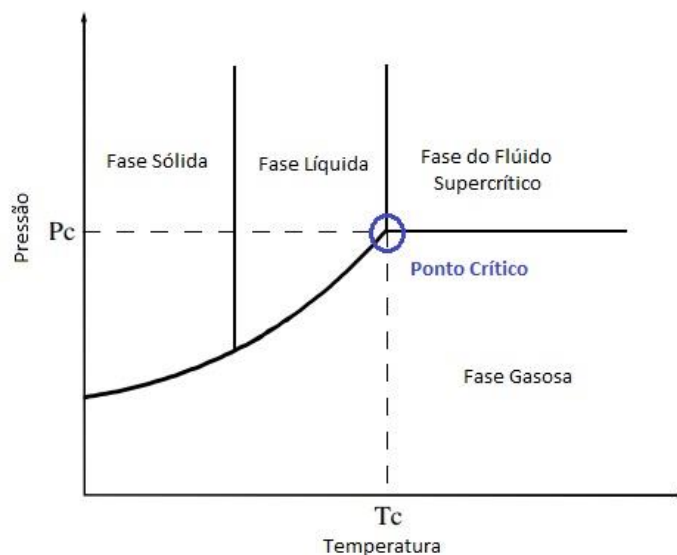
A eficiência deste ou de outro qualquer tipo de extração convencional é maioritariamente influenciada pela escolha do solvente, nomeadamente a sua polaridade, sendo que os mais usados são a água, etanol, metanol, clorofórmio, diclorometano, éter e acetona [21].

A principal vantagem desta técnica prende-se com o facto de ser um processo contínuo, ou seja à medida que a solução saturada em metabolitos solubilizados é descarregado no balão, o solvente é recondensado e efetua a extração do material continuamente. No entanto, o extrato é constantemente aquecido até ao ponto de ebulição do solvente usado, e isso pode danificar os compostos termolábeis e/ou originar a degradação dos mesmos, constituindo desta forma uma desvantagem a este método [22].

### **2.4.3. Extração Supercrítica com CO<sub>2</sub>**

A extração supercrítica é, atualmente, uma importante alternativa aos métodos de extração convencionais, pois é capaz de ultrapassar inconvenientes da hidrodestilação como a degradação térmica, hidrosolubilização e hidrólise, que pode afetar a qualidade do óleo. Assim, esta nova técnica tem sido utilizada para obter óleos voláteis e compostos bioativos plantas aromáticas e microalgas [23].

A extração supercrítica resume-se na separação de substâncias solúveis de uma matriz sólida, através do contacto com um solvente que se encontra a temperaturas e pressões acima do seu ponto crítico. O ponto crítico de qualquer substância pura define-se pelo valor de pressão e temperatura, a partir do qual não existe um equilíbrio líquido-vapor, como se encontra esquematizado na figura 5. Esta região é designada por região supercrítica, acima da qual não se verifica qualquer diferença entre o estado líquido e o estado gasoso na substância, ou seja, é um fluido homogéneo que se intitula por fluido supercrítico [24], [25].



**Figura 5** - Diagrama de fases de uma substância pura. Identificação do seu ponto crítico [25].

Aliada à vantagem de que, a maior parte dos fluídos supercríticos estarem disponíveis com um bom grau de pureza e a relativamente baixo custo, comparando com os solventes líquidos usados a nível industrial. O facto de não serem tóxicos nem inflamáveis, facilmente recuperados e apresentarem uma elevada seletividade no processo de extração, são as maiores vantagens da extração supercrítica. Assim, a extração supercrítica aplicada às matrizes de plantas é uma das melhores alternativas para obter os compostos naturais das mesmas [1], [18].

O uso de fluídos supercríticos, especialmente o dióxido de carbono, tem aumentado nas últimas duas décadas, devido às suas vantagens, pois a extração supercrítica pode ocorrer a baixas temperaturas e garante a conservação térmica dos compostos. Aliado ao facto de que permite uma rápida transferência de massa na fase supercrítica, bem como uma boa capacidade de penetração nos poros da matriz da amostra, conseguindo desta forma uma extração rápida e eficiente [24].

O dióxido de carbono é o fluido supercrítico mais utilizado devido às suas constantes críticas ( $T_c = 31,1^\circ\text{C}$  e  $P_c = 72,8 \text{ atm}$ ), baixo custo, não ser tóxico nem inflamável e poder ser reciclado para posteriores usos. É um solvente não polar, e por isso mesmo faz com que seja o mais indicado para a extração de compostos lipofílicos e de substâncias não polares. No entanto, o mesmo não se verifica quando se trata de compostos polares. De forma a contornar esta barreira, opta-se por adicionar, em

pequenas percentagens (1-10%) modificadores, designados por co-solventes. Estes co-solventes têm um poder de solvatação capaz de aumentar a polaridade do dióxido de carbono supercrítico, facilitando desta forma a extração de compostos que apresentam polaridades distintas. Os co-solventes mais utilizados, são necessariamente polares, como sendo, o etanol, o metanol, a acetona e o acetato de etilo [19], [26].

Assim, a adição de pequenas quantidades de co-solventes polares a fluídos supercríticos não-polares, resulta num solvente misto supercrítico de maior polaridade e a solubilidade dos solutos polares nesses solventes mistos é maior que a dos fluídos supercríticos não polares puros. A adição de um co-solvente geralmente também aumenta a densidade da mistura, contribuindo assim para o aumento das interações físicas e para o incremento da solubilidade. A adição de co-solvente também aumenta o ponto crítico da mistura de solventes, aumentando a diferença entre a densidade local (em torno da molécula de soluto) e a densidade aparente [27], [28].

A flexibilidade resultante das pequenas variações de pressão e temperatura, e consequente variação de densidade do fluido supercrítico, permite otimizar as diferentes solubilidades de compostos existentes nas matrizes vegetais. Contudo, esta flexibilidade tem de ser conjugada com estratégias de separação fracionada com o fluido supercrítico para garantir a obtenção de produtos de elevado valor. Assim, por exemplo, a solubilidade dos compostos voláteis em fluido supercrítico (óleos voláteis) é maior que a das ceras, atendendo às diferenças de massas moleculares. No entanto, as ceras cuticulares estão localizadas na superfície das folhas, o que representa uma posição mais favorável para a extração. Assim, a extração dos compostos voláteis é efetuada em simultâneo com as ceras e será sempre necessário uma boa estratégia de fracionamento, por diminuição da pressão e temperatura em pelo menos dois passos, para garantir a separação do óleo volátil, comparativamente às ceras da superfície das folhas [23].

## 2.5. Métodos de quantificação e caracterização dos extratos

### 2.5.1. Cromatografia gasosa – GC-FID

Os métodos de separação constituem naturalmente uma das partes mais importante das análises e a cromatografia é sem sombra de dúvidas a técnica separativa mais importante em Química Analítica, e como tal os cromatógrafos são instrumentos indispensáveis [29].

É difícil definir com rigor o que se entende por cromatografia dada a grande variedade de sistemas e técnicas que têm sido aplicadas. No entanto todos os métodos envolvem uma fase estacionária e uma fase móvel. Os componentes da mistura a separar são deslocados ao longo da fase estacionária pelo caudal da fase móvel e a separação resulta das diferentes velocidades de migração (migração diferencial) dos diversos componentes da amostra. Alternativamente pode dizer-se que os vários componentes da amostra são retardados na sua passagem, na proporção das suas interações com a fase estacionária [29].

A análise dos diferentes óleos (essencial e volátil) do *A. foeniculum* foi efetuada recorrendo-se à cromatografia gasosa com deteção por espectrometria de massa (GC-MS), e à quantificação por GC-FID determinando-se os diferentes constituintes dos mesmos.

A análise cromatográfica é de uma elevada simplicidade e usada para análise de produtos orgânicos e inorgânicos, esta técnica é realizada através de uma calibração externa com o auxílio de um conjunto de soluções padrão de concentração próxima à da amostra a analisar. Sendo este um dos métodos menos dispendiosos [29], [30].

Os principais erros analíticos associados ao uso desta técnica prendem-se com as incertezas no volume da amostra e na preparação dos padrões, bem como problemas durante o processo de injeção. A reprodutibilidade do volume injetado pode ser comprometida uma vez que se efetua manualmente e em pequenas quantidades [30].

Existem vários tipos de detetores que podem ser acoplados a um cromatógrafo para se proceder a análises por cromatografia gasosa. O FID, detetor de ionização de chama, que se encontra representado na figura 6 é um dos detetores mais utilizados em cromatografia gasosa [31].

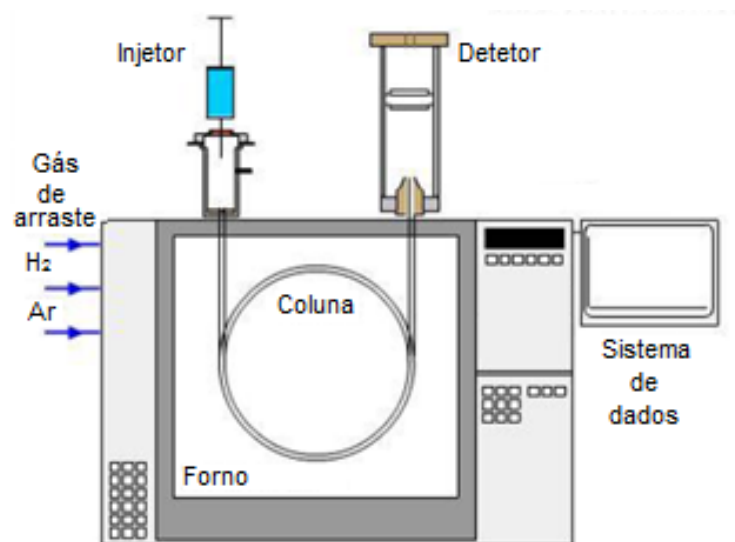


Figura 6 - Esquema representativo de um sistema cromatográfico [31]

Neste tipo de detetores, os compostos orgânicos que eluem da coluna são queimados através de uma chama constituída por hidrogénio e ar, onde através de um conjunto de reações, a maior parte dos átomos de carbono são convertidos em CH<sub>4</sub>, que é, posteriormente, oxidado a CO<sub>2</sub>. No decorrer deste processo, uma pequena fração de átomos de carbono é transformada em CHO<sup>+</sup>, que gera uma pequena corrente elétrica entre dois elétrodos. O FID deteta praticamente todos os compostos contendo carbono, à exceção de um número limitado de moléculas pequenas, tais como monóxido de carbono, dióxido de carbono, ácido fórmico e formaldeído [31], [32].

## **2.5.2. Atividade antioxidante**

Os antioxidantes naturais, em particular das frutas e plantas, têm despertado um forte interesse nos consumidores e pela comunidade científica devido ao fato do seu consumo estar associado à prevenção e diminuição do risco de doenças cardiovasculares e cancro. Os efeitos defensivos destes antioxidantes estão divididos em três grupos principais de moléculas: vitaminas, compostos fenólicos e carotenóides. O ácido ascórbico e os fenólicos são hidrofílicos, enquanto os carotenóides lipofílicos [33], [34].

A atividade antioxidante designa a capacidade de um composto em retardar, inibir ou prevenir a oxidação de materiais oxidáveis através da eliminação de radicais livres, reduzindo o stress oxidativo. Este desequilíbrio por stress oxidativo resulta nas situações em que as espécies reativas de oxigénio (ROS) em excesso podem oxidar e danificar lípidos celulares, proteínas e DNA, levando à sua modificação e frequentemente à sua inutilização, inibindo a sua função normal. Assim, os antioxidantes protegem as células dos danos causados por eventuais reduções. [35]

De forma a avaliar a atividade antioxidante de um extrato ou óleo essencial, destacam-se os ensaios espectrofotométricos que se baseiam no uso de radicais de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) e 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS). Estes métodos são os mais utilizados por serem simples, rápidos, sensíveis e bastante reprodutíveis. Outro método usado baseia-se na determinação do poder de redução do ião  $Fe^{3+}$  [35].

### **2.5.2.1. Método de DPPHH**

O método do radical livre DPPH baseia-se na capacidade de doação de electrões ou hidrogénios de um extrato ou óleo no DPPH• que se encontra em dissolvido em metanol [36]. Desta forma, o efeito dos antioxidantes presentes na amostra permitem a neutralização do DPPH• para DPPH-H, verificando-se um alteração da cor para amarelo que se deve à diminuição da absorvância ao longo de decorridos sensivelmente 40 minutos, geralmente para um comprimento de onda de 515 nm.

Sendo que, quanto mais acentuada for a diminuição da absorvância, maior poder antioxidante da amostra [36], [37].

A atividade antioxidante é determinada em termos de quantidade ou concentração necessária para inibir 50% da concentração inicial de radicais livres de DPPH• em solução, de acordo com a equação seguinte [36].

$$\%_{Inibição} = \left( \frac{A_{controle} - A_{amostra}}{A_{controle}} \right) \times 100 \quad (1)$$

Onde:

$A_{controle}$  = Absorvância medida do DPPH• em metanol

$A_{amostra}$  = Absorvância medida do DPPH• na amostra em estudo

Quanto menor for o valor de IC<sub>50</sub>, maior será a atividade antioxidante da amostra, pois será necessária uma quantidade inferior da mesma para inibir 50% da concentração inicial de radicais livres de DPPH• em solução. De forma a uma melhor percepção dos resultados obtidos é frequente fazerem-se comparações com antioxidantes de referência, sendo os mais utilizados o ácido ascórbico [33], o trolox [37] e o butil-hidroxitolueno (BHT) [35].

Este método tem como vantagens ser de fácil execução, bastante reprodutível, permite a avaliação de várias amostras em simultâneo, diminuindo o tempo de ensaio. Outra vantagem associada, é o fato de ser possível realizar ensaios com baixas concentrações. No entanto, existe a desvantagem de as moléculas de DPPH• serem muito volumosas, diminuindo desta forma o acesso ao radical [24], [36].

Este reagente é facilmente adquirido e encontra-se disponível em forma de cristais. Apresenta-se com uma cor violeta bastante acentuada e é necessário evitar e/ou reduzir ao máximo a sua exposição à luz, visto que a mesma provoca uma degradação do radical [38].

### 2.5.2.2. Método do radical ABTS

Este método mede a capacidade que os extratos e óleos (potencialmente antioxidantes) apresentam para eliminar o catião radical  $ABTS^+$  na fase aquosa em comparação com um determinado antioxidante de referência, à semelhança do método anterior [39].

O radical de  $ABTS^{\bullet+}$  é gerado pela oxidação de ABTS com persulfato de potássio e reduzido na presença de antioxidantes que doam hidrogénio. Este composto pode ser encontrado na forma sólida, como cristais e apresentam uma coloração azul esverdeada. A medição da espectrofotometria da coloração é efetuada a 734 nm e a determinação do poder antioxidante e do  $IC_{50}$  determina-se de forma semelhante ao método do DPPH, através da equação (1) [40].

Dos fatores que mais afetam o método, destacam-se as condições de armazenamento, o pH e o tempo de conversão do  $ABTS^{\bullet+}$ , o comprimento de onda utilizado na espectrofotometria, a temperatura do ensaio, a idade da solução e o agente oxidante utilizado para gerar o  $ABTS^{\bullet+}$  [36].

É frequente verificar-se que a eliminação do radical  $ABTS^{\bullet+}$  pelos extratos seja mais alta que a do radical DPPH. Fatores como a estereosseletividade dos radicais ou a solubilidade do extrato em diferentes sistemas de teste afetam a capacidade dos extratos para reagir e extinguir diferentes radicais [41], [42].

Estudos realizados com outros extratos demonstram que alguns compostos que possuem atividade de eliminação  $ABTS^{\bullet+}$  não mostraram qualquer atividade de eliminação de DPPH [39].

### **2.5.2.3. Poder de redução do ferro**

O aumento do poder de redução de um composto é influenciado pelo aumento da absorvância da mistura reacional, devido à presença de certos antioxidantes e redutores como o ácido ascórbico. Os extratos atuam como doadores de elétrons para reduzir o ferricianeto ( $\text{Fe}^{3+}$ ) em ferrocianeto ( $\text{Fe}^{2+}$ ), que transforma a solução amarela do composto (que continha o íon férrico) numa solução de cor azul ou verde, dependendo da capacidade dos extratos [43].

O método de medição do potencial antioxidante de redução do ferro, apresenta uma excelente precisão e reprodutibilidade, similarmente ao método de DPPH com um limite de detecção inferior 2  $\mu\text{mol}$  (por litro de redução) [33], [44].

O ensaio efetua-se com a medição da absorvância a 690 nm, e o resultado expresso em equivalente de trolox, pois este é um antioxidante de referência usado de forma a comparar os resultados obtidos [45].

### **2.5.3. Determinação do teor de polifenóis**

Os polifenóis são metabolitos secundários presentes em diferentes partes da planta, sendo os que mais abundam neste reino. Caracterizam-se por possuírem um ou mais anéis aromáticos com grupos hidroxilo e estão associados ao crescimento e reprodução da planta, bem como à atribuição de cor, cheiro e odor. A defesa da planta também está a cargo dos polifenóis (entre outros compostos), uma vez que permitem oferecer resistência a agentes patogénicos, parasitas e também protegem a planta da radiação UV. Os principais benefícios dos polifenóis (para além da atividade antioxidantes anteriormente mencionada) prendem-se com as propriedades anti-inflamatórias, anti-alérgicas e antimicrobianas [26].

Embora a determinação quantitativa de polifenóis seja dificultada pela complexidade e diversidade estrutural, existem vários métodos para tal, onde o método de espectrofotometria na região visível acaba por ser uma das ferramentas mais úteis para a devida quantificação [46].

As reações que podem ser medidas através da sua cor são amplamente utilizadas em métodos espectrofotométricos UV / VIS, pois a sua execução é bastante simples, rápida, de baixo custo e facilmente aplicável à escala laboratorial. No entanto, é importante que no ensaio conste uma substância de referência, assim o método avalia a concentração total de grupos fenólicos presentes no extrato da planta. Os polifenóis presentes nos extratos em questão de plantas reagem com reagentes redox específicos (reagente Folin-Ciocalteu) para formar um complexo azul que pode ser quantificado por espectrofotometria na região visível. No método Folin-Ciocalteu, a reação forma um cromóforo azul constituído por um complexo de fósfolimolibdénio, onde a absorção máxima dos cromóforos depende da solução alcalina e da concentração de compostos fenólicos. No entanto, este reagente decompõe-se em soluções alcalinas muito rápido, pelo que se torna necessário usar um excesso do mesmo, para que se obtenha uma reação completa. Contudo, este excesso pode resultar em precipitados que invalidam a análise da espectrofotometria. Para resolver este problema, o método Folin-Ciocalteu inclui sais de lítio, que impedem a formação de precipitados [46], [47].

Esta reação geralmente fornece dados bastante precisos e específicos, para os vários grupos de compostos fenólicos, pois muitos deles mudam de cor de forma distinta, devido às diferenças de massa unitária e da cinética de reação [46].

#### **2.5.4. Determinação do teor de flavonóides**

Mais de 4000 variedades de flavonóides estão atualmente identificadas, muitas das quais são responsáveis pelas atrativas cores das flores, frutas e folhas. Algumas evidências sugerem que as ações biológicas desses compostos estão intimamente relacionadas com a sua atividade antioxidante [48].

Propriedades benéficas ao nível farmacológico são atribuídas aos flavonóides, tais como efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios, anticancerígenos, apoptóticos, hepatoprotectores e anti-hipertensivos [49].

Os flavonóides pertencem ao grupo de polifenóis que inclui calcona, flavonas, flavanonas, isoflavonas, flavonóis, flavanóis e antocianinas. No entanto, apesar do amplo efeito benéfico associado aos flavonóides, estes também foram considerados prejudiciais. Trabalhos anteriores descrevem tratamentos, que realizados em doses mais elevadas, verificaram que os flavonóides podem atuar como agentes mutagénicos e pró-oxidantes na presença de metais de transição ou peroxidases [49], [50].

Compostos de baixo peso molecular, os flavonóides consistem em quinze átomos de carbono, dispostos com configurações representadas na figura seguinte. A sua estrutura consiste em dois anéis aromáticos, unidos por uma ponte de 3 carbonos, geralmente na forma de um anel heterocíclico [26].

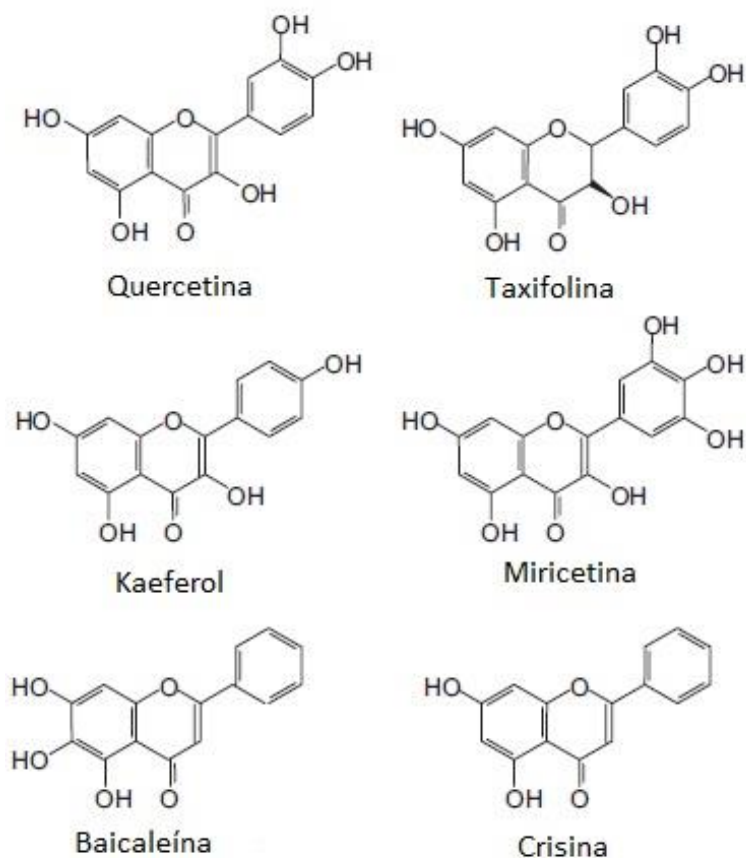


Figura 7 - Principais estruturas de flavonóides[26]

A determinação do teor de flavonóides é conseguida através do método de cloreto de alumínio, onde a absorvância é medida a 415 nm e os resultados expressos em equivalentes de catequina [51].

### 2.5.5. Tratamento de resultados e análises estatísticas

O cálculo das regressões lineares e curvas de calibração dos diferentes métodos foi efetuado segundo os testes ANOVA e respetivas equações associadas [52].

De forma a validar o método, devem determinar-se os limites de deteção (LOD) e os limites de quantificação (LOQ). Estes dependem de efeitos de matriz, da concentração da amostra, sensibilidade do instrumento e da pureza dos reagentes utilizados [53].

A determinação dos limites de deteção e quantificação é efectuada por um método que se apoia em considerações estatísticas e que se baseia em determinados parâmetros da curva de calibração. As diferenças significativas entre médias são identificadas com auxílio dos testes de Tukey HSD, de Scheffé. Enquanto as correlações e a verificação de linearidade é conseguida através do teste de Pearson [54], [55].

$$LOD = \frac{3Sa}{b} \quad (2)$$

$$LOQ = \frac{10Sa}{b} \quad (3)$$

Onde:

Sa - desvio padrão da ordenada na origem;

b – declive da reta.

## **2.6. Modelação matemática da transferência de massa em extração supercrítica**

A simulação matemática de processos de extração supercrítica é de elevada importância porque melhora a compreensão das curvas de extração em função do tempo, para além deste fato, os métodos apoiam o desenvolvimento da expansão de escala dos processos. Pode-se obter uma melhor compreensão entre as várias variáveis de processo (com um modelo cinético teórico), bem como a viabilidade de processos de extração e respetiva avaliação económica [56].

Existem vários modelos que são propostos na literatura para descrever a extração supercrítica de óleos voláteis e que permitem a otimização dos processos de extração supercrítica. Para tal, é necessário conhecer as características da matéria-prima (a concentração inicial do soluto na matriz da planta, a composição da mistura de soluto, a humidade e o pré- tratamento da matéria-prima, como secagem e moagem), os parâmetros do processo utilizados na extração (pressão, temperatura, vazão do solvente) e os dados de equilíbrio da fase fluida [57].

Os modelos matemáticos disponíveis para descrever a extração de solutos a partir de matrizes sólidas através do uso de fluidos supercríticos são classificados em quatro grupos principais: modelos empíricos, modelos baseados em analogias de transferência de calor, modelos de núcleo encolhido e modelos baseados em balanços de massa diferenciais. No entanto, os modelos que apresentam maior sucesso são os modelos que usam balanços de massa diferenciais para as fases sólida e fluida, desenvolvidos por Sovová. Estes modelos têm em conta as características da matriz da planta, nomeadamente o tamanho das partículas e a porosidade do leito. Embora impliquem a determinação de vários coeficientes, refletem os diversos mecanismos presentes nos processos de extração (relações de equilíbrio e mecanismos de transferência de massa) [57], [58].

Usualmente, na modelação e estimativa de valores teóricos é considerada através da determinação dos desvios médios absolutos entre os rendimentos experimentais e os rendimentos calculados, de acordo com a seguinte equação:

$$AAD(\%) = \frac{1}{NP} \sum_{i=1}^{NP} \text{abs} \left( \frac{e_{exp} - e_{calc}}{e_{exp}} \right)_i \times 100 \quad (4)$$

Todos os modelos matemáticos utilizados baseiam-se em alguns pressupostos gerais, sendo os mais habituais os seguintes:

- i. Assume-se que o comportamento de todos os compostos extraídos é semelhante e pode ser descrito por um componente único. Embora o leito sólido seja composto por partículas com um soluto de componentes múltiplos uma vez que, a partir de estudos anteriores realizados, foram obtidas composições similares para as amostras de extrato coletadas sucessivamente, mostrando que as alterações na composição não eram significativas;
- ii. Os gradientes de concentração na fase fluida desenvolvem-se numa escala mais elevada, sendo superiores, comparativamente ao tamanho de partícula;
- iii. A taxa de fluxo do solvente é uniformemente distribuída em cada seção do extrator e desta forma a porosidade não é afetada durante o tempo de extração;
- iv. A queda de pressão e os gradientes de temperatura dentro do extrator não são considerados relevantes. Assim, o leito sólido assume-se como homogêneo em relação à concentração inicial de soluto e ao tamanho de partícula;
- v. O solvente está isento de soluto na entrada do extrator e flui axialmente através do leito da planta moída [57].

A equação do balanço de massa diferencial, assumindo o mesmo como descrito por um sistema fluxo pistão, é a seguinte:

$$\frac{\partial C}{\partial t} + \frac{u}{\varepsilon} \frac{\partial C}{\partial h} + \frac{(1-\varepsilon)\rho_s}{\varepsilon\rho_f} \frac{\partial q}{\partial t} = 0 \quad (5)$$

Onde a determinação do rendimento da extração é dado por:

$$e = \frac{Q}{t} \int_0^t C(h=H) dt \quad (6)$$

Parte-se da suposição de que a concentração é homogénea em ambas as fases, através das seguintes condições iniciais:

$$q(h, t = 0) = q_0, \quad C(h, t = 0) = C_0 \quad (7)$$

E a condição de fronteira:

$$C(h = 0, t) = 0 \quad (8)$$

### 2.6.1. Modelo 1 - Modelo de Sovová 1994

A extensão do modelo fluxo pistão de Lack, desenvolvido por Sovová em 1994 [59] para a extração supercrítica do óleo de sementes moídas pressupõe que uma parte do soluto se encontra nas células fragmentadas (de fácil acesso no decorrer da extração) e a restante parte do soluto encontra-se inacessível nas células intactas. A equação 9 descreve a extração do soluto que se encontra acessível, controlada por transferência de massa externa [60].

$$\frac{\partial q}{\partial t} = -\frac{k_f a \rho_f}{\rho_s} (C_0 - C), \quad \text{para } q \geq q_k \quad (9)$$

Assume-se que a concentração da fase fluida de equilíbrio,  $C_0$ , é igual à solubilidade no óleo no solvente. Desta forma, quando a concentração da fase sólida diminui ( $q = q_k$ ) inicia-se a extração do óleo nas células intactas, sendo esta controlada por transferência de massa interna [60].

$$\frac{\partial q}{\partial t} = -k_s a q, \quad \text{para } q < q_k \quad (10)$$

Assume-se que a concentração na superfície da partícula é zero e de seguida despreza-se o termo de acumulação ( $\partial C/\partial t$ ) na equação 5. Assim procede-se a uma manipulação adicional, com base no pressuposto de que o extrato em solvente supercrítico é de baixa solubilidade. Desta forma é obtida uma aproximação analítica das equações 5, 6, 9 e 10 [60].

$$e = \begin{cases} (q_k \tau / Z) [1 - \exp(-Z)], & \text{para } \tau < \tau_m \\ (q_k \tau / Z) [\tau - \tau_m \exp(Z_w - Z)], & \text{para } \tau_m \leq \tau < \tau_n \\ q_0 - \left(\frac{q_k}{kZ}\right) \ln\{1 + [\exp(r_0 k Z) - 1] \exp[k(\tau_m - \tau)] / r_0\}, & \text{para } \tau \geq \tau_n \end{cases} \quad (11)$$

Onde o tempo adimensional é:

$$\tau = \frac{k_f a \rho_f C_0}{\rho_s q_k} t \quad (12)$$

A relação entre o soluto inicial total e o soluto presente nas células intactas é dada pela seguinte equação:

$$r_0 = \frac{q_0}{q_k} \quad (13)$$

Onde  $Z$  é o termo adimensional, proporcional ao coeficiente externo de transferência de massa:

$$Z = \frac{k_f a M_p \rho_f}{Q \rho_s} \quad (14)$$

A curva de extração é constituída por três regiões. A primeira região é controlada pela resistência do filme de solvente, onde ocorre a extração do soluto que se encontra acessível, em  $\tau \geq \tau_m$

$$\tau_m = r_0 - 1 \quad (15)$$

Depois das partículas do leito libertarem o soluto que está acessível, o  $\text{CO}_2$  difunde-se dentro das mesmas para extrair o soluto mais profundo, enquanto, a jusante desta região, o soluto acessível continua a ser removido [60]. As dimensões da fronteira entre as regiões com e sem soluto de fácil acesso são:

$$Z_w = \frac{1}{kr_0} \ln \frac{r_0 \exp[k(\tau - \tau_m)] - 1}{r_0 - 1}, \quad \text{para } \tau_m \leq \tau \leq \tau_n \quad (16)$$

$$k = \frac{k_s \rho_s q_k}{k_f \rho_f C_0} \quad (17)$$

A terceira e última etapa correspondem à extração do soluto dentro das partículas, controlada pela resistência de transferência de massa interna e começa em tempo adimensional.

$$\tau_n = \tau_m + \frac{1}{k} \ln \frac{1 + \tau_m \exp[k(r_0 k Z)]}{1 + \tau_m} \quad (18)$$

Este modelo apresenta três parâmetros de transferência de massa ajustáveis, sendo eles  $k_f$ ,  $k_s$  e  $r_0$ .

### 2.6.2. Modelo 2 - Modelo de Sovová 2005

A extensão do modelo fluxo pistão de Lack, para extração de óleo vegetal foi novamente modificada por Sovová, em 2005, de forma a permitir a aplicação do mesmo a diferentes tipos de equilíbrio de fase e diferentes padrões de fluxo. Assim, as equações de equilíbrio de massa para a fase sólida foram escritas para células fragmentadas e células intactas, separadamente. Assumiu-se que o coeficiente interno de transferência de massa determina o transporte de células intactas para as células fragmentadas, e o coeficiente externo de transferência de massa controla o transporte de células fragmentadas para o solvente. A fração inicial de soluto nas células fragmentadas é agora um parâmetro,  $r$ , do modelo [57].

$$r = 1 - \frac{q_k}{q_0} \quad (19)$$

As expressões aproximadas para as curvas de extração foram propostas para o caso em particular para o sistema de fluxo pistão e misturador ideal, combinado com diferentes relações de equilíbrio de fase. As expressões consistem em duas partes, a primeira é válida para o período inicial (quando prevalece a extração de células fragmentadas) e a segunda para é válida para o período final (controlado por difusão interna). Neste modelo, a expressão utilizada pressupõe o sistema de fluxo pistão, a relação de equilíbrio linear e despreza-se a resistência de transferência de massa externa [57].

$$e = Q \frac{q_0}{K + \gamma/r}, \quad \text{para } 0 \leq Q \leq Q_c \quad (20)$$

$$e = q_0[1 - C_1 \exp(-C_2 Q)], \quad \text{para } Q > Q_c \quad (21)$$

Onde  $\gamma$  é a razão entre a massa de solvente na matriz e no leito:

$$\gamma = \frac{\rho_f \varepsilon}{\rho_s (1 - \varepsilon)} \quad (22)$$

Por fim, este modelo possui dois parâmetros de transferência de massa ajustáveis, sendo eles  $k_s$  e  $r$ , que são estimados a partir das constantes  $C_1, C_2, K$  e a coordenada  $Q_c$  no ponto de intercepta a primeira e a segunda parte da curva de extração:

$$r = 1 - C_1 \exp(-C_2 Q_c) \quad (23)$$

$$k_s a = \frac{(1 - r)C_2}{1 - (1 - r)KC_2} \frac{Q}{M_p} \quad (24)$$



### 3. PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1. Preparação da amostra. Determinação do tamanho de partícula e densidade

A amostra de *Agastache foeniculum* foi facultada pela ERVITAL, que se localiza na Serra de Montemuro, no conselho de Castro de Aire (40°58'47.1" N, 7°53'43.1"O). Os processos e metodologias utilizados em todo o ciclo de produção, desde a disseminação das culturas até ao processamento final, estão de acordo com os padrões de agricultura orgânica. Apenas as partes aéreas da planta, em plena floração foram colhidas para a extração.

Inicialmente a planta foi mantida a 40 °C por um período de três dias. De seguida, separaram-se as partes da planta que foram sujeitas a estudo, nomeadamente as folhas e as flores, como é apresentado na figura 8.



Figura 8 - Separação das folhas e flores de *Agastache foeniculum* seco

Depois de seca e separadas, as folhas e as flores foram mantidas a -20 °C antes de se proceder à sua trituração. A trituração foi efetuada com o auxílio de um moinho de lâminas (IKA WERKE M20) de forma bastante cautelosa, para evitar a perda das partículas de dimensões menores (pós) aquando da abertura do moinho. De seguida, a planta seca e triturada foi sujeita a um sistema de peneiração (Retsch AS 200 control), constituído por 7 peneiros com diferentes aberturas de forma determinar o diâmetro médio de partícula.

A densidade aparente do *A. foeniculum* foi determinada recorrendo a uma balança e a uma proveta.

## **3.2. Extração de *Agastache foeniculum***

### **3.2.1. Hidrodestilação**

A primeira técnica de extração realizada foi a hidrodestilação, com o objectivo de se obter óleo essencial de *A. foeniculum*. Assim, o balão de fundo redondo (com capacidade para 1 L) foi carregado com 59,8225 g de planta (previamente seca e triturada) e 500 mL de água destilada. O ensaio decorreu por um período de três horas, de acordo com a montagem da figura seguinte.

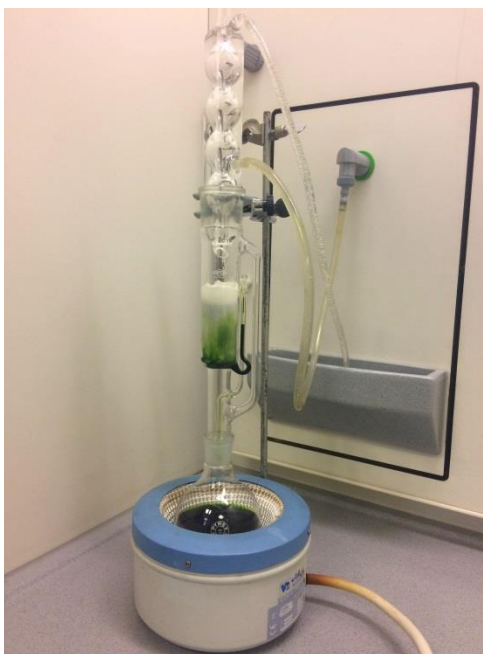


**Figura 9** - Montagem laboratorial da extração por hidrodestilação

### 3.2.2. Extração em Soxhlet

A extração em Soxhlet foi realizada com o objetivo de se obter o extrato de *A. foeniculum*. Procedeu-se ao enchimento do invólucro (papel de filtro) com 19,8929 g de planta (previamente seca e triturada). O metanol (Panreac) utilizado, 600 mL, foi retificado num sistema de destilação, no Laboratório de Inorgânica.

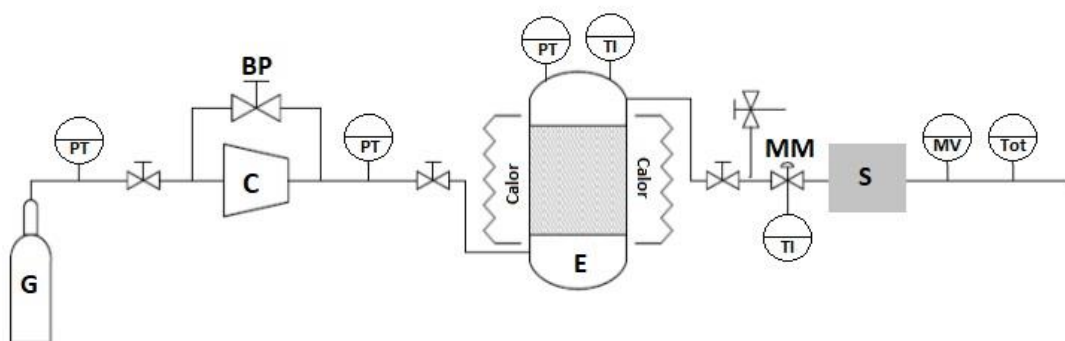
O ensaio decorreu por um período de quatro horas, na instalação apresentada na figura 10.



**Figura 10** - Montagem laboratorial da extração em soxhlet

### 3.2.3. Extração Supercrítica

As extrações supercríticas foram realizadas em dois equipamentos distintos. A obtenção dos extratos supercríticos foi realizada no equipamento existente no ISEL, Applied Separations, que se encontra representado nas figuras 11 e 12, onde são apresentados o esquema e a fotografia do equipamento para extração supercrítica, respetivamente. Enquanto a obtenção do óleo volátil foi efetuada no equipamento presente no Instituto Superior Técnico.



**Figura 11** - Instalação de fluidos supercríticos no ISEL [61] G – Garrafa de Gás que contém o CO<sub>2</sub>; C – Compressor; E – Extrator; S - Separador; PT – Manómetro; BP – Regulador de Pressão; TI – Medidor de Temperatura; MM – Válvula Micrométrica; MV – Caudalímetro; Tot – Totalizador.



**Figura 12** - Extrator Supercrítico utilizado. Applied Separations

O funcionamento da extração supercrítica é dividido em três fases distintas [55], [62]:

- 1ª Fase – Compressão do CO<sub>2</sub>

Nesta fase, verifica-se uma compressão do CO<sub>2</sub> (através de um compressor auxiliar – Jun-Air, modelo OF302) que força o aumento da pressão até 7 bar. O aumento desta pressão ativa o compressor (C) (Applied Separations, modelo Spe-ed SFE), visto só estar apto a proceder a compressões acima de 7 bar, e desta forma atinge-se a pressão de funcionamento desejada.

- 2ª Fase – Aquecimento

De seguida, o CO<sub>2</sub> comprimido segue para o extrator (E) (Applied Separations Spe-ed SFE-2) de forma a ser aquecido à temperatura de funcionamento desejada. A amostra a extrair foi previamente introduzida na célula, que se encontra no interior do forno.

- 3ª Fase – Extração Supercrítica

Estabilizadas as condições críticas de funcionamento (pressão e temperatura), o CO<sub>2</sub> percorre a célula que contém a amostra a extrair e solubiliza-a. Posteriormente a amostra é recolhida pela válvula micrométrica (MM). A saída e recolha da amostra é efetuada pelo separador (S), que atua como filtro (Applied Separations, modelo Spe-ed SFE phase extraction). De seguida o CO<sub>2</sub> é enviado para o caudalímetro (MV) e medidor de gás (Alicat Scientific, modelo M-5SLPM-D) que efetua a medição do caudal instantâneo e volume total de CO<sub>2</sub>.

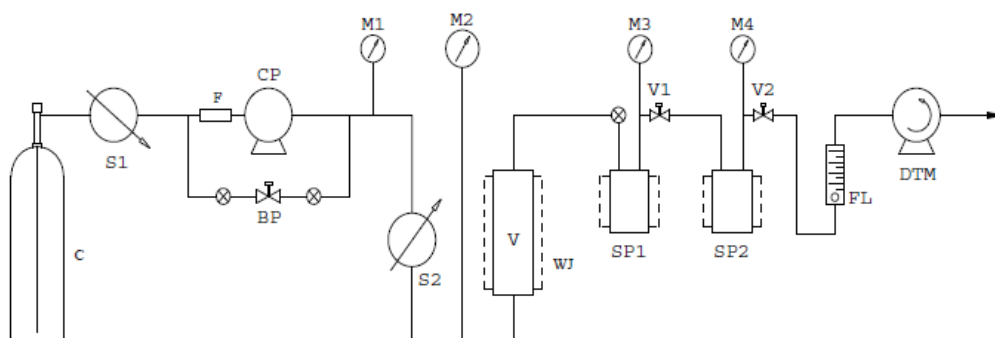
Foram realizadas seis extrações supercríticas, três das quais, no ISEL, que levaram à obtenção do extrato. Enquanto as restantes três, foram realizadas no IST, que levaram à obtenção do óleo volátil.

1. Inicialmente coloca-se lã de propileno numa das suas extremidades do vaso extrator, de seguida o mesmo é preenchido com cerca de 13 gramas de amostra (*A. foeniculum*) seca e por fim coloca-se mais um pouco de lã de polipropileno na outra extremidade. Esta lã serve de filtro para impedir o arrastamento de

partículas sólidas para o sistema durante o ensaio. O vaso é introduzido dentro do forno e ligado através de conexões de alta pressão.

2. Estabilizaram-se as condições de trabalho (pressão e temperatura), nomeadamente de 400 bar e 40 °C, para a obtenção do extrato supercrítico.
3. Iniciou-se o ensaio com a abertura da válvula micrométrica (MM), fazendo variar o caudal de CO<sub>2</sub>.
4. O ensaio continuou com a medição de vários pontos, onde se registou o volume total de CO<sub>2</sub>, o tempo decorrido e a massa recolhida. A massa foi recolhida à pressão atmosférica e a uma temperatura controlada por banho de gelo.

A extração supercrítica que visa a obtenção do óleo volátil foi realizada num equipamento de 1 litro, que se encontra no IST e representado na figura 13, onde se torna mais perceptível a diferença de metodologias utilizadas. A necessidade de se utilizar este segundo equipamento é imposta pela obrigatoriedade de realizar uma separação fracionada, pois só assim é possível obter os compostos voláteis das plantas [19], [23], [58]. O funcionamento do equipamento encontra-se descrito na literatura, sendo que a principal alteração para o sistema do ISEL é a utilização de cerca de 80 gramas de planta em cada ensaio.



**Figura 13** - Instalação de fluidos supercríticos no IST. S1 – Arrefecimento; F – Filtro; CP – Bomba de Circulação; BP- Regulador de Pressão; M1-M4 – Manómetros; S2 – Permutador de Calor; V – Vaso de Extração; SP1, SP2 – Separadores; V1, V2 – Válvulas; FL – Rotametro; DTM – Contador de gás seco

### 3.3. Determinação dos compostos dos óleos por GC-FID

Os óleos essenciais e voláteis, obtidos por hidrodestilação e extração supercrítica, respetivamente, foram analisados por GC-FID de forma a quantificar os diferentes compostos presentes.

Na análise cromatográfica gasosa com o detetor de FID, utilizou-se um Cromatógrafo Perkin Elmer Autosystem XL (Perkin Elmer, Shelton, CT, EUA), equipado com dois detetores de ionização de chama (FID). No injetor a amostra é vaporizada para duas colunas capilares de diferentes polaridades DB-1 (id de 30 m x 0,25 mm, espessura de filme de 0,25 µm; J & W Scientific Inc, EUA), e DB-17HT (30 m x 0,25 mm, espessura filme de 0,15 µm; J & W Scientific Inc.). Os restantes parâmetros durante a análise foram os seguintes: Temperatura do forno: isotérmico a 40 °C (2 min), posteriormente a 3°C/min até que atingisse uma temperatura de 230 °C e finalmente aumentou-se o incremento para 5 °C/min até atingir os 310 °C. Esta temperatura final foi mantida isotérmicamente durante 15 min. As temperaturas do injetor e detetor são de 310 °C, sendo o gás de arraste, hélio, ajustado para uma velocidade linear de 24 cm/s.

Os compostos foram identificados com base nos seus índices de retenção, em relação a uma mistura de n-alcanos C<sub>9</sub> – C<sub>33</sub>, e amostras padrão existentes no laboratório do CESAM, Centro de Biotecnologia Vegetal, FCUL, assim como a utilização da comparação dos espectros de massa com padrões de referência e restantes óleos existentes em laboratório, no caso do GC-MS, que se descreve de seguida.

Para uma amostra de óleo essencial efetuou-se ainda um ensaio para confirmar os compostos por GC-MS, tendo-se para tal usado um Perkin Elmer Autosystem XL cromatógrafo (Perkin Elmer, Shelton, CT, EUA) com uma coluna DB-1 (id de 30 m x 0,25 mm, espessura de película 0,25 µm; J & W Scientific), ligado a um espectrómetro de massa de Perkin-Elmer Turbomass (software versão 4.1; Perkin-Elmer). A temperatura do forno foi programada a partir dos 45 °C até 175 °C com um incremento de 3°C/min, posteriormente aumentou-se o incremento para 15°C/min até que fosse atingida a temperatura de 300 °C e finalmente manteve-se isotermicamente durante 10 minutos.

A temperatura do injetor foi de 280 °C; temperatura da linha de transferência, 280°C; o gás de transporte utilizado foi o hélio, ajustado para uma velocidade linear de 30 cm/s; razão de Split, 1:40.

As restantes condições operatórias foram as seguintes:

- Energia de ionização: 70 eV;
- Gama de massas: 40 – 300 u;
- Corrente de ionização: 60 µA;
- Tempo de varrimento: 1 segundo

Este ensaio permitiu verificar as massas ionizadas e compará-las com as bases de dados para verificação dos compostos a identificar.

### **3.4. Quantificação e Caracterização dos extratos de *A. foeniculum***

#### **3.4.1. Método do Radical Livre DPPH**

O poder antioxidante das amostras foi determinado de acordo com o descrito na literatura [37], [63], com algumas alterações, recorrendo ao leitor de microplaca (BioTek Synergy 2). Inicialmente, 30 µL de cada amostra com diferentes concentrações (dissolvidas em metanol) foram misturadas com 270 µL de solução de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil, 4mM, 100 µL). A mistura reacional foi incubada sem exposição à luz durante 40 minutos tendo sido lida a absorvância a 515 nm, após este período de incubação.

De forma simultânea, foram efetuadas medidas ao branco (constituído apenas por solvente, neste caso, por metanol) e ao controlo, que ao contrário do extrato é constituído por metanol. Foram utilizadas soluções de ácido ascórbico (Panreac 99,0%) e trolox (Sigma Aldrich 98%) para uma gama de concentrações de 20 a 120 µg/mL, como antioxidantes de referência para a realização da curva de calibração e análise de sensibilidade do método [37], [63].

Foram utilizadas placas NUNC-96 de fundo plano.

### 3.4.2. Método Radical Catião ABTS

Foi preparada 25 mL de uma solução de persulfato de potássio ( $K_2O_8S_2$ , Sigma-Aldrich 99,0%) 2,5 mM. A partir da mesma, foi preparada uma solução de 10 mL de ABTS 2,2'-azino-bis(3-etilbenzenotiazolina-6-sulfónico) 7,4 mM. A solução preparada foi mantida à temperatura ambiente, sem exposição à luz, durante 16 horas, por forma a obter o radical catião  $ABTS^+$ . A análise do poder antioxidante foi efetuada em microplaca. Após incubada a solução de ABTS, procederam-se a várias diluições em metanol, de modo a obter uma absorvância (lida a 734 nm) igual à unidade.

No ensaio, pipetaram-se 20  $\mu$ L de cada amostra, de diferentes concentrações para cada poço. Foram efetuados quadruplicados de cada concentração. De seguida pipetaram-se 280  $\mu$ L da solução de ABTS (cuja diluição anteriormente efetuada foi igual à unidade) e procedeu-se à sua leitura, a 734 nm.

À semelhança do método de DPPH, foram utilizadas soluções de ácido ascórbico e Trolox (para uma gama de concentrações de 15 a 180  $\mu$ g/mL), como antioxidantes de referência para a realização da curva de calibração e análise de sensibilidade deste método. A realização do método descrito permitiu a determinação do  $IC_{50}$ , que foi expresso em concentração (mg/mL).

### 3.4.3. Método do Poder de Redução do ião $Fe^{3+}$

O poder de redução do ferro das amostras foi determinado como é sugerido na literatura, em microplaca, com algumas alterações, recorrendo ao leitor de microplaca. Inicialmente, amostras com diferentes concentrações foram dissolvidas em metanol, e recorreu-se ao seguinte procedimento [37], [63]:

1. Pipetaram-se 25  $\mu$ L de cada amostra, de diferentes concentrações para cada poço. Foram efetuados quadruplicados de cada concentração;
2. Adicionaram-se 25  $\mu$ L de tampão fosfato (200 mM e pH=6,6);
3. Adicionaram-se 25  $\mu$ L de ferricianeto de potássio ( $K_3[Fe(CN)_6]$ , Merck, 1 % (W/V));

4. Deixou-se em repouso durante 20 minutos a 50 °C;
5. Adicionaram-se 25 µL de ácido tricloroacético, 10% (w/v);
6. Adicionaram-se 10 µL de solução de cloreto de ferro (III) 0,1% (w/v);
7. Efetuou-se a leitura a 690 nm.

De forma simultânea, foram efetuadas medidas ao branco (constituído apenas por solvente, neste caso, por metanol) e ao controlo, que ao invés do extrato é constituído por metanol e os restantes solventes mencionados anteriormente. Foi utilizada uma solução de trolox (para uma gama de concentrações de 15 a 190 µg/mL) para a realização da curva de calibração, desta forma, os resultados foram expressos em micromoles de TEAC por grama de extrato.

#### **3.4.4. Determinação do teor de polifenóis**

A determinação do teor de polifenóis foi efetuada com base no método de Folin-Ciocalteu em microplaca, com algumas alterações, recorrendo ao leitor de microplaca. Inicialmente, amostras com diferentes concentrações foram dissolvidas em metanol, recorrendo-se ao seguinte procedimento [45], [64]:

1. Pipetaram-se 30 µL de cada amostra, de diferentes concentrações para cada poço. Foram efetuados quadruplicados de cada concentração;
2. Adicionaram-se 150 µL de reagente Folin-Ciocalteu (2N, previamente diluído em água destilada, 1:10, v/v);
3. Deixou-se em repouso durante 4 minutos;
4. Adicionaram-se 120 µL de solução de carbonato de sódio (previamente preparado, 75 g/L);
5. Deixou-se em repouso durante 30 minutos a 40 °C;
6. Efetuou-se a leitura a 765 nm.

De forma simultânea, foram efetuadas medidas ao branco (constituído apenas por solvente, neste caso, por metanol) e ao controlo, que ao contrário do extrato é constituído por metanol e os restantes solventes mencionados anteriormente.

Foi utilizada uma solução de ácido gálico (Sigma Aldrich, 97,5-102,5%) para a realização da curva de calibração (entre 0 e 55 µg), desta forma, os resultados foram expressos em equivalentes de ácido gálico.

### **3.4.5. Determinação do teor em flavonóides**

A determinação do teor de flavonóides foi efetuada com base no método de cloreto de alumínio em microplaca, com algumas alterações. Inicialmente, amostras com diferentes concentrações foram dissolvidas numa solução de etanol/água, 50:50 (v/v) de acordo com o seguinte procedimento [45]:

1. Pipetaram-se 25 µL de cada amostra, de diferentes concentrações para cada poço. Foram efetuados quadruplicados de cada concentração;
2. Adicionaram-se 100 µL de água destilada;
3. Adicionaram-se 7,5 µL de uma solução de NaNO<sub>2</sub> (previamente preparado, 5 % w/V);
4. Deixar em repouso durante 5 minutos à temperatura ambiente;
5. Adicionaram-se 7,5 µL de solução de AlCl<sub>3</sub> (Merck – Schuchardt 97%), 10 % em etanol (m/v);
6. Deixar em repouso durante 5 minutos à temperatura ambiente;
7. Adicionaram-se 100 µL de NaOH;
8. Deixar em repouso durante 10 minutos à temperatura ambiente;
9. Efetuar a leitura a 415 nm.

De forma simultânea, foram efetuadas medidas ao branco (constituído apenas por solvente, neste caso, por etanol/água, 50:50 (v/v)) e ao controlo, que ao invés do extrato é constituído por etanol/água e os restantes solventes mencionados anteriormente. Foi utilizada uma solução de catequina (para uma gama de concentrações de 0 a 500 µg/mL) para a realização da curva de calibração, desta forma, os resultados foram expressos em equivalentes de catequina.

As análises aos óleos (essencial e volátil) foram efetuadas, dissolvendo-os em metanol, ao contrário da mistura etanol/água.



## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Determinação do tamanho de partícula e densidade de *Agastache foeniculum*

Após a amostra triturada e peneirada, obteve-se uma distribuição de tamanho de partícula de acordo com os valores na tabela 3.

**Tabela 3** - Distribuição quantitativa da amostra, nos diferentes peneiros

Peneiro	Diâmetro do Poro (mm)	Massa (g)
1	1,18	104,19
2	1,00	38,61
3	0,710	105,42
4	0,500	93,94
5	0,355	76,27
6	0,300	18,73
7	0,212	109,12
<b>Massa Total:</b>		<b>546,28</b>

O diâmetro médio de partícula, de acordo com a fração mássica retida em cada peneiro foi de 0,62 mm, sendo determinado pela equação 25.

$$d_i = \frac{x_i d_i}{\sum x_i d_i} \quad (25)$$

A densidade do *A. foeniculum* foi medida, obtendo-se o valor de 0,32 g/mL, de acordo com os valores em Anexo B.

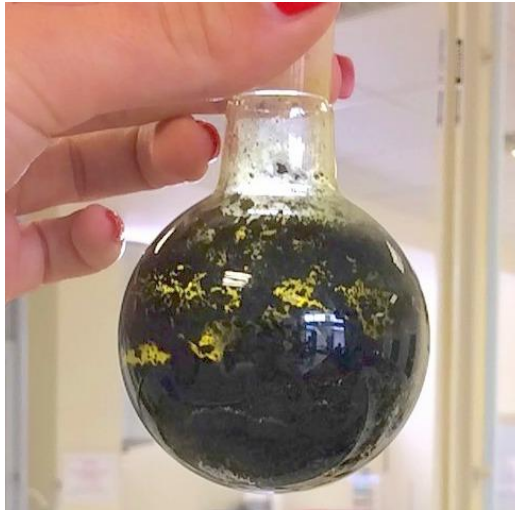
#### **4.2. Obtenção do extrato e óleo essencial de *Agastache foeniculum* através dos métodos convencionais: Extração em Soxhlet e hidrodestilação**

A obtenção do óleo essencial foi efetuada através da realização da hidrodestilação. O rendimento foi determinado através da quantidade de óleo obtida, face à quantidade de planta seca usada como carga, sendo este de 1,03% (m/m). O óleo obtido caracteriza-se pela sua tonalidade amarela translúcida e apresentar um odor característico bastante acentuado, de acordo com a literatura [65].

Estudos realizados revelaram que existe uma forte ligação entre o sistema de irrigação, e o rendimento obtido por hidrodestilação, podendo este variar de 1,64% a 2,30%. Bem como, a altura do ano e que a semente é planta e colhida [2], [4]. Por exemplo, num estudo realizado com sementes de *A. foeniculum* produzidas em Budapeste, plantadas no Irão, e colhidas no período de maior floração obteve-se um rendimento de 1,87% [65].

O extrato de *A. foeniculum* foi obtido por extração em Soxhlet, onde foi usado metanol retificado como solvente. Após a extração, o solvente contendo o extrato foi levado ao rotavapor e seco sobre vácuo a 40 °C. Foi posteriormente levado à linha de vácuo para garantir a secagem total do extrato e separação do solvente usado. Obteve-se um rendimento no valor de 30,97%.

O extrato obtido (figura 14) apresentava uma tonalidade verde escura e sem nenhum aroma perceptível.



**Figura 14** - Extrato de *Agastache foeniculum* obtido através da extração em Soxhlet

### **4.3. Obtenção do extrato e óleo volátil de *Agastache foeniculum* através dos métodos não-convencionais com CO<sub>2</sub> supercrítico**

O extrato de *Agastache foeniculum* com CO<sub>2</sub> supercrítico foi obtido através de três ensaios, tendo-se fixado a pressão e temperatura e variando a polaridade do solvente supercrítico com a adição de pequenas quantidades co-solventes: metanol e etanol. A pressão de 400 bar e 40°C foi escolhida, porque não sendo demasiado elevada (atualmente para a obtenção de antioxidantes de algumas matrizes fazem-se extrações até 700 bar), encontra-se referenciada na literatura como uma das mais utilizadas para a obtenção de extratos e comparação com os métodos tradicionais [1].

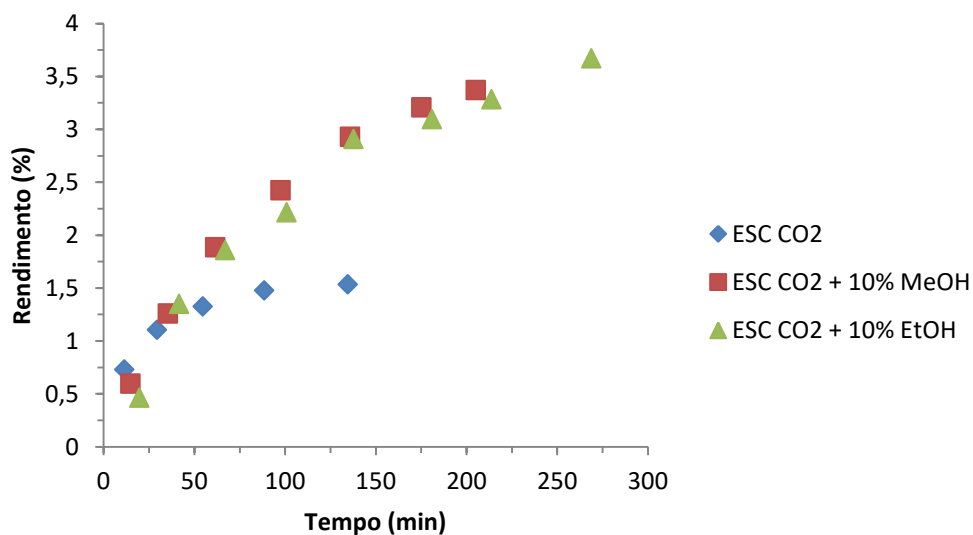
Ao longo do tempo foi medida a massa extraída, bem como o volume de solvente utilizado, para se proceder ao estudo do rendimento da extração ao longo do tempo, verificando-se assim que quando a massa extraída era insignificante para um determinado volume, dava-se por terminado o ensaio.

O rendimento dos extratos foi determinado como a razão percentual entre a massa de extrato obtido no final da extração e a massa de material vegetal que se encontrava no vaso de extração utilizado, encontrando-se os resultados na tabela 4.

**Tabela 4** - Rendimento global e condições operatórias das extrações supercríticas realizadas

	Extração Supercrítica CO <sub>2</sub>	Extração Supercrítica CO <sub>2</sub> + 10% metanol	Extração Supercrítica CO <sub>2</sub> + 10% etanol
<b>Pressão (bar)</b>	400	400	400
<b>Temperatura (°C)</b>	40	40	40
<b>Rendimento (%)</b>	1,54	3,37	3,67

Como se pode verificar na tabela anterior, a extração supercrítica realizada sem o auxílio de co-solventes foi a que obteve um rendimento inferior. Este ensaio foi resultado de 5 pontos medidos (massa extraída ao longo do tempo). No que diz respeito às extrações supercríticas com CO<sub>2</sub> e co-solventes, a obtenção do extrato foi conseguida com um rendimento muito semelhante entre o uso de metanol e etanol. Todas as medições efetuadas encontram-se descritas no Anexo C.

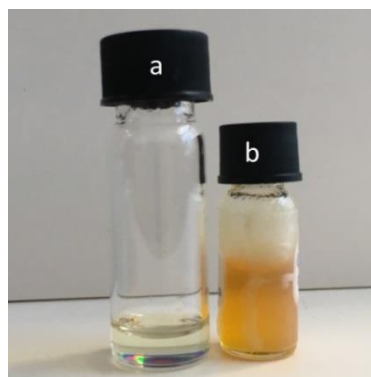


**Figura 15** - Rendimento da extração supercrítica do extrato de *A. foeniculum* em função do tempo

A adição de metanol e etanol faz aumentar a polaridade do dióxido de carbono o que possibilita uma melhor extração dos constituintes mais polares que se encontram presentes na matriz da planta [26].

Para a obtenção do óleo volátil através da extração supercrítica foram realizados três ensaios com as seguintes condições operatórias: 90 bar e 40 °C num ensaio e 110 bar e 50 °C nos dois restantes ensaios, fazendo-se variar, neste último o caudal de dióxido de carbono. Assim, obteve-se um óleo de tonalidade bem díspar do anterior, uma vez que se apresentava alaranjado, menos transparente e com um odor menos intenso.

As diferenças visíveis entre os dois óleos podem ser verificadas na figura 16.



**Figura 16** - Óleos obtidos por a) hidrodestilação e b) extração supercrítica com CO<sub>2</sub>

De forma semelhante às extrações supercríticas realizadas, foram efetuadas várias medições ao longo do tempo que permitiram uma melhor compreensão da evolução da extração, figura 17, que se encontram todas discriminadas no Anexo C.

Verifica-se que, um maior caudal de dióxido de carbono reduz o tempo de extração, sendo a evolução de ambas as extrações tendendo para um mesmo patamar (igual rendimento), perto de 1%. Ou seja, o ensaio realizado com um caudal de 13,63 L/min decorreu de uma forma mais rápida, alcançando-se um rendimento de 0,98% ao fim de 96 minutos. Enquanto, o ensaio realizado com um caudal de 7,95 L/min teve a duração de 149 minutos. Também é possível constatar que, um aumento do caudal de CO<sub>2</sub> não se traduz num aumento do rendimento, pois a quantidade de óleo presente na planta é a mesma.

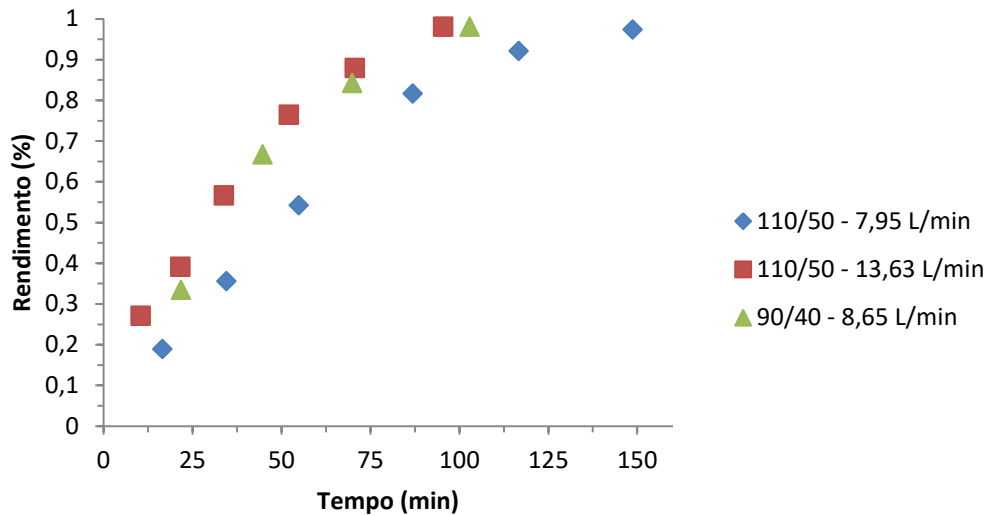


Figura 17 – Rendimento da extração supercrítica do óleo volátil de *A. foeniculum* em função do tempo

Por comparação com o óleo essencial, obtido por hidrodestilação, cujo rendimento foi de 1,03 %, as diferenças dos valores experimentais são insignificantes, extraíndo-se 100 % de óleo disponível na planta. Por fim verificou-se que, para condições de temperatura e pressão inferiores (90 bar e 40 °C) é obtido o rendimento máximo mais rapidamente, por comparação com o ensaio efetuado (110 bar e 50 °C) para o mesmo caudal de CO<sub>2</sub>.

#### 4.4. Determinação dos compostos dos óleos por GC-FID

Como referido anteriormente o principal método de quantificação dos compostos presentes no óleo essencial e óleo volátil foi a utilização da técnica de GC-FID. Na Tabela 5 é apresentado os resultados para o óleo essencial (HD) e para o óleo volátil (SFE) nas duas condições de pressão e temperatura. A variação de caudal não influenciou os compostos obtidos no óleo, mas sim exclusivamente a sua eficiência e velocidade de extração.

Tabela 5 - Composição do óleo essencial e óleo volátil de *A. foeniculum*

Compostos Identificados	Índice de Retenção	Óleo Essencial (HD)	Óleo Volátil 110/50	Óleo Volátil 90/40
$\alpha$ -Pinoeno	930	t	t	T
1-Octen-3-ol	961	0.8	0.4	0.6
3-Octanona	961	t	0.2	T
Ácido Hexanoico	968	t	t	T
$\beta$ -Mirceno	975	0.1	t	0.1
1,8-Cineole	1005	t	t	T
$\beta$ -Felandreno	1005	t	t	T
Limoneno	1009	5.4	3.1	4.5
Linalol	1074	t	t	0.1
1-Octan-3-il acetate	1086	0.2	0.1	0.4
Mentona	1120	t	t	T
Isomentona	1126	0.2	0.2	T
Methyl chavicol (Estragole)	1163	90.0	85.5	84.9
Pulegona	1207	0.6	0.6	T
Citral	1240	t	T	T
Eugenol	1327	t	T	T
$\delta$ -Elemeno	1332	0.1	T	0.1
Methyl eugenol	1377	t	T	T
$\beta$ -Cariofileno	1414	1.0	2.0	1.8
$\alpha$ -Humuleno	1447	t	0.1	0.1
Germacrene D	1474	t	0.2	0.2
Biciclogermacrene	1487	0.4	0.8	1.2
$\gamma$ -Cadineno	1500	t	T	T
$\delta$ -Cadineno	1505	0.1	T	0.6
Óxido de $\beta$ -Cariofileno	1561	0.1	0.5	T
$\alpha$ -Cadinol	1626	0.1	T	T
Hexanoato de etil	1936	t	T	T
Acetato de fitol 2	2101	0.2	2.7	2.5
Linoleato de etil	2137	t	1.7	1.0
<i>n</i> -Heptacosano	2700	t	0.1	0.1
<i>n</i> -Octacosano	2800	t	0.1	0.1
<i>n</i> -Nonacosano	2900	t	T	T
<i>n</i> -Triacontano	2000	t	T	T
<i>n</i> -Hentriacontano	3100	t	T	T
<i>n</i> -Dotriacontano	3200	t	T	T
<i>n</i> -Tritriacontano	3300	t	T	T
Compostos Identificados		99.3	98.3	98.3
Grupos de Compostos				
<b>Hidrocarbonetos Monoterpénicos</b>		5.5	3.1	4.6
<b>Monoterpenos oxigenados</b>		0.8	0.8	0.1
<b>Sesquiterpenos hidrocarbonetos</b>		1.6	3.1	4.0
<b>Sesquiterpenos oxigenados</b>		0.2	0.5	T
<b>Fenilpropanoides</b>		90.0	85.5	84.9
<b>Outros</b>		1.2	5.3	4.7

RI: índice de retenção calculados em relação a uma mistura de alcanos C<sub>9</sub>-C<sub>33</sub> *n*-alcanos na coluna DB-1; t: traços (<0.05%).

Na Tabela 5 são identificados maioritariamente os 15 componentes que representam pelo menos 98% dos componentes totais no óleo. Os compostos voláteis obtidos são dominados por fenilpropanoides. Em quantidades variáveis, o estragol (85 a 90%), o limoneno (3 a 5%) e  $\beta$ -cariofileno são os compostos que dominam as diferentes amostras.

Observa-se que os óleos voláteis obtidos com CO<sub>2</sub> supercrítico contêm maior quantidade de acetato de fitol 2 quando comparado com o óleo essencial. Este componente pode ser um contributo relevante para a qualidade do óleo, considerando a importância e as referências na literatura. Também as diferentes colorações dos óleos podem ter origem na maior percentagem deste componente no óleo volátil.

Além disso, este aumento do acetato de fitol 2 nos óleos voláteis, não é acompanhado por um aumento significativo do conteúdo em ceras relativamente ao óleo essencial, dando a entender que uma boa separação e fracionamento são obtidos durante o processo no separador 2.

#### **4.5. Quantificação e Caracterização do *A. foeniculum***

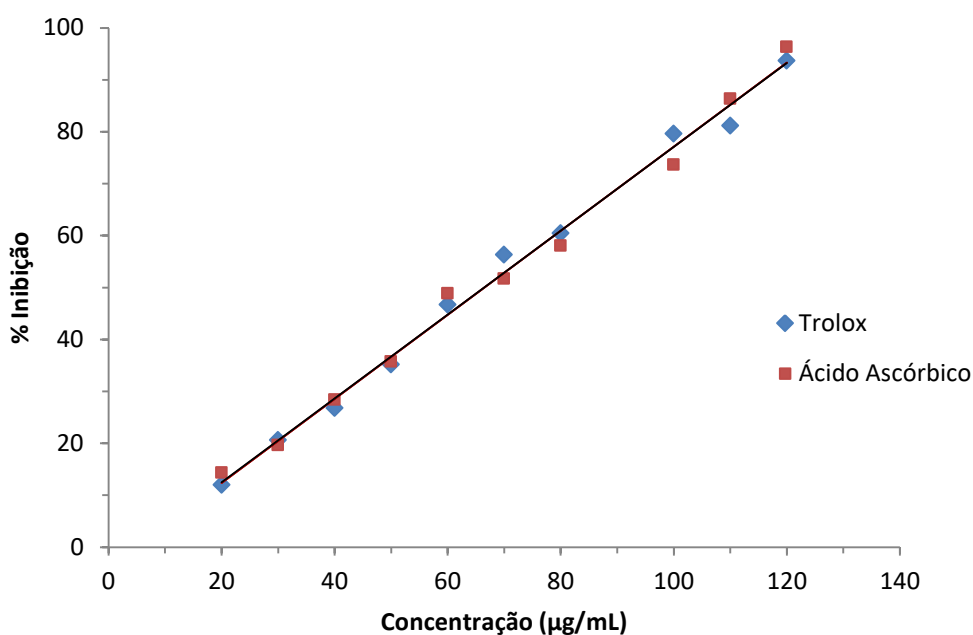
Para determinar a poder antioxidante do *Agastache foeniculum*, foram realizados três métodos distintos: DPPH, ABTS e poder de redução do ferro.

##### **4.5.1. Determinação do poder antioxidante pelo método do DPPH**

No método do DPPH, a atividade dos extratos com o DPPH é determinada por espectrofotometria, sendo que o radical do DPPH reage com um composto antioxidante, de forma a poder doar um hidrogénio, reduzindo-se. Assim, foi medida a variação de cor ao fim de um período de tempo, e determinada a percentagem de inibição [66].

Em cada ensaio realizado procurou-se chegar a concentrações que traduzissem a inibição de pelo menos dois valores inferiores a 50%, e dois valores superior ao mesmo, para que a determinação do IC<sub>50</sub> fosse conseguida com maior precisão.

De forma a ser possível comparar os resultados obtidos com antioxidantes de referência, foram efetuados dois ensaios com ácido ascórbico e Trolox, cujas curvas de calibração se encontram representadas na figura 18.



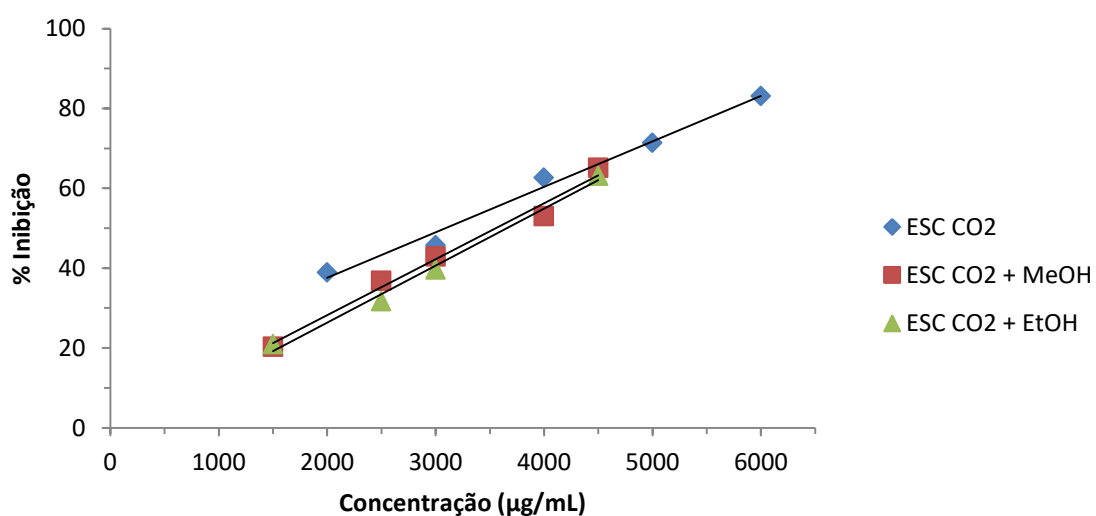
**Figura 18** - Curvas de calibração e respectiva regressão linear para os antioxidantes trolox e ácido ascórbico, pelo método de DPPH

Os parâmetros das curvas de calibração encontram-se descritos na tabela 6 e os resultados que traduzem a análise do poder antioxidante dos extratos supercríticos encontram-se representados na figura 19.

**Tabela 6** - Parâmetros de regressão ANOVA para os antioxidantes de referência, pelo método de DPPH

$$y = a + bx$$

<b>Trolox</b>	Ordenada na origem	-3,836 ± 3,993
	Declive	8,10E-01 ± 5,30E-02
	R quadrado	0,994
	Erro padrão da correlação y/x	2,361
	Limite de detecção	6,42 µg/mL
	Limite de quantificação	21,39 µg/mL
<b>Ácido Ascórbico</b>	Ordenada na origem	-3,648 ± 4,415
	Declive	8,08E-01 ± 5,86E-02
	R quadrado	0,992
	Erro padrão da correlação y/x	2,611
	Limite de detecção	7,11 µg/mL
	Limite de quantificação	23,71 µg/mL



**Figura 19** - Curvas de inibição e respectivas retas de linearidade dos extratos supercríticos, pelo método de DPPH

Foi igualmente determinada a capacidade antioxidante do extrato obtido pela extração em Soxhlet, que se encontra representado na figura 20.

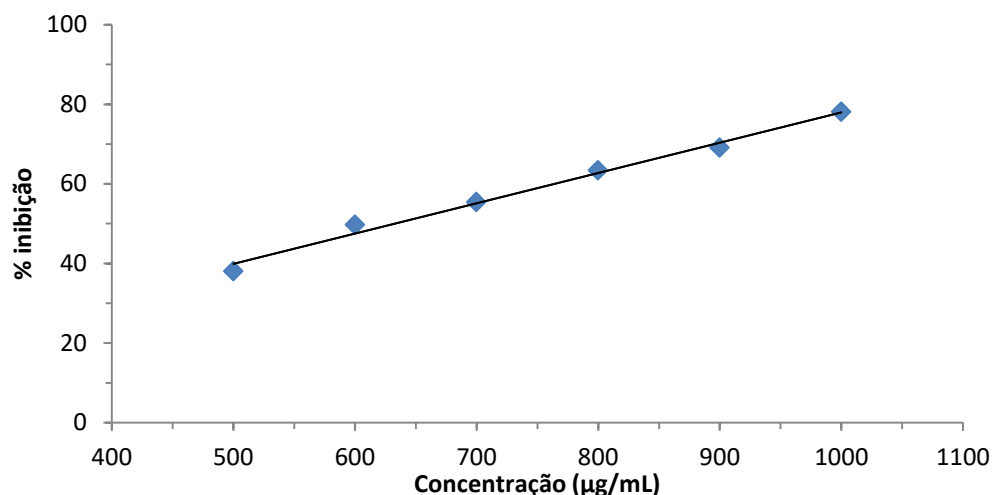


Figura 20 - Curva de inibição e respectiva reta de linearidade do extrato soxhlet, pelo método de DPPH

Determinado o valor que induz a 50% da capacidade antioxidante é apresentado na tabela 7.

Tabela 7 - Determinação do IC<sub>50</sub>, pelo método de DPPH, dos extratos supercríticos, soxhlet e antioxidantes de referência

	IC <sub>50</sub> (µg/mL)
<b><i>A. foeniculum</i> - ESC CO<sub>2</sub></b>	3093,13
<b><i>A. foeniculum</i> - ESC CO<sub>2</sub>+ 10% MeOH</b>	3555,04
<b><i>A. foeniculum</i> - ESC CO<sub>2</sub>+ 10% EtOH</b>	3657,18
<b><i>A. foeniculum</i> – Ex. Soxhlet</b>	632,86
<b>Trolox</b>	57,02
<b>Ácido Ascórbico</b>	57,39

Pela análise dos valores representados é possível verificar que os antioxidantes de referência, trolox e ácido ascórbico, possuem um melhor poder antioxidante, pois apresentam valores de IC<sub>50</sub> inferiores, que correspondem à quantidade que inibe 50% do radical DPPH presente na solução. Assim quanto menor este valor for, melhor será o seu poder antioxidante.

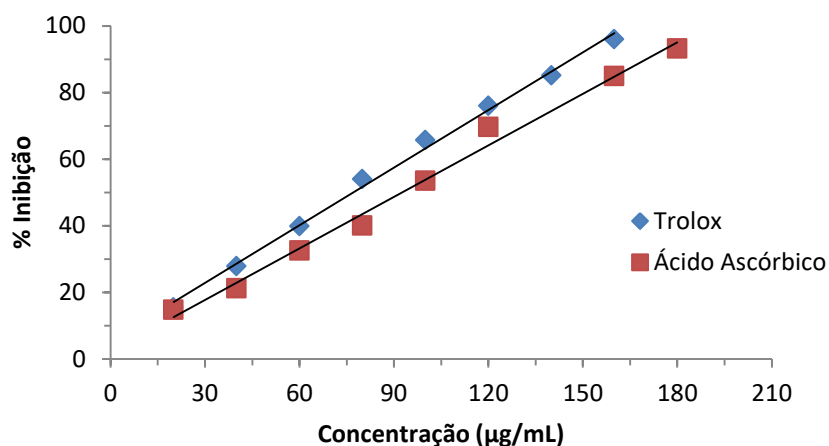
A capacidade antioxidante do extrato obtido por extração em soxhlet ( $IC_{50}=632,86 \mu\text{g/mL}$ ) é significativamente maior do que a apresentada pelos extratos supercríticos. Nestes, constata-se que, quando a extração é realizada apenas com  $\text{CO}_2$  como solvente, confere ao extrato um melhor poder antioxidante, pois obteve-se um valor de  $IC_{50}$  inferior ( $3093,13 \mu\text{g/mL}$ ), comparativamente à extração onde se adicionaram co-solventes, nomeadamente de metanol ( $IC_{50}=3555,04 \mu\text{g/mL}$ ) e etanol ( $IC_{50}=3657,18 \mu\text{g/mL}$ ). No entanto, a diferença entre ambos os co-solventes não é significativa.

Resultados comparados com a literatura mostram que, o poder antioxidante do óleo essencial de *A. foeniculum* é superior ao determinado no presente trabalho (através da extração supercrítica), nomeadamente,  $IC_{50}=2870,2 \mu\text{g/mL}$  [6]. No presente trabalho a capacidade antioxidante dos óleos essencial e volátil não foi determinada (pelos métodos de DPPH e ABTS) devido à insolubilidade dos mesmos em metanol e etanol, para as concentrações necessárias ao estudo.

A disparidade de valores determinados pode ser justificada pela variação de percentagem entre folhas e flores com que se realizou a extração, visto que às folhas do *A. foeniculum* está associado um poder antioxidante muito superior (98,99 %), quando comparado com as flores da mesma (55,72 %) [63].

#### **4.5.2. Determinação do poder antioxidante pelo método do ABTS**

Este outro método para a quantificação da atividade antioxidante dos extratos é semelhante ao método anterior, pelo que de igual forma é averiguado o poder dos dois antioxidantes de referência: trolox e ácido ascórbico.



**Figura 21** - Curvas de calibração e respectiva regressão linear para os antioxidantes trolox e ácido ascórbico, pelo método do ABTS

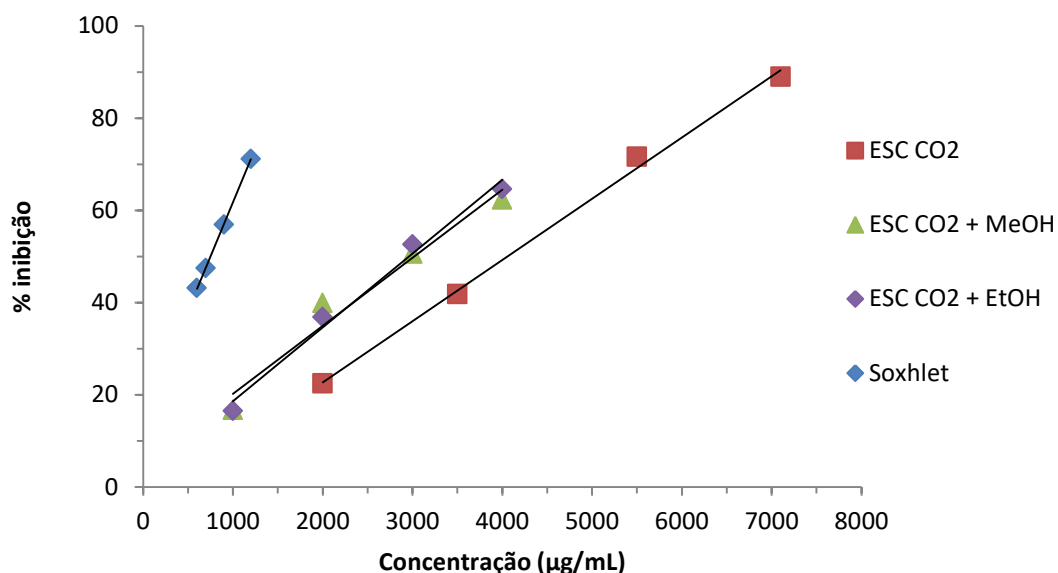
Os parâmetros das curvas de calibração encontram-se apresentados na tabela 8.

**Tabela 8** - Parâmetros de regressão ANOVA para os antioxidantes de referência, pelo método do ABTS

$$y = a + bx$$

<b>Trolox</b>	Ordenada na origem	5,550 ± 3,614
	Declive	5,77E-01 ± 3,58E-02
	R quadrado	0,996
	Erro padrão da correlação y/x	1,895
	Limite de detecção	7,68 µg/ML
	Limite de quantificação	25,59 µg/mL
<b>Ácido Ascórbico</b>	Ordenada na origem	2,296 ± 5,351
	Declive	5,15E-01 ± 4,93E-02
	R quadrado	0,991
	Erro padrão da correlação y/x	2,999
	Limite de detecção	12,73 µg/mL
	Limite de quantificação	42,44 µg/mL

Assim sendo, os resultados que traduzem a análise do poder antioxidante pelo método do ABTS dos extratos supercríticos, e extração em Soxhlet, encontram-se representados na figura 22.



**Figura 22** - Curvas de inibição e respectivas retas de linearidade dos extratos supercríticos e soxhlet, pelo método do ABTS

Determinado o valor que induz a 50% da capacidade antioxidante é apresentado na tabela 9.

**Tabela 9** - Determinação do IC<sub>50</sub>, pelo método do ABTS, dos extratos supercríticos, soxhlet e antioxidantes de referência

	IC <sub>50</sub> (µg/mL)
<b><i>A. foeniculum</i> - ESC CO<sub>2</sub></b>	4047,25
<b><i>A. foeniculum</i> - ESC CO<sub>2</sub>+ 10% MeOH</b>	3027,27
<b><i>A. foeniculum</i> - ESC CO<sub>2</sub>+ 10% EtOH</b>	2960,19
<b><i>A. foeniculum</i> – Ex. Soxhlet</b>	749,64
<b>Trolox</b>	77,02
<b>Ácido Ascórbico</b>	92,59

Semelhantemente ao ensaio do DPPH, os antioxidantes de referência, trolox e ácido ascórbico apresentam um melhor poder antioxidante, pois apresentam valores de IC<sub>50</sub> inferiores. Comparando os dois antioxidantes de referência, verifica-se que, o trolox (IC<sub>50</sub>=77,02 µg/mL) possui um poder antioxidante superior, quando comparado com o ácido ascórbico (IC<sub>50</sub>=92,59 µg/mL).

A capacidade do extrato obtido por extração em soxhlet (IC<sub>50</sub>=749,64 µg/mL) é significativamente maior do que a apresentada pelos extratos supercríticos.

Contrariamente ao verificado pelo método de DPPH, no método de ABTS o extrato supercrítico obtido apenas com CO<sub>2</sub> como solvente, confere ao extrato um inferior poder antioxidante, pois obteve-se um valor de IC<sub>50</sub> superior (4047,25 µg/mL). As extrações supercríticas onde se adicionaram co-solventes, nomeadamente de metanol (IC<sub>50</sub>=3027,27 µg.mL) e etanol (IC<sub>50</sub>=2960,19 µg.mL), obtiveram um comportamento semelhante ao anteriormente verificado, ou seja, um poder antioxidante bastante semelhante, podendo-se concluir que a diferença entre ambos os co-solventes não é significativa.

Resultados comparados com a literatura mostram que, o poder antioxidante do óleo essencial, pelo método ABTS, é superior ao determinado no presente trabalho (através da extração supercrítica), nomeadamente, IC<sub>50</sub>=1307 µg/mL. Contrariamente ao que se verifica com o extrato soxhlet (IC<sub>50</sub>=749,64 µg/mL), visto que este apresenta um maior poder antioxidante [6].

#### 4.5.3. Determinação do poder antioxidante pelo método da redução do Ferro

O poder antioxidante pelo método da redução do ferro foi testado com o antioxidante de referência trolox, que está representado na figura 23.

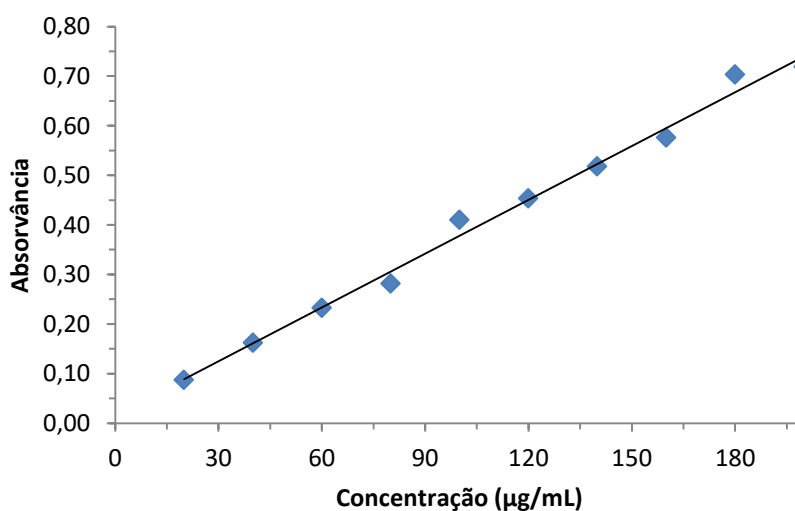


Figura 23 - Curva de calibração e respetiva regressão linear para o trolox, pelo método de redução do ferro

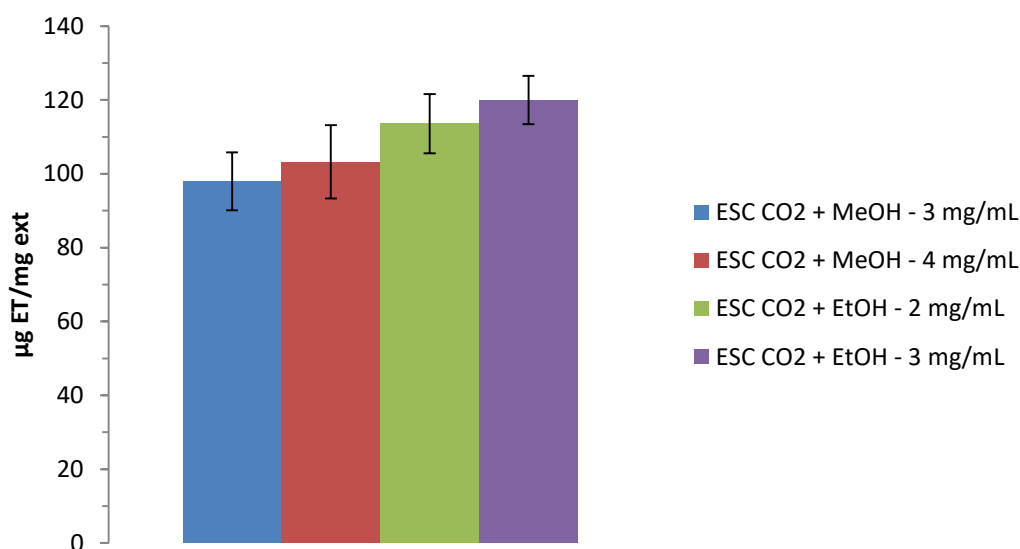
Os parâmetros da curva de calibração encontram-se descritos na tabela 10.

**Tabela 10** - Parâmetros de regressão ANOVA, para a curva de calibração do método de redução do ferro utilizando trolox

$$y = a + bx$$

<b>Ordenada na origem</b>	1,63E-02 ± 3,40E-02
<b>Declive</b>	3,62E-03 ± 2,74E-04
<b>R quadrado</b>	0,991
<b>Erro padrão da correlação y/x</b>	2,16E-02
<b>Limite de detecção</b>	12,25 µg/mL
<b>Limite de quantificação</b>	40,82 µg/mL

A determinação do poder de redução do ferro, nos extratos supercríticos encontra-se representada na figura 24, sendo os valores dados em equivalentes de trolox por mg de extrato (µg ET/mg ext).



**Figura 24** - Poder de redução do ferro para os extratos supercríticos de *A. foeniculum*

Pela análise do gráfico anterior pode-se constatar que o poder de redução do ferro, para o extrato supercrítico com uso de metanol como co-solvente varia com a

concentração do mesmo, assim para uma concentração inferior (3 mg/mL) obteve-se um poder de redução de 97,94  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , enquanto que para uma concentração superior (4 mg/mL) obteve-se um poder de redução de 103,23  $\mu\text{g}/\text{mg}$ .

Para o extrato supercrítico com uso de etanol verificou-se que para uma concentração inferior (2 mg/mL) obteve-se um poder de redução de 113,56  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , enquanto que para uma concentração superior (3 mg/mL) obteve-se um poder de redução de 119,96  $\mu\text{g}/\text{mg}$ .

Pode-se concluir que o poder de redução aumenta com a concentração do extrato, e que a extração supercrítica com recurso ao etanol se apresenta mais eficaz, comparativamente ao uso de metanol.

A determinação do poder de redução do ferro, nos extratos convencionais (extração em soxhlet) encontra-se representada na figura 25.

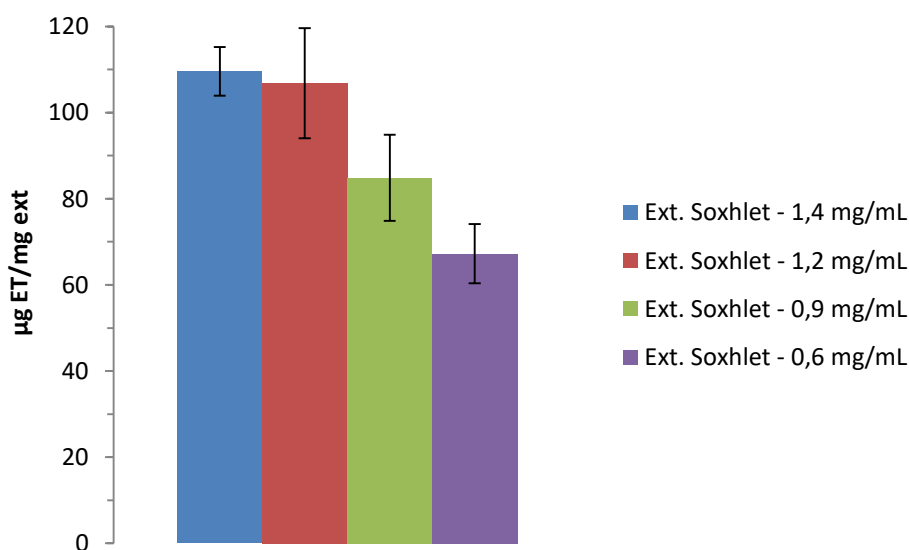


Figura 25 - Poder de redução do ferro para os extratos soxhlet de *A. foeniculum*

Pela análise da figura anterior pode-se verificar que, o poder de redução diminui, com a diminuição da concentração dos extratos. No entanto, para as concentrações mais elevadas estudadas, 1,4 e 1,2 mg/mL, obteve-se um poder de redução muito semelhante, nomeadamente de 109,56 e 106,80  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , respetivamente. A diferença torna-se mais notória em concentrações mais baixas, onde 0,9 e 0,6 mg/mL obtiveram um poder de redução de 85,85 e 67,24  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , respetivamente.

Pode-se verificar também que, não existem diferenças significativas comparando os extratos supercríticos, com os extratos soxhlet, pois ambos apresentam um poder de redução dentro da mesma ordem de grandeza.

A determinação do poder de redução do ferro, nos óleos (essencial e supercrítico) encontra-se representada na figura 26.

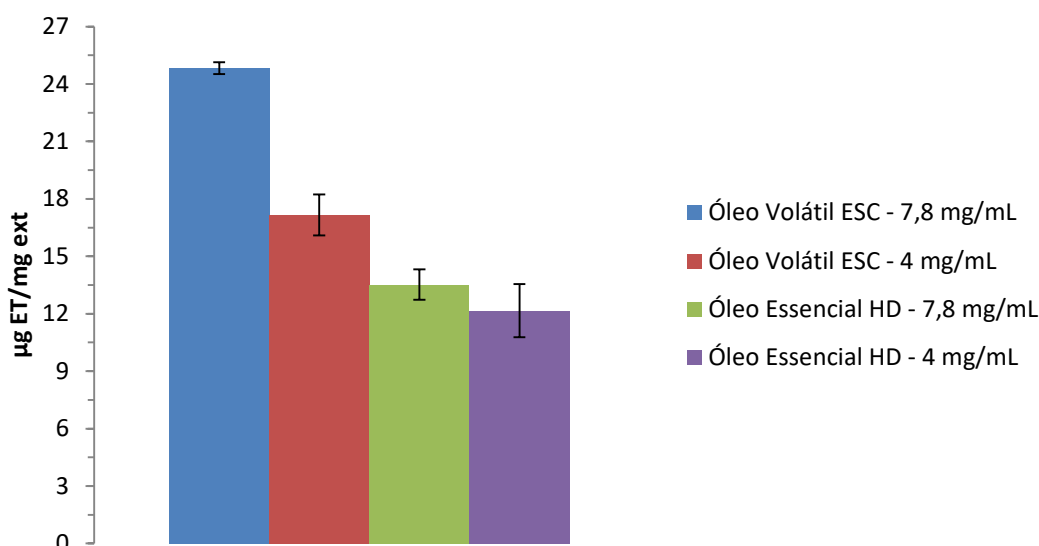


Figura 26 - Poder de redução do ferro para o óleo essencial e volátil de *A. foeniculum*

À semelhança das análises anteriores verifica-se que o poder de redução do ferro diminui com a diminuição da concentração dos óleos. O óleo volátil obtido por extração supercrítica com 7,8 mg/mL apresenta um poder de redução de 24,83 µg/mg e o óleo de concentração inferior (4 mg/mL) apresenta um poder de redução inferior, nomeadamente de 17,16 µg/mg.

O óleo essencial obtido por hidrodestilação com 7,8 mg/mL apresenta um poder de redução de 13,52 µg/mg e o óleo de concentração inferior (4 mg/mL) apresenta um poder de redução inferior, nomeadamente de 12,16 µg/mg. Ou seja, não se verifica uma diferença significativa nas duas concentrações estudadas.

Pode-se concluir que, óleo volátil apresenta um poder de redução superior ao óleo essencial. No entanto, ambos os óleos apresentam um poder de redução muito inferior quando comparados com os restantes extratos (supercrítico e soxhlet).

#### 4.5.4. Determinação do teor de polifenóis

A quantificação dos polifenóis dos diferentes extratos foi efectuada para um composto referência, o ácido gálico (figura 27). Desta forma, todos os resultados são expressos em equivalentes de ácido gálico.

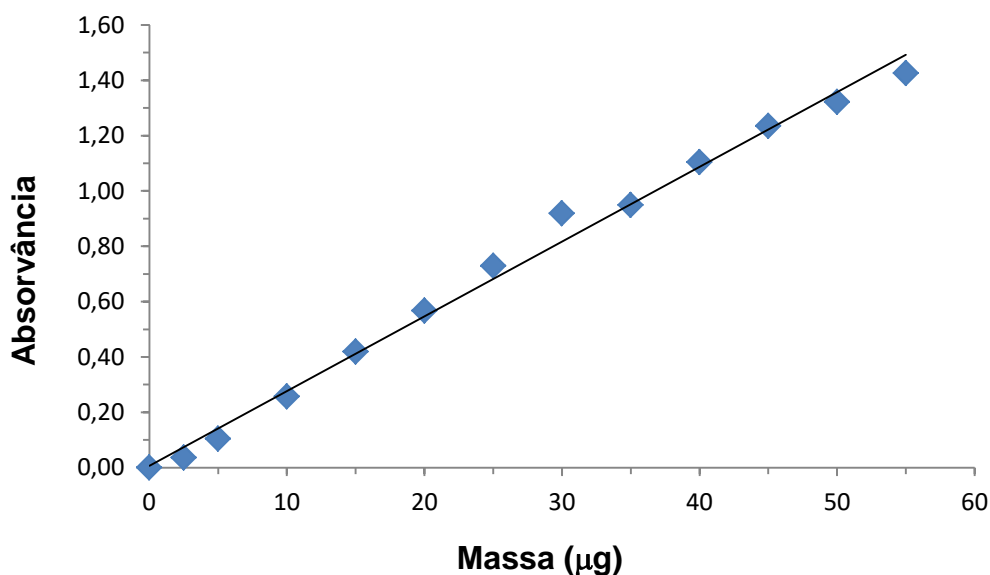


Figura 27 - Curva de calibração e respetiva regressão linear para o ácido gálico, para determinação do teor em polifenóis

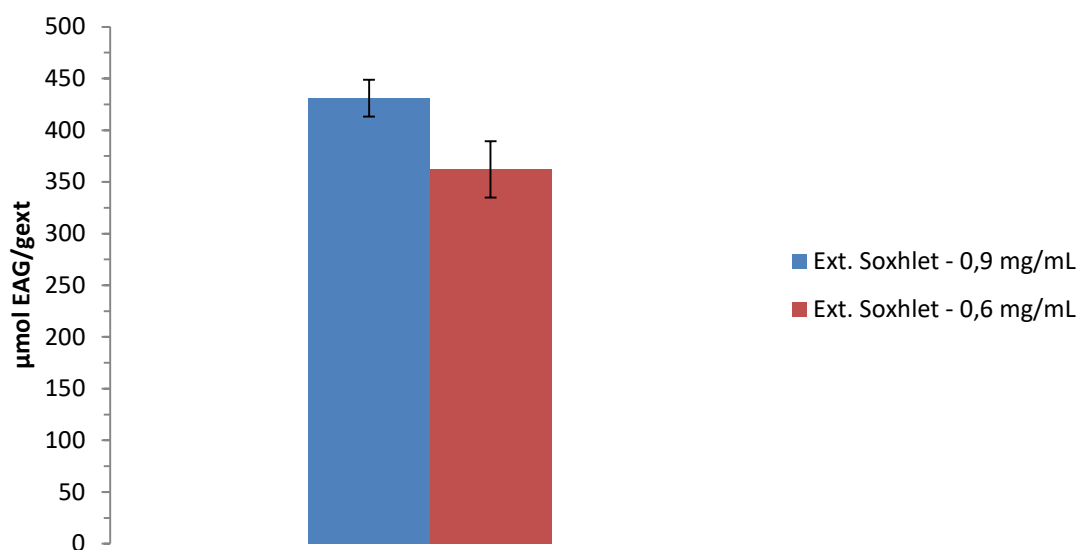
Os parâmetros da curva de calibração encontram-se descritos na tabela 11.

Tabela 11 - Parâmetros de regressão ANOVA, para o ácido gálico, para determinação do teor em polifenóis

$$y = a + bx$$

<b>Ordenada na origem</b>	9,010E-03 ± 1.803E-3
<b>Declive</b>	2,695E-02 ± 5.855E-2
<b>R quadrado</b>	0.991
<b>Erro padrão da correlação y/x</b>	4.047E-2
<b>Limite de deteção</b>	2.92 µg
<b>Limite de quantificação</b>	9.75 µg

Verificou-se que o maior teor de polifenóis foi obtido no extrato proveniente da extração em Soxhlet, como se encontra representado na figura 28.



**Figura 28** – Teor de polifenóis do extrato de *A. foeniculum*, obtido por extração em Soxhlet

Assim sendo, pela análise do gráfico representado, verifica-se que, o extrato com maior concentração, 0,9 mg/mL, apresenta um teor em polifenóis superior, nomeadamente de 430,85  $\mu\text{mol EAG/g}$  extrato, enquanto o extrato de concentração inferior (0,6 mg/mL) apresenta um teor de 362,07  $\mu\text{mol EAG/g}$  extrato.

O teor de polifenóis dos restantes extratos e óleo é significativamente inferior, como se encontra representado na figura 29.

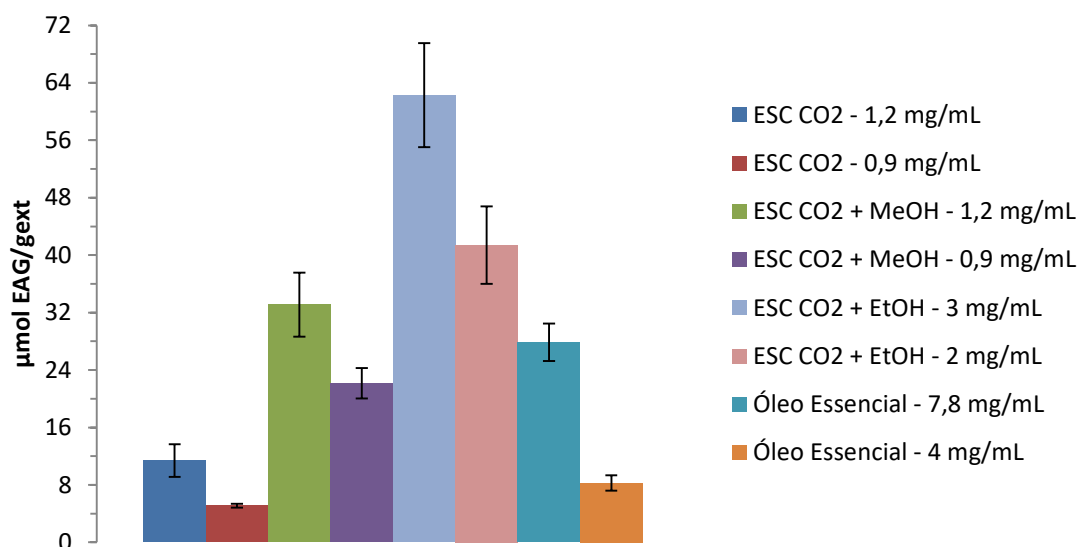


Figura 29 - Teor de polifenóis do extrato e óleo de *A. foeniculum*

Pela análise do gráfico anterior pode-se constatar que a extração supercrítica com uso apenas de CO<sub>2</sub>, confere aos extratos um teor de polifenóis inferior, quando comparado com o uso de co-solventes. O extrato sem co-solvente com 1,2 mg/mL apresenta um teor de polifenóis de 11,38 µmol EAG/ g extrato, enquanto que uma concentração inferior do extrato (0,9 mg/mL) traduz num espetável teor de polifenóis inferior, nomeadamente 5,11 µmol EAG/ g extrato.

O extrato supercrítico com uso de metanol de maior concentração (1,2 mg/mL) apresenta um teor de 33,10 µmol EAG/ g extrato, enquanto o extrato com concentração inferior (0,9 mg/mL) apresenta um teor de 22,14 µmol EAG/ g extrato. O extrato supercrítico obtido com etanol e de maior concentração (3 mg/mL) apresenta um teor de 62,27 µmol EAG/ g extrato, enquanto o extrato com concentração inferior (2 mg/mL) apresenta um teor de 41,39 µmol EAG/ g extrato.

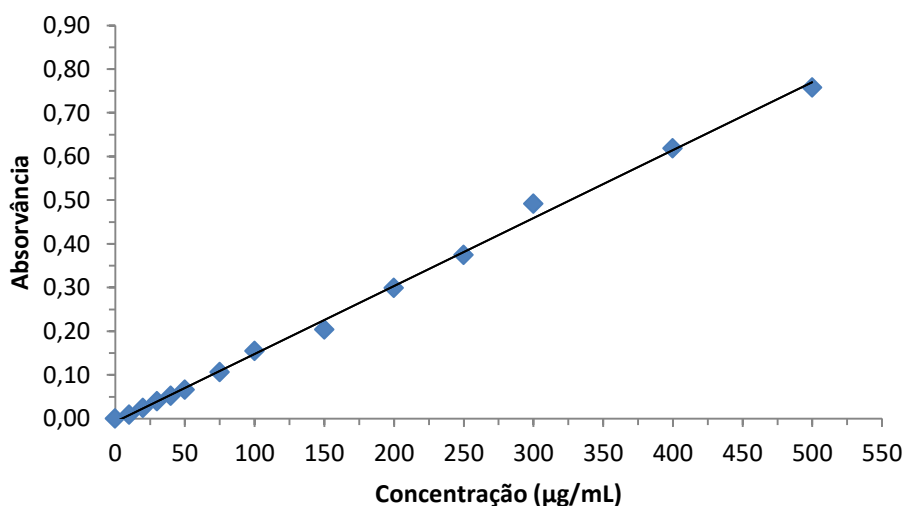
Relativamente ao óleo essencial, verifica-se um acentuado aumento do teor de polifenóis para uma concentração superior, assim, o óleo estudado com 7,8 mg/mL apresenta um teor de 27,86  $\mu\text{mol}$  EAG/ g extrato, enquanto o óleo de concentração inferior (4 mg/mL) apresenta um teor de 8,28  $\mu\text{mol}$  EAG/ g extrato.

Comparados os resultados com a literatura [37], verifica-se que o óleo essencial, apresenta um teor em polifenóis de 8,38 mg/ 100 g de planta, sendo que este pode variar consoante dois parâmetros: estado de desenvolvimento da flor e as horas de colheita da planta.

Outros trabalhos referenciam um teor de polifenóis bastante superior, nomeadamente de 14,67 mg/g extrato [63].

#### 4.5.5. Determinação do teor de flavonóides

Antes de se proceder à quantificação dos flavonóides dos diferentes extratos, foi efetuada a curva de calibração para um composto referência, nomeadamente da catequina, como se encontra representado na figura 30.



**Figura 30** - Curva de calibração e respetiva regressão linear utilizando-se catequina, para determinação do teor em flavonóides

Os parâmetros da curva de calibração encontram-se descritos na tabela seguinte.

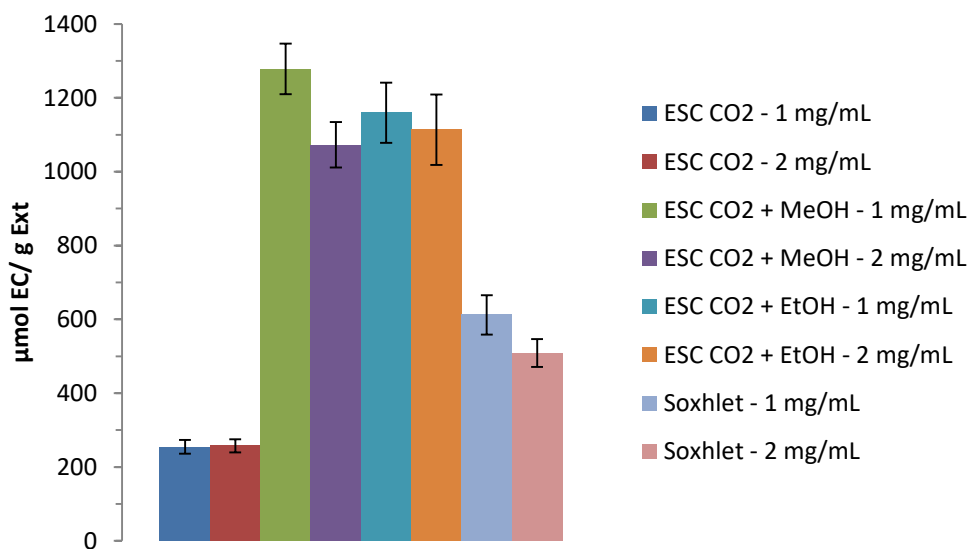
**Tabela 12** - Parâmetros de regressão ANOVA, para a catequina, para determinação do teor em flavonóides

$$y = a + bx$$

<b>Ordenada na origem</b>	-8,75E-03 ± 1.171E-2
<b>Declive</b>	1,56E-03 ± 5.30E-5
<b>R quadrado</b>	0,997
<b>Erro padrão da correlação y/x</b>	1.304E-2
<b>Limite de deteção</b>	10.24 µg/ml
<b>Limite de quantificação</b>	34.13 µg/ml

Todos os resultados são expressos em equivalentes de catequina.

Determinada a reta de calibração, procedeu-se à determinação do teor em flavonóides dos extratos (soxhlet e supercríticos) e dos óleos, que se encontram representados na figura 30.



**Figura 31** - Representação gráfica do teor em flavonóides dos extratos de *A. foeniculum*

Como se pode verificar pela análise do gráfico anterior, a adição de co-solventes na extração supercrítica confere ao extrato um maior teor em flavonóides, comparativamente à extração supercrítica realizada apenas com CO<sub>2</sub>.

A extração supercrítica com uso de co-solventes apresenta um comportamento contrário ao verificado anteriormente, ou seja, maiores concentrações traduzem-se num inferior teor em flavonóides. Assim o extrato supercrítico com uso de metanol de maior concentração (2 mg/mL) apresenta um teor de 1072,9 µmol EC/ g extrato, sendo que o extrato com concentração inferior (1 mg/mL) apresenta um teor de 1278,1 µmol EC/ g extrato. O extrato supercrítico com uso de etanol de maior concentração (2 mg/mL) apresenta um teor de 1113,8 µmol EC/ g extrato, enquanto o extrato com concentração inferior (1 mg/mL) apresenta um teor de 1159,9 µmol EC/ g extrato.

Pelo método convencional, extração em Soxhlet, o teor em flavonóides é ligeiramente superior (612,4 e 508,7 µmol EC/ g extrato, para uma concentração do extrato de 1 e 2 mg/mL, respetivamente) ao obtido pela extração supercrítica com dióxido de carbono, mas ainda assim bastante inferior quando comparado com a adição de co-solventes na mesma. Assim pode-se concluir que, no que ao teor de flavonóides diz respeito, a técnica mais vantajosa é a extração supercrítica com adição de co-solventes (metanol e etanol).

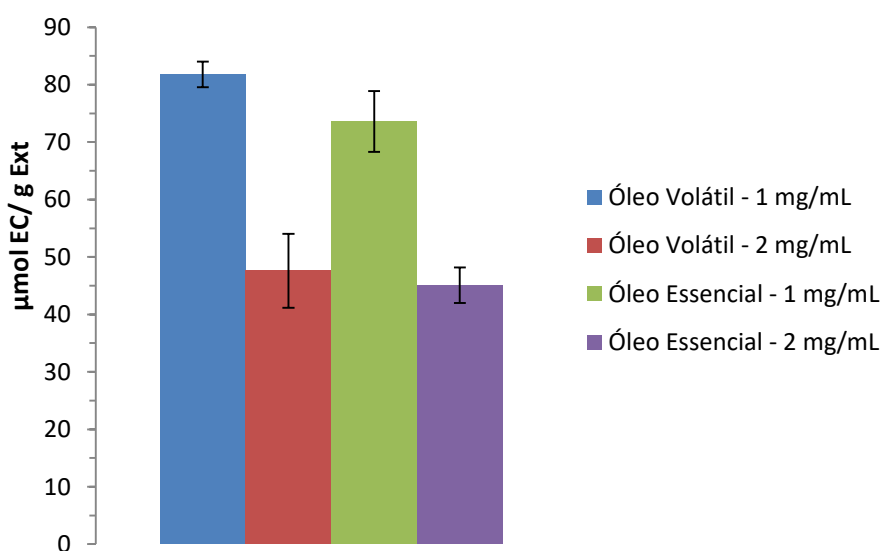


Figura 32 - Representação gráfica do teor em flavonóides dos óleos de *A. foeniculum*

Em relação aos óleos, pode-se verificar que não existe uma diferença significativa entre o óleo essencial (obtido pela hidrodestilação) e o óleo volátil (obtido por extração supercrítica). Assim, o óleo volátil obtido por extração supercrítica com 2 mg/mL apresenta um teor de flavonóides de 47,6 EC/ g extrato e o óleo de concentração inferior (1 mg/mL) apresenta um teor de flavonóides de 81,86 EC/ g extrato. O óleo essencial obtido por hidrodestilação com 2 mg/mL apresenta um teor de flavonóides de 45,1 EC/ g extrato e o óleo de concentração inferior (1 mg/mL) apresenta um teor de flavonóides superior, nomeadamente de 73,6 EC/ g extrato.

## 4.6. Modelação

### 4.6.1. Modelação do processo de obtenção dos óleos voláteis de *Agastache foeniculum*

Pelo modelo 1, Sovová 1994, o ajuste dos dados experimentais, para os 3 ensaios realizados encontra-se representado na figura 33.

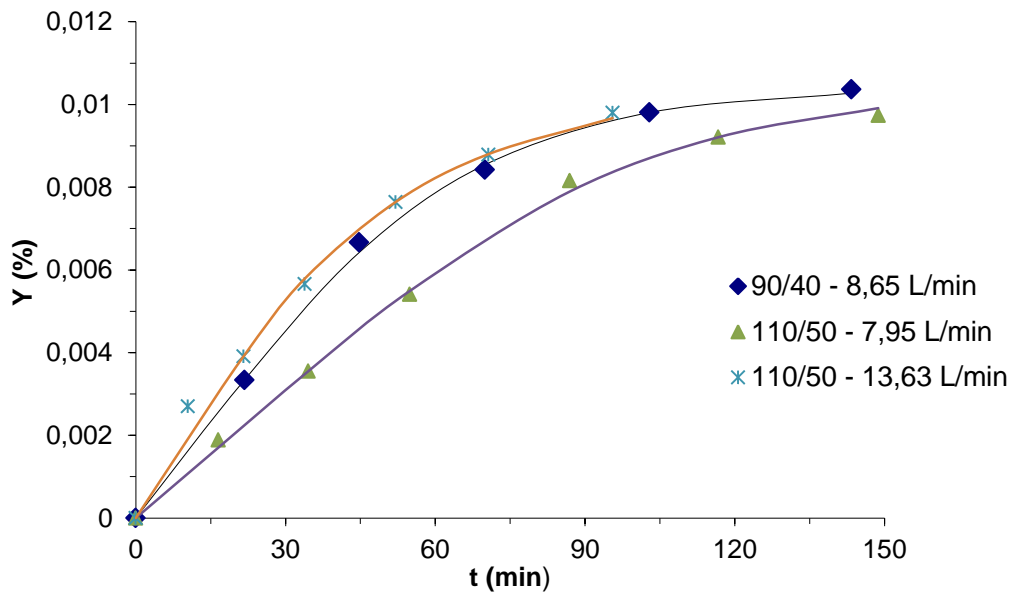


Figura 33 – Modelação dos resultados experimentais pelo Modelo 1, Sovová 1994, para os três ensaios efetuados

Pelo modelo 2, Sovová 2005, o ajuste dos dados experimentais, para os 3 ensaios realizados encontra-se representado na figura 34.

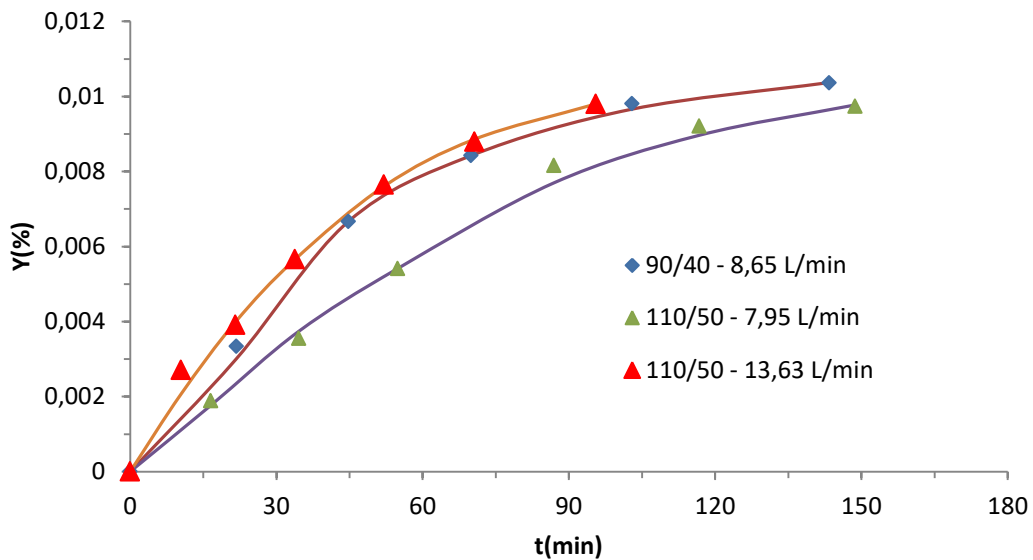


Figura 34 - Modelação dos resultados experimentais pelo modelo 2, Sovová 2005, para os três ensaios efetuados

Os resultados obtidos para a modelação da extração supercrítica do óleo volátil de *A. foeniculum* pelos dois métodos estudados (Sovová 1994 e Sovová 2005), encontram-se descritos na tabela 13, nomeadamente os coeficientes externos e internos de transferência de massa (respetivamente  $k_f$  e  $k_s$ ) e o desvio padrão (%), onde se pode ver o erro associado entre os dados experimentais, e os dados calculados pelos modelos.

Tabela 13 - Coeficientes de transferência de massa e desvio para a extração do óleo volátil de *Agastache foeniculum*

Condições	Caudal de CO <sub>2</sub> (L. min)	Modelo 1 - Sovová 1994			Modelo 2 - Sovová 2005	
		$k_s \times 10^8$ (m. s <sup>-1</sup> )	$k_f \times 10^7$ (m. s <sup>-1</sup> )	Desvio padrão (%)	$k_s \times 10^7$ (m. s <sup>-1</sup> )	Desvio padrão (%)
90 bar 40 °C	8,65	6,79	5,80	1,19	1,30	1,92
110 bar 50 °C	7,95	5,28	3,46	2,69	2,08	2,91
	13,63	5,93	6,27	5,49	1,81	3,83

Pela análise da tabela anterior é possível verificar que para um mesmo caudal (aproximadamente 8 L/min), os coeficientes de transferência de massa interna e externa, aumentam com a diminuição das condições operatórias, nomeadamente para o ensaio realizado a 90 bar e 40 °C, em ambos os modelos.

No ensaio realizado a 110 bar e 50 °C, constatou-se que, para um caudal superior (13,63 L/min), os coeficientes externos e internos de transferência de massa aumentam, no modelo de Sovová 1994, verificando-se o oposto para o modelo de Sovová 2005.

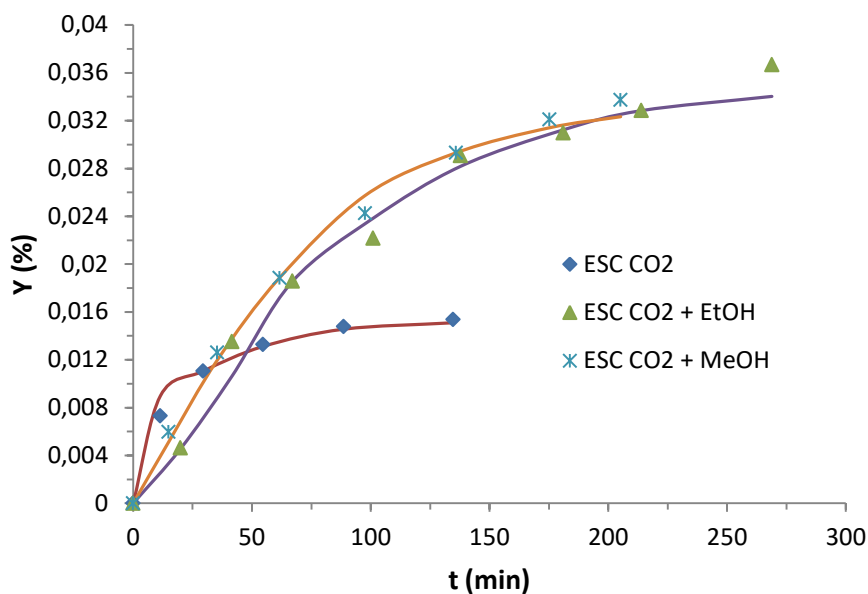
Foi determinado o desvio padrão, onde se obtiveram valores inferiores a 6%, o que leva a concluir que estes são modelos que apresentam uma boa solução para o ajuste destes dados experimentais

#### **4.6.2. Modelação do processo de obtenção dos extratos supercríticos de *Agastache foeniculum***

O modelo de Sovová pode ser igualmente aplicado à obtenção de extratos sólidos de plantas, embora sejam menos comuns [67].

Para a mesma pressão e temperatura, o sistema binário (dióxido de carbono/metanol ou dióxido de carbono/etanol apresenta sempre uma densidade superior quando comparado com o sistema unitário de CO<sub>2</sub>. Este aumento da densidade deve-se ao facto de que como há moléculas de CO<sub>2</sub> agregadas às moléculas de etanol/metanol, o número de moléculas de etanol/metanol polares é superior. Pelo que foi incrementado um aumento de 10% face à densidade do CO<sub>2</sub> nas condições de pressão e temperatura do ensaio [68], [69].

Pelo modelo 2, Sovová 2005, o ajuste dos dados experimentais para a obtenção dos extratos supercríticos dos 3 ensaios realizados encontram-se representados na figura 35.



**Figura 35** - Modelação dos resultados experimentais pelo modelo 2, Sovová 2005, para os três ensaios efetuados, com e sem adição de co-solventes

Na tabela 14 encontram-se descritos os coeficientes internos de transferência de massa ( $k_s$ ) e o desvio padrão (%), onde se pode ver o erro associado entre os dados experimentais obtidos, para obtenção dos extratos obtidos com CO<sub>2</sub> supercrítico e com adição de co-solventes (metanol e etanol).

**Tabela 14** - Coeficientes de transferência de massa e desvio para o extrato supercrítico de *Agastache foeniculum*, obtido a 400 bar e 40 °C

<b>Modelo 2 – Sovová 2005</b>		
<b>Solvente da ESC</b>	<b><math>k_s \times 10^8</math> (<math>m \cdot s^{-1}</math>)</b>	<b>Desvio padrão (%)</b>
<b>CO<sub>2</sub></b>	6,18	4,56
<b>CO<sub>2</sub> + MeOH</b>	6,90	4,30
<b>CO<sub>2</sub> + EtOH</b>	3,50	4,85

Verificou-se que os coeficientes internos de transferência de massa têm a mesma ordem de grandeza, bem como o desvio entre os dados experimentais e a modelação efetuada, que são bastante reduzidos (inferiores a 5%).

Tendo-se verificado que os coeficientes internos de transferência de massa ( $k_s$ ) são inferiores na obtenção dos extratos, comparativamente à obtenção dos óleos voláteis, pode-se concluir que a extração supercrítica dos extratos ocorre com maior dificuldade, sendo por isso mais lenta.

É de realçar que, o modelo de fluxo pistão de Lack leva em consideração ambas as resistências de transporte (no fluido e nas fases sólidas). Assim, o coeficiente de transferência de massa  $k_f$ , além de descrever o período de equilíbrio da extração, também reflete o seu desvio do modelo de fluxo pistão, pois é obtido pelo ajuste da curva no período de transição em relação ao rendimento experimental. Portanto,  $k_s$  é estimado de uma forma mais precisa, tornando-o mais significativo do que o coeficiente  $k_f$ . Na realidade o modelo apresenta como desvantagem o facto de assumir a não existência da interação soluto-matriz, inicialmente adotada na extração de lípidos. Contudo, uma vez que o conteúdo de lípidos é sempre maior do que o conteúdo do óleo volátil, a interação entre a matriz e soluto desempenha um papel fundamental, neste ultimo caso, que deveria ser contabilizado.

## 5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Verifica-se que a eficácia da obtenção de extratos e óleos do *Agastache foeniculum* é fortemente dependente da técnica usada, dos solventes (e consequente polaridade dos mesmos) e dos constituintes a extrair, pois estes apresentam diferentes complexidades, propriedades físicas e químicas. Assim, na extração por métodos convencionais, a hidrodestilação e a extração em Soxhlet, obtiveram rendimentos de 1,03% e 30,97%, respetivamente. Enquanto o óleo volátil obtido pelo método não convencional (extração supercrítica com CO<sub>2</sub>) apresenta um rendimento de 1%.

Foram estudados dois caudais de CO<sub>2</sub> na obtenção do óleo volátil, onde o rendimento não foi consideravelmente afetado, apenas o tempo de extração diminuiu com o aumento do caudal. Este facto pode ser explicado pelo elevado tempo de residência do mesmo no interior do extrator. Assim, o solvente que está em contacto com a planta é saturado, desta forma, não entra CO<sub>2</sub> fresco no extrator. Outra justificação possível passa pela existência de convecção natural do solvente em caudais baixos, atrasando desta forma a extração.

Um dos principais fatores estudados neste trabalho é a adição de co-solvente na extração supercrítica, que demonstrou ser eficaz (com um rendimento de 3,37% e 3,67% no uso de metanol e etanol, respetivamente), não só por reduzir o tempo de extração, mas também por aumentar o teor de polifenóis e flavonóides dos extratos. Apesar de esta adição implicar um aumento dos custos do processo, assim como operações adicionais, visto ser necessário proceder-se à remoção dos co-solventes.

Verificou-se pela análise GC-FID que, o óleo essencial obtido por hidrodestilação apresenta um teor de metil chavicol superior (90%) aos restantes dois óleos voláteis analisados. Nomeadamente, o óleo volátil obtido a 110 bar e 50 °C apresenta um teor de metil chavicol superior (85,5%) ao óleo obtido a 90 bar e 40 °C (84,9%). Contudo, constatou-se ainda que os óleos voláteis apresentam uma maior percentagem de acetato de fitol 2 (superior a 2%) quando comparados com o óleo essencial, que apresenta apenas 0,2%.

Pela realização de três distintos métodos (DPPH, ABTS e poder de redução do ferro) verificou-se o extrato com maior capacidade antioxidante é o obtido em Soxhlet, em detrimento dos extratos supercríticos e em comparação com os compostos de referência estudados (trolox e ácido gálico).

Verificou-se de igual forma um alto teor de polifenóis e flavonóides, maioritariamente no extrato obtido em soxhlet e nos extratos supercríticos com auxílio de co-solventes.

A modelação dos resultados experimentais da extração supercrítica permitiu a confirmação de que a mesma permite um bom ajuste tanto nos resultados experimentais do óleo volátil como nos extratos supercríticos. Nos dois modelos estudados, Sovová 1994 e Sovová 2005, os coeficientes de transferência de massa interna e externa apresentam valores na mesma ordem de grandeza e desvios padrão no ajuste entre 1,19% e 5,49%. A utilidade prática destes modelos prende-se com a possível previsão de comportamentos a diferentes condições de trabalho (pressão, temperatura e caudal de CO<sub>2</sub>), bem como o conhecimento do regime em causa (laminar ou turbulento).

De forma a dar continuidade ao estudo do *Agastache foeniculum* sugere-se a realização de extrações supercrítica com adição de diferentes co-solventes, como é o caso do isopropanol, visto que este se demonstra bastante promissor em outros óleos semelhantes. Sugere-se a comparação dos extratos e óleos obtidos neste trabalho ao nível da composição química, fazendo-se uso de diferentes tipos de técnicas, como por exemplo o HPLC. A atividade antioxidante por diferentes métodos, de forma a consolidar os resultados, também poderá ser desenvolvida. Sugere-se também que efetuem testes para a determinação da atividade biológica e consequente deteção de atividade microbiana

## 6. BIBLIOGRAFIA

- [1] J. Coelho and A. Palavra, "Supercritical Fluid Extraction of Compounds from Spices and Herbs," in *High Pressure Fluid Technology for Green Food Processing*, 2015, pp. 357–396.
- [2] S. Zielińska and A. Matkowski, "Phytochemistry and bioactivity of aromatic and medicinal plants from the genus *Agastache* (Lamiaceae)," *Phytochem. Rev.*, vol. 13, no. 2, pp. 391–416, 2014.
- [3] S. Chae, W. Lee, S. Park, U. Romij, K. Jae, and H. Haeng, "Variation of carotenoid content in *agastache rugosa* and *agastache foeniculum*," *Asian J. Chem.*, vol. 25, no. 8, pp. 4364–4366, 2013.
- [4] R. Omidbaigi and M. Mahmoodi, "Effect of Irrigation Regimes on the Essential Oil Content and Composition of *Agastache foeniculum*," *J. Essent. Oil Bear. Plants*, vol. 13, no. 1, pp. 59–65, 2010.
- [5] "Uniprot.org," *Taxonomy - Agastache foeniculum (Blue giant hyssop)*. Consultado a 4 de Agosto de 2017
- [6] M. Hashemi, A. Ehsani, A. Hassani, A. Afshari, and M. Aminzare, "Phytochemical , Antibacterial , Antifungal and Antioxidant Properties of *Agastache foeniculum* Essential Oil," *J. Chem. Heal. Risks*, vol. 7, pp. 95–104, 2017.
- [7] "Plants - United Stats Department of Agriculture," *Natural Resources Conservation Service - Agastache foeniculum (Pursh) Kuntze Show All blue giant hyssop*. [Online]. Available: <https://plants.usda.gov/core/profile?symbol=AGFO#%7C~>. [Accessed: 01-Aug-2017].
- [8] T. Fornari, G. Vicente, E. Vazquez, M. Garcia-Risco, and G. Reglero, "Isolation of essential oil from different plants and herbes by supercritical fluid extraction.," *J. Chromatogr.*, vol. 1250, no. 1, pp. 34–48, 2012.

- [9] I. Nykanen, H. Yvonne, and R. Hiltunen, "Composition of the Essential Oil of *Agastache foeniculum*," *Planta Med.*, vol. 55, pp. 314–315, 1989.
- [10] A. Ebadollahi, "Chemical constituents and toxicity of *Agastache foeniculum* (pursh) kuntz against two stored-product insect pests," *Chil. J. Agric. Res.*, vol. 71, no. June, pp. 212–217, 2011.
- [11] A. Menghini, M. Capuccella, R. Pagiotti, N. Pocceschi, and M. Spigarelli, "Pigment Content and Methyl Chavicol Production in *Agastache foeniculum* Kuntze Cultured In Vitro," *J. Essent. Oil Res.*, vol. 4, no. 5, pp. 483–486, 1992.
- [12] G. Mazza and F. A. Kiehn, "Essential Oil of *Agastache foeniculum* , A Potential Source of Methyl Chavicol," *J. Essent. Oil Res.*, vol. 4, no. 3, pp. 295–299, 1992.
- [13] G. Alves, "<http://www.defesavegetal.net/rhitdo>," *Consultado a 1 de Setembro de 2017*.
- [14] E. Yener, "Supercritical Fluid Processing for the Recovery of Bioactive Compounds from Food Industry By-Products," in *High Pressure Fluid Technology for Green Food Processing*, 2015, pp. 305–356.
- [15] J. Azmir, I. S. Zaidul, M. M. Rahman, K. Sharif, and A. Mohamed, "Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review," *J. Food Eng.*, vol. 117, no. 4, pp. 426–436, 2013.
- [16] L. V. Silva, D. L. Nelson, M. F. B. Drummond, L. Dufossé, and M. B. A. Glória, "Comparison of hydrodistillation methods for the deodorization of turmeric," *Food Res. Int.*, vol. 38, no. 8–9, pp. 1087–1096, 2005.
- [17] M. Samadi, Z. Z. Abidin, R. Yunus, D. R. Awang Biak, H. Yoshida, and E. H. Lok, "Assessing the kinetic model of hydro-distillation and chemical composition of *Aquilaria malaccensis* leaves essential oil," *Chinese J. Chem. Eng.*, vol. 25, no. 2, pp. 216–222, 2017.
- [18] C. Grosso, A. C. Figueiredo, J. Burillo, J. G. Barroso, J. A. Coelho, and A. M. F. Palavra, "Supercritical fluid extraction of the volatile oil from *Santolina chamaecyparissus*," *J. Sep. Sci.*, vol. 32, no. 18, pp. 3215–3222, 2009.

- [19] K. Mechergui, W. Jaouadi, J. Coelho, M. Serra, A. Palavra, and M. Khouja, "Chemical composition and antioxidant activity of *Tunisian Origanum glandulosum* Desf. essential oil and volatile oil obtain by supercritical CO<sub>2</sub> extraction," *Int. J. Adv. Res.*, vol. 2, no. 12, pp. 337–343, 2014.
- [20] A. Mishra, "<http://discoverfoodtech.com/soxhlet-extraction-method/>," *Soxhlet Extraction Method- Estimation Of Fat In Food*, 2017. .
- [21] M. M. Cowan, "Plant Products as Antimicrobial Agents Plant Products as Antimicrobial Agents," *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 12, no. 4, pp. 564–582, 1999.
- [22] V. Seidel, "Initial and Bulk Extraction '," in *Natural Products Isolation*, vol. 2, 2006, pp. 27–46.
- [23] A. M. F. Palavra, J. P. Coelho, J. G. Barroso, A. P. Rauter, J. M. Fareleira, and A. Mainar, "Supercritical carbon dioxide extraction of bioactive compounds from microalgae and volatile oils from aromatic plants," *J. Supercrit. Fluids*, vol. 60, pp. 21–27, 2011.
- [24] A. R. Fontana, A. Antonioli, and R. Bottini, "Grape pomace as a sustainable source of bioactive compounds: Extraction, characterization, and biotechnological applications of phenolics," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 61, no. 38, pp. 8987–9003, 2013.
- [25] E. Riera, Y. Golás, A. Blanco, J. A. Gallego, M. Blasco, and A. Mulet, "Mass transfer enhancement in supercritical fluids extraction by means of power ultrasound," *Ultrason. Sonochem.*, vol. 11, no. 3–4, pp. 241–244, 2004.
- [26] C. M. Ajila, S. K. Brar, M. Verma, R. D. Tyagi, S. Godbout, and J. R. Valéro, "Extraction and AnalyAjila, C. M., Brar, S. K., Verma, M., Tyagi, R. D., Godbout, S., & Valéro, J. R. Extraction and Analysis of Polyphenols: Recent trends.," *Crit. Rev. Biotechnol.*, vol. 31, no. 3, pp. 227–249, 2011.
- [27] U. Kopcak and R. S. Mohamed, "Caffeine solubility in supercritical carbon dioxide/co-solvent mixtures," *J. Supercrit. Fluids*, vol. 34, no. 2, pp. 209–214, 2005.

- [28] A. Berna, A. Cháfer, and J. B. Montón, "High-pressure solubility data of the system resveratrol (3) + ethanol (2) + CO<sub>2</sub> (1)," *J. Supercrit. Fluids*, vol. 19, no. 2, pp. 133–139, 2001.
- [29] J. C. Pessoa, "Técnicas Experimentais - Cromatografia," *Boletim de Sociedade Portuguesa de Química*, vol. 50, pp. 57–62, 1993.
- [30] M. J. Rosa, "Caracterização de amostras de resina por GC-MS, RMN e análise quimiométrica composição e origem," Universidade de Coimbra, 2014.
- [31] J. Trigo, "Implementação de métodos para análise de matrizes alimentares por GC-FID," Universidade do Porto, 2016.
- [32] L. A. Sobrado, L. Freije-Carrelo, M. Moldovan, J. R. Encinar, and J. I. G. Alonso, "Comparison of gas chromatography-combustion-mass spectrometry and gas chromatography-flame ionization detector for the determination of fatty acid methyl esters in biodiesel without specific standards," *J. Chromatogr. A*, vol. 1457, pp. 134–143, 2016.
- [33] K. Thaipong, U. Boonprakob, K. Crosby, L. Cisneros-Zevallos, and D. Hawkins Byrne, "Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts," *J. Food Compos. Anal.*, vol. 19, no. 6–7, pp. 669–675, 2006.
- [34] B. Setiawan, A. Sulaeman, and D. Giraud, "Carotenoid Content of Selected Indonesian Fruits," *J. Food Compos. Anal.*, vol. 14, no. 2, pp. 169–176, 2001.
- [35] W. J. Li, X. L. Cheng, J. Liu, R. C. Lin, G. L. Wang, and S. S. Du, "Phenolic compounds and antioxidant activities of *Liriope muscari*," *Molecules*, vol. 17, no. 2, pp. 1797–1808, 2012.
- [36] R. Apak, S. Gorinstein, V. Böhm, K. M. Schaich, M. Özyürek, and K. Güçlü, "Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report)," *Pure Appl. Chem*, vol. 85, no. 5, pp. 957–998, 2013.

- [37] S. C. Duda, L. A. Mărghitaş, D. Dezmiorean, M. Duda, R. Mărgăoan, and O. Bobiş, "Changes in major bioactive compounds with antioxidant activity of *Agastache foeniculum*, *Lavandula angustifolia*, *Melissa officinalis* and *Nepeta cataria* : Effect of harvest time and plant species," *Ind. Crops Prod.*, vol. 77, pp. 499–507, 2015.
- [38] S. Sarker, Z. Latif, and A. Gray, "Natural Product Isolation," in *Natural Products Isolation*, 2006, pp. 1–26.
- [39] M. Wang, J. Li, M. Rangarajan, Y. Shao, E. J. LaVoie, and T.-C. Huang, "Antioxidative Phenolic Compounds from Sage (*Salvia officinalis*)," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 46, no. 12, pp. 4869–4873, 1998.
- [40] R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, and C. Rice-Evans, "Antioxidant Activity Applying an Improved Abts Radical Cation Decolorization Assay," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 26, no. 98, pp. 1231–1237, 1999.
- [41] A. A. Adedapo, F. O. Jimoh, A. J. Afolayan, and P. J. Masika, "Antioxidant properties of the methanol extracts of the leaves and stems of *Celtis africana*," *Rec. Nat. Prod.*, vol. 3, no. 1, pp. 23–31, 2009.
- [42] L. Yu, S. Haley, and J. Perret, "Free radical scavenging properties of wheat extracts," *J. Agric.*, no. 50, pp. 1619–1624, 2002.
- [43] H. Arbaayah and Y. Umi Kalsom, "Antioxidant properties in the oyster mushrooms (*Pleurotus spp.*) and split gill mushroom (*Schizophyllum commune*) ethanolic extracts," *Mycosphere*, vol. 4, no. 4, pp. 661–673, 2013.
- [44] I. F. F. Benzie and Y. T. Szeto, "Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing/antioxidant power assay," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 47, no. 2, pp. 633–636, 1999.
- [45] F. S. Reis, E. Pereira, L. Barros, M. J. Sousa, A. Martins, and I. C. F. R. Ferreira, "Biomolecule profiles in inedible wild mushrooms with antioxidant value," *Molecules*, vol. 16, no. 6, pp. 4328–4338, 2011.

- [46] A. Blainski, G. C. Lopes, and J. C. P. De Mello, "Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from *Limonium Brasiliense L.*," *Molecules*, vol. 18, no. 6, pp. 6852–6865, 2013.
- [47] M. I. D. G. Pelozo, M. L. C. Cardoso, and J. C. P. De Mello, "Spectrophotometric determination of tannins and caffeine in preparations from *Paullinia cupana var. sorbilis*," *Brazilian Arch. Biol. Technol.*, vol. 51, no. 3, pp. 447–451, 2008.
- [48] L. A. Figueroa, L. B. Navarro, M. P. Vera, and V. L. Petricevich, "Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid contents, and cytotoxicity evaluation of *Bougainvillea xbuttiana*," *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, vol. 6, no. 5, pp. 497–502, 2014.
- [49] O. Hernández-Abreu, M. Torres-Piedra, S. García-Jiménez, M. Ibarra-Barajas, R. Villalobos-Molina, and S. Montes, "Dose-dependent antihypertensive determination and toxicological studies of tilianin isolated from *Agastache mexicana*," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 146, no. 1, pp. 187–191, 2013.
- [50] E. Schijlena, C. Ric de Vos, and A. Bovy, "Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants," *Phytochemistry*, vol. 65, no. 19, pp. 2631–2648, 2004.
- [51] M. Rajasekaran and C. Kalaimagal, "In vitro antioxidant activity of ethanolic extract of a medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum*," *J. Pharm. Sci. Res.*, vol. 3, no. 9, pp. 1427–1433, 2011.
- [52] J. Miller and J. Miller, *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, 5th ed. Pearson Education Limited, 2005.
- [53] N. Saadati, M. P. Abdullah, Z. Zakaria, S. B. T. Sany, M. Rezayi, and H. Hassonizadeh, "Limit of Detection and Limit of Quantification Development Procedures for Organochlorine Pesticides Analysis in Water and Sediment Matrices.," *Chem. Cent. J.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–10, 2013.
- [54] A. Shrivastava and V. Gupta, "Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods," *Chronicles Young Sci.*, vol. 2, no. 1, p. 21, 2011.

- [55] J. Veiga, “Extração e Caracterização de Extractos de Plantas: Comparação entre Meios Convencionais e Fluídos Supercríticos,” Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, 2016.
- [56] Z. Huang, “Mass Transfer Models fro Supercritical Fluid Extraction,” in *High Pressure Fluid Technology for Green Food Processing*, 2015, pp. 77–115.
- [57] J. P. Coelho, C. Grosso, A. Palavra, and H. Sovova, “Mathematical modelling of supercritical CO<sub>2</sub> extraction of volatile oils from aromatic plants,” *Chem. Eng. Sci.*, vol. 65, no. 11, pp. 3579–3590, 2010.
- [58] J. Coelho, A. Cristino, P. Matos, A. Rauter, B. Nobre, and R. Mendes, “Extraction of volatile oil from aromatic plants with supercritical carbon dioxide: Experiments and modeling,” *Molecules*, vol. 17, no. 9, pp. 10550–10573, 2012.
- [59] H. Sovová, “Rate of the vegetable oil extraction with supercritical CO<sub>2</sub>—I. Modelling of extraction curves,” *Chem. Eng. Sci.*, vol. 49, no. 3, pp. 409–414, 1994.
- [60] A. Grosso, “Supercritical Fluid Extraction of Biological Compounds from Aromatic Plants with interest for the Pharmaceutical, Food and Agrochemical Industries,” Instituto Superior Técnico, 2009.
- [61] A. Marques and J. Coelho, “Determination of fat contents with Supercritical CO<sub>2</sub> Extraction in two commercial powder chocolate products: Comparison with NP-1719,” *J. Food Process Eng.*, vol. 34, no. 5, pp. 1597–1608, 2011.
- [62] M. Santos, “Extração e Caracterização de Extractos *Jatropha gossypifolia* L. Avaliação da sua Atividade Antimicrobiana e Antioxidante,” Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, 2014.
- [63] R. V. B. Academy, I. Stancheva, B. Academy, and P. Physiology, “Evaluation of antioxidant activity of *Agastache foeniculum* and *Agastache rugosa* extracts,” vol. 3, no. 69, pp. 295–302, 2016.

- [64] G. Bobo-García, G. Davidov-Pardo, C. Arroqui, P. Vírseda, M. R. Marín-Arroyo, and M. Navarro, "Intra-laboratory validation of microplate methods for total phenolic content and antioxidant activity on polyphenolic extracts, and comparison with conventional spectrophotometric methods," *J. Sci. Food Agric.*, vol. 95, no. 1, pp. 204–209, 2015.
- [65] R. Omidbaigi and F. Sefidkon, "Essential Oil Composition of *Agastache foeniculum* Cultivated in Iran," *J. Essent. Oil Res.*, vol. 15, no. 1, pp. 52–53, 2003.
- [66] G. Miliauskas, P. R. Venskutonis, and T. A. van Beek, "Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts," *Food Chem.*, vol. 85, no. 2, pp. 231–237, 2004.
- [67] M. Minozzo, A. Popiolski, V. Dal Prá, H. Treichel, R. L. Cansian, and J. Vladimir Oliveira, "Modeling of the overall kinetic extraction from maytenus aquifolia using compressed CO<sub>2</sub>," *Brazilian J. Chem. Eng.*, vol. 29, no. 4, pp. 835–843, 2012.
- [68] J. Zhang, "Relationship between the density of supercritical CO<sub>2</sub> + ethanol binary system and its critical properties," *Sci. China Ser. B*, vol. 46, no. 3, p. 290, 2003.
- [69] C. J. Chang, C.-Y. Day, C.-M. Ko, and K.-L. Chiu, "Densities and P-x-y diagrams for carbon dioxide dissolution in methanol, ethanol, and acetone mixtures," *Fluid Phase Equilib.*, vol. 131, no. 1–2, pp. 243–258, 1997.

## 7. ANEXOS

### ANEXO A – Distribuição do tamanho de partícula e determinação do diâmetro médio da mesma

Tabela 15 - Distribuição do tamanho de partícula e respectivo cálculo do diâmetro médio

Peneiro	Diâmetro Poro (mm)	Massa (g)	Fracção Mássica	F x D
1	1,18	104,19	0,191	0,23
2	1	38,61	0,071	0,07
3	0,71	105,42	0,193	0,14
4	0,5	93,94	0,172	0,09
5	0,355	76,27	0,140	0,05
6	0,3	18,73	0,034	0,01
7	0,212	109,12	0,200	0,04
Diâmetro médio				0,62

### ANEXO B – Determinação da densidade do *Agastache foeniculum*

Tabela 16 - Determinação da densidade do *A. foeniculum* e respectivos ensaios

Volume (mL)	Massa (g)	Densidade (g/mL)
1,0	0,287	0,287
2,0	0,6204	0,310
3,0	0,9649	0,322
4,0	1,3023	0,326
5,0	1,6664	0,333
6,0	2,0375	0,340
7,0	2,3968	0,342
Média:		0,323
Desvio Padrão		0,019
Erro (%):		5,97

## ANEXO C – Medições efectuadas para a obtenção do extrato e do óleo supercrítico

Tabela 17 - Medições efectuadas e rendimento obtido do extrato supercrítico com CO<sub>2</sub>

Ensaio	Tempo (min)	Volume CO <sub>2</sub> (L)	Massa extraída (g)	Rendimento (%)
1	11,45	9,71	0,0925	0,730
2	18,00	12,28	0,0474	1,104
3	25,20	20,64	0,0281	1,326
4	34,00	33,60	0,0192	1,478
5	46,00	40,51	0,0073	1,535

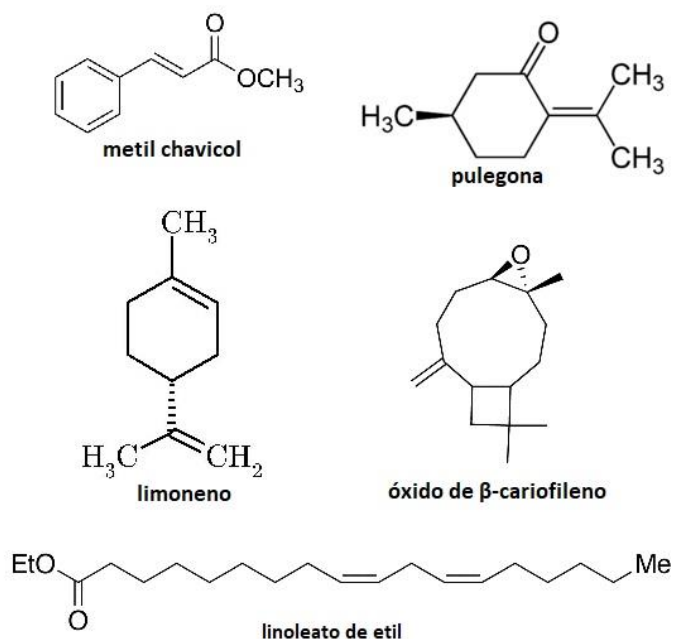
Tabela 18 - Medições efectuadas e rendimentos obtidos na Extração Supercrítica com CO<sub>2</sub> + 10% metanol e 10% etanol, para obtenção do extrato de *Agastache foeniculum*

	Ensaio	Tempo (min)	Volume CO <sub>2</sub> (L)	Massa extraída (g)	Rendimento (%)
Extração Supercrítica com CO <sub>2</sub> + 10% metanol	1	14,90	10,71	0,0754	0,596
	2	20,51	14,36	0,0841	1,260
	3	26,18	21,08	0,0790	1,884
	4	36,00	30,29	0,0684	2,425
	5	38,28	28,96	0,0639	2,930
	6	39,33	31,50	0,0351	3,207
	7	30,00	25,00	0,0207	3,371
Extração Supercrítica com CO <sub>2</sub> + 10% etanol	1	19,84	11,254	0,0577	0,462
	2	21,80	15,158	0,1111	1,350
	3	25,45	20,530	0,0633	1,857
	4	33,84	25,053	0,0449	2,216
	5	36,83	30,15	0,0864	2,907
	6	43,32	32,50	0,0237	3,097
	7	32,77	25,46	0,0234	3,284
	8	55,00	27,00	0,0481	3,669

**Tabela 19** - Medições efetuadas e rendimentos obtidos na Extração com CO<sub>2</sub> Supercrítico, para obtenção do óleo volátil de *A. foeniculum*

	Ensaio	Tempo (min)	Volume CO <sub>2</sub> (L)	Massa extraída (g)	Rendimento Cumulativo (%)
<b>110 bar</b> <b>50 °C</b> <b>7,95 L/min</b>	1	16,55	131,99	0,1509	0,189
	2	18,03	147,50	0,1333	0,355
	3	20,30	158,25	0,1488	0,541
	4	32,04	257,20	0,2197	0,816
	5	29,80	236,92	0,0839	0,921
	6	32,00	248,08	0,0422	0,974
<b>110 bar</b> <b>50 °C</b> <b>13,63 L/min</b>	1	10,45	154,69	0,2165	0,271
	2	11,12	143,24	0,0961	0,391
	3	12,25	178,00	0,1401	0,566
	4	18,25	246,03	0,1588	0,764
	5	18,58	250,08	0,0916	0,879
	6	24,85	313,46	0,0809	0,980
<b>90 bar</b> <b>40 °C</b> <b>8,65 L/min</b>	1	21,77	176,17	0,2576	0,334
	2	23,00	222,33	0,2569	0,667
	3	25,15	223,62	0,1353	0,842
	4	33,00	282,22	0,1067	0,981
	5	40,45	325,98	0,0431	1,036

## ANEXO D – Principais compostos identificados no GC-FID



**Figura 36** - Principais compostos identificados no óleo essencial e óleo volátil de *A. foeniculum*, por GC-FID

## ANEXO E – Medições efectuadas na caracterização dos extratos e óleos de *Agastache foeniculum*

Tabela 20 - Medições efectuadas para a determinação do poder de redução do ferro nos diferentes extratos e óleos

	Concentração (mg/mL)	Ensaios				Média	Desvio Padrão	Erro (%)
		1	2	3	4			
<b>Extrato Supercrítico CO<sub>2</sub> + MeOH</b>	3	0,971	1,09	1,05	1,213	1,07	0,1	9,43
	4	1,072	1,166	1,287	1,018	1,119	0,118	10,54
<b>Extrato Supercrítico CO<sub>2</sub> + EtOH</b>	2	1,068	0,847	0,845	0,946	0,897	0,105	11,76
	3	0,878	0,973	0,858	0,926	0,902	0,051	5,71
	0,6	0,605	0,462	0,531	0,563	0,540	0,060	11,17
<b>Extrato Soxhlet</b>	0,9	0,643	0,595	0,592	0,7	0,633	0,051	8,02
	1,2	0,792	0,769	0,67	0,649	0,720	0,071	9,86
	1,4	0,758	0,851	0,729	0,786	0,781	0,052	6,68
<b>Óleo Essencial (HD)</b>	4	0,435	0,359	0,412	0,328	0,384	0,049	12,73
	7,8	0,430	0,425	0,466	0,366	0,422	0,041	9,82
<b>Óleo Volátil (ESC)</b>	4	0,51	0,567	0,555	0,608	0,561	0,04	7,19
	7,8	0,768	0,858	0,762	0,751	0,765	0,049	6,45

Tabela 21 - Medições efectuadas para a quantificação do teor de polifenóis nos diferentes extratos e óleos

	Concentração (mg/mL)	Ensaios				Média	Desvio Padrão	Erro (%)
		1	2	3	4			
<b>Extrato Supercrítico CO<sub>2</sub></b>	0,9	0,192	0,195	0,192	0,215	0,199	0,011	5,58
	1,2	0,242	0,249	0,223	0,219	0,233	0,015	6,22
<b>Extrato Supercrítico CO<sub>2</sub> + MeOH</b>	0,9	0,273	0,278	0,294	0,295	0,285	0,047	3,92
	1,2	0,328	0,341	0,38	0,397	0,362	0,032	8,96
<b>Extrato Supercrítico CO<sub>2</sub> + EtOH</b>	2	0,53	0,663	0,695	0,59	0,62	0,074	11,96
	3	0,788	0,871	1,019	0,949	0,907	0,099	10,98
<b>Extrato Soxhlet</b>	0,6	1,456	1,556	1,347	1,509	1,467	0,090	6,12
	0,9	1,779	1,784	1,875	1,822	1,815	0,044	2,45
<b>Óleo Essencial (HD)</b>	4	0,342	0,388	0,477	0,311	0,379	0,072	19,05
	7,8	0,945	0,903	1,070	1,127	1,011	0,105	10,37

Tabela 22 - Medições efectuadas para a quantificação do teor de flavonóides nos diferentes extratos e óleos

		Ensaios						
	Concentração (mg/mL)	1	2	3	4	Média	Desvio Padrão	Erro (%)
<b>Extrato Supercrítico CO<sub>2</sub></b>	1	0,160	0,134	0,145	0,152	0,148	1,10E-02	7,463
	2	0,287	0,249	0,275	0,251	0,266	1,86E-02	6,996
<b>Extrato Supercrítico CO<sub>2</sub> + MeOH</b>	1	0,592	0,595	0,600	0,661	0,612	3,28E-02	5,365
	2	0,987	1,069	-	0,958	1,005	5,76E-02	5,730
<b>Extrato Supercrítico CO<sub>2</sub> + EtOH</b>	1	0,533	0,591	-	0,517	0,593	3,92E-02	7,026
	2	0,940	-	1,079	1,106	1,042	8,91E-02	8,551
<b>Extrato Soxhlet</b>	1	-	0,355	0,301	0,347	0,334	2,91E-02	8,717
	2	0,476	0,556	0,538	0,563	0,533	3,96E-02	7,425
<b>Óleo Essencial (HD)</b>	1	0,069	0,059	0,066	-	0,066	4,72E-03	7,174
	2	0,077	-	0,068	0,07	0,073	4,99E-03	6,815
<b>Óleo Volátil (ESC)</b>	1	0,077	0,074	0,077	0,073	0,075	2,06E-03	2,740
	2	0,074	0,094	-	0,076	0,081	1,10E-02	13,543

## **ANEXO F – Divulgação de trabalho realizado para a comunidade científica**

### **Comunicações em Painel**

- “Supercritical CO<sub>2</sub> Extraction of *Agastache foeniculum* Aerial Parts: Composition, Modelling and Comparison with hydrodistillation”, J. Coelho, J. Ramos, A. Cardoso, A. Palavra, J. Barroso, A. C. Figueiredo. 16th European Meeting on Supercritical Fluids – 25-28 Abril de 2017 em Lisboa, Portugal.
- “Characterization of *Agastache foeniculum* L. essential oil and volatiles obtained by SFE-CO<sub>2</sub> extraction: Modelling”, A. Cardoso, J. Coelho, A. Palavra, J. Barroso, A. C. Figueiredo. iFEQB – Forum de Engenharia Química e Biológica, 16-18 Maio, ISEL. Lisboa, Portugal.

### **Comunicações Orais**

- “Recovering Value from Organic Waste Materials. Supercritical Fluid Extraction of Grape Seed Oil” R. Filipe, J. Coelho, A. Cardoso, R. Stateva. 16th European Meeting on Supercritical Fluids – 25-28 Abril de 2017 em Lisboa, Portugal.
- “Comparative analysis of the composition of essential oils and supercritical CO<sub>2</sub> oils from *Agastache foeniculum* aerial parts”, J. Coelho, A. Cardoso, J. Ramos, A. Palavra, J. Barroso, A. C. Figueiredo. XIXth Euroanalysis, 28 Agosto -1 Setembro 2017 em Estocolmo, Suécia.