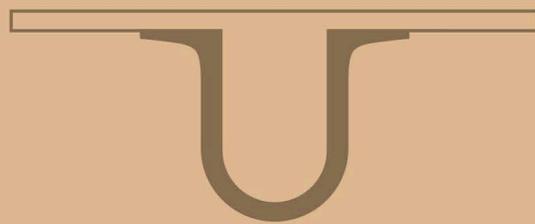




UNIVERSIDADE D
COIMBRA



Vanessa Monteiro Leal

DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES BASEADAS
EM ATRATIVOS/REPELENTES PARA O
CONTROLO DO INSETO VETOR DO
NEMÁTODE-DA-MADEIRA-DO-PINHEIRO (NMP)

Dissertação de Mestrado Integrado em Engenharia Química,
orientada pelo Professor Doutor Hermínio José Cipriano de Sousa
e pela Professora Doutora Mara Elga Medeiros Braga
e apresentada ao Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia
da Universidade de Coimbra

Setembro de 2018

Departamento de Engenharia Química da
Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

DESENVOLVIMENTO DE
FORMULAÇÕES BASEADAS EM
ATRATIVOS/REPELENTES PARA O
CONTROLO DO INSETO VETOR DO
NEMÁTODE-DA-MADEIRA-DO-PINHEIRO
(NMP)

Vanessa Monteiro Leal

Dissertação no âmbito do Mestrado Integrado em Engenharia Química orientada pelo Professor Doutor Hermínio José Cipriano de Sousa e pela Professora Doutora Mara Elga Medeiros Braga e apresentada ao Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Setembro de 2018



UNIVERSIDADE D
COIMBRA



O tema desta proposta de mestrado insere-se num projeto intitulado “*New eco-friendly approaches for the biomanagement of the pinewood nematode vector at Eurasia*” - ECOVECTOR, referência POCI-01-0145-FEDER-016820, cofinanciado por fundos Europeus Estruturais e de Investimento (FEEL) e pelo Orçamento de Estado.

Cofinanciado por:



UNIÃO EUROPEIA

Fundos Europeus
Estruturais e de Investimento

Esta cópia da tese é fornecida nas condições de que quem a consulta reconhece que os direitos de autor são pertença do autor da tese e de que nenhuma citação ou informação obtidas a partir dela podem ser publicadas sem a devida referência.

This copy of the thesis has been supplied under the conditions that anyone who consults it is understood to recognize that its copyright rests with its author and that no quotation from the thesis and no information derived from it may be published without proper acknowledgement.

Agradecimentos

Neste local procuro agradecer e homenagear todos aqueles que de forma direta e indireta me auxiliaram na construção desta longa jornada.

Aos orientadores, Professora Doutora Mara Braga e Professor Doutor Herminio Sousa e, pelo seu saber, orientação, disponibilidade e conselhos que permitiram a finalização deste trabalho.

Às investigadoras Marisa e Rita e, por toda a paciência, orientação, auxílio e disponibilidade. Sem dúvida que a vossa contribuição foi indispensável para a conclusão deste projeto.

Às empresas Resiquímica e Goat Nutrition, Ltd. pela disponibilização de alguns dos materiais indispensáveis ao desenvolvimento deste projeto.

Em particular, um muito obrigada aos meus pais, por me proporcionarem esta incrível experiência universitária e por todo o apoio incondicional. O que eu sou a vocês o devo!

Ao pessoal do B18, por toda ajuda e apoio e por todos os momentos divertidos que permitiram manter a calma em alturas mais trabalhosas.

Aos amigos que nunca deixaram de me apoiar durante este período da minha vida, pela compreensão das minhas ausências, pelos desabafos de horas e pela preocupação que sempre tiveram para comigo. Em especial, à Laura, à Mariana, ao Danilo, à Daniela, à Mónica, à Bella e a todos os amigos que a faculdade me trouxe e que espero levar daqui por muitos anos.

Às minhas meninas de Leiria: Sara, Bia, Simone e Ana, por todos os momentos de convívio, por me perdoarem todas as ausências aos jantares, noites e dias de praia e mesmo quando as coisas não estavam a correr muito bem, por sempre me deixarem com um sorriso e boa disposição.

E por fim não podia deixar aqui de agradecer ao meu namorado, Vitor, por ter estado sempre lá, nos momentos bons e nos menos bons deste trabalho, por toda a paciência que teve para lidar com o meu mau feitio nas horas críticas e sempre com uma palavra de conforto ou um gelado para me animar, por nunca me ter deixado desistir e pelo contributo para as imagens desta tese.

Resumo

A doença da murchidão do pinheiro (DMP) e o seu agente patogénico são um dos fatores que tem contribuído para a grande redução das florestas de pinheiro-bravo (*Pinus pinaster*) em Portugal. De forma a combater a propagação do agente patogénico da DMP, o Nemátode-da-Madeira-do-Pinheiro (NMP), têm sido desenvolvidas medidas de ação que procuram impedir a dissipação deste através do controlo do seu inseto vetor *Monochamus galloprovincialis*. No entanto, os produtos atualmente comercializados ainda apresentam limitações em relação à sua eficácia, à duração e à facilidade de aplicação que precisam de ser suplantadas para que as medidas sejam eficazes. Assim, com a realização deste trabalho, procurou-se desenvolver formulações de base polimérica, biodegradáveis, para libertação controlada de semioquímicos naturais com atividade atrativa ou repelente (α -pineno e o eucaliptol) para o inseto vetor do NMP, para serem aplicadas em armadilhas florestais comerciais. As formulações foram processadas por espumagem/*mixing* com CO₂ supercrítico, a partir de misturas de α -pineno e poli(ϵ -caprolactona) (PCL), com e sem adição de cera de carnaúba ou serradura. Posteriormente, foi testado um revestimento comercial. Os resultados obtidos demonstraram que os materiais compósitos baseados em PCL, aos quais foi adicionada cera ou serradura, bem como os que foram revestidos, emitiram α -pineno em taxas de libertação mais baixas do que as obtidas para formulações poliméricas de PCL pura. Além do controlo da taxa de libertação da emissão de voláteis, as estratégias para as formulações aplicadas também permitiram aumentar a capacidade de carregamento em termos de α -pineno e conduziram a taxas de degradação mais rápidas durante os testes de degradação acelerada. O α -pineno e o eucaliptol não apresentaram degradação ao fim de 1 mês em condições ambientais simuladas (radiação UVB e UVC e temperaturas ambientais típicas – 25 e 40°C). As formulações desenvolvidas no decorrer deste trabalho têm potencial para serem aplicadas no controlo do inseto vetor do NMP, e as metodologias aqui apresentadas são estratégias promissoras para, no futuro, conseguir desenvolver formulações melhoradas, e que possam ser utilizadas com outros semioquímicos e, deste modo, possam também ser aplicadas no controlo de outros insetos.

Palavras-chave: Formulações porosas de base polimérica, Semioquímicos de origem natural, Espumagem/*Mixing* com dióxido de carbono supercrítico, *Monochamus galloprovincialis*, Doença da Murchidão do Pinheiro

Abstract

Pine Wilt Disease (PWD) and its pathogen are one of the factors that have contributed to the large reduction of maritime pine (*Pinus pinaster*) forests in Portugal. To combat the spread of the PWD pathogen, the Pinewood Nematode (PWN), action measures have been developed to prevent its dissipation through the control of its insect vector *Monochamus galloprovincialis*. However, currently marketed products still have limitations in terms of their effectiveness, durability and ease of application that need to be overcome for the measures to be effective. With our study, we tried to develop biodegradable polymer-based formulations for the controlled release of bioactive natural semiochemical with attractant or repellent activity (α -pinene and eucalyptol) for the insect vector of PWN, to be applied together with commercial forest traps. Formulations were processed as blends of α -pinene and poly(ϵ -caprolactone) (PCL), by foaming/mixing with supercritical CO₂, with or without carnauba wax or sawdust as additives. A commercial polymer coating was further tested. It was found that the composite materials based on PCL with wax or sawdust, as well as those that were coated, emitted α -pinene at release rates than the obtained for pure PCL polymeric formulations. In addition to the control of volatile emission release rates, the employed formulations strategies also allowed to increase the loading capacity in terms of α -pinene and led to fast degradation rates in accelerated experiments. α -pinene and eucalyptol did not show degradation after 1 month of exposure to environmental conditions (UVB and UVC radiation and typical environmental temperatures – 25 and 40°C). The formulations developed along this study have potential to be applied in the control of the insect vector of the PWN, and the methodologies here presented are promising strategies for, in the future, develop optimized formulations and that might be able to be used with different semiochemical substances and thus, to be applied in the control of other insects.

Key-words: Polymer based porous formulations, Natural-origin semiochemicals, Supercritical carbon dioxide foaming/mixing, *Monochamus galloprovincialis*, Pine Wilt Disease

Índice

Agradecimentos	i
Resumo	iii
Abstract.....	v
Índice	1
Índice de Figuras	3
Índice de Tabelas	5
Objetivos e Motivações	7
1. INTRODUÇÃO.....	9
1.1. A importância do pinheiro-bravo para a economia portuguesa	9
1.2. Estratégias fitossanitárias para controlo do NMP.....	11
1.3. Desenvolvimento de formulações com compostos bioativos para o inseto vetor...	19
1.4. Estratégias para controlar a difusão do(s) composto(s) bioativo(s).....	23
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
2.1. Materiais	27
2.2. Processamento das formulações	28
2.3. Caracterização dos materiais desenvolvidos.....	31
2.3.1. Análise morfológica e física.....	31
2.3.2. Cinética de libertação do α -pineno.....	33
2.3.2.1. Análise gravimétrica	33
2.3.2.2. Análise cromatográfica (SPME – GC-MS/FID).....	34
2.4. Degradação dos bioativos e do produto final.....	35
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
3.1. Caracterização morfológica	39
3.2. Caracterização termogravimétrica	50
3.3. Cinética de libertação do α -pineno	65

CONCLUSÃO	81
Trabalhos Futuros.....	83
Referências	85
Anexos.....	i
Anexo I – Materiais testados para o revestimento das matrizes poliméricas	iii
Anexo II – Análise da cera de carnaúba, da serradura de pinheiro e da resina por GC/MS.....	iv
Anexo III – Análise diferencial térmica simultânea (SDT).....	vii
Anexo IV – Intrusão de mercúrio e adsorção de azoto.....	xi
Anexo V - Degradação dos bioativos	xiii
Anexo VI - Degradação do produto final	xvii
Anexo VII – Cinética de libertação de α -pineno.....	xix
Anexo VIII – Frases H/P de saúde e segurança.....	xxiii

Índice de Figuras

Figura 1 - Ciclo de transmissão do Nemátodo-da-madeira-do-pinheiro. Adaptado de Cram e Hanson (2014) [25].....	12
Figura 2 - Exemplo de formulações utilizadas em produtos comerciais atrativos no controlo do inseto <i>Monochamus galloprovincialis</i> (Galloprotect Plus [®] , SEDQ). Difusores: (A) ipsenol e 2-metil-3-buten-2-ol, (B) 2-undeciloxi-1-etanol, (C) α -pineno.....	17
Figura 3 - Exemplos de armadilhas aplicadas no controlo do inseto vetor <i>Monochamus galloprovincialis</i> . À esquerda: Armadilha do tipo multi-funil; à direita: armadilha do tipo painéis cruzados [58].....	18
Figura 4 - Evolução das estratégias de controlo com armadilhas e compostos bioativos adotadas em Portugal, adaptado de ICNF (2013) [5].....	18
Figura 5 - Representação esquemática dos mecanismos envolvidos na libertação de compostos voláteis (•) através de matrizes poliméricas porosas.	25
Figura 6 - Diagrama de desenvolvimento de um difusor de α -pineno.....	29
Figura 7 - Esquema ilustrativo do túnel de vento utilizado no ensaio para avaliar a libertação de α -pineno em condições de vento controladas.....	35
Figura 8 - Imagens macroscópicas das matrizes porosas. Constituição da matriz: PCL (A), PCL e cera (B); PCL e serradura (C).....	40
Figura 9 - Imagens obtidas por microscopia eletrónica de varrimento (SEM) das formulações sem revestimento.	41
Figura 10 - Imagens obtidas por microscopia eletrónica de varrimento (SEM) dos compósitos com serradura em diferentes proporções.....	44
Figura 11 - Imagens macro (esquerda) e microscópicas (direita) de formulações com revestimento onde é visível a película dentro dos poros da matriz.	45
Figura 12 - Área de superfície específica determinada por adsorção de azoto (A) e porosidade (A), volume de poros (B), densidade <i>skeletal</i> aparente e densidade <i>bulk</i> (C) determinadas por intrusão de mercúrio.	48
Figura 13 - Temperatura de fusão ($T_{F,1}$) temperatura de degradação ($T_{D,2}$) e cristalinidade (χ_c) das formulações.....	53
Figura 14 - Espectros de eucaliptol obtidos por GC/MS. Controlos (A); Exposição à radiação UV (B) e às temperaturas: 25°C (C) e 40°C (D).....	56
Figura 15 - Espectros de α -pineno obtidos por GC/MS. Controlos (A); Exposição à radiação UV (B) e à temperatura: 25°C (C) e 40°C (D).....	61

Figura 16 - Representação gráfica da massa das amostras em NaOH 5 M, ao longo do tempo.	63
Figura 17 - Massa de voláteis total (α -pineno, H ₂ O e outros compostos do revestimento e CO ₂) (A) e massa de α -pineno total libertada a partir das amostras (B).....	67
Figura 18 - Perda de massa das amostras analisadas por gravimetria, ao longo das primeiras 2 semanas de ensaio.	70
Figura 19 - Concentração de α -pineno medida no túnel de vento ao longo do tempo pelas formulações sem revestimento contendo ou não enchimentos (A) e contendo ou não revestimento (B, C e D).....	75
Figura III.1 - Exemplo dos perfis obtidos por análise diferencial térmica simultânea para as formulações (1 : 0 : 0 : 0) (—) e (1 : 0 : 0 : 1,02) (-----). Derivada do peso (■) e fluxo de calor (■) em função da temperatura.	vii
Figura III.2 - Exemplo dos perfis obtidos por análise diferencial térmica simultânea para os difusores de α -pineno com uma base sólida de PCL pura (A), PCL + Cera (B) e PCL + Serradura (C), com (-----) e sem (—) revestimento. Derivada do peso (■) e fluxo de calor (■) em função da temperatura.	viii
Figura III.3 - Exemplo da determinação das temperaturas de fusão e de degradação e da entalpia de degradação utilizada no cálculo da cristalinidade das formulações.	ix
Figura VI.1 - Linearização da cinética de perda de massa durante a fase de degradação dos difusores sem revestimento (A), a fase de inchaço dos difusores com revestimento (B), a fase de degradação dos difusores com revestimento (C).....	xvii
Figura VII.1 - Representação gráfica da linearização das cinéticas de libertação obtidas. xx	

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Produtos comerciais utilizados em programas de gestão do inseto vetor do NMP.	16
Tabela 2 - Formulações desenvolvidas para libertação controlada de semioquímicos para controlo de pragas.....	21
Tabela 3 - Propriedades e características de interesse de alguns dos materiais usados.....	27
Tabela 4 - Composição das diferentes formulações processadas.	30
Tabela 5 - Técnicas e respetivo equipamento, especificações utilizadas para a determinação de parâmetros para caracterizar morfológica e fisicamente os materiais porosos produzidos.	32
Tabela 6 - Identificação das condições de temperatura ou radiação a que as amostras de α -pineno e eucaliptol foram sujeitas e o respetivo tempo a que esteve exposta a estes fatores.	36
Tabela 7 - Temperaturas de fusão, temperaturas de degradação e cristalinidade obtidas por análise diferencial térmica simultânea (SDT) para os materiais desenvolvidos.	51
Tabela 8 - Identificação dos compostos obtidos nos controlos de α -pineno.....	58
Tabela 9 - Linearização das curvas obtidas durante as fases de inchaço do revestimento e da degradação das matrizes poliméricas. y = massa da amostra; x = tempo (h).....	64
Tabela 10 - Capacidade de carregamento de α -pineno nas matrizes e dimensões das amostras analisadas por gravimetria. D =diâmetro; h =altura.....	66
Tabela 11 - Parâmetros característicos da cinética de libertação.	72
Tabela 12 – Massa de α -pineno libertado pelos difusores durante o ensaio no túnel de vento.	78
Tabela 13 - Taxa de α -pineno pontualmente libertado pelos difusores, medida por análise gravimétrica.	80
Tabela I.1 - Materiais testados para o revestimento das matrizes poliméricas	iii
Tabela IV.1 - Compilação dos resultados obtidos pelas técnicas de intrusão de mercúrio e adsorção de azoto.....	xi
Tabela IV.2 - Área total de poros para cada intervalo de tamanho de poros obtido por intrusão de mercúrio.	xii
Tabela V.1 - Gama de referência de intensidades definida a partir dos controlos 1 e 2....	xiii
Tabela V.2 - Identificação dos compostos obtidos nos espetros de α -pineno.....	xiv

Tabela VII.1 - Massa inicial, voláteis e α -pineno libertados pelas amostras analisadas por gravimetria. Resultados compilados na Figura 7.	xix
Tabela VII.2 – Resultados da linearização das curvas de libertação obtidas por análise gravimétrica para as amostras sem revestimento em diferentes intervalos de tempo.	xix
Tabela VII.3 - Concentração de α -pineno libertado no túnel de vento ao longo do tempo.	xxi
Tabela VIII.1 – Frases H/P de saúde e segurança ^a	xxiii

Objetivos e Motivações

A grande perda de área florestal que Portugal tem vindo a enfrentar nos últimos anos, é uma das maiores preocupações ambientais do país. Em particular, a fileira do pinho, uma das mais importantes e com maior impacto económico para o país, tem sido uma das mais afetadas. Entre as principais causas desta devastação, podem distinguir-se algumas associadas à presença de pragas e doenças, como a doença da murchidão do pinheiro (DMP), que afeta a espécie de pinheiro mais comum e com mais valor socio-económico em Portugal, o pinheiro-bravo (*Pinus pinaster* Aiton).

Apesar das inúmeras medidas que têm vindo a ser tomadas com o objetivo de conseguir controlar e erradicar o agente patogénico desta doença, o Nemátode-da-madeira-do-pinheiro (NMP), *Bursaphelenchus xylophilus*, este agente biótico continua a propagar-se e a devastar hectares de florestas de pinheiro a nível mundial.

A par deste facto, os riscos para o meio ambiente e os elevados custos financeiros, geralmente associados à implementação destas medidas, tem fomentado a procura contínua por estratégias alternativas, entre as quais se têm vindo a destacar as que, através de métodos biotécnicos, atuam no controlo do inseto vetor do NMP. Estas estratégias procuram, através do uso de produtos com bioatividade, repelir ou atrair os insetos para locais afastados das áreas infetadas ou para armadilhas onde são capturados.

A preocupação global com a sustentabilidade e com o impacto ambiental, inerente ao uso de compostos sintéticos perigosos para a saúde humana e para o meio ambiente, tem promovido uma tendência de substituição dos mesmos por substâncias naturais bioativas menos perigosas, como é exemplo disso os semioquímicos. Contudo, os produtos atualmente comercializados baseados no uso de compostos naturais ainda apresentam algumas limitações que precisam de ser ultrapassadas para que estas medidas sejam eficazes no controlo do inseto vetor, nomeadamente no que diz respeito à eficácia, à duração e à facilidade de aplicação dos mesmos.

É neste âmbito que se insere esta tese, por via da qual se procurou desenvolver formulações de base polimérica, biodegradáveis e contendo compostos bioativos de origem natural, menos tóxicos, que apresentam poder atrativo ou repelente para o inseto vetor do NMP (α -

pineno e eucaliptol) com o objetivo final de tentar aumentar a sua eficácia e, desta forma, reduzir de forma controlada, sustentável e ecológica, a infecção nos pinhais.

Os principais desafios científicos a fim de atingir estes objetivos passam, essencialmente, por desenvolver formulações específicas que permitam controlar a quantidade (dose) dos agentes bioativos de interesse, protegê-los de fatores externos que contribuam para a sua degradação, e promover a sua difusão dentro dos limites de eficácia pretendidos e de uma forma controlada e sustentada no tempo.

Para isto, propõe-se o uso de uma técnica de *foaming/mixing* com dióxido de carbono supercrítico (scCO₂), para a produção de materiais compósitos, porosos e biodegradáveis, de base de poli(ε-caprolactona) (PCL), e contendo enchimentos/revestimentos, igualmente biodegradáveis, de origem natural ou sintética.

1. INTRODUÇÃO

1.1. A importância do pinheiro-bravo para a economia portuguesa

Portugal é atualmente um dos países com maior percentagem de área florestal da Europa, a qual cobre cerca de 40% do território nacional e que é constituída, essencialmente por monoculturas de eucalipto e de pinheiro-bravo (*Pinus pinaster* Aiton) [1].

A fileira do pinho é uma das fileiras florestais com maior importância para o país, tanto a nível ambiental como económico. Em termos ambientais, contribui não só para a regulação ambiental e conservação dos solos mas também para a captura de CO₂ o que, conseqüentemente, contribui para a diminuição da emissão de gases com efeito de estufa. As florestas de pinheiros são ainda a base de uma grande variedade de ecossistemas naturais. Além dos benefícios ambientais, esta fileira funciona como um motor da economia portuguesa, oferecendo diversos bens e serviços de alto valor acrescentado, é exemplo disso a madeira utilizada nas indústrias da serração e da pasta e papel, pellets e resina [2]. Em 2017, a fileira do pinho contribuía para 50% do VAB (Valor Acrescentado Bruto) do país, fornecendo recursos para 87% das empresas do setor florestal, responsáveis pela criação de 80% dos postos de trabalho deste setor e por 36% das exportações, o que corresponde a 3,4% do total das exportações nacionais [3].

Nos últimos anos, Portugal tem visto a sua área florestal ser reduzida [4] e, no período entre 1995 e 2010 essa redução chegou a ser de 263 mil hectares [5], conduzindo a uma falta de matéria-prima [6] e uma conseqüente desvalorização dos produtos e serviços oferecidos por esta indústria [7].

Os graves riscos ambientais e o forte impacto negativo na balança comercial do país que a perda de floresta de pinheiro-bravo acarreta, tem conduzido à procura de estratégias que levem à inversão desta tendência. Entre os principais fatores que contribuem para esta situação estão a gestão inadequada e a intensa exploração destes recursos, fatores abióticos, como os incêndios e as alterações climáticas, e fatores bióticos como por exemplo pragas e doenças, como é o caso da doença da murchidão do pinheiro (DMP), [2, 8-10].

Originário das florestas da América do Norte, o agente patogénico da DMP, o Nemátode-da-madeira-do-pinheiro (NMP), pode hoje ser encontrado em diferentes regiões do mundo.

No entanto, enquanto nas florestas de pinheiros da América do Norte convive em equilíbrio com as espécies nativas, para as regiões para onde se tem vindo a propagar, o NMP representa uma das maiores ameaças à sanidade das florestas de pinheiros [2]. Descoberto no Japão, em 1905 [11], onde causou uma perda de mais de 46 milhões de metros cúbicos de floresta nos últimos 50 anos, fatores como as condições meteorológicas e topográficas e, sobretudo as trocas comerciais internacionais [12], conduziram à introdução deste agente patogénico no continente europeu, onde foi reportado pela primeira vez em Portugal, em 1999 na região de Setúbal [13]. Contudo, apesar da implementação de medidas fitossanitárias e do restrito controlo feito sobre o comércio e exportação de produtos da indústria da madeira ou derivados, a dificuldade em controlar a dispersão deste agente patogénico levou à sua propagação para outras regiões do país e, mais recentemente, para território espanhol (2008) e para a ilha da Madeira (2009) [14]. As principais espécies responsáveis pela transmissão da doença em Portugal, o nemátode *Bursaphelenchus xylophilus* e o seu inseto vetor *Monochamus galloprovincialis*, estão atualmente classificadas como organismos de quarentena pela Organização Europeia e Mediterrânica para a Proteção das Plantas (OEPP) [14].

Pela severidade dos impactos ambientais e socioeconómicos que o NMP acarreta tanto para os países afetados como para outros suscetíveis à sua entrada, esta doença representa atualmente uma das principais preocupações ambientais e económicas a nível mundial. Neste sentido, ao abrigo do Programa de Ação para o Controlo do Nemátodo-da-madeira-do-pinheiro, têm vindo a ser implementadas múltiplas medidas de ação que procuram monitorizar, controlar e erradicar as espécies envolvidas na propagação da doença [15]. No entanto, o facto da implementação destes planos de ação ser bastante dispendiosa, como é o exemplo dos 9,5 milhões de dólares gastos pela Coreia em 2005 em medidas de combate à DMP, e o facto destas medidas demonstrarem não ser suficientes para impedir a dispersão do NMP, tem fomentado a procura contínua por novas estratégias [12, 16].

1.2. Estratégias fitossanitárias para controlo do NMP

Os planos de ação desenvolvidos para o controlo do NMP abrangem medidas de prevenção, de controlo e de erradicação e têm vindo a ser implementados tanto por países onde a doença já foi detetada, como por países que estejam suscetíveis à entrada do NMP pela sua proximidade com regiões afetadas ou por efetuarem trocas comerciais de produtos ou derivados da indústria da madeira com países infetados [14, 15].

Como medida de prevenção, é geralmente feita a monitorização do NMP através de inspeções rigorosas em zonas de quarentena, tanto em áreas florestais como em áreas ligadas à circulação e exportação de madeira, como é o caso dos parques de madeiras e dos portos marítimos. Em particular, na União Europeia (UE), foram estabelecidas diversas regulamentações e diretivas relacionadas com o comércio nacional e internacional de produtos e sub-produtos provenientes da indústria da madeira, como é o caso da Regulamentação nº 995/2010 para o comércio de madeira manufaturada [17]. Em Portugal, o Decreto-Lei nº 95/2011 publicado no Diário da República nº 151/2011, define um conjunto de medidas de proteção fitossanitária essenciais ao controlo do NMP [18].

Outra medida preventiva adotada por alguns dos países em que foi detetada a DMP, como é caso Portugal, foi o estabelecimento de faixas fitossanitárias em torno de áreas florestais onde a doença foi detetada e que estão sob constante monitorização [19].

Entre as medidas de controlo e erradicação deste inseto, que têm vindo a ser adotadas, podem distinguir-se as medidas baseadas em métodos mecânicos como é o caso da queima e do abate de árvores ou ramos, que apresentem sinais da doença, como por exemplo a descoloração das agulhas, a secura parcial ou total da copa e a redução do fluxo de resina, e as que têm como princípio métodos culturais através de intervenções silviculturais [12, 20]. Outras são baseadas em métodos biológicos onde o controlo do agente patogénico é conseguido através da introdução de populações de organismos inimigos naturais do seu inseto vetor, como é o caso do fungo *Scleroderma guani* utilizado na China no combate aos insetos *Monochamus* [16], ou ainda em métodos químicos, onde estão incluídas a fumigação ou pulverização da madeira com nematodocidas ou inseticidas. Por último, e embora menos frequentemente utilizadas, são as estratégias baseadas em método genéticos que, através da alteração genética das árvores, procuram aumentar a resiliência desta ao agente patogénico [15, 21, 22].

No caso da UE, os principais tratamentos aplicados em zonas de quarentena incluem a queima e remoção das árvores infetadas, a fumigação da madeira ou a injeção de substâncias fitossanitárias nos troncos e ainda o tratamento térmico da madeira e produtos derivados dela, como por exemplo de embalagens [16, 23]. No entanto, a maioria destas estratégias pode ter um impacto nocivo no meio ambiente e na saúde humana e requer um elevado consumo de tempo e de recursos humanos e económicos. Além disso, a dificuldade em restringir a propagação da doença através do controlo direto do nemátode e o risco de este ou o inseto vetor desenvolverem resistência aos produtos químicos fitossanitários utilizados, têm-se refletido na ineficácia da maioria das estratégias adotadas [12, 24].

Como alternativa, surgiram, mais recentemente, os métodos biotécnicos que visam prevenir ou tratar a doença através da manipulação das interações entre a árvore e o inseto vetor, ao invés de incidir no controlo direto do NMP [15].

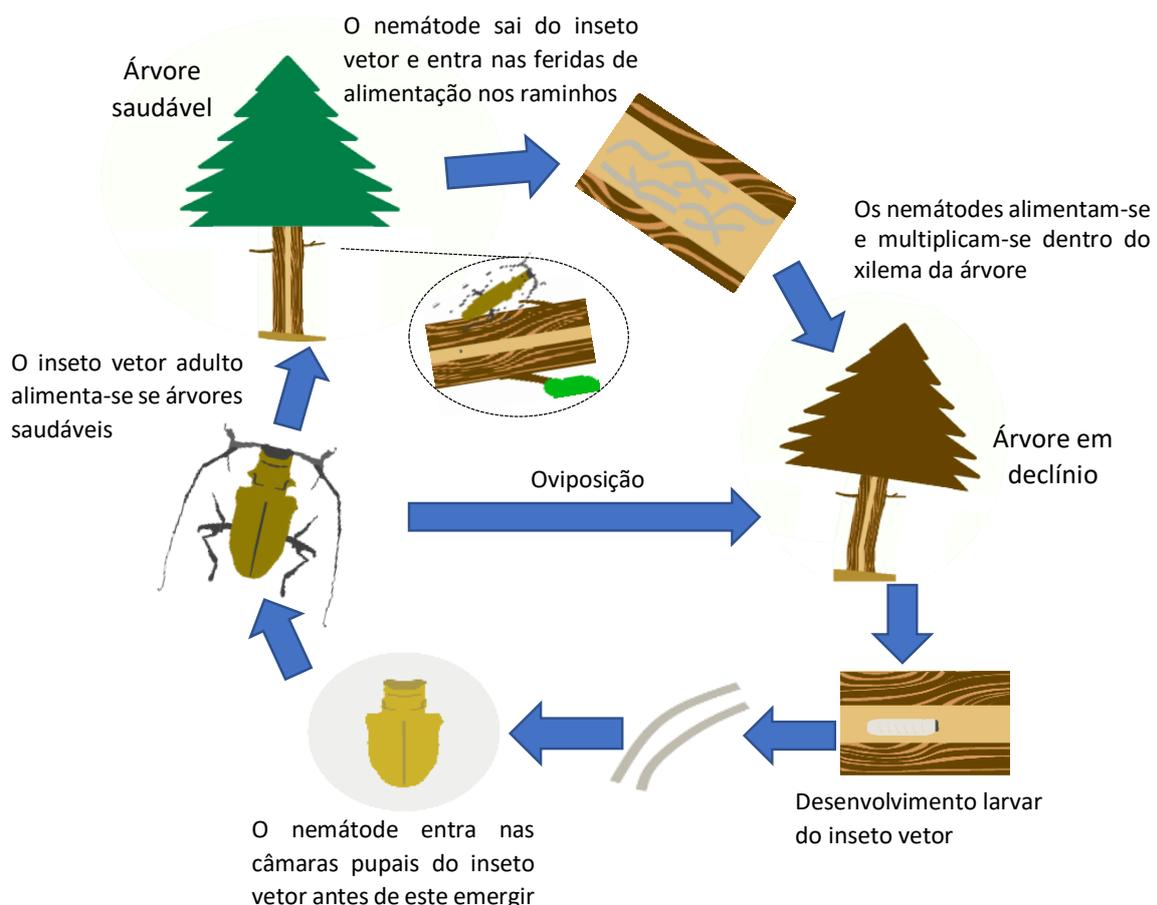


Figura 1 - Ciclo de transmissão do Nemátodo-da-madeira-do-pinheiro. Adaptado de Cram e Hanson (2014) [25].

A DMP resulta da interação entre o agente patogénico NMP, o inseto vetor responsável pelo seu transporte e as árvores que, depois de colonizadas, entram em rápido declínio [2]. Durante o ano, o transporte dos nemátodes até às árvores pode ocorrer em dois períodos (Figura 1): durante a fase jovem dos insetos vetores, enquanto se alimentam de pinheiros saudáveis (transmissão primária), ou durante a fase adulta, durante o qual estes insetos selecionam árvores em declínio para que ocorra a oviposição (transmissão secundária) [12]. O período de vôo dos insetos vetores decorre geralmente entre os meses de Maio e Outubro [26].

As estratégias de controlo do inseto vetor são geralmente implementadas durante o seu período de vôo e procuram interferir nas relações inseto-árvore através do uso de compostos químicos bioativos aplicados, na maioria das vezes, em conjunto com armadilhas de insetos [19]. A aplicação destes compostos tem como objetivo mimetizar as substâncias voláteis emitidas pelas árvores e que são responsáveis pela capacidade do inseto vetor detetar a sua presença [27]. Estas substâncias voláteis e bioativas, designadas de semioquímicos, são capazes de desencadear sinais químicos que interferem no comportamento de outros organismos, da mesma espécie ou de espécies diferentes, e que podem funcionar como agente atrativos ou repelentes [28]. Nos últimos anos, o interesse pelo uso destes compostos em programas de gestão de pragas e doenças tem vindo a crescer, sendo utilizados como uma estratégia para impedir que os organismos envolvidos na transmissão das doenças alcancem as árvores saudáveis [29, 30].

De acordo com a forma como afetam as inter-relações, os semioquímicos podem distinguir-se em feromonas, quando as alterações ocorrem entre organismos da mesma espécie, e em aleloquímicos, quando afetam relações entre organismos de espécies diferentes. Por sua vez, os aleloquímicos podem subdividir-se em alomonas ou em cairomonas, quando as alterações comportamentais desencadeadas são benéficas ou desfavoráveis, respetivamente, para o organismo emissor [31].

O uso de semioquímicos em substituição dos pesticidas convencionais torna-se vantajoso, uma vez que estes compostos são normalmente de origem biológica e geralmente biodegradáveis, os seus efeitos são menos nocivos para o ambiente e para a saúde humana [14]. Outras vantagens da sua utilização são o menor risco de ocorrer fitotoxicidade para as culturas ou das espécies-alvo desenvolverem resistência aos químicos e a sua maior

seletividade, que permite reduzir o risco de contaminação ou de interferirem com outras espécies e, por conseguinte, diminuir a quantidade de pesticidas necessária [32-34].

Nos produtos agroquímicos convencionais, como os pesticidas, recorre-se muitas vezes a compostos bioativos de origem sintética. Contudo, estes compostos apresentam algumas desvantagens, especialmente pelo maior risco que representam para o ambiente e para a saúde humana [35, 36]. Por este motivo, compostos semioquímicos de origem natural como os óleos essenciais, têm recebido especial atenção para produtos agrícolas [37]. Em particular, e para programas de gestão de pragas, a utilização de óleos essenciais enquanto substâncias capazes de manipular o comportamento dos insetos, tem vindo cada vez mais a ser explorada e as suas propriedades bioativas foram já descritas na literatura para uma grande variedade de espécies de insetos [34], incluindo o *galloprovincialis* [38-40]. Estas substâncias podem interferir a nível do crescimento, da reprodução ou dos recetores olfativos dos insetos, desencadeando um efeito atrativo ou repelente [33, 41], dependendo do tipo, natureza e concentração de cada composto presente no óleo [42].

Os óleos essenciais são constituídos por misturas de compostos aromáticos voláteis e podem ser obtidos de espécies vegetais. Desde há muito tempo que estes óleos têm vindo a ser utilizados para as mais diversas aplicações em áreas como a farmacêutica e a alimentar e, por conseguinte, a maior parte dos óleos atualmente utilizados no controlo de pragas, já pode ser facilmente adquirido com um grau de pureza considerável (~95%) e a um custo relativamente baixo [43, 44].

Neste âmbito, diversos estudos têm procurado identificar os principais óleos essenciais emitidos por diferentes espécies de pinheiros que têm sido infetadas pela DMP, como o *P. pinaster*, *P. pinea*, *P. sylvestris* e *P. nigra* [45], e que podem ser responsáveis por atrair ou por repelir os insetos do género *Monochamus*, com especial incidência nas árvores em fase de decadência, uma vez que é neste estado que são preferencialmente escolhidas pelas fêmeas adultas, para ocorrer a oviposição. Entre os voláteis encontrados estão terpenos, terpenos oxigenados, sesquiterpenos e diterpenos. No entanto, monoterpenos como Δ -3-carene, α -pineno e β -pineno foram identificados como os compostos emitidos em maiores quantidades [46]. Dentro destes voláteis, o α -pineno tem sido o composto mais utilizado em estratégias de controlo do NMP pela sua capacidade atrativa para os insetos do género *Monochamus* [47, 48]. No entanto, a utilização destes óleos em conjunto com certas substâncias cairomonais, como o ipsenol, ou feromonais, como o 2-undeciloxi-1-etanol,

resulta num efeito sinérgico, que potencia a interação com os insetos, uma vez que permitem simular de forma mais realista a dinâmica dos pinheiros na natureza [49]. Desta forma, é possível melhorar a eficácia dos produtos atrativos e reduzir o risco de os insetos desenvolverem resistência aos químicos [44].

De forma a conhecer o que existe no mercado, realizou-se uma pesquisa acerca dos produtos comerciais baseados no uso de substâncias semioquímicas, desenvolvidos para programas de gestão do inseto vetor *M. galloprovincialis*, cujas informações se encontram reunidas na Tabela 1.

Na Tabela 1, pode verificar-se que o α -pineno tem sido um dos principais óleos essenciais usados na composição dos produtos comerciais atrativos para controlo do inseto vetor. Além do seu poder atrativo, fatores como a abundância, um dos compostos terpénicos emitidos em maior quantidade pelos pinheiros, e a fácil acessibilidade por extração tornam esta substância apelativa para o uso em produtos comerciais agrícolas [46]. Como se observa nos produtos apresentados na Tabela 1 é frequente utilizar misturas de α -pineno com outros semioquímicos, como por exemplo, substâncias caíromonais como o etanol, o ipsenol ou o ipsdienol [48, 50] e feromonas de agregação emitidas pelos insetos-macho da espécie *M. galloprovincialis*, como o 2-undeciloxi-1-etanol [49]. Deste modo, é possível obter um efeito sinérgico, melhorando a eficiência de atração para a captura dos insetos [44, 51].

Apesar de não se conhecerem produtos comerciais específicos para repelir os insetos *M. galloprovincialis*, óleos essenciais como o óleo de eucalipto, de cânfora ou de citronela, são algumas das substâncias mais usadas como repelentes de insetos [52]. O óleo de eucalipto é reconhecido pela sua atividade repelente, que tem vindo a ser demonstrada na literatura para diferentes espécies de insetos, designadamente mosquitos, baratas e besouros-da-batata [53], facto que se deve à presença de compostos o eucaliptol (1,8-cineole), citral, limoneno, γ -terpineno, etc. [42]. Embora o eucaliptol não seja o principal responsável pelas propriedades repelentes do óleo de eucalipto, quando é misturado com outras substâncias presentes no óleo, promove-se um efeito sinérgico que potencia a sua bioatividade [42]. Por outro lado, apesar de ainda não haverem evidências científicas sobre o efeito repelente deste óleo no inseto *M. galloprovincialis*, no trabalho desenvolvido por Faria, et al., 2013, foi demonstrado que o eucaliptol pode ser usado como nematodocida no controlo do NMP [54].

Tabela 1 - Produtos comerciais utilizados em programas de gestão do inseto vetor do NMP.

Formulações comerciais	Ação	Composto(s) Bioativo(s)	Características do produto	Outras observações	Ref
Galloprotect 2D® (SEDQ, Espanha)	Atrativa	<u>Cairomonas</u> : ipsenol, 2-metil-3-buten-2-ol <u>Feromona de agregação</u> : 2-undeciloxi-1-etanol	- <u>Tempo de utilização</u> : 45-50 dias - <u>Constituição</u> : 2 difusores de vapor independentes, constituídos por membranas permeáveis	- É recomendado a sua utilização em armadilhas de funil ou barreiras. Os difusores devem ser colocados em locais diferentes das armadilhas, de forma a mantê-los o mais separado possível.	a
Galloprotect Plus® (SEDQ, Espanha)	Atrativa	Galloprotect 2D® + α -pineno	- <u>Tempo de utilização</u> : 45-50 dias - <u>Constituição</u> : 3 difusores de vapor independentes. No difusor de α -pineno o óleo é colocado dentro de um frasco de plástico (Figura 2)	- Adequado para locais de grande densidade de insetos. O difusor de α -pineno deve ser colocado a meio da armadilha e é aconselhado que seja utilizada 1 armadilha em cada 100-150m.	a,b
Gallowit® (Witasek, Austria)	Atrativa	<u>Cairomonas</u> : α -pineno ipsdienol, ipsenol, cis-verbenol	Não disponível		[50], c
Gallopro Pinowit® (Witasek, Austria)	Atrativa	Não disponível	Não disponível		d
Monochamus lite combo lure #3053 (Synergy Semiochemicals Corp., EUA)	Atrativa	<u>Cairomonas</u> : (-) α -pineno, etanol, ipsenol, monocalamol	- <u>Tempo de utilização</u> : 60-90 dias - <u>Constituição</u> : Blister plástico (“Bubble”) com monocalamol	- <u>Taxa de libertação</u> : 1 mg/dia (a 20°C)	e

^a Liscampo, www.liscampo.com (consultado em 05/07/2018)^b Florigenese, www.florigenese.com (consultado em 13/09/2018)^c Vikersas, www.vitakersas.lt (consultado em 05/07/2018)^d Witasek, www.witasek.com (consultado em 07/07/2018)^e Synergy Semiochemicals Corporation, www.semiochemical.com (consultado em 07/07/2018)

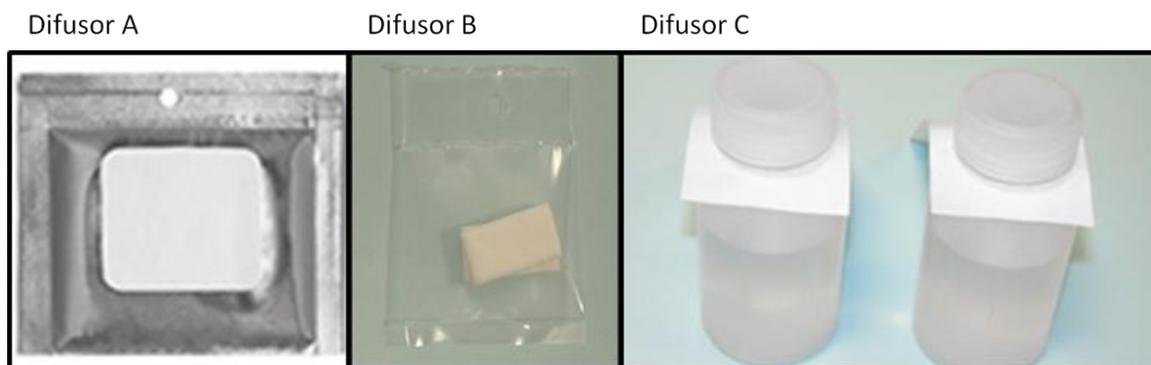


Figura 2 - Exemplo de formulações utilizadas em produtos comerciais atrativos no controlo do inseto *Monochamus galloprovincialis* (Galloprotect Plus®, SEDQ). Difusores: (A) ipsenol e 2-metil-3-buten-2-ol, (B) 2-undeciloxi-1-etanol, (C) α -pineno.

Além dos motivos apresentados, o óleo de eucalipto, considerado como não-tóxico nos EUA, onde é também reconhecido como substância GRAS (Geralmente Reconhecido Como Seguro) pela FDA, e aprovado pelo Conselho Europeu desde que utilizado em baixas concentrações (≤ 5 mg/kg) [42], torna-se ainda apelativo para utilização em Portugal pela abundância de culturas de eucalipto no país e pela facilidade de extração deste composto [1, 42].

As estratégias adotadas em programas de gestão de pragas desenvolvidas para o controlo de insetos resultam muitas vezes de combinações de estratégias envolvendo misturas de repelentes e atrativos (Figura 4) e, nos últimos anos, duas abordagens têm-se vindo a destacar pela sua eficácia no combate a insetos vetores. Designadas por *Lure and Kill* (Atrair e Matar) e *Push-Pull* (Empurra-Puxar), estas estratégias procuram impedir que os insetos alcancem as culturas de árvores e as colonizem. No entanto, enquanto na estratégia *Lure and Kill* são apenas usados atrativos integrados em armadilhas existentes no local, onde são capturados ou mortos [55], na estratégia *Push-Pull*, além dos atrativos, são também usados repelentes com o objetivo de afastar os insetos da área infetada, conduzindo-os para armadilhas ou outras áreas afastadas das culturas, sendo aí capturados ou extintos [29, 56].

As armadilhas usadas devem ter um *design* adequado, que permita simular o tronco das árvores, e específico para a espécie de interesse. As armadilhas do tipo multi-funil têm sido bastante usadas para capturar diferentes espécies de cerambicídeos [57]. Para a captura de insetos *M. galloprovincialis*, tanto estas armadilhas como as de painéis cruzados (Figura 3),

de silhueta preta ou transparentes, têm demonstrado ser eficazes, apresentando os maiores índices de captura destes insetos [15, 27].



Figura 3 - Exemplos de armadilhas aplicadas no controlo do inseto vetor *Monochamus galloprovincialis*. À esquerda: Armadilha do tipo multi-funil; à direita: armadilha do tipo painéis cruzados [58].

Por conseguinte, as formulações com compostos bioativos desenvolvidas para programas de gestão de pragas, além de ter uma boa biodisponibilidade e seletividade para os organismos-alvo, devem ser de baixo custo, ter uma duração adequada, i.e., que não implique a reaplicação frequente do produto, serem fáceis de manipular e, quando aplicável, serem fáceis de colocar nas armadilhas instaladas nas florestas [29, 59].

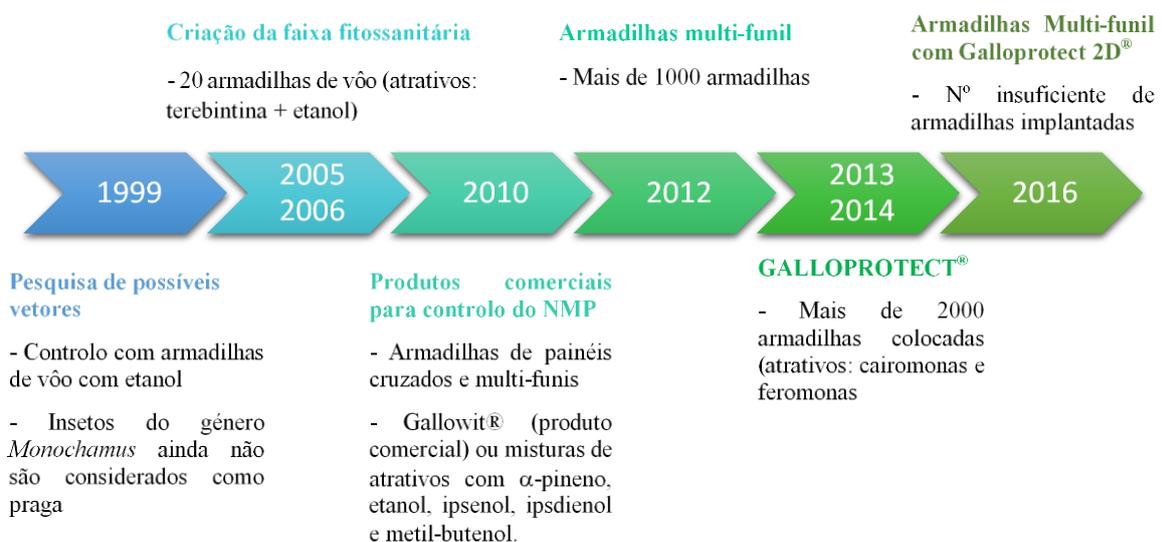


Figura 4 - Evolução das estratégias de controlo com armadilhas e compostos bioativos adotadas em Portugal, adaptado de ICNF (2013) [5].

1.3. Desenvolvimento de formulações com compostos bioativos para o inseto vetor

Apesar das vantagens associadas ao uso de semioquímicos como os óleos essenciais, em substituição de substâncias sintéticas, por serem substâncias químicas produzidas por organismos vivos, estão bastante sujeitos a variabilidade uma vez que a sua composição química depende de fatores como o estado fisiológico, a maturidade e o órgão da planta onde é sintetizado, das condições climáticas, do solo e das variações sazonais a que esta está sujeita, etc. [33]. Além disso, propriedades como o seu carácter altamente volátil e suscetível de sofrer alteração química e/ou biológica perante a exposição a fatores ambientais, como a radiação UV, a temperatura ou a fatores oxidativos [60, 61], fazem com que estas substâncias sejam rapidamente libertadas para o meio ambiente e, em geral, se degradem mais rápido do que as substâncias sintéticas [62]. Para que a sua utilização em estratégias de controlo do NMP seja eficaz, ainda é necessário ultrapassar algumas limitações, tais como questões relacionadas com a eficácia, a duração e o manuseamento do produto.

Por este motivo, é fulcral que a formulação do produto seja apropriada a substâncias altamente voláteis e sensíveis, conferindo-lhes proteção da influência de fatores de degradação, e permitindo que a sua libertação ocorra a uma concentração que esteja dentro dos limites de deteção do inseto, e a uma velocidade adequada ao tempo de duração desejada para o produto. Idealmente, estas formulações devem ser de baixo custo, facilmente aplicadas em conjunto com as armadilhas instaladas nos pinhais e permitir que a libertação dos compostos ocorra de forma controlada durante todo o período de vôo dos insetos, reduzindo assim os custos e esforços associados à manutenção e reaplicação destes produtos [63].

Apesar de em produtos comerciais como o Galloprotect® Plus (SEDQ, Espanha) os óleos essenciais têm vindo a ser utilizados no estado líquido, colocados dentro de recipientes plásticos que permitem a sua libertação através da entrada do frasco, a rápida volatilização dos óleos essenciais condiciona a duração do produto, sendo muitas vezes inferior ao tempo referido pelo fornecedor. Neste âmbito, as formulações de libertação controlada de ingredientes ativos têm demonstrado ser uma solução eficaz para suplantar muitas destas limitações. Em particular, no caso de óleos essenciais este tipo de formulações permite aumentar a biodisponibilidade, diminuir a taxa de volatilização prolongando o tempo de

libertação das formulações, melhorar a estabilidade química e térmica do produto e facilitar nas etapas de processamento, armazenamento e manuseamento [64].

Aerossóis, filmes, géis, tubos, saquetas e frascos de polietileno, dispositivos de membranas, fibras ocas, redes impregnadas e formulações à base de cera, são algumas das formulações sólidas utilizadas no controlo de pragas são alguns exemplos de formulações utilizadas para libertação controlada de semioquímicos [44, 56, 65]. A tabela 2 reúne alguns exemplos onde estas formulações foram aplicadas para controlo de pragas.

As formulações de libertação controlada mais comuns são limitadas pelo mecanismo de difusão, entre as quais, de acordo com a forma como o ingrediente ativo é incorporado na formulação, se podem distinguir sistemas do tipo reservatório, em que o ingrediente ativo se encontra concentrado no interior do sistema e que é envolvido por uma barreira difusional, ou em sistemas monolíticos, nos quais o ingrediente ativo se encontra disperso ou dissolvido, em geral, uniformemente numa matriz [66].

Em oposição às formulações que utilizam um grande volume de ingrediente ativo e que para isso fazem uso de grandes reservatórios, pode ser interessante ter uma matriz que permita carregar um volume de ingrediente ativo inferior ao utilizado nos reservatórios e que ao mesmo tempo essa própria matriz favorecesse a libertação. Deste modo, conseguir-se-ia melhorar o produto ao economizar a quantidade de ingrediente ativo aplicada na formulação e ainda ter um produto de menores dimensões. Isto pode ser possível através do uso de materiais porosos nos quais o ingrediente ativo se encontra disperso na matriz.

Os sistemas monolíticos macroporosos têm vindo a ser utilizados em diversas aplicações em áreas como a engenharia de tecidos e a libertação de fármacos ou de agroquímicos [67-69]. Nestes materiais, a difusão do composto ocorre essencialmente através dos poros da matriz e depende de parâmetros como o coeficiente de difusão do ingrediente ativo, que está diretamente relacionado com a geometria do sistema (esférica, cilíndrica ou em filme) [70], o tamanho de poros e a porosidade [66].

Tabela 2 - Formulações desenvolvidas para libertação controlada de semioquímicos para controlo de pragas.

Formulação	Composto(s) bioativo(s)	Espécies-alvo / Local de aplicação	Limitações	Ref
Filmes de proteína de soja isolada (biodegradáveis)	Óleo essencial: óleo de citronela	- Mosquitos da fruta mediterrânicos (<i>Ceratitis capitata</i>)	Redução da bioatividade do óleo depois de formulado.	[71]
Matriz sólida de base de cera	Feromonas de agregação	- Broca da raiz da uva (<i>Vitacea polistiformis</i>). - Local: Vinha	A eficácia do produto requer a aplicação manual de uma grande quantidade de difusores.	[72]
Tubos de polietileno	Feromonas de agregação	- Traça da fruta oriental (<i>Grapholita molesta</i>) e Mariposa-das-maçãs (<i>Cydia pomonella</i>) - Local: Pomar	-	[73]
Vídeos de sílica porosa impregnados	Feromonas	- Traça da fruta oriental (<i>G. molesta</i>) e Mariposa-do café (<i>Leucoptera coffeella</i>) - Local: Plantações de café e pomares	-	[74]
Micropartículas biodegradáveis para incorporação num substrato poroso ou para pulverização aérea	Feromonas sexuais: 1,2-epoxyoctadecane e 1-dodecanol	- Mariposa-das-maçãs (<i>C. pomonella</i>) e Mariposa-cigana (<i>Lymantria dispar</i>)	-	[75]
Fibras ocas	-	- Traça do tomateiro (<i>Keiferia lycopersicella</i>) - Local: Plantações de tomate	Requer aplicação manual das fibras, difícil manuseamento e grandes custos associados.	[76]
<i>Puffer</i> (dispensor)	Feromonas	- Traça (<i>Spodoptera exigua</i>)	Para grandes áreas agrícolas, requer a aplicação de uma grande quantidade de difusores.	[77]

Estas matrizes são constituídas por poros de diferentes dimensões, que se podem distinguir de acordo com o seu diâmetro (d) em micro ($d < 2 \text{ nm}$), meso ($2 < d < 50 \text{ nm}$) ou macroporos ($d > 50 \text{ nm}$), e de acordo com a quantidade de poros que apresentam, podem ser de alta, média ou baixa porosidade. Além disso, estes poros podem estar interconectados, permitindo a difusão do ingrediente ativo através da matriz, ou podem estar separados impedindo o fluxo da matéria nestes incorporada através da matriz, designados poros cegos [78].

A porosidade e tamanho de poros estão relacionados com a área de superfície específica e são fatores limitantes da transferência de massa do ingrediente ativo na matriz. Assim, quanto maior for o tamanho de poros e menor for a porosidade da matriz, menor será a área de superfície específica e menor será a taxa de difusão do ingrediente ativo [79].

Deste modo, com materiais macroporosos consegue-se alcançar uma menor taxa de libertação do que em materiais micro ou mesoporosos, uma vez que estes últimos apresentam uma grande área de superfície específica. Por conseguinte, o uso de materiais macroporosos permite obter um produto com um maior tempo de duração do produto.

No entanto, a porosidade e a área de superfície específica afetam não só a difusão e a taxa de libertação mas também a capacidade de carregamento de ingrediente ativo na matriz [80], sendo que quanto menor for a porosidade e área de superfície específica, menor será a quantidade de composto incorporado na formulação.

Deste modo, através do controlo destes parâmetros, porosidade e área de superfície específica, é possível controlar a taxa de libertação e a capacidade de carregamento de ingrediente ativo na formulação, de forma a obter um produto com o tempo de duração e uma taxa de libertação desejadas. De acordo com os dados encontrados na literatura, o tempo médio de duração dos produtos comerciais é de 6 semanas [26, 81] e a taxa de libertação deve estar entre 0,32 e 1000 mg/dia [48, 81].

A produção de materiais monolíticos porosos tem sido feito através de técnicas como o *solvent casting* e a extrusão ou moldagem a quente [82]. No entanto, a estas técnicas estão associadas limitações como, no caso do *solvent casting*, o uso de solventes orgânicos, havendo o risco do produto final conter resíduos deste solvente [82], ou a necessidade de utilizar elevadas temperaturas durante o processamento, como no caso da extrusão a quente da PCL que requer o uso de temperaturas próximas de 80°C [83] e que, devido à natureza

termolábil dos óleos essenciais, pode conduzir à volatilização e à degradação destas substâncias. Neste âmbito, o uso de tecnologias de processamento com fluidos supercríticos, têm recebido cada vez mais atenção [84]. Esta é uma tecnologia mais ecológica que os processos convencionais, não exigindo o uso de solventes perigosos para o meio ambiente. Além disso, uma vez que o fluido supercrítico atua como um solvente e reduz as interações intermoleculares entre as cadeias poliméricas, as temperaturas de fusão e de transição vítrea dos materiais diminuem e, desta forma, consegue-se operar em condições de temperatura mais baixas e minimizar as perdas por volatilização dos compostos durante o processo [82, 85, 86]. O CO₂ supercrítico tem sido um dos solventes mais utilizados, em especial por ser inerte, e por isso não reagir com o polímero ou com o composto bioativo, e não ser tóxico [87, 88], o que o torna interessante para produção de materiais para aplicação agrícola [89, 90].

1.4. Estratégias para controlar a difusão do(s) composto(s) bioativo(s)

Além da geometria do sistema e da porosidade, a difusão do ingrediente ativo através da matriz depende ainda da seleção dos materiais que constituem a formulação.

Tendo em conta a aplicação em estudo e a natureza dos óleos essenciais, deve optar-se por materiais estáveis durante o tempo de utilização, compatíveis com o ingrediente ativo e que permitam a sua libertação da matriz sem reagir com este. Além destas características, os materiais não devem ser tóxicos para o meio ambiente e devem ser de baixo custo e fáceis de produzir ou obter, uma vez que podem ser necessários em grandes quantidades [91].

A crescente preocupação com o meio ambiente exige o uso de polímeros biodegradáveis na produção de dispositivos agrícolas. Deste modo, além de permitir que a libertação para o meio ambiente decorra de forma controlada, o(s) polímero(s) utilizado(s) deve(m) degradar-se de forma espontânea no meio ambiente por influência de fatores como a luz visível e UV, a temperatura, o vento, a humidade e a presença de outros agentes bióticos [89].

Em relação aos materiais poliméricos que podem ser utilizados na produção dos materiais porosos com semioquímicos, apesar de polímeros biodegradáveis de origem natural, como o quitosano, a gelatina, o colagénio e alginatos terem vindo a ganhar destaque no mercado

[92], limitações como a grande variabilidade a que estão sujeitos, o custo elevado e a dificuldade em processá-los, e a instabilidade que tendem a desenvolver ao longo do tempo, ainda condicionam a sua aplicação [93, 94]. Para aplicações agrícolas ainda é dada preferência à utilização de polímeros biodegradáveis de origem sintética como os poliésteres, os polianidridos e as poliuretanas [95, 96]. Os polímeros sintéticos apresentam ainda vantagens como uma maior reprodutibilidade e uma maior facilidade em controlar e prever a composição química e o comportamento da matriz ao longo do tempo [93].

Em particular para o processamento de formulações com compostos voláteis, tem sido dada preferência a polímeros da classe dos poli(α -ésteres), como a poli-(ϵ -caprolactona) (PCL), o poli(ácido láctico) (PLA), o poli(ácido glicólico) (PGA) e o poli(ácido láctico-coglicólico) (PLGA). A sua grande afinidade com o CO₂ e as baixas temperaturas de fusão e transição vítrea, que no caso da PCL são respetivamente de 60-64°C e -60°C [97], permitem a aplicação do método de *foaming/mixing* para a produção de matrizes porosas [98, 99].

Durante o processamento destes sistemas com materiais poliméricos, o ingrediente ativo pode ficar incorporado adsorvido à superfície da matriz, volatilizado dentro dos poros ou ainda dentro da rede polimérica (Figura 5). A entrada do ingrediente ativo nas cadeias polimérica é consequência da diminuição da temperatura de transição vítrea (T_g) do polímero durante o processamento, conduz a um aumento da mobilidade das cadeias, causando a expansão da rede polimérica e possibilitando assim a entrada do composto na matriz por dissolução e a sua difusão pela rede [66].

Deste modo, quando o material poroso é colocado no ambiente e fica exposto à influência dos fatores que causam a sua degradação, a par da transferência de massa que ocorre pela convecção das moléculas de ingrediente ativo à adsorvida na superfície da matriz, e da difusão das moléculas incorporadas nos poros interconectados da matriz, ocorre ainda a difusão das moléculas retidas nos poros cegos da matriz e nas cadeiras poliméricas [100].

Uma vez que, o aumento da porosidade da matriz contribui tanto para a velocidade de difusão do ingrediente ativo como para a velocidade de degradação das matrizes porosas, entende-se que a através do controlo deste parâmetro é possível controlar a cinética de libertação da formulação.

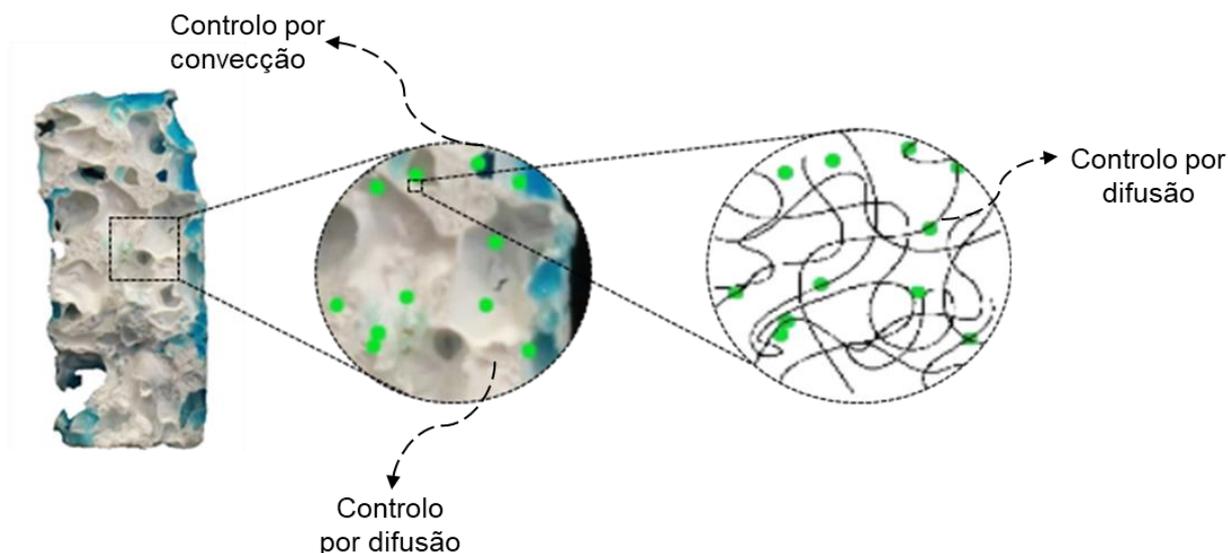


Figura 5 - Representação esquemática dos mecanismos envolvidos na libertação de compostos voláteis (•) através de matrizes poliméricas porosas.

Assim, além da seleção do material polimérico, têm sido adotadas estratégias que permitem controlar a difusão e a degradação dos materiais porosos através do controlo de parâmetros como a porosidade a fim de alcançar um perfil da cinética de libertação adequado às especificações de desempenho do produto. Algumas destas estratégias recorrem ao uso de aditivos no processamento das matrizes poliméricas, tais como plastificantes, solventes porogénicos [101, 102] materiais de enchimento [103, 104] ou ainda há aplicação de um revestimento [105]. Para esta aplicação em específico, a adição de materiais de enchimento pode ser uma estratégia interessante uma vez que permite controlar tanto a taxa de libertação e a capacidade de carregamento de óleo na matriz como ainda promover a degradabilidade das formulações.

Em suma, embora o uso de produtos comerciais de compostos semioquímicos, como o *Galloprotect 2D[®] ou Plus* (SEDQ, Espanha) ou o *Gallowit[®]* (Witasek, Áustria) em associação com armadilhas, pareça ser uma estratégia de controlo promissora no combate ao inseto vetor do NMP [106], ainda é necessário ultrapassar limitações como a baixa eficácia no controlo dos insetos derivado da baixa eficiência em manter a libertação dos compostos com atividade biológica em níveis de concentração dentro dos limites de deteção dos insetos, por períodos de tempo superiores a 6 semanas e a dificuldade de reaplicação dos produtos.

Assim, o objetivo deste trabalho é desenvolver novas formulações de base polimérica, biodegradáveis, para serem aplicadas em conjunto com armadilhas florestais comerciais, e que permitam controlar a liberação de compostos semioquímicos naturais, com atividade atrativa ou repelente para o inseto vetor do NMP, por um período superior a 6 semanas e uma taxa de liberação entre 0,32 e 1000 mg/dia.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Materiais

A poli-(ϵ -caprolactona) (PCL), adquirida na forma de *pellets* com um peso molecular (M_w) de $45000\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$, a acetona (pureza $\geq 99,5\%$), o α -pineno (pureza $\geq 97\%$) e o eucaliptol (pureza $\geq 99\%$) foram obtidos da Sigma-Aldrich. O metanol HPLC (pureza $\geq 99,9\%$) usado na preparação dos pós de PCL foi fornecido pela Carlo Erba. A serradura de pinheiro foi obtida de uma serração local e a cera de carnaúba com pureza do Tipo 1 da Stévia Comercial Ltda (Brasil). O CO_2 (pureza $\geq 99,998\%$ (v/v)), utilizado durante o processo de *foaming*, foi fornecido pela Praxair (Espanha). Em relação aos materiais testados para o revestimento, a resina Polidisp 6320 foi obtida da Resiquímica, a resina da Ceska[®]WL da CSK Food Enrichment, a cera Paradip[™] Red L2 da Paramelt e a parafina e a estearina da Glicerina e Parafinas de Portugal. Também as fibras SPME PDMS/DVB Stableflex e PDMS/DVB CAR, utilizadas durante os ensaios de cromatografia gasosa, foram obtidos da Supelco – Sigma-Aldrich. Por último, o acetato de etilo LC-MS (pureza $\geq 99,7$) e o NaOH, obtido em *pellets*, foram adquiridos, respetivamente, da Fluka e da Akzonobel Eka.

Tabela 3 - Propriedades e características de interesse de alguns dos materiais usados.

Composto	Fórmula química	Densidade ($\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$)	Outras propriedades	Ref.
α -pineno	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}$	0,859 (a 20°C)	$T_f = -55^\circ\text{C}$; $T_e = 155-156$	[107]
Poli-(ϵ -caprolactona) (PCL)	$(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_2)_n$	1,145	$T_f = 58-60^\circ\text{C}$; $T_g = -60$	[86]
Dióxido de Carbono	CO_2	0,85 (a 45°C e 189bar)	Ponto Crítico: $P_c = 73,8$ bar; $T_c = 31,1^\circ\text{C}$	[108]
Cera de carnaúba	-	0,97	$T_f = 82-86^\circ\text{C}$	-
Serradura de pinheiro	-	-	-	-

2.2. Processamento das formulações

As formulações desenvolvidas funcionam como difusores de α -pineno (Figura 6) e consistem em compósitos compostos por um polímero biodegradável (PCL) e cera de carnaúba ou serradura, em diferentes proporções. As matrizes foram processadas por *foaming/mixing* com CO₂ supercrítico de forma a obter uma matriz porosa e cilíndrica. A PCL é um poliéster semi-cristalino, insolúvel em água e com baixas temperaturas de fusão e transição vítrea e um comportamento hidrofóbico, apresentado por isso afinidade com os óleos essenciais [85, 108]. Além disso, este polímero de baixo custo [109], já foi utilizado em diversos trabalhos para o processamento de formulações para indústrias como a farmacêutica, cosmética e agroquímica [109-112], em particular, recorrendo à tecnologia de *foaming* com scCO₂ [113-116].

Uma vez que a adição de diferentes materiais resulta em diferentes interações da matriz tanto com o α -pineno como no ambiente, com a adição cera ou serradura procura-se aumentar o carregamento de α -pineno na matriz, modular a cinética de libertação do volátil, prolongando o tempo de libertação da formulação, e favorecer a degradação da matriz no meio ambiente. A seleção destes materiais teve por base a sua origem natural e o facto de não representarem um risco para o meio ambiente e estarem disponíveis no mercado a um baixo custo. Além disso, a serradura de pinheiro é um dos principais resíduos da indústria da madeira [117] e a cera é um composto comercial lipofílico, com óleos essenciais na sua constituição, já utilizado em diversas indústrias, incluindo em formulações para controlo de pragas [103, 118].

Por fim, e ainda com o objetivo de controlar a libertação do α -pineno, as matrizes polimérica foram revestidas com uma película de uma resina de base aquosa comercial, permeável à saída do óleo.

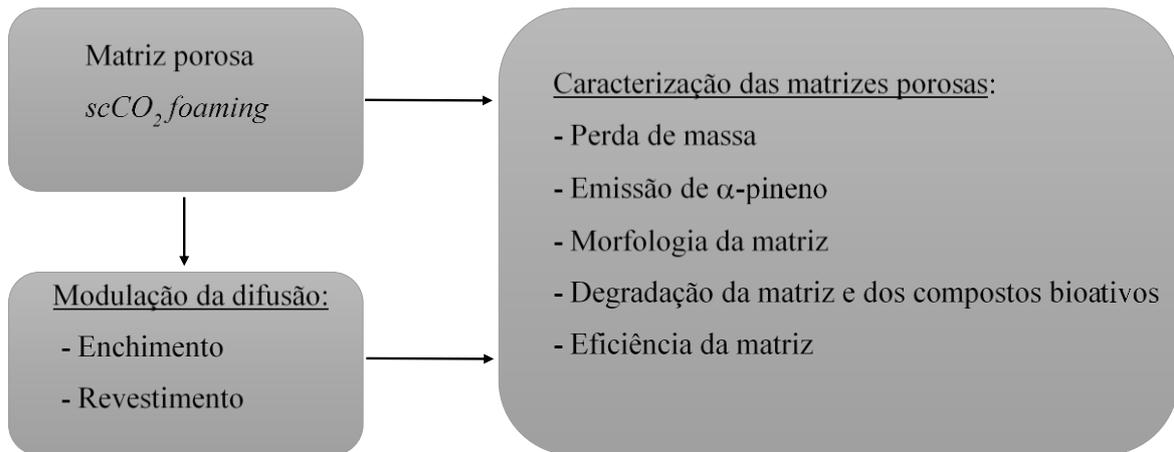


Figura 6 - Diagrama de desenvolvimento de um difusor de α -pineno.

Pré-preparação dos materiais

Numa primeira etapa, foi necessário transformar *pellets* de PCL em pós com uma distribuição de tamanhos entre 500 e 850 μm , seguindo a metodologia descrita por Matos (2013) [115]. A serradura foi previamente seca numa câmara a 25°C, de forma a diminuir o teor de humidade e, assim como a cera, foi seleccionada para obter partículas com a mesma distribuição de tamanhos dos pós de PCL. Posteriormente, as partículas de cera ou serradura foram misturadas com o volume de α -pineno que foi mais tarde utilizado no processamento dos materiais compósitos. As partículas de cera ou serradura ficaram imersas no α -pineno por um período de 12 h, para que ficassem saturadas de óleo antes do processamento e, só após este tempo foram adicionados os pós de PCL.

Processamento com CO₂ supercrítico

O processamento dos difusores de α -pineno com as composições indicadas na Tabela 4, foi feito de acordo com os trabalhos de Churro (2015) e Rosa (2013) [113, 114], a uma pressão de 189 bar e a 45°C [68]. As amostras foram deixadas em contacto com o scCO₂ durante 2h e a despressurização da célula foi feita a uma taxa de 10bar/min [68]. Foram produzidas pelo menos duas réplicas para cada ensaio.

Tabela 4 - Composição das diferentes formulações processadas.

Composição	Formulação (PCL : α -pineno : cera : serradura)
(1) PCL	(1 : 0 : 0 : 0)
(2) PCL + α -pineno	(1 : 1,02 : 0 : 0)
(3) PCL + cera + α -pineno	(0,70 : 0,30 : 0 : 1,02)
(4) PCL + serradura + α -pineno	(0,85 : 0 : 0,15 : 1,02)
(5) PCL + serradura + α -pineno	(0,75 : 0 : 0,15 : 1,02)
(6) PCL + serradura + α -pineno	(0,80 : 0 : 0,25 : 0,25)

Pós-processamento

As matrizes com α -pineno, depois de processadas, foram pesadas e mantidas numa câmara a 25°C, dentro de frasco hermeticamente fechado e previamente saturado com α -pineno, de forma a evitar a saída de composto volátil devido ao gradiente de concentração que se formaria com o exterior, até posterior utilização.

Com o objetivo de criar uma nova resistência à saída do composto volátil da matriz e prolongar o tempo de libertação do difusor, foram feitas réplicas das formulações com composição (2), (3) e (4), às quais foi adicionada uma película de resina à superfície externa. Optou-se por apenas fazer o revestimento das amostras com a mesma massa da composição inicial (1 g) de forma a ser comparável o efeito do revestimento na modulação da difusão do composto volátil.

Para a seleção do material do revestimento, foram previamente testados diferentes materiais que incluíram materiais naturais e sintéticos, tipicamente usados em revestimentos de formulações na indústria alimentar (ANEXO I). Tendo em conta o objetivo da formulação e a aplicação em estudo, o material ideal deveria cumprir requisitos como: ser biodegradável e, assim como os seus produtos de degradação, não ser nocivo para o ambiente, ser permeável à saída do composto volátil, ter afinidade com a matriz, permitindo a sua adesão mas sem ocorrer reação com a matriz ou com o ingrediente ativo e, por fim, formar soluções de baixa viscosidade. De um ponto de vista mais técnico, este material deveria ser de baixo custo, fácil de aplicar e secar, de forma a não ocorrerem grandes perdas de voláteis durante

o processo [86]. Depois de uma análise a todos estes fatores, optou-se por utilizar uma resina com 45% de sólidos, constituída por copolímeros de vinil-acetato e éster dibutílico de ácido maleico. A resina Polidisp 6320 (Resiquímica) foi utilizada com uma diluição de (5:1), de forma a tornar a mistura menos viscosa e mais fácil de aplicar, de secar e formar películas de menor espessura.

As matrizes poliméricas foram revestidas pelo método de *deep-coating* e foram secas utilizando 2 secadores de 1900 W, na posição 2, durante 15 min. Os secadores foram colocados em lados opostos e a cerca de 30cm da amostra, criando-se uma atmosfera envolvente a uma temperatura de, aproximadamente, 30 °C. As amostras foram pesadas antes e depois do revestimento ser aplicado.

É de notar que as formulações às quais foi aplicado o revestimento são identificadas por (*).

2.3. Caracterização dos materiais desenvolvidos

2.3.1. Análise morfológica e física

Nesta etapa foram realizados um conjunto de análises e testes de forma a compreender a micro e a macroestrutura das matrizes produzidas, bem como outros parâmetros físicos que permitissem analisar a capacidade de carregamento e a taxa de libertação das formulações e a degradabilidade do produto final. As amostras foram analisadas em duplicado.

A Tabela 5 reúne um resumo dos parâmetros determinados e da respetiva técnica, especificações e equipamento usado nos ensaios.

Tabela 5 - Técnicas e respetivo equipamento, especificações utilizadas para a determinação de parâmetros para caracterizar morfológica e fisicamente os materiais porosos produzidos.

Técnica	Equipamento	Especificações	Parâmetros determinados
Microscopia Eletrónica de Varrimento (Scanning Electronic Microscopy, SEM)	Gemini2, ZEISS e Vega3, Tescan	- Voltagem: 5 kV - Revestimento de ouro e paládio de < 5 nm, durante 30 s - Ampliações: 50 k, 200 k, 500 k, 1000 k, 2000 k	- Distribuição de tamanho de poros - Porosidade - Área total de poros - Densidade <i>skeletal</i> - Densidade <i>bulk</i>
Intrusão de mercúrio	AutoPore IV 9500 Micromeritics	-	- Área de superfície (BET) - Volume de poros - Diâmetro médio de poros
Adsorção de azoto	ASAP 2000 Micromeritics, modelo 20Q-34001-01	-	- Temperatura de fusão (T_m) e de degradação (T_D) - Entalpia de fusão ($\Delta H_f(T_m)$) - Cristalinidade (X_c)
Análise diferencial térmica simultânea (Simultaneous Differential Thermal Analysis, SDT)	TA Q600	- Caudal de azoto: 100 ml/min - $T=25\text{ }^\circ\text{C}$ - Rampa de aquecimento: $10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ até aos $600\text{ }^\circ\text{C}$	

2.3.2. Cinética de libertação do α -pineno

A análise do perfil de libertação de α -pineno pelos difusores foi feita por duas vias: através da perda de massa das amostras e da concentração e análise dos voláteis emitidos ao longo do tempo. Para isso, recorreu-se à análise gravimétrica e cromatográfica das amostras, e à técnica de microextração em fase sólida (SPME). As amostras foram analisadas em duplicado para a técnica de gravimetria, enquanto que para a cromatografia foi analisada apenas uma amostra de cada composição.

2.3.2.1. Análise gravimétrica

As amostras analisadas por esta técnica foram retiradas do frasco saturado com α -pineno, onde foram mantidas por um período de 12 h, à exceção das amostras sem α -pineno, e passaram a ser pesadas numa balança analítica, a cada hora, durante as primeiras oito horas, e a cada 24 h nas duas semanas seguintes – período a partir do qual a perda de massa de dia para dia deixou de ser significativa. Após este tempo, as amostras foram pesadas de 1 em 1 semana durante 7 semanas, sendo que depois deste tempo de ensaio os valores se mantiveram constantes. No entanto, ao fim de 25 dias de ensaio, uma réplica de cada amostra foi analisada por cromatografia gasosa, recorrendo à técnica SPME, com o objetivo de avaliar se continuava a ocorrer libertação de α -pineno, uma vez que esta técnica é seletiva, mais sensível e tem um limite de deteção maior.

Durante o tempo de ensaio as amostras foram deixadas expostas ao ar, numa sala onde a temperatura média durante o tempo do projeto manteve-se a 19 °C. A porta da sala foi deixada aberta de forma a fomentar a circulação do ar.

A partir dos resultados obtidos, foi possível calcular a eficiência de incorporação de α -pineno durante o processamento, definida pela massa de α -pineno incorporada, que se considerou ser igual à massa de α -pineno utilizada na preparação da amostra (1,02 g).

Para conhecer o perfil de libertação de voláteis de cada amostra, a partir dos dados obtidos gravimetricamente, foram determinados os parâmetros que caracterizam a cinética de libertação aplicando o modelo de Korsmeyer-Peppas'. Este modelo, baseado na Lei de Fick para a difusão, foi aplicado aos dados obtidos pela análise gravimétrica e que correspondem

a uma libertação igual ou inferior a 60% ($M_t/M_\infty \leq 0,6$) [119]. O modelo, que pode ser aplicado a matrizes de geometria cilíndrica insolúveis em água, é descrito pela equação (1) onde M_t traduz a massa de voláteis emitida num tempo t , M_∞ à massa total libertada, k é uma constante cinética relacionada com a estrutura e geometria do dispositivo e n é um parâmetro relacionado com o mecanismo de libertação.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad (1)$$

2.3.2.2. Análise cromatográfica (SPME – GC-MS/FID)

Com o objetivo de simular como decorreria a libertação de α -pineno pelo produto quando exposto às condições do meio ambiente, as amostras foram colocadas num túnel de vento com uma atmosfera envolvente mais aproximada da que se faz sentir nas florestas. De forma a inferir sobre a concentração de α -pineno que era libertada pela formulação ao longo do tempo, recorreu-se à técnica de SPME e à análise cromatográfica por GC/MS-FID.

Na Figura 7 encontra-se esquematizado o sistema do túnel utilizado. A amostra foi colocada a 25 cm da entrada de um túnel de PVC, de geometria cilíndrica, e com 2m de comprimento e 20 cm de raio. Na entrada do túnel foi colocada uma ventoinha que cria uma corrente de vento de 0,4 m/s. A outra extremidade do túnel foi direcionada para uma *hotte* (HL-ST01 Laborial). O ensaio decorreu a uma temperatura média de 20 ± 5 °C.

Para o cálculo da concentração de α -pineno emitido ao longo do tempo pela técnica de SPME, foram expostas fibras de SPME ao ambiente do túnel (a 1,75 m da entrada do túnel e a 6cm de distância da parede) em intervalos de tempo regulares. O tempo de exposição das fibras (tempo de sorção) foi de 30s. As fibras foram, posteriormente, analisadas por cromatografia gasosa, utilizando o equipamento GC (7890 Agilent Technologies) acoplado a um detector FID, e uma coluna DB5 (30 m x 320 μ m x 0.25 μ m). O solvente hélio foi mantido a um caudal de 1,02 mL/min. A temperatura do injetor foi de 250 °C, temperatura do detector de 300 °C, com taxa de aquecimento de 3 °C/min, a partir de 60 até 105 °C [130]. Para a análise das fibras, o tempo de exposição (tempo de dessorção) foi de 3min e o tempo total de corrida foi de 14,30 min. Antes do início de cada ensaio foi feito um branco do túnel e das fibras SPME de forma a saber se os compostos presentes no túnel e nas fibras poderiam aparecer no espetro com o mesmo tempo de retenção que o α -pineno, evitando assim uma

sobre-quantificação da concentração de composto volátil emitida. Pelo mesmo motivo, além de no início do ensaio, foram feitas limpezas das fibras a cada 24 h.

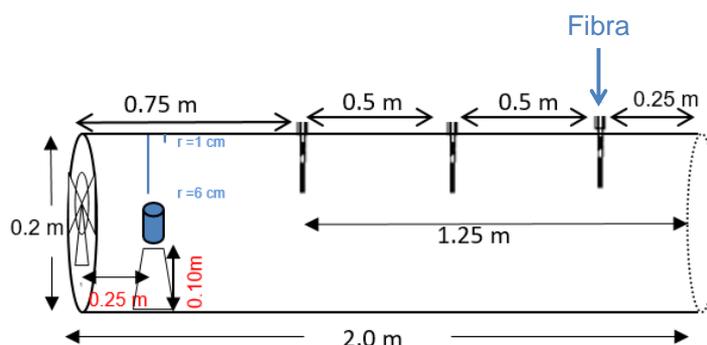


Figura 7 - Esquema ilustrativo do túnel de vento utilizado no ensaio para avaliar a libertação de α -pineno em condições de vento controladas.

2.4. Degradação dos bioativos e do produto final

Degradação dos bioativos: α -pineno e eucaliptol

Diversas investigações têm sido feitas acerca do efeito de fatores ambientais como a radiação e a temperatura na degradação de óleos essenciais como o α -pineno, o que poderia influenciar a eficácia do produto apresentado neste projeto [120]. Com o propósito de avaliar o comportamento do α -pineno durante o tempo de aplicação em campo e perante a exposição a estes fatores, foram realizados testes onde se sujeitaram diferentes amostras de óleo à incidência de radiação UV e a diferentes temperaturas (25 °C e 40 °C). Além do α -pineno, foi também estudado o efeito no eucaliptol, uma vez que este óleo poderia vir a ser incorporado em formulações semelhantes às desenvolvidas, para casos em que o produto funcionasse enquanto repelente de insetos.

Para avaliar a influência da radiação, foram preparadas diluições de 1 mg/mL de α -pineno em acetato de etilo, das quais foram retirados 4 mL e inseridos em frascos de vidro transparentes. Estes frascos foram selados e colocados dentro de uma câmara UV (BS-02), constituída por quatro tubos de cada tipo de radiação, UVB e UVC. O ensaio foi feito à temperatura ambiente e os frascos foram colocados deitados, de forma deixar exposta a

maior área de líquido possível. Foram feitas 2 réplicas de cada amostra, que foram retiradas da câmara em diferentes intervalos de tempo, tal como indicado na Tabela 6.

Para o estudo do efeito da temperatura, o procedimento foi semelhante. Contudo, os frascos de vidro das amostras colocadas em câmaras a 25 ou a 40 °C foram embrulhados em folha de alumínio, para que não houvesse influência da exposição à radiação. As temperaturas usadas no ensaio foram definidas de acordo com a temperatura mínima e máxima atingidas ao longo do dia nas florestas portuguesas (24 °C e cerca de 40 °C, respetivamente) [121].

A composição das amostras foi determinada por cromatografia gasosa, recorrendo ao GC/MS e a influência na degradação dos óleos à exposição destas condições foi avaliada comparando os espectros das amostras que tinham sido sujeitas a diferentes tempos de exposição.

Neste ensaio foi utilizado o equipamento GC acoplado a um detector de massa (7890 Agilent Technologies) e uma coluna DB5-MS (30 m x 250 µm x 0.25 µm). O solvente hélio foi mantido a um caudal de 1mL/min. A temperatura do injetor foi de 250 °C, o foi mantido a 50 °C por 5 min com aquecimento de 10 °C/min até 270 °C, temperatura à qual fica por 5 min.

Tabela 6 - Identificação das condições de temperatura ou radiação a que as amostras de α -pineno e eucaliptol foram sujeitas e o respetivo tempo a que esteve exposta a estes fatores.

Condições de teste	Tempo de exposição (h)
Controlo	-
	24 (1 dia)
25°C	168 (1 semana)
	5040 (1 mês)
	24 (1 dia)
	168 (1 semana)
40°C	336 (2 semanas)
	5040 (1 mês)
	5184 (1 mês e 6 dias)
	24 (1 dia)
Radiação	
UVB+UVC	168 (1 semana)
	5040 (1 mês)

Degradação do produto final

De forma a analisar como decorreria a degradação do produto final, quando sujeito às condições do meio ambiente, foi realizado um teste de degradação hidrolítica acelerada que seguiu a metodologia descrita por Lam et al. (2008) [122]. De forma a garantir a humidificação de toda a amostra, antes do início do ensaio, 2 réplicas de cada amostra foram pesadas ($m_{\text{amostra seca}}$), passadas por uma seringa com água MiliQ e deixadas imersas por um período de 12 h. As amostras foram novamente pesadas ($m_{\text{amostra húmida}}$) e, posteriormente, imersas em 100 mL de uma solução de NaOH 5 M e deixadas num *termoshaker* (THO 500/1, Gerhardt Analytical Systems) a 100 rpm e a 37 °C. Para avaliar a perda de massa ao longo do tempo, as amostras foram pesadas em intervalos de 1 h durante as primeiras 8 h e a cada 4 h nos dias seguintes até que não se verificasse perda de massa significativa.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Embora a proposta inicial deste projeto incluísse a preparação de formulações com compostos atrativos e repelentes para o inseto vetor do NMP, dado o tempo disponível para a sua realização, apenas foi possível estudar e desenvolver formulações com o α -pineno.

Este capítulo será focado no estudo das propriedades físicas e morfológicas dos difusores de α -pineno desenvolvidos e que permitem avaliar o seu desempenho e duração, tendo em conta o objetivo do projeto de conseguir carregar a matriz porosa com uma quantidade de α -pineno suficiente e controlar a sua libertação para o meio ambiente de forma a obter um produto final com uma taxa de libertação constante, entre 0,32 e 1000 mg/dia [48, 81], em concentrações eficientes e por um longo período de tempo (superior a 6 semanas). Estes parâmetros foram estabelecidos de acordo com os produtos comerciais atualmente usados no controlo do inseto vetor *M. galloprovincialis*.

3.1. Caracterização morfológica

Análise macroscópica e microscópica

Nas Figuras 8 e 9 são apresentadas imagens macro e microscópicas, respetivamente, das estruturas produzidas, onde se podem distinguir as diferenças morfológicas causadas pela adição de outros compostos como o α -pineno, a cera, a serradura e a película de revestimento, às matrizes de PCL.

Analisando as diferenças morfológicas das matrizes porosas processadas com 1 g de PCL (Figura 8A), torna-se evidente que com a adição de α -pineno à matriz se obtém estruturas com maior volume, nomeadamente maior altura, e com poros de maiores dimensões. Este efeito porogénico do α -pineno pode ser comprovado tanto nos resultados obtidos por SEM (Figura 9), como nos resultados obtidos por intrusão de mercúrio e adsorção de azoto, nomeadamente pela maior área total de poros e pelo maior volume de poros que a formulação (1: 0 : 0 : 1,02) apresenta quando comparado com os da formulação (1: 0 : 0 : 0) que serão mais à frente discutidos.

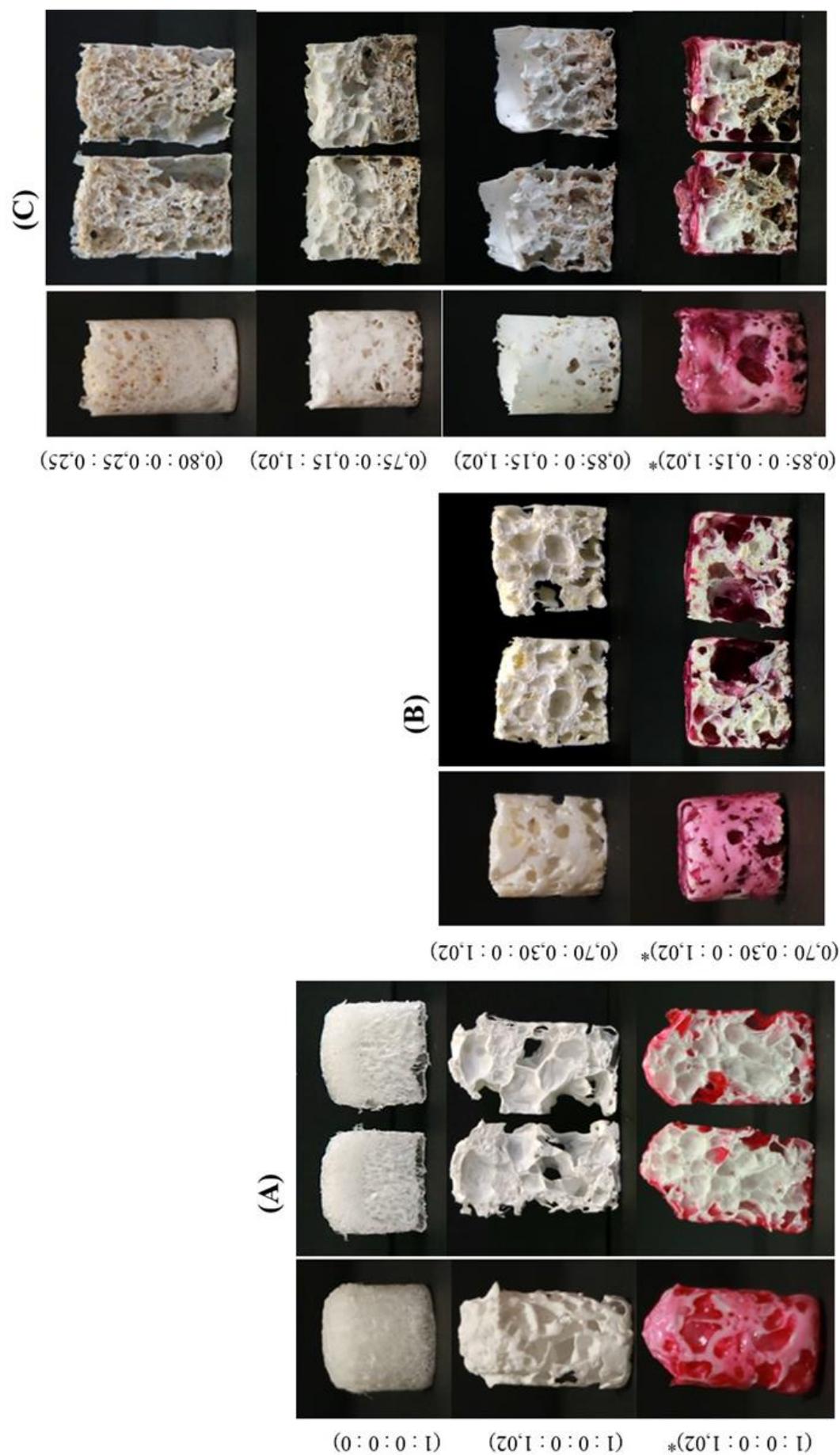


Figura 8 - Imagens macroscópicas das matrizes porosas. Constituição da matriz: PCL (A), PCL e cera (B); PCL e serradura (C).

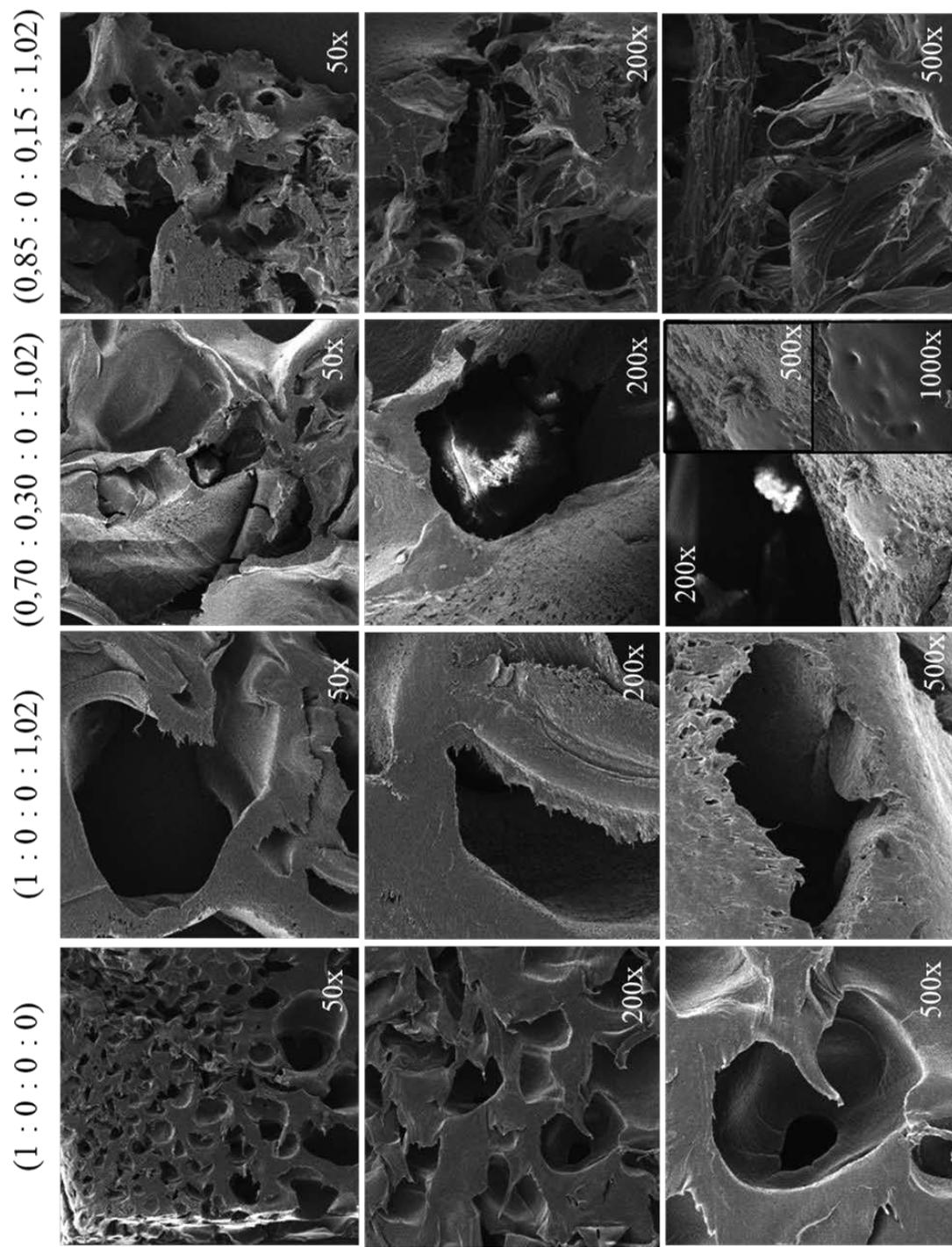


Figura 9 - Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varrimento (SEM) das formulações sem revestimento.

Ainda nas imagens obtidas por SEM, tornam-se ainda evidentes duas características comuns entre as estruturas produzidas: os poros de formato irregular e uma superfície também irregular, constituída por microporos que não são visíveis nas imagens macroscópicas. A existência destes microporos na superfície de poros de maiores dimensões, contribui para o aumento da área superficial da matriz o que, de acordo com o verificado por Rödel, M., et al. (2018) pode favorecer a adsorção das moléculas de α -pineno e, conseqüentemente, aumentar a capacidade de carregamento de óleo na matriz [123].

Por outro lado, na estrutura da formulação (1 : 0 : 0 : 0), com as ampliações de 200 e 500 x, e da formulação (1 : 0 : 0 : 1,02)*, com uma ampliação de 50x, pode constatar-se a existência de poros cegos e poros interconectados. Embora a existência de poros conectados seja fundamental para que ocorra a difusão dos voláteis através da matriz [124], a presença de poros cegos onde o volátil fique incorporado pode também ser importante para o controlo da taxa de libertação, permitindo que a difusão do gás retido dentro destes poros ocorra durante a degradação da matriz.

Observando as imagens macroscópicas das diferentes formulações, verifica-se que enquanto as matrizes constituídas apenas de PCL apresentam um aspeto homogéneo, o aspeto das estruturas com cera e serradura é mais heterogéneo. Tanto nas imagens macro como microscópicas, pode facilmente distinguir-se as partículas de cera ou serradura da parte polimérica da matriz.

Tal como acontece quando é adicionado óleo à matriz, também a adição destes materiais provoca alterações nas dimensões da matriz, na porosidade e no diâmetro dos poros formados. Nas imagens macroscópicas dos compósitos com cera podem observar-se as partículas de cera alojadas dentro dos poros formados ao longo de toda a matriz e o menor volume, nomeadamente a altura, destas estruturas em relação ao da formulação (1 : 0 : 0 : 1,02). No entanto, embora não seja observável a nível macroscópico, nas imagens obtidas por SEM da formulação (0,70 : 0,30 : 0 : 1,02)* com uma ampliação de 1000x, é também possível identificar regiões da matriz cobertas por uma camada de cera fundida. Deste modo, embora se verifique que durante o processamento a cera fique maioritariamente no estado sólido dado a sua temperatura de fusão ser bastante superior à da PCL (Tabela 3), as porções de cera fundida encontradas na superfície da matriz demonstram que as condições de

temperatura e pressão usadas na tecnologia com CO₂ supercrítico permite fundir parcialmente a cera usada na mistura.

Em relação à diferença no tamanho de poros formados, os resultados apresentados na Figura 8 mostram que o diâmetro dos poros das matrizes dos compósitos de cera se situa em gamas de tamanhos mais baixas do que quando as matrizes com α -pineno são apenas constituídas por PCL.

Por outro lado, nas imagens macroscópicas das matrizes com serradura pode constatar-se que se forma uma película no exterior da matriz de PCL, que não se formava nas outras formulações, e que reveste os poros existentes na superfície externa da matriz. O facto de os poros ficarem cobertos, pode resultar como uma barreira à saída do α -pineno incorporado e, conseqüentemente, diminuir a taxa de libertação destas formulações. Além disso, na Figura 10 verifica-se que esta película é mais compacta no caso das formulações (0,75 : 0 : 0,15 ; 1,02) e (0,85 : 0 : 0,15 ; 1,02).

Por outro lado, comparando a morfologia das matrizes produzidas com serradura em diferentes proporções (Figura 10), verifica-se que com o aumento da quantidade de óleo utilizado no processamento, as partículas de serradura tendem a ficar alojadas na base da matriz e menor é a altura da matriz e o diâmetro dos poros formados. Embora não tenham sido encontrados valores para a densidade da serradura de pinheiro na literatura, a tendência da serradura se depositar na base da matriz sugere que este material tem maior densidade do que a PCL. Analisando a formulação (0,80 : 0 : 0,25 : 1,02), é visível uma grande distribuição de tamanhos de poros, destacando particularmente dois poros de dimensões bastante superiores às dos poros formados nas matrizes com outras proporções da mistura serradura e PCL.

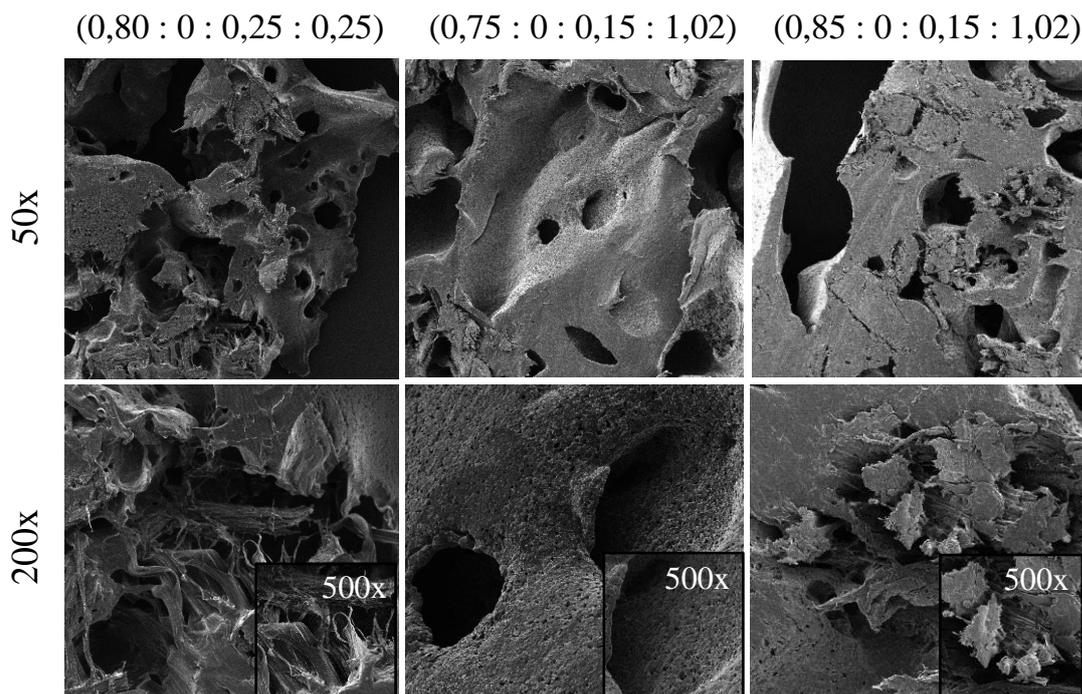


Figura 10 - Imagens obtidas por microscopia eletrónica de varrimento (SEM) dos compósitos com serradura em diferentes proporções.

Nas imagens microscópicas dos compósitos com serradura (Figura 11), pode mais uma vez observar-se a superfície bastante microporosa destas estruturas e ainda constatar-se que com o aumento da proporção serradura : PCL, a estrutura da matriz torna-se mais fibrosa.

Nas imagens micro e macroscópicas das formulações com revestimento apresentadas na Figura 12, pode observar-se que a fina camada de revestimento que se forma, fica principalmente adsorvida à superfície externa da matriz. No entanto, na ampliação da formulação (1: 0 : 0 : 1,02)* é possível distinguir situações em que a película fica apenas na superfície dos poros ou situações em que enche completamente o seu interior. Por outro lado por ser visível que apenas uma pequena quantidade de resina alcança os poros internos, pensa-se que este composto não irá interferir com o volátil incorporado no interior da matriz. O facto de esta película ficar adsorvida à superfície da matriz sugere que com a aplicação do revestimento se consegue diminuir a área de superfície específica da matriz exposta ao ambiente e assim reduzir a taxa de libertação de α -pineno. Estes dados são confirmados através dos resultados obtidos pelas técnicas de intrusão de mercúrio e adsorção.

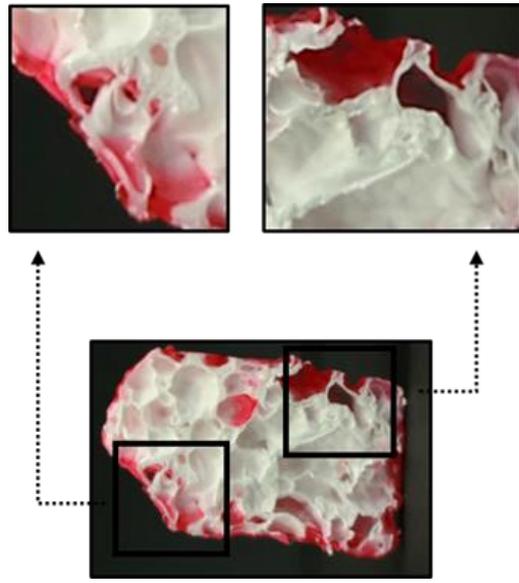
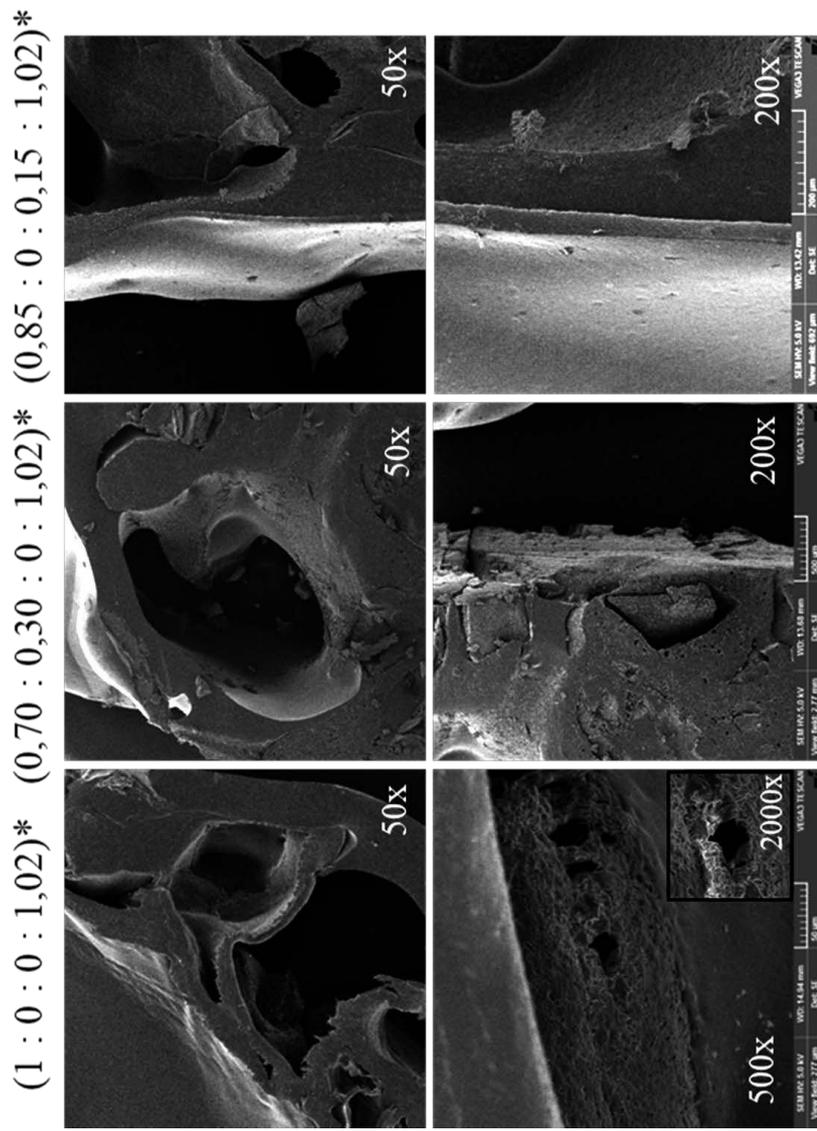


Figura 11 – Imagens macro (esquerda) e microscópicas (direita) de formulações com revestimento onde é visível a película dentro dos poros da matriz.

Intrusão de Mercúrio e Adsorção de Azoto

Através das técnicas de intrusão de mercúrio e adsorção de azoto foram obtidas informações acerca da porosidade, densidade, área de superfície (BET) e densidade das amostras. Estes parâmetros fortemente relacionados com a capacidade de carregamento de óleo e a taxa de libertação de cada formulação, foram compilados na Figuras 12 e são apresentados individualmente no ANEXO IV.

Analisando os resultados obtidos para as formulações (1 : 0 : 0 : 0) e (1 : 0 : 0 : 1,02) (Figura 12A) verifica-se que, com a adição do composto bioativo, ocorre uma redução de cerca de 20% da porosidade da matriz e uma diminuição da área de superfície (BET) de $1,57 \pm 0,30$ para $1,04 \pm 0,37 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$. Como consequência da redução da porosidade, há um aumento da densidade *bulk*, uma vez que é calculada tendo em conta a parte sólida e os poros da matriz. Pode ainda verificar-se um aumento do volume de poros de $1,51 \pm 0,30 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ para $5,51 \pm 0,36 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ quando se adiciona α -pineno à formulação, que demonstra o efeito porogénico deste composto.

As diferenças de resultados das formulações (1 : 0 : 0 : 1,02) e (1 : 0 : 0 : 1,02)* mostram que a aplicação de uma camada de revestimento conduz a uma redução de cerca de 12% da porosidade e a uma diminuição do volume de poros para $2,78 \pm 1,69 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$. Uma vez que a porosidade é um dos fatores determinantes da taxa de libertação dos sistemas matriciais [123], a diminuição destes parâmetros sugere que a aplicação do revestimento permitirá cumprir o objetivo de reduzir a taxa de libertação dos difusores.

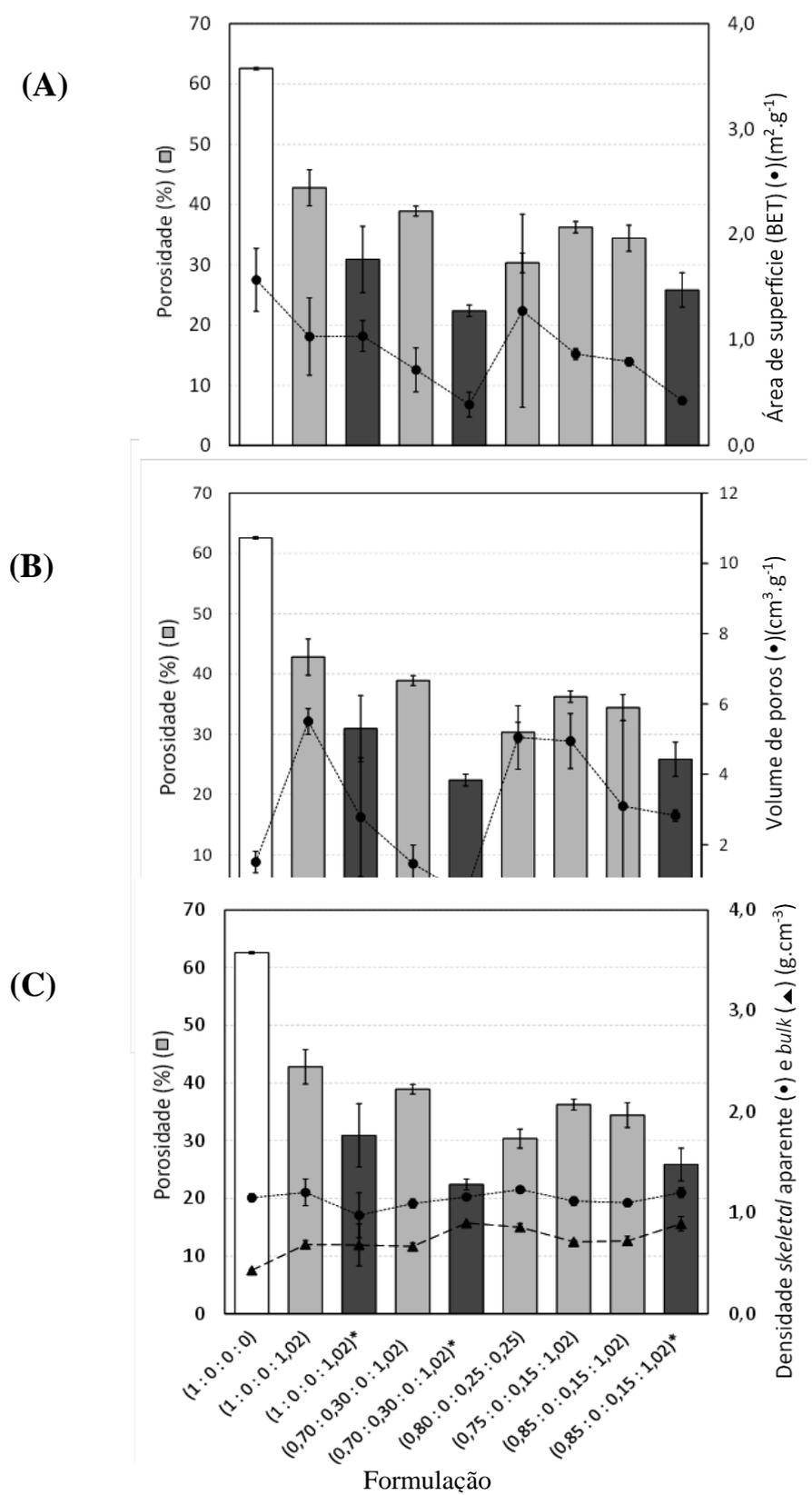


Figura 12 – Área de superfície específica determinada por adsorção de azoto (A) e porosidade (A), volume de poros (B), densidade *skeletal* aparente e densidade *bulk* (C) determinadas por intrusão de mercúrio.

Por outro lado, o estudo da influência da adição de materiais como a cera e a serradura à composição da matriz polimérica, pode ser estudada comparando os resultados dos difusores com a mesma massa de base sólida (1g). Estes resultados demonstraram que ao aditivar as matrizes com cera ou serradura, representadas pelas formulações (0,70 : 0,30 : 0 : 1,02) e (0,85 : 0 : 0,15 : 1,02), promove-se um decréscimo na porosidade da matriz de $42,80 \pm 3,00$ % para $38,91 \pm 0,82$ e $34,42 \pm 2,15$ %, respetivamente. Os compósitos produzidos apresentam também menor área de superfície (BET) e menor volume de poros. A diminuição destes parâmetros, diretamente relacionados com a taxa de libertação dos difusores, permitem inferir que ao adicionar estes compostos à matriz será possível prolongar a emissão de α -pineno. Contudo, de acordo com o que foi observado por Rödel et al. (2018), a diminuição a porosidade e a área de superfície (BET) pode implicar uma redução da capacidade de incorporação de óleo na formulação uma vez que estes parâmetros também estão relacionados com a capacidade de adsorção das moléculas de α -pineno à matriz [123].

Uma vez que já foi demonstrado o efeito da adição de α -pineno na porosidade da matriz, a influência do teor em serradura nas matrizes dos compósitos foi avaliada apenas a partir das formulações (0,75 : 0 : 0,15 : 1,02) e (0,85 : 0 : 0,15 : 1,02), por terem a mesma quantidade α -pineno. A comparação dos resultados permitiu concluir que com o aumento da fração (PCL : serradura) ocorre uma ligeira diminuição tanto da porosidade como da área de superfície (BET) da matriz, respetivamente de $36,24 \pm 0,96$ % e de $0,87 \pm 0,05$ m².g⁻¹ para $34,42 \pm 2,15$ % e $0,80 \pm 0,04$ m².g⁻¹. Assim, espera-se que à formulação (0,85 : 0 : 0,15 : 1,02) esteja associada uma menor taxa de libertação mas também uma menor capacidade de carregamento de óleo na matriz. Contudo, é importante não esquecer que a diminuição da quantidade de polímero também implica uma redução da quantidade de α -pineno que pode ficar retido nas cadeiras poliméricas, o que afeta a quantidade de óleo incorporado.

Da mesma forma que se observou que a aplicação de revestimento à formulação (1 : 0 : 0 : 1,02) resultava numa diminuição dos parâmetros condicionantes da taxa de libertação do difusor, também as matrizes aditivadas com cera ou serradura apresentaram valores inferiores de porosidade, área de superfície (BET) e volume de poros quando eram recobertas por uma película de resina. Esta diminuição sugere mais uma vez, que a aplicação do revestimento permite reduzir a superfície disponível para a saída do α -pineno adsorvido à matriz e, conseqüentemente, a taxa de libertação das formulações.

Além disso, pode ainda observar-se uma ligeira diminuição na densidade *skeletal* das formulações aditivadas com cera (Figura 12), uma vez que este material tem uma densidade inferior à da PCL (Tabela 3). Por este motivo, e apesar de terem menor porosidade e volume de poros do que a formulação (1 : 0 : 0 : 1,02), as matrizes (0,70 : 0,30 : 0 : 1,02) apresentam uma densidade *bulk* $0,02 \pm 0,04 \text{ g.cm}^{-3}$ menor. Por outro lado, comparando a diferença de densidades *skeletal* entre as formulações (0,80 : 0 : 0,25 : 0,25), (0,75 : 0 : 0,15 : 1,02) e (0,85 : 0 : 0,15 : 1,02), verifica-se que o aumento do teor em serradura conduz a um aumento da densidade *skeletal* da matriz, podendo concluir-se que a serradura será mais densa do que parte polimérica.

Adicionalmente ao efeito plastificante do CO₂ [113], e como se pode observado nos resultados da análise macroscópica e microscópica, o α -pineno também atua como plastificante, baixando temporariamente a temperatura de transição vítrea da PCL [68], e como agente porogénico. Deste modo, com a adição do volátil à matriz promoveu-se a sua degradação, o que pode ser verificado pelos resultados da análise SDT.

3.2. Caracterização termogravimétrica

A incorporação de α -pineno durante o processamento pode ocorrer por adsorção das moléculas à superfície da matriz ou por incorporação dentro das cadeias poliméricas ou das partículas de cera ou serradura adicionadas à matriz, em particular durante as 12 h que estiveram imersas em α -pineno antes de serem processadas. Por outro lado, no caso das moléculas adsorvidas à superfície da matriz, estas podem ainda ficar dentro de poros interconectados ou, como pode ser observado por SEM, dentro de poros cegos. A saída de voláteis da formulação processa-se por duas fases. Na primeira ocorre a libertação das moléculas adsorvidas à superfície externa da matriz por convecção e a difusão do óleo incorporado nos poros interconectados existentes no interior da matriz, através dos quais se gera um fluxo de matéria que atinge o exterior. A segunda fase acontece durante a degradação da matriz onde ocorre a difusão do composto incorporado nos poros cegos da matriz, entre as cadeias poliméricas ou nas partículas de cera ou serradura.

Uma das estratégias para conseguir que a maior quantidade possível de composto seja libertado da formulação em tempo útil e ainda assim manter a taxa de libertação num nível adequado ao controlo do inseto vetor (0,32 – 1000 mg/dia) por um período superior a 6

semanas, passa por conjugar estas duas fases de libertação do composto. Assim, com a adição de materiais como a cera e a serradura à matriz, espera-se conseguir promover a degradação da formulação e antecipar a saída do composto incorporado.

A análise diferencial térmica simultânea (SDT) permitiu determinar as temperaturas de fusão, degradação e a cristalinidade das formulações e dos materiais usados no processamento e que foram reunidas na Tabela 7 e na Figura 13. Estes resultados permitem avaliar a influência da adição dos diferentes enchimentos e do revestimento na estabilidade térmica da matriz.

Tabela 7 - Temperaturas de fusão, temperaturas de degradação e cristalinidade obtidas por análise diferencial térmica simultânea (SDT) para os materiais desenvolvidos.

Formulação (PCL: cera : serradura: α -pineno)	$T_{F,1}$ (°C)	$T_{F,2}$ (°C)	$T_{D,1}$ (°C)	$T_{D,2}$ (°C)	χ_c (%)
(1 : 0 : 0 : 0)	65,2 ± 1,4	-	-	408,9 ± 0,6	47,3 ± 0,6
(1 : 0 : 0 : 1,02)	65,1 ± 0,8	-	-	408,1 ± 0,9	47,1 ± 0,6
(1 : 0 : 0 : 1,02)*	65,5 ± 0,6	-	332,7 ± 4,1	403,6 ± 2,6	47,0 ± 0,3
(0,70 : 0,30 : 0 : 1,02)	65,7 ± 1,2	86,2 ± 1,7	-	410,4 ± 1,6	47,1 ± 0,9
(0,70 : 0,30 : 0 : 1,02)*	66,1 ± 0,4	85,5 ± 0,3	333,3 ± 3,6	406,2 ± 2,6	47,4 ± 0,3
(0,85 : 0 : 0,15 : 1,02)	65,8 ± 0,5 ^a	-	-	406,1 ± 3,1	47,2 ± 0,5
(0,85 : 0 : 0,15 : 1,02)*	66,0 ± 0,6 ^a	-	337,7 ± 3,5	403,3 ± 1,3	47,4 ± 0,4
(0,80 : 0 : 0,25 : 0,25) ^b	67,1 ± 1,2 ^a	-	-	407,3 ± 1,2	48,2 ± 0,8
(0,75 : 0 : 0,15 : 1,02) ^b	64,1 ± 1,9 ^a	-	-	407,7 ± 1,4	46,0 ± 1,2
PCL	64,5 ± 0,2		407,3 ± 1,6		
Cera	86,1 ± 0,5		423,4 ± 3,9		
Serradura	-		346,0 ± 0,3		
Resina	80,4 ± 7,1		336,8 ± 0,1		

^aNas amostras aditivadas com serradura, esta temperatura é referente à fusão da PCL e da serradura

^bAmostras que não foram feitas nas mesmas condições dos restantes ensaios

As diferenças apresentadas pelas formulações (1 : 0 : 0 : 0) e (1 : 0 : 0 : 1,02), cujas temperaturas de fusão e de degradação foram, respetivamente, de 65,2 ± 1,4 e 65,1 ± 0,8 °C e de 408,9 ± 0,6 e 408,1 ± 0,9 °C, com as temperaturas de fusão e de degradação obtidas para PCL antes de ser processada, respetivamente de 64,5 ± 0,2 e de 407,3 ± 1,6 °C, mostram que tanto o método de processamento adotado como a adição de α -pineno à matriz constituída apenas por PCL, não tiveram um efeito significativo na estabilidade térmica da PCL, o que

vai de encontro aos resultados apresentados por Matos et al. (2013), Rosa (2013) e Churro (2015) [113-115].

Porém, observando os perfis obtidos para a derivada do peso em função da temperatura (ANEXO III), verifica-se que quando é aplicado o revestimento passa a ser possível distinguir dois picos onde ocorre uma perda acentuada de massa durante a fase de degradação. O primeiro pico, designado de $T_{D,1}$, ocorre aos $332,7 \pm 4,1$ °C, e corresponde sobretudo à fase de degradação da resina, que antes de ser adicionada à matriz se degrada a cerca de 5°C acima desta temperatura. A degradação da matriz polimérica acontece principalmente durante a segunda fase, cujo pico designado de $T_{D,2}$, se verifica aos $403,6 \pm 2,6$ °C para os difusores com uma base sólida formada apenas por PCL, e, portanto, 4°C abaixo da T_D da PCL antes de ser formulada.

Quando é adicionada cera à matriz polimérica, passa a ser possível identificar duas fases de perda de massa até que toda a amostra seja fundida: uma primeira fase que ocorre aos $65,7 \pm 1,2$ °C e uma segunda aos $86,2 \pm 1,7$ °C. Comparando estas temperaturas de fusão com a da PCL e a da cera antes de serem processadas, pode atribuir-se o primeiro pico à fusão da parte polimérica da matriz e o segundo pico à fusão da cera. No entanto, com a adição de cera não há alteração significativa da temperatura de degradação das formulações, verificando-se que as formulações (1 : 0 : 0 : 1,02) e (0,70 : 0,30 : 0 : 1,02), têm temperaturas de degradação bastante próximas e, respetivamente, de $408,1 \pm 0,9$ e $410,4 \pm 1,6$ °C.

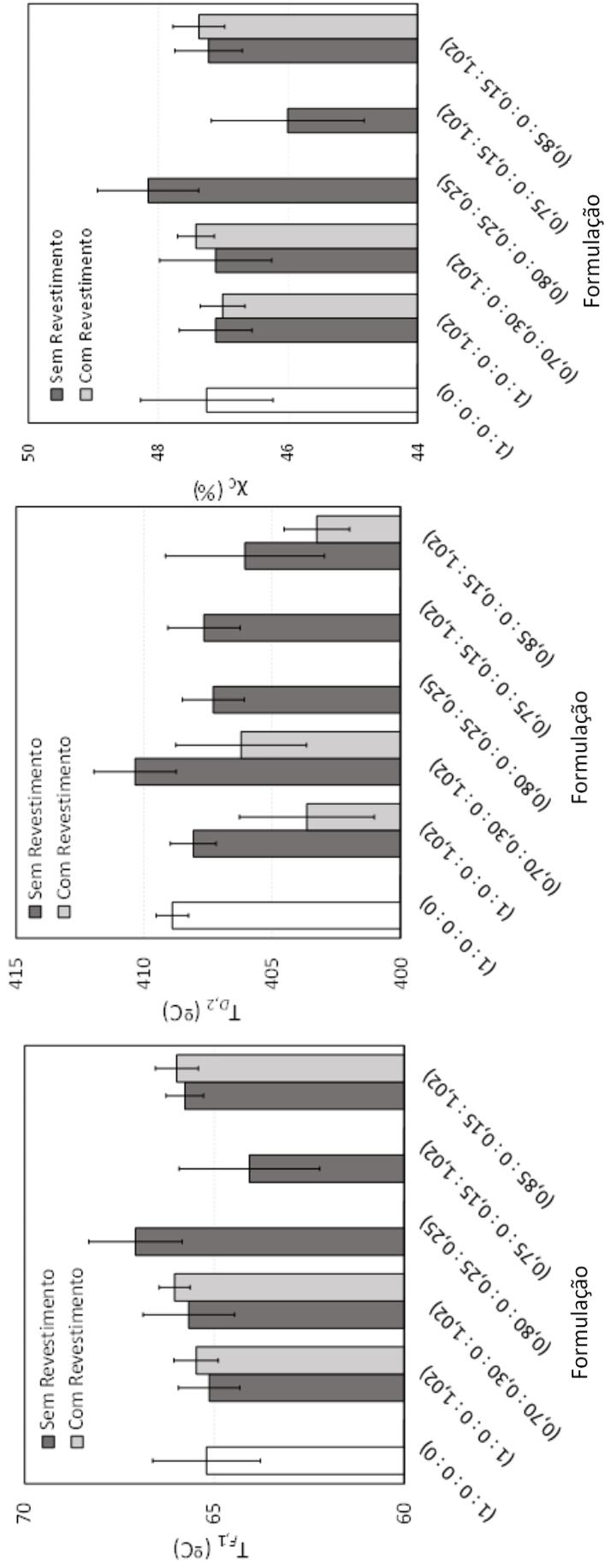


Figura 13 - Temperatura de fusão (T_{F,1}) temperatura de degradação (T_{D,2}) e cristalinidade (X_c) das formulações.

Quando a matriz é aditivada com serradura, apenas se distingue um pico no perfil da análise SDT durante a etapa de fusão. Este pico aproxima-se das temperaturas de fusão das matrizes de PCL pura, à exceção da formulação (0,80 : 0 : 0,25 : 0,25) que funde a uma temperatura de cerca de 2°C acima.

Embora na natureza as formulações nunca atinjam as temperaturas de degradação, este parâmetro é indicativo que ocorre alteração na estrutura da matriz. Além disso, apesar dos elevados desvios-padrão, não se verificam alterações significativas na cristalinidade do polímero quando formulado com diferentes composições, variando entre os 45 e os 49%. Estes desvios estão relacionados com a variabilidade dos compostos naturais como a cera e a serradura que compõem a formulação e da homogeneidade da amostra.

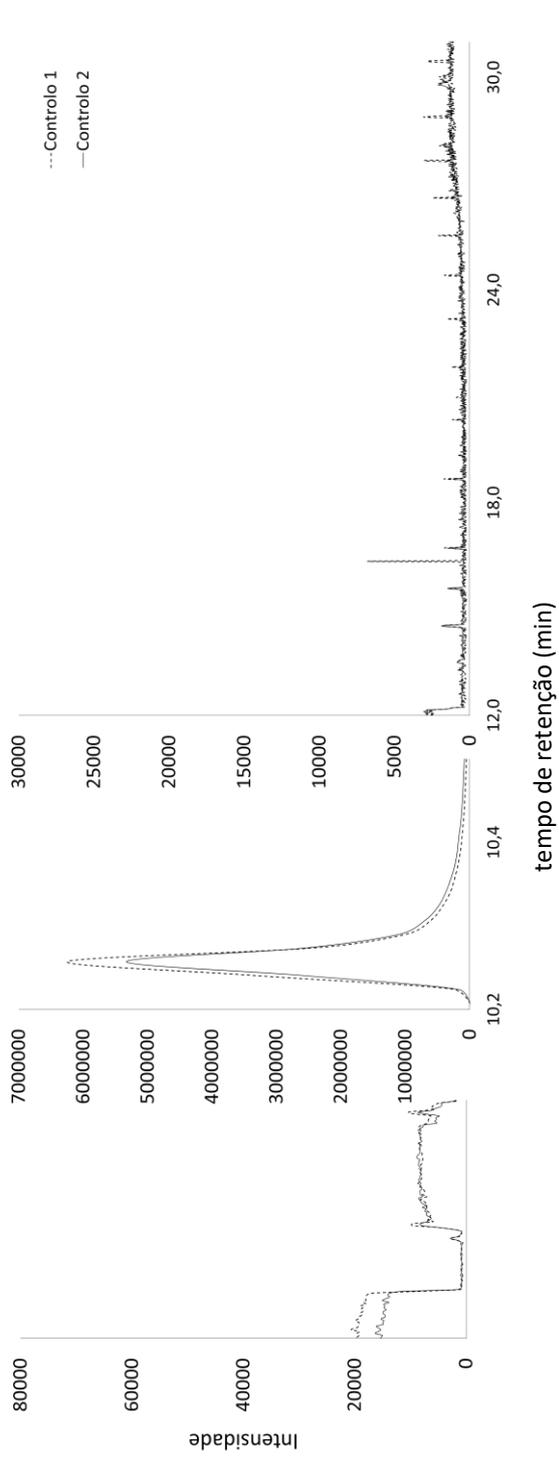
3.2.1. Degradação dos bioativos e do produto final

A estabilidade dos compostos bioativos, atrativos ou repelentes, perante a exposição a diferentes temperaturas e à incidência de radiação UV, foi avaliada a partir dos espectros obtidos por análise cromatográfica com o GC/MS. Para a identificação dos compostos recorreu-se às bibliotecas FFNSC (*Flavor and Fragrance Natural and Synthetic Compounds*), adequada para análises a substâncias com sabor e fragrância, e NIST que, em geral, contém uma ampla gama de diferentes compostos.

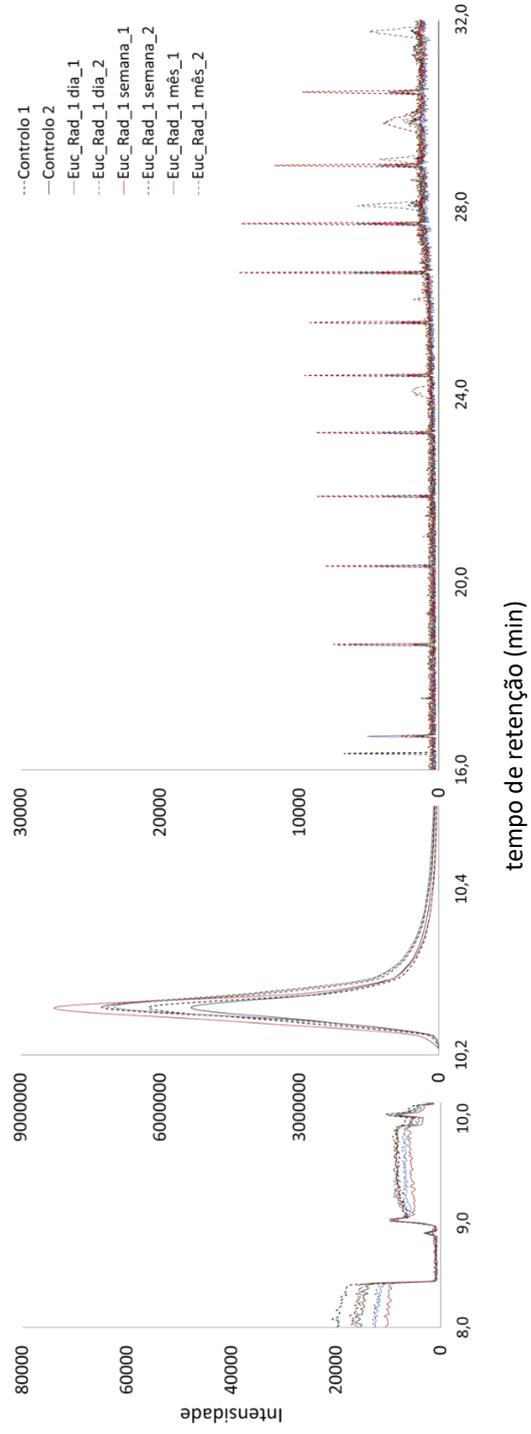
Eucaliptol

Apesar de nos espectros obtidos para as amostras de eucaliptol se conseguirem distinguir picos com tempos de retenção e intensidades diferentes (Figura 14), uma vez que a sua área é bastante reduzida em relação à área do pico do eucaliptol, estes fragmentos/resíduos não foram considerados. Os resultados demonstram que todas as amostras apresentam uma composição de aproximadamente 100% de eucaliptol e, por conseguinte, conclui-se que este composto não sofre degradação quando exposto à radiação UV ou às temperaturas de 25 e 40°C.

A) Controlos



B) Radiação UV



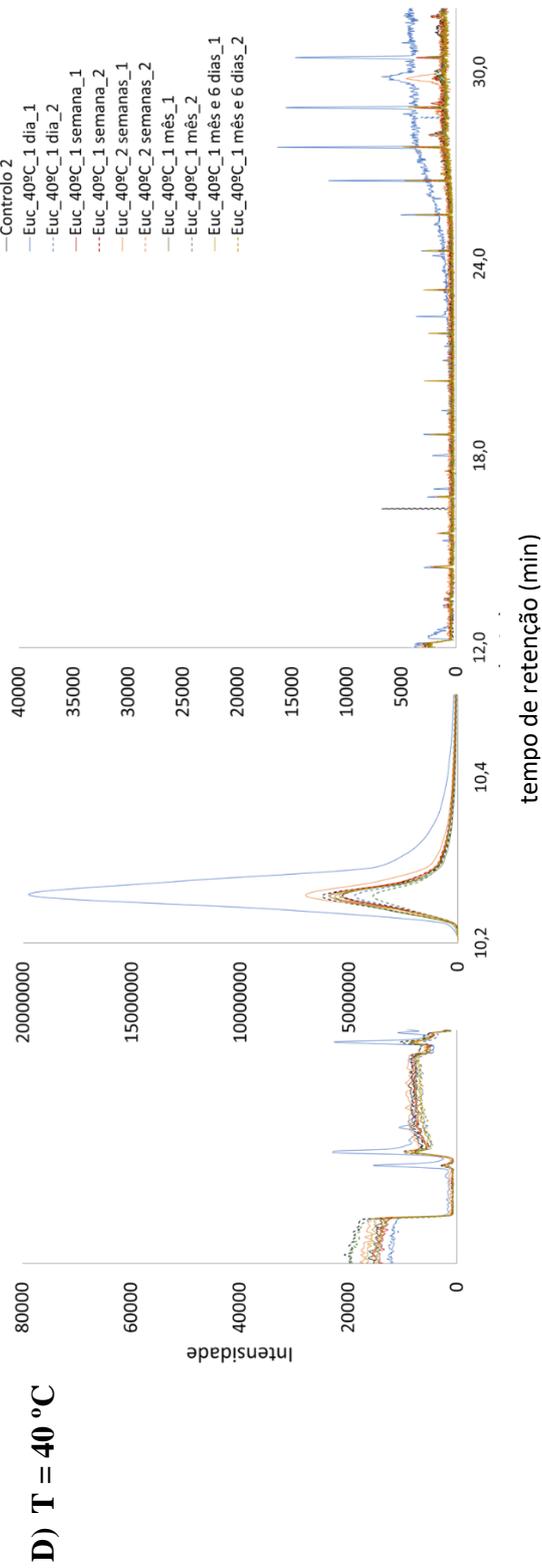
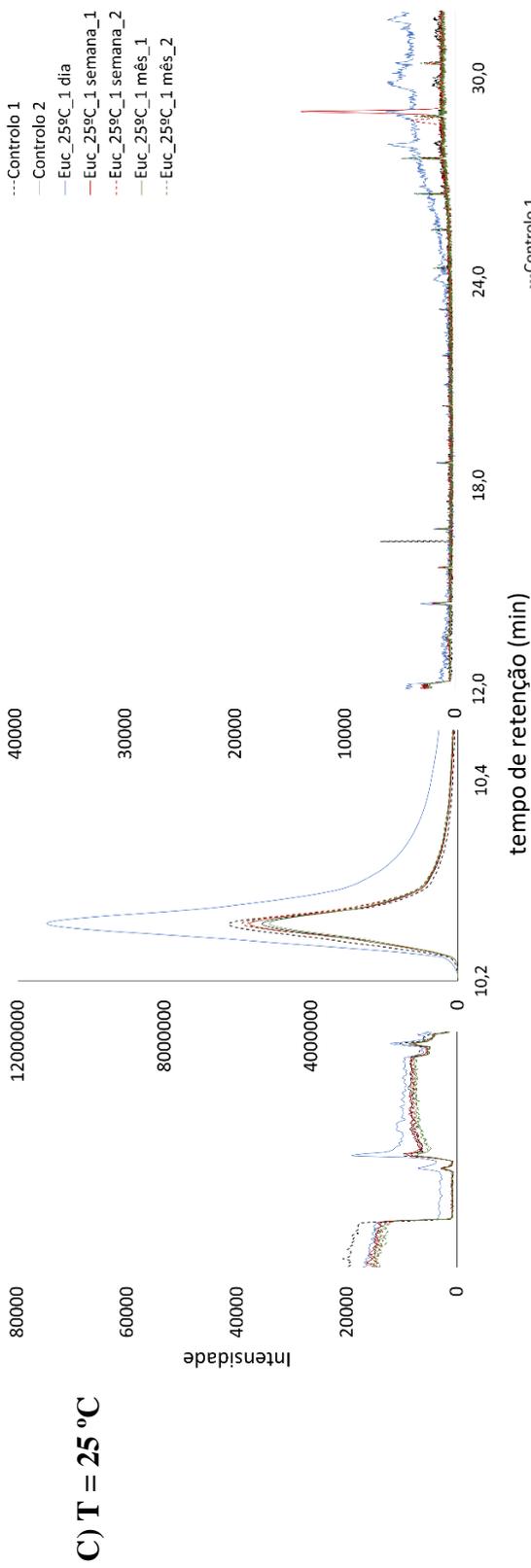


Figura 14 - Espetros de eucaliptol obtidos por GC/MS. Controlos (A); Exposição à radiação UV (B) e às temperaturas: 25°C (C) e 40°C (D).

α -pineno

Nas amostras de α -pineno, analisadas por cromatografia, a área do espectro referente ao α -pineno foi aproximadamente de 98%. Embora esta percentagem seja consideravelmente alta, tentou-se perceber se alguns dos picos pequenos, que apareciam nos espectros, poderiam ser de sub-produtos de degradação. No entanto, estabeleceu-se que apenas seriam analisados os picos dos controlos com uma intensidade superior a 10000 e que representassem uma área superior a 0,01% da área total do espectro, uma vez que os picos abaixo destes valores já apresentam uma área e intensidade bastante reduzida em relação à área e intensidade do pico correspondente ao α -pineno.

Dada a grande quantidade de compostos identificados e a variabilidade entre a intensidade dos picos dos controlos 1 e 2 apresentados na Tabela 8, optou-se mais tarde, por preparar e analisar dois novos controlos (3 e 4). No entanto, ao observar os resultados dos quatro controlos, torna-se evidente que há uma semelhança entre os compostos identificados cada par de controlos: 1-2 e 3-4. Os controlos 3 e 4 apresentaram apenas dois picos dentro das considerações estabelecidas para os picos que seriam analisados, tendo ambos sido identificados como α -pineno para o controlo 4. No controlo 3, além do α -pineno, identifica-se ainda a presença de um outro terpeno, o limoneno, possivelmente devido a contaminação. Contudo, nos controlos 1 e 2 foram encontrados cerca de 14 compostos para além do α -pineno, o que sugere que o volume de óleo utilizado na preparação destas amostras já apresentava sinais de degradação, possivelmente devido à entrada de oxigénio dentro do frasco de α -pineno, uma vez que os restantes compostos identificados, como o triciclono, óxido de α -pineno, o myrtenal e a pinocarvona, são geralmente encontrados como impurezas ou sub-produtos do processo de autoxidação do α -pineno [120].

Uma vez que as amostras colocadas na câmara UV e nas câmaras a 25 e 40°C foram preparadas a partir do mesmo volume de α -pineno que os controlos 1 e 2, ao contrário dos controlos 3 e 4 que foram mais tarde preparados a partir de uma amostra de óleo diferente, entende-se que parte dos compostos encontrados nos controlos 1 e 2 também estivessem presentes nessas amostras. Por conseguinte, optou-se por avaliar se houve degradação das amostras perante a influência dos fatores radiação e temperatura por comparação com os resultados dos controlos 1 e 2, o que pode ser analisado no espectros compilados na Figura 15.

Tabela 8 - Identificação dos compostos obtidos nos controles de α -pineno.

tr (min)	Controlo 1		Controlo 2		Controlo 3		Controlo 4	
	Composto	Intensidade	Composto	Intensidade	Composto	Intensidade	Composto	Intensidade
7,665	Triciclono	79901	Triciclono	80186	-	-	-	-
7,962	α -pineno	13076737	α -pineno	13800667	IR- α -pineno	1458208	α -pineno	1497340
8,374	Δ -3-Carene	329095	Δ -3-Carene	314075	dl-Limoneno	157860	α -pineno	268910
9,035	α -pineno	83887	α -pineno	77345				
10,124	Limoneno	11252	Limoneno	11897				
10,256	trans-3-carene-2-ol	10772	trans-3-carene-2-ol	11324				
11,528	Óxido de α -pineno	35786	Óxido de α -pineno	32105				
11,709	trans-3-Pinen-2-ol (2,6,6-trimethylbicyclo(3.1.1)hept-3-en-2-ol)	50900	trans-3-Pinen-2-ol (2,6,6-trimethylbicyclo(3.1.1)hept-3-en-2-ol)	59978				
11,775	1(7),3,8-o-Menthatriene	10930	1,3,5-Trimethylenecycloheptane	20129				
12,006	α -Campholenal	23426	α -Campholenal	26772				
12,287	trans-Pinocarveol	12955	trans-Pinocarveol	14568				
12,337	trans-Verbenol	57729	trans-Verbenol	68067				
12,634	cis-Pinocarveol	18396	Pinocarvone	21663				
13,195	Myrtenal	18626	Myrtenal	18837				
13,393	l-verbenon	22461	Verbenona	24083				

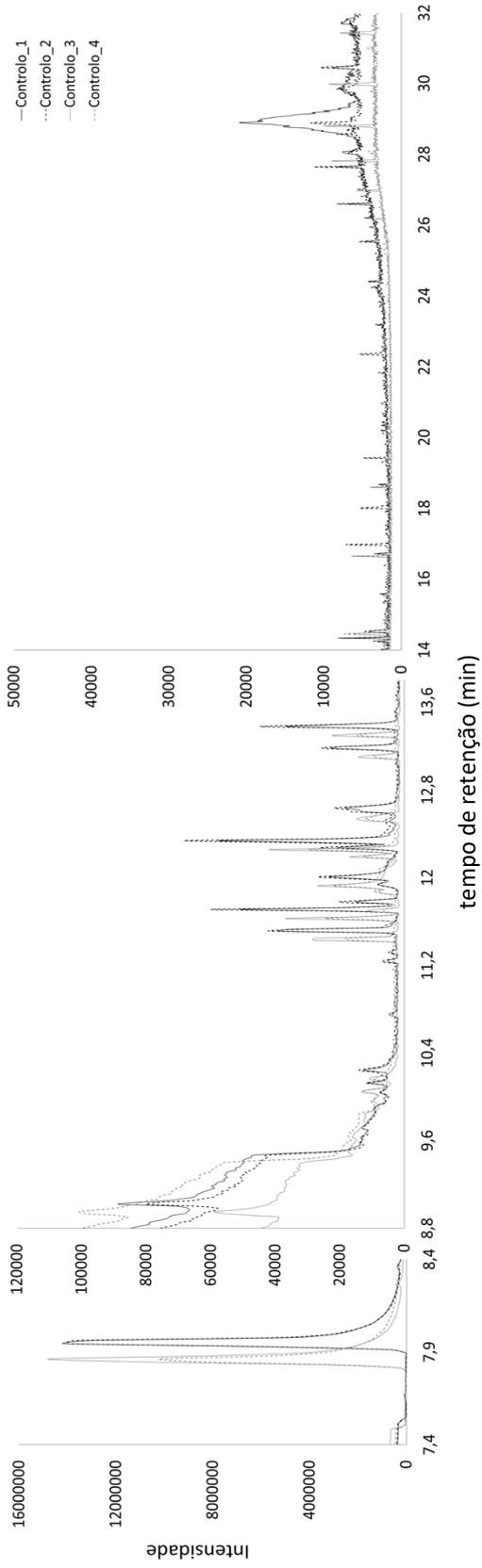
Dada a variabilidade de resultados que as próprias amostras-controlo apresentaram, foi definida uma gama de referência a partir da diferença entre a intensidade dos picos respetivos ao mesmo composto, encontrados em cada controlo. Considerou-se que os compostos que tivessem sido identificados tanto nas amostras expostas à radiação ou à temperatura, como nos controlos 1 e 2, cuja intensidade do respetivo pico estivesse dentro da gama de referência definida, seria considerado que não tinha ocorrido degradação devido à exposição a estes fatores. Por outro lado, quando a intensidade dos picos se situasse acima ou abaixo desta gama, seria considerado que tinha ocorrido formação ou degradação, respetivamente, desse composto. Os casos em que os picos identificados como correspondendo à presença de compostos diferentes dos encontrados nos controlos, foram analisados individualmente.

Por último, uma vez que as fibras SPME têm uma composição de polidimetilsiloxanas, divinilbenzeno e Carboxen®, os picos identificados como compostos que pudessem pertencer à constituição das fibras não foram analisados.

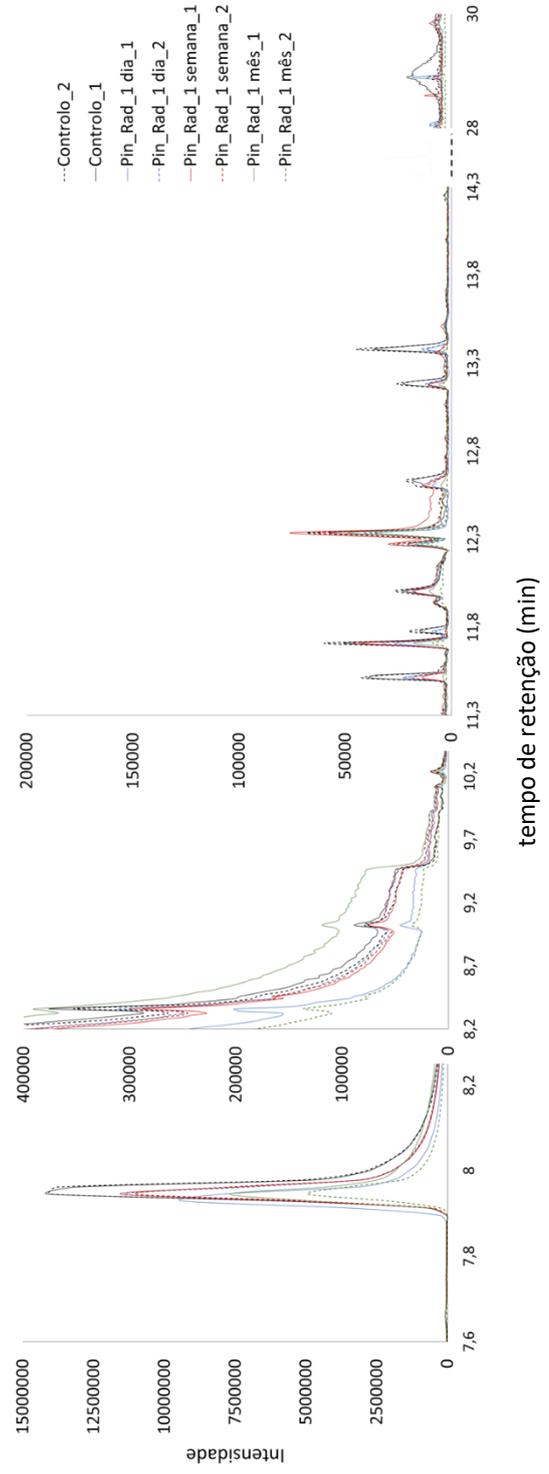
Os resultados obtidos pela análise às amostras expostas à radiação ou à temperatura encontram-se compilados no ANEXO V, tendo-se verificado que a intensidade dos picos identificados como sendo de α -pineno é inferior à dos picos dos controlos, o que poderia sugerir que todas as amostras teriam sofrido degradação. No entanto, ao contrário do que foi descrito no trabalho de Schrader et al. (2001), comparando a diferença entre a intensidade do pico de α -pineno entre as amostras sujeitas ao mesmo fator de temperatura ou radiação mas com um tempo de exposição diferente, não se consegue distinguir uma tendência para a evolução do pico [120]. Como exemplo pode observar-se o que acontece para as amostras expostas à radiação por 1 dia, 1 semana e 1 mês, onde a intensidade dos picos de α -pineno foram, respetivamente, de 7730824 ± 410480 , 7787781 ± 418455 e 6580242 ± 2288966 . A intensidade do pico da amostra com 1 semana de exposição é superior ao da amostra com 1 dia mas também é superior à das amostras com 1 mês.

Por outro lado, foram encontrados compostos diferentes dos identificados nos controlos, como é o caso do α -longipineno e pinocanfona. Porém, é notória a inconsistência com que estes picos aparecem apenas numa das réplicas ou apenas para um determinado tempo de exposição, como é o caso do verbenol que aparece apenas numa das réplicas das amostras colocadas a 40°C por 2 semanas. Os resultados obtidos não permitiram inferir acerca da influência dos fatores radiação e temperatura na degradação do α -pineno.

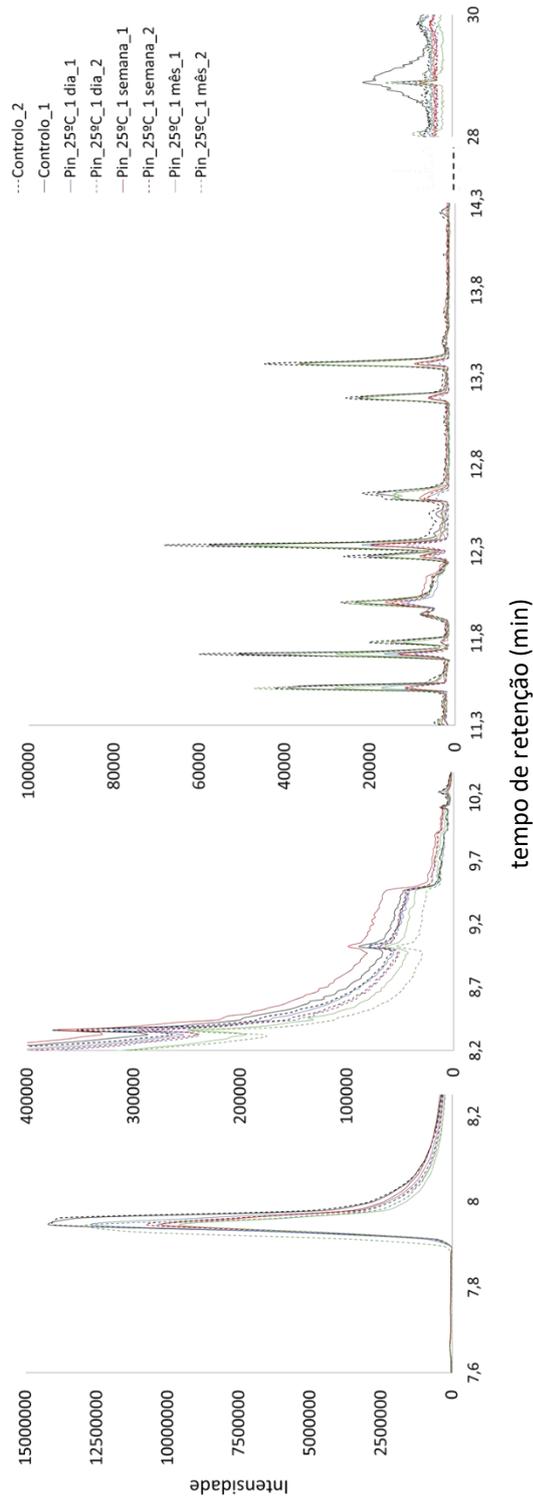
A) Controlos



B) Radiação UV



C) T = 25°C



D) T = 40 °C

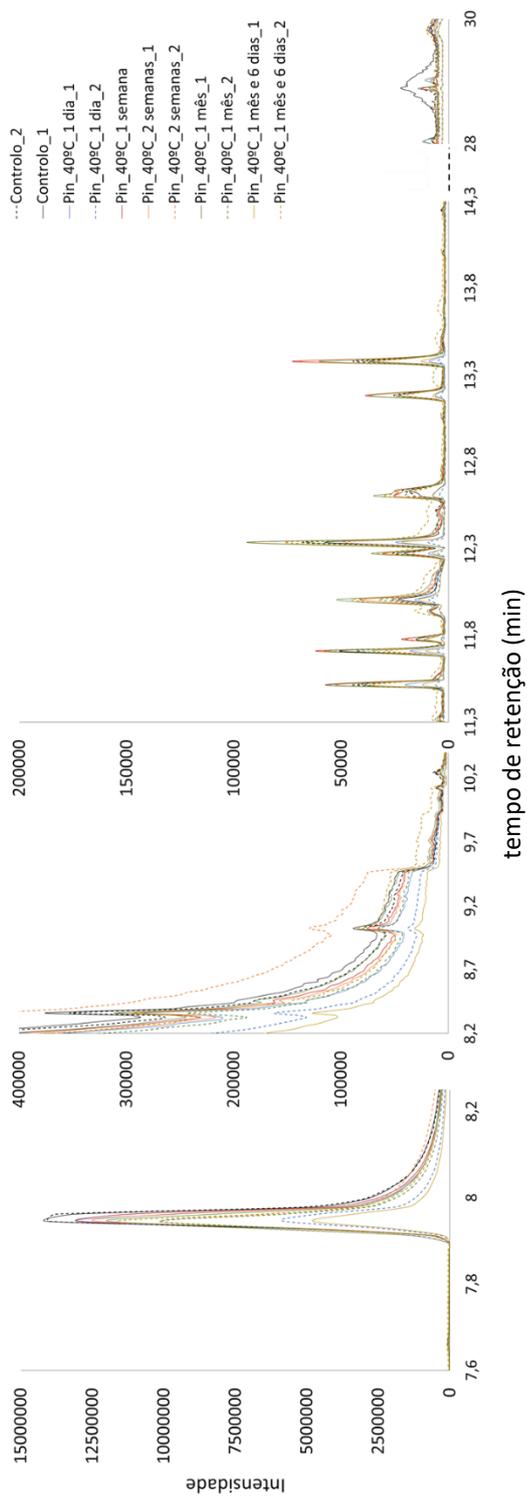


Figura 15 - Espetros de α -pineno obtidos por GC/MS. Controlos (A); Exposição à radiação UV (B) e à temperatura: 25°C (C) e 40°C (D).

Degradação do produto final

Para avaliar a degradação do produto final foi simulada a degradação acelerada das matrizes porosas num meio alcalino de NaOH 5M. Os resultados deste ensaio foram representados na Figura 16.

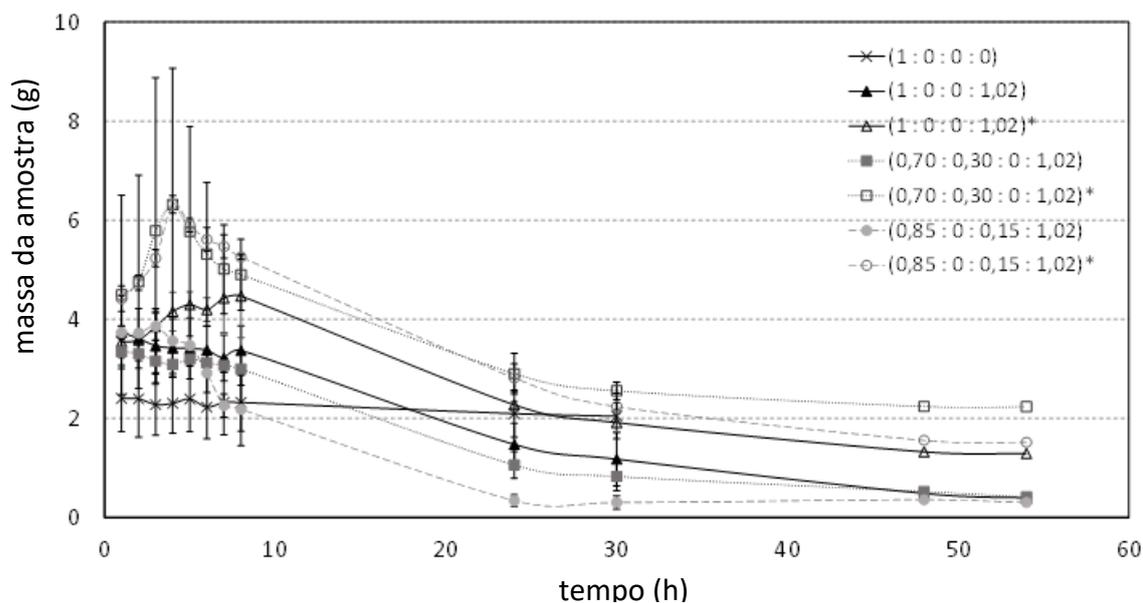


Figura 16 - Representação gráfica da massa das amostras em NaOH 5 M, ao longo do tempo.

Embora a variação seja grande, o que mostra variabilidade da matriz, foram detetadas claras tendências.

Durante as primeiras 5 h, houve um aumento de massa que indica ainda a incorporação da solução no interior das formulações. Quando a matriz se encontra submersa, o processo de hidrólise é iniciado, com conseqüente perda de massa.

A influência da composição da formulação na velocidade de degradação foi avaliada pelos declives obtidos pela linearização das curvas de perda de massa (ANEXO VI), cujos resultados foram compilados na Tabela 9.

Comparando a perda de massa da formulação (1 : 0 : 0 : 0) com a da formulação (1 : 0 : 0 : 1,02), torna-se evidente o efeito da adição do composto bioativo na degradabilidade da matriz polimérica, uma vez que este atua como um agente porogénico, favorecendo a degradação da matriz, o que pode ser vantajoso do ponto de vista ambiental.

Nos resultados obtidos podem também notar-se diferenças no comportamento dos difusores com e sem aplicação de revestimento, particularmente evidenciadas durante as primeiras 8 horas de ensaio. Os difusores sem revestimento apresentam uma perda de massa gradual a partir do momento em que são colocados em solução, deixando de ser tão evidente a partir das 30 h. Nos resultados obtidos pela linearização das curvas de perda de massa (Tabela 9), verifica-se que os declives das retas lineares para a fase de degradação das formulações (1 : 0 : 0 : 1,02), (0,70 : 0,30 : 0 : 1,02) e (0,85 : 0 : 0,15 : 1,02) foram respetivamente de -0,0918, -0,1007 e de -0,1586. Esta diminuição do declive demonstra que a perda de massa é mais rápida para as formulações com serradura, seguidas das formulações com cera e, por fim, das matrizes formadas apenas por PCL. Por outro lado, ao ser adicionada uma camada de revestimento, verifica-se que numa fase inicial ocorre um ganho de massa devido à entrada de solução no revestimento, designada de fase de inchaço. Esta fase é mais prolongada para a formulação (1 : 0 : 0 : 1,02)*, e decorre até que o revestimento fique saturado de solução e esta alcance a matriz, provocando a sua degradação. Apesar da adição de uma película de resina, as amostras com serradura continuam a apresentar a maior velocidade de degradação. Além disso, assim como no caso dos difusores sem revestimento, a partir das 30 h a perda de massa das amostras deixa de ser tão acentuada. Contudo, embora praticamente toda a parte polimérica da formulação se tenha desagregado até este tempo, para ambos os casos ainda era possível encontrar dispersas em solução tanto as partículas de cera e serradura, como, no caso das amostras revestidas, a película de resina.

Tabela 9 - Linearização das curvas obtidas durante as fases de inchaço do revestimento e da degradação das matrizes poliméricas. y = massa da amostra; x = tempo (h).

Formulação (PCL: cera : serradura: α - pineno)	Fase de inchaço do revestimento			Fase de degradação		
	Eq. da reta linear	Declive	R ²	Eq. da reta linear	Declive	R ²
(1 : 0 : 0 : 0)		-		y=-0,0115x+2,3792	-0,0115	0,8385
(1 : 0 : 0 : 1,02)		-		y=-0,0918x+3,8511	-0,0918	0,9830
(1 : 0 : 0 : 1,02)*	y=0,1413x+3,4267	0,1413	0,9092	y=-0,1204x+5,3717	-0,1204	0,9815
(0,70 : 0,30 : 0 : 1,02)		-		y=-0,1007x+3,5977	-0,1007	0,9562
(0,70 : 0,30 : 0 : 1,02)*	y=0,649x+3,7138	0,649	0,9557	y=-0,1223x+6,0389	-0,1223	0,9722
(0,85 : 0 : 0,15 : 1,02)		-		y=-0,1586x+3,9461	-0,1586	0,8919
(0,85 : 0 : 0,15 : 1,02)*	y=0,6205x+3,6245	0,6205	0,9259	y=-0,1517x+6,6205	-0,1517	0,9876

Em suma, com os resultados deste ensaio conclui-se que com a utilização de materiais compósitos em vez de matrizes unicamente poliméricas, o processo de degradação do material poroso seria mais rápido. Depois da degradação da parte polimérica da matriz, as partículas de cera e serradura ficaram desagregadas em solução, o que pode indicar que após a degradação da matriz no meio ambiente, ainda pode continuar a ocorrer difusão de α -pineno para o ambiente através do óleo que ficou incorporado nas partículas de cera ou serradura e que é libertado durante a degradação destes materiais.

Contudo, este ensaio expôs também o facto do revestimento utilizado ter uma taxa de degradação mais lenta do que a matriz porosa, o que pode ter consequências do ponto de vista ambiental. Porém, ainda que se reconheça que em trabalhos futuros se deve ponderar a substituição da resina usada por compostos biodegradáveis, a análise SDT feita aos resíduos de revestimento que ficaram em solução, demonstrou que a temperatura de degradação deste resíduo é de 177,6 °C, um valor bastante inferior ao da resina antes de ser aplicada aos difusores. Deste modo, conclui-se que embora o revestimento não se tenha degradado ao fim de 56 h, neste tempo já se encontrava num estado avançado de degradação.

3.3. Cinética de libertação do α -pineno

A análise de libertação do α -pineno é uma etapa crucial para verificação da emissão dos voláteis nas formulações. O método gravimétrico dá uma indicação da perda de massa em intervalos reduzidos e controláveis, ao passo que a análise cromatográfica identifica especificamente cada volátil existente, ainda que este seja emitido em concentrações reduzidas.

Os dados da análise gravimétrica foram compilados na Tabela 10. As Figuras 17A e 17B traduzem, respetivamente, a média da massa total de voláteis libertados na qual estão englobados o α -pineno e outros voláteis existentes no revestimento, e apenas a massa acumulada de α -pineno libertado.

Tabela 10 - Capacidade de carregamento de α -pineno nas matrizes e dimensões das amostras analisadas por gravimetria. D=diâmetro; h=altura

Formulação (PCL : cera : serradura : α -pineno)	α -pineno libertado (g)	$m_{\alpha\text{-pineno libertado}}/$ $m_{\text{base sólida}} \text{ (g/g)}$	Eficiência de incorporação (%)	D × h (cm)
(1 : 0 : 0 : 0)		-		1,67 × 1,61
				1,64 × 1,65
(1 : 0 : 0 : 1,02)	0,47319	0,47782	46,85	1,56 × 2,91
	0,49735	0,50075	49,09	1,57 × 3,2
(1 : 0 : 0 : 1,02)*	0,59917	0,60500	59,31	1,7 × 3,34
	0,40365	0,40788	39,88	1,61 × 2,96
(0,70 : 0,30 : 0 : 1,02)	0,5439	0,54184	53,12	1,6 × 1,65
(0,70 : 0,30 : 0 : 1,02)*	0,9833	1,00873	98,99	1,8 × 1,67
	0,31348	0,31962	31,34	1,78 × 1,58
(0,85 : 0 : 0,15 : 1,02)	0,60641	0,61381	60,18	1,8 × 1,81
	0,56324	0,56691	55,58	1,83 × 1,85
(0,85 : 0 : 0,15 : 1,02)*	0,53341	0,53923	52,87	1,86 × 1,74
	0,88889	0,90013	88,25	1,93 × 1,74
(0,70 : 0,30 : 0 : 1,02) ^a	0,59021	0,59396	58,23	2,01 × 1,65
	0,57355	0,58109	56,97	1,96 × 1,61
(0,80 : 0 : 0,25 : 0,25) ^{a,b}	0,08646	0,08195	32,78	1,71 × 2,64
	0,08567	0,08125	32,50	1,7 × 2,6
(0,75 : 0 : 0,15 : 1,02)	0,59669	0,66051	64,76	1,68 × 1,64
	0,57343	0,63537	62,29	1,69 × 1,65

^aNão foi utilizada a mesma distribuição de tamanhos de partículas de cera ou serradura que os de PCL.

^bA serradura não foi previamente imersa em α -pineno.

Para as amostras sem revestimento, considerou-se que a perda de massa das amostras verificada ao longo das 7 semanas de ensaio se deviam essencialmente à libertação do α -pineno incorporado na matriz e que todo o CO₂ utilizado no processamento se difundiu para o exterior da matriz durante a despressurização. Este pressuposto foi baseado na variação da massa das amostras (1: 0 : 0 : 0), processadas apenas com PCL, que foi praticamente nula (Figura 17A).

Por outro lado, para os difusores revestidos, a massa perdida é resultado da volatilização do α -pineno e de outros compostos voláteis, essencialmente água, presentes na resina de base aquosa utilizada como revestimento. Por conseguinte, para conhecer a massa de α -pineno libertado (Tabela 10) foi necessário estimar e descontar a massa perdida devido à perda de massa do revestimento (H₂O e outros compostos), embora se reconheça que a interação da água com o α -pineno possa alterar a volatilização do mesmo. Uma vez que esta massa não

era conhecida, para efeitos de cálculo foi usada uma estimativa obtida a partir da perda de massa registada ao longo do tempo por três matrizes porosas produzidas da mesma forma que as restantes mas que, antes de serem revestidas, foram libertadas de α -pineno. No entanto, esta aproximação não foi a mais adequada uma vez que, quando misturados com α -pineno, a taxa de volatilização dos compostos do revestimento é alterada e por isso a massa perdida pelas amostras libertadas antes de serem revestidas é diferente dos difusores com α -pineno. Além deste fator, outra justificação para os desvios-padrão verificados entre réplicas (Figura 17A e B), é a massa de revestimento aplicada em cada amostra que, dado o método de aplicação adotado é variável e, por isso, a massa de voláteis presente também é diferente. Porém, em média, a massa de voláteis libertada é de 0,68992 g.

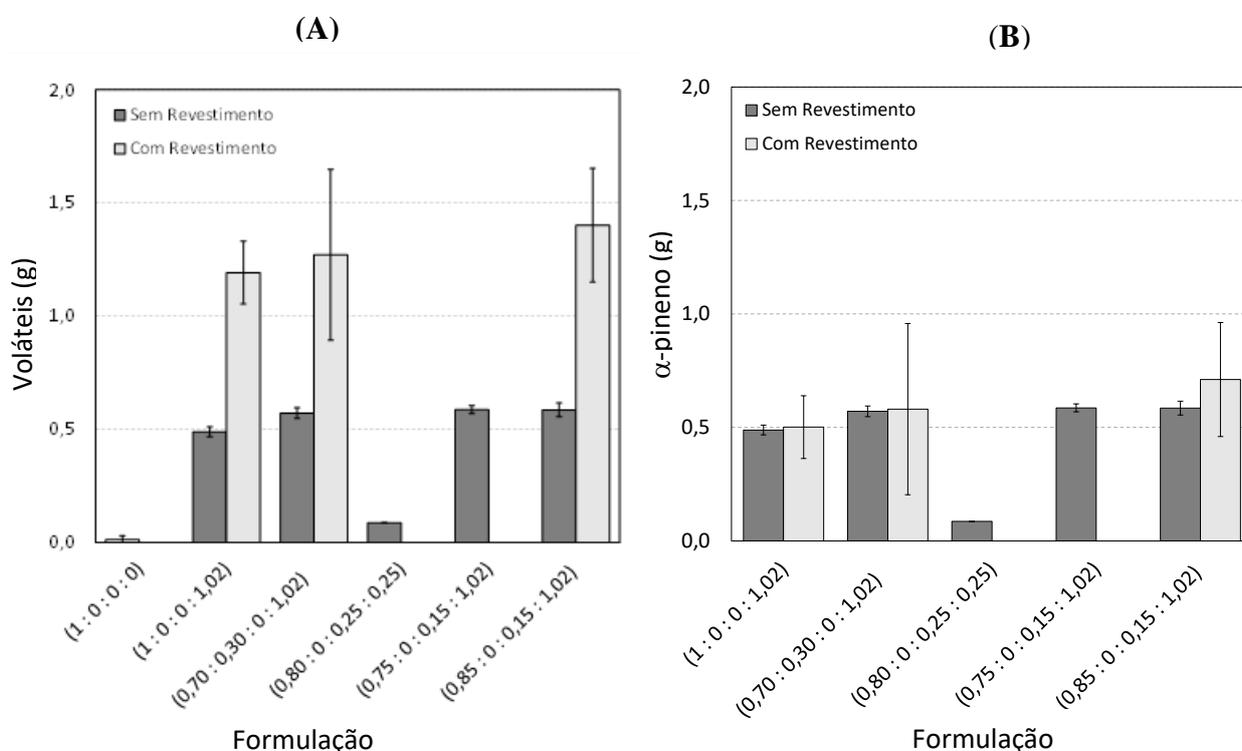


Figura 17 - Massa de voláteis total (α -pineno, H₂O e outros compostos do revestimento e CO₂) (A) e massa de α -pineno total libertada a partir das amostras (B).

A quantidade total de α -pineno libertada durante as 7 semanas foi não só diferente entre amostras com diferentes composições mas também entre réplicas da mesma formulação (Tabela 10). Esta diferença que é mais evidente nas amostras com revestimento pode ser devida a vários fatores: à variabilidade inerente ao pré-processamento do material polimérico que pode resultar em pós de PCL com cadeias com diferentes pesos moleculares; à

variabilidade associada à origem natural dos materiais usados para a produção de compósitos; ao método de processamento e de revestimento e, para o caso das amostras revestidas, à aproximação feita da massa perdida pelo revestimento (H_2O e outros compostos).

Na análise destes resultados considerou-se ainda que a quantidade total de α -pineno libertado durante o tempo do ensaio correspondia à massa total de α -pineno que foi possível incorporar dentro da formulação, uma vez que a variação de massa das amostras ao fim deste tempo já estava no limite de deteção do equipamento. Contudo, reconhece-se que esta consideração pode não ser completamente correta uma vez que embora a variação da massa das amostras pudesse ser mínima, o ensaio não foi prolongado até que ocorresse a degradação das formulações, devido ao facto da PCL demorar muito tempo a degradar-se, e deste modo, o óleo que incorporado nos poros cegos, nas cadeias poliméricas ou nas partículas de cera e serradura pode não ter sido contabilizado.

Partindo do pressuposto anterior, e analisando a massa de α -pineno libertado pelas formulações sem revestimento, pode constatar-se que o método de processamento permite atingir uma eficiência de incorporação média de 55%, definida como a massa de α -pineno libertada em relação à massa de α -pineno utilizado na preparação da amostra. A partir destes resultados pode inferir-se acerca da quantidade de α -pineno incorporado nas formulações com revestimento, uma vez que se pode assumir que antes da aplicação do revestimento as amostras continham aproximadamente a mesma massa de α -pineno que os respetivos difusores sem revestimento. No entanto, uma vez que durante o processo de secagem do revestimento ocorrem perdas de matéria por volatilização dos compostos da resina e também de α -pineno, é expectável que estas amostras libertem uma menor quantidade de α -pineno total libertado em relação às respetivas amostras não revestidas, mas não afetaria a velocidade de difusão destes compostos.

Comparando agora os resultados obtidos para as formulações com uma base sólida unicamente polimérica e para as formulações com compósitos, pode constatar-se que ao fim das 7 semanas de ensaio, os materiais compósitos libertaram maiores quantidades de α -pineno do que as matrizes formadas apenas PCL. Isto sugere que, com a adição de cera ou serradura à matriz, se conseguem produzir formulações com uma maior capacidade de

carregamento de óleo, o que se deve ao facto da cera e a serradura serem hidrofóbicas e adsorventes.

Analisando os compósitos produzidos com serradura em diferentes proporções (Tabela 10), observa-se que as formulações (0,75 : 0 : 0,15 : 1,02) e (0,85 : 0 : 0,15 : 1,02) conseguiram incorporar, em média, respetivamente 63,52 e 57,88% do α -pineno utilizado no processamento. Estes resultados permitem concluir que quanto maior for a razão PCL : serradura usada, menor será a eficiência de incorporação. Esta conclusão vai de encontro ao que tinha seria expectável tendo em conta que a porosidade e a área de superfície (BET) determinadas anteriormente, estão relacionadas com a capacidade de carregamento de óleo na matriz.

Por outro lado, os resultados da análise gravimétrica à formulação (0,80 : 0 : 0,25 : 0,25), cuja a eficiência de incorporação é, em média, de 32,64%, mostraram que a capacidade de carregamento de óleo das outras formulações com serradura é significativamente superior. Esta diminuição pode-se dever à menor quantidade de α -pineno utilizada, que é um agente porogénico, ou também pode indicar que a serradura não tem um carácter porogénico e, por isso, não aumenta a área de superfície específica. Apenas a área de superfície da serradura é somada à da matriz polimérica porosa (cuja porosidade foi obtida pelo CO₂), ou seja, a serradura vai ser um agente adsorvente de óleo que vai alterar a estrutura, deixando-a menos densa, mas não aumenta a porosidade do material final. Deste modo, uma vez que um dos objetivos é conseguir incorporar na matriz a maior quantidade de α -pineno possível, entre os compósitos com serradura, as formulações (0,75 : 0 : 0,15 : 1,02) e (0,85 : 0 : 0,15 : 1,02) são as mais promissoras para alcançar os objetivos do projeto, contendo maior quantidade de α -pineno.

Na Figura 18, encontra-se representada a evolução da massa das amostras registada diariamente ao longo das primeiras 2 semanas após o processamento das formulações. A variação da massa das amostras com revestimento pode ser considerada como o resultado da libertação de α -pineno e também dos voláteis presentes no revestimento (H₂O e outros compostos), uma vez que a perda de massa por volatilização do revestimento foi variável com a composição de cada amostra. Por conseguinte, para conhecer a cinética de libertação do ingrediente ativo foi efetuada uma análise cromatográfica que permite identificar os compostos foram emitidos.

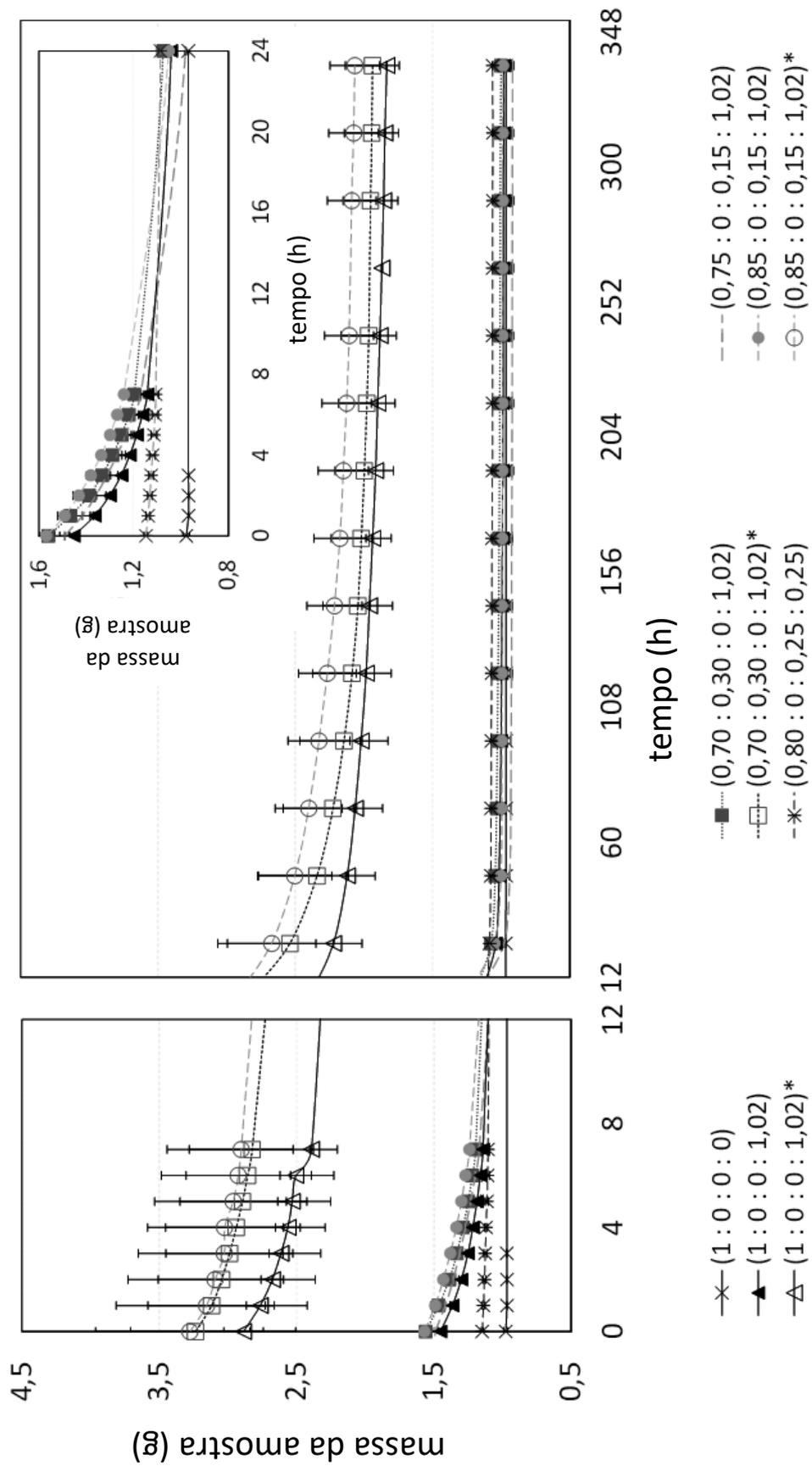


Figura 18 - Perda de massa das amostras analisadas por gravimetria, ao longo das primeiras 2 semanas de ensaio.

Ao fim das primeiras 24 h todas as amostras já tinham libertado mais de 80 % da quantidade de α -pineno incorporada, à exceção da formulação (0,80 : 0 : 0,25 : 0,25) (Figura 18). Embora a partir deste tempo a variação de massa das amostras fosse baixa, a análise gravimétrica foi prolongada até às 7 semanas uma vez que, apesar de haverem dúvidas acerca da adsorção de α -pineno nas paredes do túnel (composição de PVC), os resultados obtidos por cromatografia para as amostras analisadas no túnel de vento, demonstraram que após 25 dias algumas amostras ainda libertavam α -pineno. Este assunto será discutido mais adiante.

A perda de massa das formulações sem revestimento, em particular durante as primeiras 24 h demonstra que a cinética de libertação de α -pineno dos difusores depende da composição da matriz. Além disso, os resultados da regressão linear feita a estas curvas (ANEXO VII), permitem ainda determinar a variação da taxa de libertação de cada formulação, ao longo do tempo. Analisando os declives obtidos pela regressão linear, verifica-se que durante as primeiras 3 h, as amostras com cera têm uma maior taxa de libertação, seguidas das amostras com uma matriz formada apenas por PCL e das amostras com serradura e com 1,02 g de α -pineno. Já entre as 3 e as 6 h, as amostras com uma base sólida constituída apenas por PCL, passam a ter a menor taxa de libertação e, entre as 6 e as 24 h, a taxa de libertação dos difusores com serradura torna-se superior à dos difusores com cera, continuando as amostras com a formulação (1 : 0 : 0 : 1,02) a apresentar a menor taxa de libertação.

Ao contrário do que aconteceu nas formulações sem revestimento, os difusores de α -pineno que foram revestidos ainda apresentaram variações de massa significativas ao fim de 336h (2 semanas). Embora em parte estas variações de massa podiam ser devidas à volatilização do revestimento (H_2O e outros compostos), a maior taxa de libertação verificada ao fim deste período de tempo pode também estar relacionada com a criação de uma resistência à passagem do composto bioativo quando é adicionada uma película de resina, e que permite prolongar o tempo de libertação.

Modelação da cinética de libertação

Os resultados da aplicação do modelo de Korsmeyer-Peppas' às curvas de libertação estão representados na Tabela 11, tendo-se obtido para todas as amostras um coeficiente de correlação superior a 0,94.

Tabela 11 - Parâmetros característicos da cinética de libertação.

Formulação (PCL: cera : serradura: α -pineno)	Parâmetros cinéticos		
	n	k	R ²
(1 : 0 : 0 : 1,02)	1,0041	0,3676	0,9776
(1 : 0 : 0 : 1,02)*	0,9197	0,3093	0,9720
(0,70 : 0,30 : 0 : 1,02)	1,0093	0,3561	0,9691
(0,70 : 0,30 : 0 : 1,02)*	0,7029	0,3115	0,9486
(0,85 : 0 : 0,15 : 1,02)	1,0226	0,3201	0,9809
(0,85 : 0 : 0,15 : 1,02)*	0,7121	0,3174	0,9627

*Amostras com revestimento

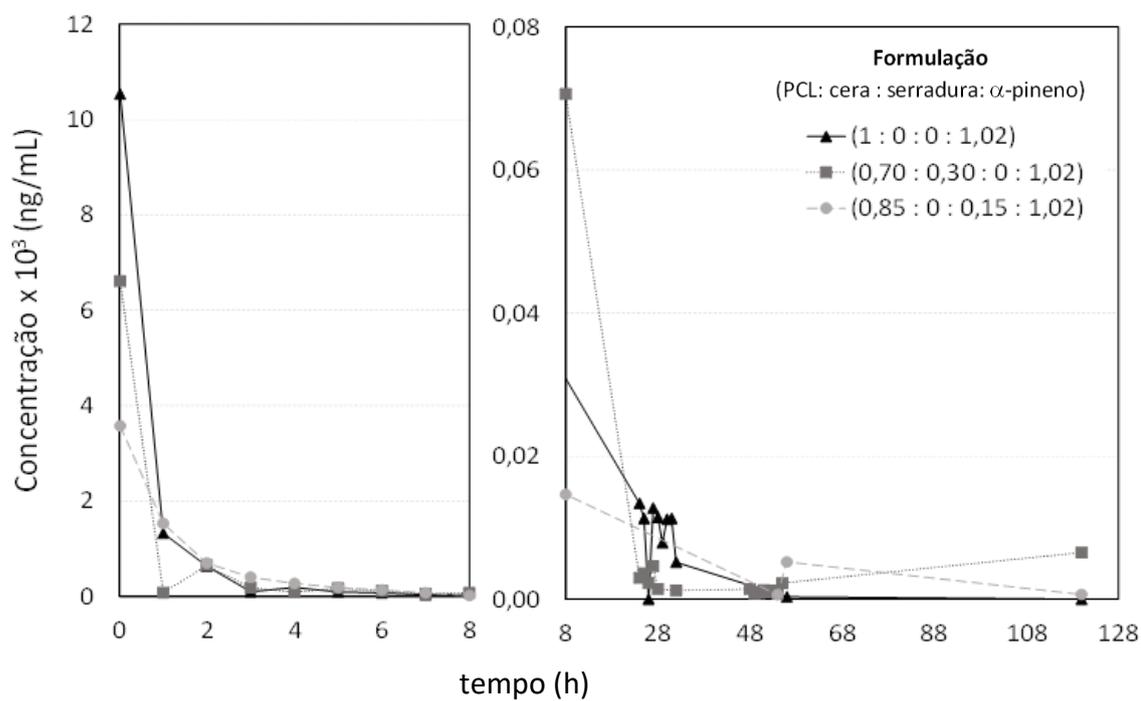
Analisando o parâmetro n obtido para as diferentes amostras verificou-se que as amostras apresentaram diferentes regimes de libertação. Segundo a classificação de Macheras e Illiadis, (2016) para matrizes cilíndricas, quando n toma valores entre 0,45 e 0,89 como é o caso das amostras com enchimento e revestimento, estamos perante um mecanismo de difusão anómalo ou não-Fickiano [119], i.e., que devido à relaxação das cadeias poliméricas, ao longo do tempo a libertação ocorre por diferentes mecanismos [125]. No entanto, para as amostras sem revestimento e para a formulação (1 : 0 : 0 : 1,02)*, ou seja com revestimento mas sem enchimento, este parâmetro toma valores superiores a 0,89, indicando que o mecanismo de libertação é do tipo transporte caso II. Deste modo, conclui-se que a aplicação de enchimento e de revestimento, permite que o mecanismo de libertação se aproxime mais da difusão Fickiana. Quando observamos a diferença entre os valores da constante cinética, k , obtidos quando é aplicado o revestimento a cada formulação, verifica-se que quando é aplicado o revestimento, esta constante diminui, o que indica que a velocidade de libertação das amostras com revestimento é inferior à velocidade das respetivas amostras sem revestimento. Estes resultados sugerem que com a aplicação de revestimento, a taxa de libertação diminui e, por conseguinte, que o tempo de duração da libertação pode ser superior [103]. Estes resultados são comprovados pelos resultados da análise cromatográfica no túnel de vento.

Além da análise gravimétrica, a taxa de libertação das formulações foi estudada recorrendo à técnica SPME e à análise cromatográfica das formulações colocadas a libertar no túnel de vento. Na Figura 19 estão representados os valores de concentração obtidos ao longo do tempo, durante a exposição dos difusores ao ambiente do túnel de vento, e lidos por análise cromatográfica. Os valores de concentração apresentados foram determinados a partir das curvas de calibração elaboradas para as fibras SPME usadas nos ensaios.

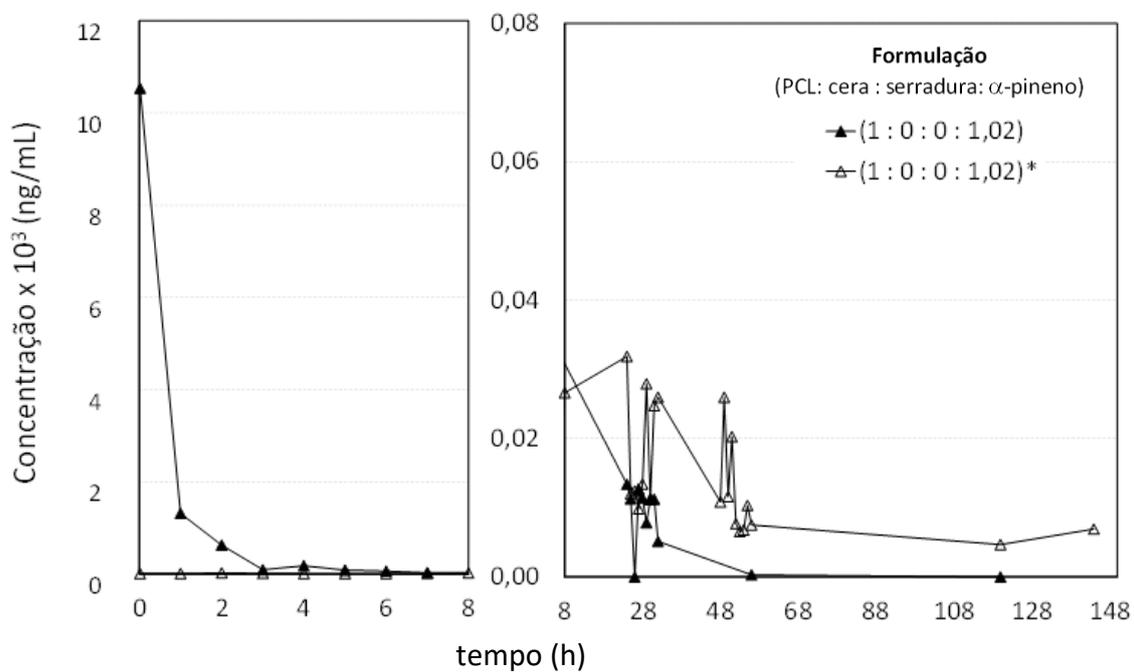
Durante a difusão do composto volátil das matrizes porosas podem distinguir-se duas fases onde predominam diferentes mecanismos de libertação. Durante a primeira fase ocorre, maioritariamente, a saída das moléculas adsorvidas à superfície externa da matriz por convecção e na segunda fase, o mecanismo predominante é a difusão do interior da matriz, sendo que nesta fase é libertada a maior parte do α -pineno retido nos poros interconectados da matriz [125]. Como consequência destas duas etapas, a taxa de libertação dos difusores de α -pineno pode ser bastante variável até que seja atingido um equilíbrio entre o ambiente externo e o ambiente do difusor. Esta variação é facilmente identificada a partir dos resultados da análise cromatográfica das amostras colocadas em libertação no túnel de vento.

Analisando o comportamento das amostras sem revestimento (Figura 19A), pode observar-se que no fim do primeiro minuto, após a entrada das amostras no túnel, o valor de concentração medido foi bastante superior aos valores medidos durante o resto do ensaio. Este pico, designado em inglês por *burst*, resulta do grande gradiente de concentração que se forma entre o ambiente do túnel e a superfície do difusor, até que seja atingido o equilíbrio entre estes dois ambientes. Durante o *burst* ocorre essencialmente a libertação das moléculas adsorvidas à superfície externa da matriz [126] e, por conseguinte, quanto maior for a área da superfície externa da matriz, maior será a quantidade de óleo adsorvido e mais acentuado é o *burst* inicial, o que pode justificar que este efeito seja mais acentuado no caso da formulação (1 : 0 : 0 : 1,02).

A)



B)



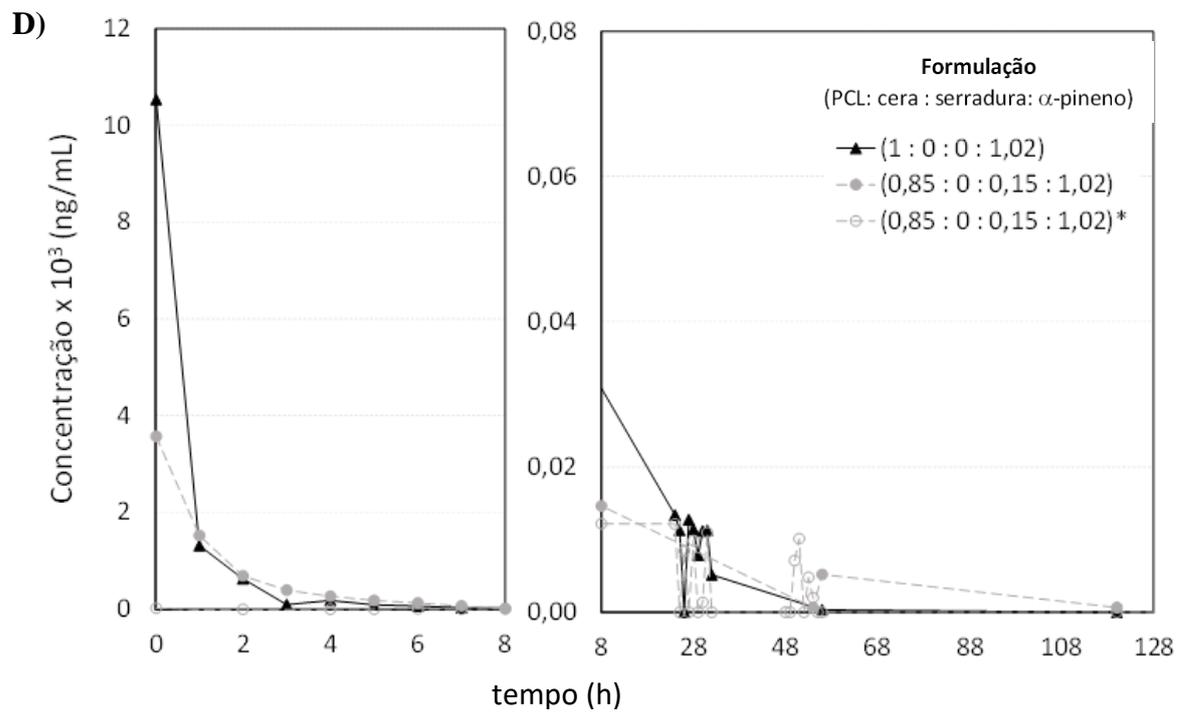
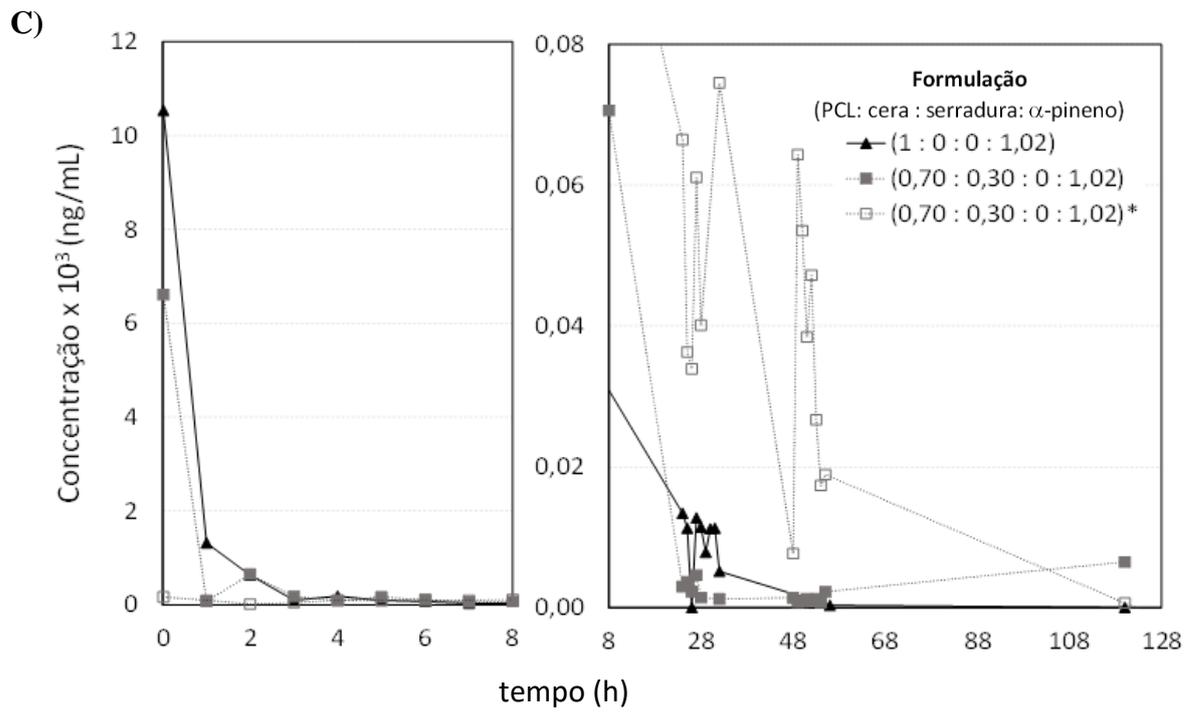


Figura 19 – Concentração de α -pineno medida no túnel de vento ao longo do tempo pelas formulações sem revestimento contendo ou não enchimentos (A) e contendo ou não revestimento (B, C e D).

Nas 8 h seguintes, detetou-se uma redução abrupta da concentração de α -pineno lida no túnel. Durante este período, ao fim de 1 hora de ensaio, pode identificar-se a diminuição da concentração para valores inferiores a 2×10^{-3} ng/mL enquanto, ao fim de 3 h, a emissão de α -pineno já tinha diminuído para níveis de concentração inferiores a 25 % deste valor. De um modo geral, durante as primeiras 7 h, a formulação (0,85 : 0 : 0,15 : 1,02) emitiu α -pineno em maior concentração seguida da formulação (0,70 : 0,30 : 0 : 1,02) e, por fim da formulação (1 : 0 : 0 : 1,02). Entre as 8 e as 48 h, observou-se uma inversão desta ordem, e o difusor (1 : 0 : 0 : 1,02) passou a emitir em concentrações superiores às dos difusores (0,70 : 0,30 : 0 : 1,02) e (0,85 : 0 : 0,15 : 1,02). A afinidade do α -pineno pela cera e pela serradura pode ter prevalecido à porosidade do material e, após este tempo e todo o α -pineno presente na superfície ter sido libertado, o gradiente de concentração que se formou devido ao α -pineno adsorvido nas partículas de cera, conduziu a que as amostras emitissem em maior concentração.

Por último, na medição feita às 122 h, verifica-se que os níveis de concentração emitidos pelo difusor (0,70 : 0,30 : 0 : 1,02) eram bastante superiores aos do difusor (0,85 : 0 : 0,15 : 1,02), enquanto o difusor (1 : 0 : 0 : 1,02) já não apresentou sinais de emissão de α -pineno. Os resultados obtidos para a variação de concentração de α -pineno medida ao longo do tempo permitem concluir que a partir de materiais compósitos com cera ou serradura é possível controlar a saída do ingrediente ativo da matriz, prolongando o tempo de libertação por períodos superiores a 122 h.

Com a aplicação de uma camada de revestimento à matriz, que funcionasse como uma barreira à saída do volátil, esperava-se conseguir prolongar o tempo de ensaio em que se verificasse emissão de α -pineno. Em primeira instância, os resultados revelaram que com a adição de revestimento se deixa de verificar o pico de concentração medido no primeiro minuto para os difusores sem revestimento (Figura 19B, C e D). Isto pode não só dever-se à resistência à passagem das moléculas de α -pineno da matriz para a atmosfera do túnel, que é criada quando se aplica o revestimento, mas também porque, durante o processo de secagem da resina, parte do óleo volatiliza, principalmente as moléculas que estavam adsorvidas à superfície da matriz.

O facto dos difusores revestidos deixarem de apresentar o *burst* inicial (Figura 19A), tem um efeito positivo para a aplicação em estudo, uma vez que a este pico de concentração estão

muitas vezes associadas desvantagens como a rápida libertação de ingrediente ativo, o que torna o tempo de ação do produto reduzido ou implica a utilização de maiores quantidades de ingrediente ativo, e os valores de concentração emitidos durante esta fase podem ser imprevisíveis e ter um efeito tóxico para o inseto vetor ou para outras espécies [126].

Nos resultados obtidos pode observar-se que, durante as primeiras 24 horas, os difusores sem revestimento emitem α -pineno em maiores concentrações. Contudo, ao fim deste tempo, os difusores revestidos passam a emitir em gamas de concentrações superiores às respetivas amostras sem revestimento, à exceção do compósito com cera onde esta inversão ocorre logo ao fim de 8 h.

Na Figura 19B, é evidente que a adição do revestimento permitiu não só operar em níveis de concentração superiores a partir das 24 h, como também prolongar o tempo de libertação em relação à formulação (1 : 0 : 0 : 1,02). Por outro lado, constatou-se que, com a adição de revestimento à formulação (0,70 : 0,30 : 0 : 1,02), a partir das 8 h se passa a conseguir operar em concentrações mais elevadas, pelo menos até às 56 h (Figura 19C). A partir deste tempo, apesar de haverem dúvidas acerca da adsorção de α -pineno nas paredes do túnel (composição de PVC), a formulação (0,70 : 0,30 : 0 : 1,02)* passou a apresentar menores níveis de emissão do que quando não era aplicado revestimento.

Por último, observando o comportamento do compósito de serradura, verifica-se que quando é aplicado revestimento, a emissão de α -pineno passa ocorrer em níveis de concentração bastante inferiores aos das restantes formulações. Além disso, pode constatar-se que os níveis de concentração medidos para a formulação (0,85 : 0 : 0,15 : 1,02)* foram bastante flutuantes, intervalando entre períodos sem emissão e períodos com picos significativamente elevados face aos obtidos para o difusor não revestido (Figura 19D). No entanto, ao fim de 122 h a formulação (0,85 : 0 : 0,15 : 1,02)* já não apresentava sinais de libertação, contrariamente ao que aconteceu quando a formulação não era revestida. Para as restantes formulações, tal como tinha sido observado nos resultados da análise gravimétrica (Tabela 8), a massa total α -pineno libertada por cada difusor durante os ensaios no túnel, e a massa libertada pela respetiva formulações com aplicação revestimento, foram idênticas. Deste modo, se observarmos a massa total libertada pela formulação (0,85 : 0 : 0,15 : 1,02)* até às 144 h e pela formulação (0,85 : 0 : 0,15 : 1,02), para o mesmo período de tempo, e considerando que a quantidade de α -pineno incorporado durante o processamento, tenha sido semelhante em ambas as amostras, a diferença de cerca de metade da massa libertada

entre os difusores pode indicar que, embora os níveis de concentração medidos durante o ensaio tenham sido muito baixos, o difusor (0,85 : 0 : 0,15 : 1,02)* ainda poderia conter α -pineno no seu interior que não foi libertado durante o tempo em que decorreu o ensaio. Estes resultados sugerem que o tempo de libertação desta formulação seria superior ao das restantes amostras, ainda que os níveis de concentração em que a amostra opera durante as 144 h sejam inferiores. No entanto, dado o tempo disponível para a realização do projeto, apenas foi possível prolongar este ensaio até às 144 h e, por isso, no futuro este ensaio deve ser repetido para um maior período de tempo.

Tabela 12 – Massa de α -pineno libertado pelos difusores durante o ensaio no túnel de vento.

Formulação (PCL : cera : serradura : α -pineno)	α-pineno libertado (g)	$m_{\alpha\text{-pineno libertado}}/m_{\text{base sólida}}$ (%)
(1 : 0 : 0 : 1,02)	0,5704	57,42
(1 : 0 : 0 : 1,02)*	0,4678	46,66
(0,70 : 0,30 : 0 : 1,02)	0,6495	64,76
(0,70 : 0,30 : 0 : 1,02)*	0,6610	65,80
(0,85 : 0 : 0,15 : 1,02)	0,6710	67,04
(0,85 : 0 : 0,15 : 1,02)*	0,3153	31,69

Também por questões relacionadas com o tempo disponível para a concretização deste trabalho e pela otimização do ensaio do túnel, só foi possível analisar uma réplica de cada amostra. De forma a comprovar estes resultados, no futuro este ensaio deverá ser repetido para todas as amostras. Além disso, ao longo do trabalho identificou-se que as condições de libertação de α -pineno pelo difusor podem ter sido variáveis, uma vez que segundo Bernardo e Braga (2018), a 25 cm da ventoinha ainda se opera numa região de turbulência, devendo a amostra ter sido colocada a cerca de 1 m da ventoinha, onde o regime de escoamento já estaria perfeitamente estabelecido [127].

Outro fator que não foi tido em consideração e que pode ter influenciado a taxa de libertação e consequentemente a concentração medida no túnel, foi o fluxo de ar da hotte para a qual a saída do túnel estava direcionada. Numa fase posterior aos ensaios, identificou-se que o caudal de exaustão da hotte é condicionado por uma torre de saída do edifício e que era desconhecida pelos utilizadores. Outra possível fonte de erro foi o material constituinte do túnel (PVC), tendo-se verificado que durante os ensaios algum óleo ficava adsorvido às

paredes do túnel e que não era possível contabilizar essa quantidade. Ainda assim, com a realização deste ensaio foi possível concluir que os difusores com diferentes composições emitem em gamas de concentração distintas e por diferentes períodos de tempo. A adição de revestimento permite controlar a cinética de libertação, evitando que ocorra um *burst* de concentração numa fase inicial.

É também importante referir que este ensaio permitiu identificar e confirmar os voláteis emitidos pelos difusores e, deste modo, fazer uma quantificação específica e seletiva do α -pineno sem a interferência da água ou de outros compostos do revestimento. No entanto, esta quantificação é feita pontualmente e numa secção específica do túnel, o que oferece apenas a concentração do α -pineno num determinado tempo t .

Uma vez que ainda não foram feitos estudos acerca da taxa de libertação ótima a que o α -pineno deve ser libertado das armadilhas utilizadas nos pinhais para que funcione como atrativo, em específico para o inseto *M. galloprovincialis*, estabeleceu-se que a taxa de libertação do produto desenvolvido deveria ser entre 0,32 e 1000 mg/dia. Esta gama foi definida a partir das taxas de libertação utilizadas nos trabalhos de Miller et al. (2009) e Boone et al. (2015) onde, tal como é esperado para o produto desenvolvido nesta tese, o α -pineno em conjunto com outras substâncias semioquímicas foi utilizado em armadilhas do tipo multi-funil com vista a atrair o inseto *M. galloprovincialis* [48, 81]. Na literatura são também encontrados valores de 2000-3000 mg/dia, geralmente definidos a partir da análise gravimétrica ao recipiente com α -pineno colocado na armadilha e, por conseguinte, estes valores podem estar acima da taxa de libertação ótima para apresentar bioatividade com o inseto. Nos casos em que o α -pineno era libertado às taxas de 0,32 e 1000 mg/dia, anteriormente mencionadas, a sua eficácia foi igualmente demonstrada e, deste modo, é evitado um uso excessivo deste composto e de recursos económicos.

Tendo em consideração a perda de massa diária dos difusores analisados por gravimetria (Tabela 13) se verificou que, ao fim de 2 semanas, os difusores ainda apresentavam emissão de α -pineno com concentrações de 0,72 a 13,48 mg/dia, ou seja muito acima dos valores referidos e que, a análise cromatográfica feita às amostras ao fim de 25 dias, demonstrou que estas ainda emitiam α -pineno, conclui-se que estas formulações têm potencial para, provavelmente, conseguirem emitir α -pineno num prazo para além do tempo das 7 semanas do ensaio de gravimetria.

Tabela 13 - Taxa de α -pineno pontualmente libertado pelos difusores, medida por análise gravimétrica.

t (h)	Taxa de libertação pontual (mg/dia)						
	(1:0:0:1,02)	(1:0:0:1,02)*	(0,70:0,30:0:1,02)	(0,70:0,30:0:1,02)*	(0,85:0:0,15:1,02)	(0,85:0:0,15:1,02)*	(0,80:0:0,25:0,25) (0,75:0:0,15:1,02)
24	412,07	663,69	485,16	0,00	518,20	0,00	61,34 511,43
48	23,42	100,05	29,48	84,75	47,97	153,05	9,32 40,32
72	8,77	58,58	10,46	54,62	5,05	98,10	2,72 7,53
96	5,57	42,84	5,83	42,87	0,80	73,82	1,65 2,72
120	3,95	36,80	4,67	38,62	0,96	63,69	0,87 3,44
144	3,90	24,12	5,06	26,48	1,34	53,64	4,62 0,91
168	2,49	22,92	2,76	16,11	1,23	32,97	0,00 0,76
192	2,32	22,44	3,86	19,61	1,74	21,70	2,97 1,89
216	1,61	14,36	0,19	16,84	1,20	26,75	1,17 1,76
240	0,98	16,40	3,12	13,13	0,00	14,80	0,61 0,00
264	1,09	14,33	0,75	12,46	1,07	0,00	0,00 0,81
288	2,23	12,57	0,34	12,25	0,94	18,45	0,86 1,18
312	1,06	9,70	2,55	9,71	0,34	13,91	0,72 0,00
336	1,28	13,48	2,98	13,01	1,72	8,69	0,00 1,58

CONCLUSÃO

Foram preparadas formulações poliméricas porosas (com *foaming* com CO₂ supercrítico), às quais foi adicionado α -pineno como composto atrativo para serem empregues em armadilhas, no combate ao inseto vetor do NMP. Os compósitos porosos foram constituídos por misturas de α -pineno, PCL e cera ou serradura, aos quais foi adicionada uma película de revestimento para o controlo da libertação do volátil.

O estudo da cinética de libertação deste volátil demonstrou que a adição de uma camada de revestimento permitiu controlar a taxa de libertação, deixando de se observar um efeito *burst* (pico de concentração) no início da libertação. Este estudo comprovou também que a adição de cera e serradura à matriz polimérica possibilitou aumentar a capacidade de carregamento de α -pineno na matriz e, simultaneamente, controlar a taxa de libertação do composto, conseguindo-se obter um produto com potencial para emitir α -pineno por um período superior a 7 semanas.

A caracterização dos materiais desenvolvidos permitiram concluir que com a formação de materiais compósito se consegue controlar parâmetros diretamente relacionados com a taxa de libertação das formulações, nomeadamente a porosidade e a área de superfície específica da matriz. Em relação à degradabilidade das formulações, os resultados da caracterização termogravimétrica e degradação acelerada (com NaOH) revelaram que com a adição de cera e serradura, se consegue obter um material poroso que se degrade mais rápido, o que é vantajoso tanto do ponto de vista ambiental (uso de materiais naturais de fonte renovável) como para o controlo da taxa de libertação das formulações. Além disso, a análise da estabilidade dos óleos essenciais perante a exposição prolongada a fatores externos, nomeadamente à radiação UV e às temperaturas de 25 e 40°C, indicaram que, ao fim de 1 mês de exposição, o eucaliptol e o α -pineno não apresentaram sinais de degradação.

Concluiu-se assim que o principal objetivo deste projeto foi alcançado e que as formulações desenvolvidas são promissoras para aplicar num futuro produto comercial para controlo do NMP em combinação com armadilhas florestais. Além disso, as formulações e as metodologias desenvolvidas durante este trabalho podem vir a ser aplicadas no controlo de outras pragas e serem utilizadas com outras substâncias bioativas, se forem devidamente adaptadas.

TRABALHOS FUTUROS

Considerando os resultados obtidos durante o desenvolvimento deste trabalho, recomendam-se algumas opções de melhoria a desenvolver no futuro, uma vez que devido ao tempo e aos recursos disponíveis não foram possíveis realizar.

- Desenvolver formulações com eucaliptol ou outros óleos essenciais que demonstrem ter atividade biológica com o inseto vetor.
- Avaliar a possibilidade de utilizar outro material no revestimento das matrizes, que seja biodegradável e testar outro método para aplicar o revestimento que não implique o uso de calor.
- Projetar uma célula utilizada no processamento das matrizes, com maiores dimensões, que permita produzir formulações de maior volume que possam carregar uma maior quantidade de óleo.
- Repetição dos ensaios no GC com a distância adequada (1 m) entre a ventoinha e a fonte de emissão de voláteis e ponderar a utilização de um túnel constituído por um material inerte, que não adsorva α -pineno.
- Repetição da análise cromatográfica da libertação no túnel de vento para réplicas de cada amostra.
- Testar o desempenho das formulações desenvolvidas, primeiramente num túnel de vento onde são colocadas em conjunto com os insetos *M. galloprovincialis* e, posteriormente, em ambiente florestal.
- Analisar as formulações por calorimetria diferencial de varrimento (DSC), de forma a estudar a influência dos diferentes compostos da formulação na temperatura de transição vítrea e a compreender o efeito plastificante que o α -pineno pode ter nas diferentes formulações.

REFERÊNCIAS

1. Quercus. *Floresta*. Acedido em 2 de Janeiro de 2018, em: <http://www.quercus.pt>
2. Branco, M., et al., *Pests and Diseases in Portuguese Forestry: Current and New Threats*, in *Forest Context and Policies in Portugal: Present and Future Challenges*, F. Reboredo, Editor. 2014, Springer International Publishing: Suíça. p. 117-154.
3. Centro Pinus. *A Fileira do Pinho em 2016 - Indicadores da Fileira do Pinho*. 2017. Acedido em 3 de Março de 2018
4. Quercus. *Desflorestação em Portugal é uma das mais elevadas do Mundo*. 2016. Acedido em 21 de Novembro de 2017, em: <http://www.quercus.pt>.
5. ICNF. *IFN6 – Áreas dos usos do solo e das espécies florestais de Portugal continental. Resultados preliminares*. 2013, Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas, Lisboa
6. Carvalho, M., *Floresta está sob a ameaça das pragas, do calor e da incúria*, em *Público*. 2014. Acedido em 30 de Abril de 2018
7. Pereira, J.M.R., *Estimativa do potencial produtivo de resina em pinheiro-bravo no concelho de Castro Daire*. 2015. (Tese de Mestrado). Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa
8. ICNF, *Pragas Florestais - Novos agentes bióticos nocivos*. 2014. Acedido em 5 de Agosto de 2018
9. ICNF, *Relatório de prospeção, monitorização e controlo de organismos de quarentena 2016*. 2016. Acedido em 1 de Maio de 2018
10. Rodrigues, J. M., *Pragas e Doenças que Afetam o Pinhal: Diagnóstico e Medidas de Proteção Fitossanitária*, em *Forum Fitossanidade Florestal*. 2015, ICNF. Acedido em: 5 de Julho de 2018
11. Lee, K.S., *Stability Analysis and Optimal Control Strategy for Prevention of Pine Wilt Disease*. Abstract and Applied Analysis, 2014. p. 15
12. Zhao, B.G., et al., *Pine Wilt Disease*. 2008, Springer, Japão
13. Mota, M.M., et al., *Pine Wilt Disease And The Pinewood Nematode, Bursaphelenchus Xylophilus*, in *Integrated Management of Fruit Crops Nematodes*, A. 2009, Springer, Holanda. p. 253-274
14. Mota, M.M. e Vieira, P.R., *Pine Wilt Disease: A Worldwide Threat to Forest Ecosystems*. 2009, Springer, Holanda.

15. Sousa, E. et al., *Doença da Murchidão do Pinheiro - Interações Biológicas e Gestão Integrada*. 2015, FNAPF, Lisboa
16. Ryss, A. et al., *Pine wilt disease: A short review of worldwide research*. *Forestry Studies in China*, 2012. **13**(2): p. 132-138
17. *Regulamentação (EU) n° 995/2010*. Parlamento Europeu e do Conselho. 20 de Outubro 2010. Bruxelas
18. *Decreto-Lei n° 95/2011*. Diário da República n° 151/2011. 8 de Agosto 2011. Lisboa
19. Boone, C., et al., *Monochamus species from different continents can be effectively detected with the same trapping protocol*. *Journal of Pest Science*, 2018. p. 1-9
20. Vicente, C., et al., *Pine Wilt Disease: a threat to European forestry*. *European Journal of Plant Pathology*, 2012. **133**(1): p. 89-99
21. Bonifácio, L.F.P., *Impacto e evolução da doença da murchidão dos pinheiros (pine wilt disease) na zona afectada a sul do Rio Tejo*. (Tese de Doutoramento). 2009, Universidade de Lisboa
22. Sartoretto, L.M. et al., *Transformação genética: estratégias e aplicações para o melhoramento genético de espécies florestais*. *Ciência Rural*, 2008. **38**: p. 861-871
23. Gonthier, P. e Nicolotti, G. *Infectious forest diseases*. 2013, CABI
24. Rajasekharan, S.K., et al., *Assessments of iodoindoles and abamectin as inducers of methuosis in pinewood nematode, Bursaphelenchus xylophilus*. *Scientific Reports*, 2017. **7**(1): p. 6803.
25. Cram, M. e Hanson, J., *How to Identify and Manage Pine Wilt Disease and Treat Wood Products Infested by the Pinewood Nematode*. 2014, U.S. Forest Service.
26. Firmino, P.N., et al., *Monochamus galloprovincialis and Bursaphelenchus xylophilus life history in an area severely affected by pine wilt disease: Implications for forest management*. *Forest Ecology and Management*, 2017. **389**: p. 105-115.
27. Rassati, D., et al., *Monitoring of the pine sawyer beetle Monochamus galloprovincialis by pheromone traps in Italy*. *Phytoparasitica*, 2012. **40**(4): p. 329-336.
28. Agelopoulos, N., et al., *Exploiting semiochemicals in insect control*. *Pesticide Science*, 1999. **55**(3): p. 225-235.
29. Zhu, H., et al., *Measurement of semiochemical release rates with a dedicated environmental control system*. *Biosystems Engineering*, 2015. **129**: p. 277-287.

30. Petersen-Silva, R., et al., *Atractivo inovador para monitorização de pragas*, em *1º Simpósio SCAP e 7º Congresso da SPF*, 2014, BIOSANI. Acedido a 5 de Fevereiro de 2018
31. Bhagat, D. et al., *Efficient Management of Fruit Pests by Pheromone Nanogels*. Scientific Reports, 2013. **3**: p. 1294
32. Faleiro, J.R., et al., *Controlled Release Products for Managing Insect Pests*. Outlooks on Pest Management, 2016. **27**(4): p. 175-180
33. Regnault-Roger, C., *The potential of botanical essential oils for insect pest control*. Integrated Pest Management Reviews, 1997. **2**(1): p. 25-34
34. Isman, M.B., *Pesticides Based on Plant Essential Oils: Phytochemical and Practical Considerations*, em *Medicinal and Aromatic Crops: Production, Phytochemistry, and Utilization*. Editores: Jeliazkov, V. D. e Cantrell, C. L. 2016, American Chemical Society. p. 13-26
35. Nerio, L.S., et al. *Repellent activity of essential oils: A review*. Bioresource Technology, 2010. **101**(1): p. 372-378
36. Murray, B.I., *Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world*. Annual Review of Entomology, 2006. **51**(1): p. 45-66
37. Dayan, F.E., et al., *Natural products in crop protection*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2009. **17**(12): p. 4022-4034
38. Ibeas, F., et al., *An operative kairomonal lure for managing pine sawyer beetle *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera: Cerymbycidae)*. Journal of Applied Entomology, 2006. **131**(1): p. 13-20
39. Ryall, K., et al., *Further evidence that monochamol is attractive to *Monochamus* (Coleoptera: Cerambycidae) species, with attraction synergised by host plant volatiles and bark beetle (Coleoptera: Curculionidae) pheromones*. 2015, 147(5): p. 564-579
40. Flaherty, L., et al., *Pheromone-enhanced lure blends and multiple trap heights improve detection of bark and wood-boring beetles potentially moved in solid wood packaging*. Journal of Pest Science, 2018. p. 1-17
41. Lucia, A., et al., *Novel polymeric micelles for insect pest control: encapsulation of essential oil monoterpenes inside a triblock copolymer shell for head lice control*. PeerJ, 2017. **5**: p. e3171

42. Batish, D.R., et al., *Eucalyptus essential oil as a natural pesticide*. Forest Ecology and Management, 2008. **256**(12): p. 2166-2174
43. Isman, M.B., *Plant essential oils for pest and disease management*. Crop Protection, 2000. **19**(8): p. 603-608
44. Tripathi, A.K., et al., *A review of essential oils as biopesticide in insect-pest management*. Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy, 2009. **1**(15)
45. Franco, A., et al., *Study of symptoms and gene expression in four Pinus species after pine wood nematode infection*. Plant Genetic Resources, 2011. **9**(2)
46. Szmigielski, R., et al., *Identification of volatiles from Pinus silvestris attractive for Monochamus galloprovincialis using a SPME-GC/MS platform*. Environmental Science and Pollution Research International, 2011. **19**(7): p. 2860-9
47. Fan, J. et al. *Attraction of the Japanese pine sawyer, Monochamus alternatus, to volatiles from stressed host in China*. Annals of Forest Science, 2007. **64**(1): p. 67-71
48. Miller, D.R. e Rabaglia, R.J. *Ethanol and (-)-alpha-Pinene: attractant kairomones for bark and ambrosia beetles in the southeastern US*. Journal of Chemical Ecology, 2009. **35**(4): p. 435-48
49. Pajares, J.A., et al., *Identification and field activity of a male-produced aggregation pheromone in the pine sawyer beetle, Monochamus galloprovincialis*. Journal of Chemical Ecology, 2010. **36**(6): p. 570-83
50. Jurc, M., et al., *The attraction of cerambycids and other xylophagous beetles, potential vectors of Bursaphelenchus xylophilus, to semio-chemicals in Slovenia*. Phytoparasitica, 2012. **40**(4): p. 337-349.
51. Holsten, E.H. et al., *MCH Released in a Novel Pheromone Dispenser Prevents Spruce Beetle, Dendroctonus rufipennis (Coleoptera: Scolytidae), Attacks in South-central Alaska*. Journal of Economic Entomology, 2003. **96**(1): p. 31-34
52. Jayakumar, M. et al., *Repellent activity and fumigant toxicity of a few plant oils against the adult rice weevil Sitophilus oryzae Linnaeus 1763 (Coleoptera: Curculionidae)*. Journal of Entomology and Zoology Studies, 2017. **5**(2): p. 324.
53. Klocke, J.A. et al., *1,8-Cineole (Eucalyptol), a mosquito feeding and ovipositional repellent from volatile oil of Hemizonia fitchii (Asteraceae)*. Journal of Chemical Ecology, 1987. **13**(12): p. 2131-41.

54. Faria, J.M., et al., *Bioactivity against Bursaphelenchus xylophilus: Nematotoxics from essential oils, essential oils fractions and decoction waters*. *Phytochemistry*, 2013. **94**: p. 220-8
55. El-Sayed, A.M., et al., *Potential of "lure and kill" in long-term pest management and eradication of invasive species*. *Journal of Economic Entomology*, 2009. **102**(3): p. 815-35
56. Heuskin, H., et al., *The use of semiochemical slow-release devices in integrated pest management strategies*. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 2011. **15**(3): p. 459-470
57. Allison, J.D., et al., *Design Factors That Influence the Performance of Flight Intercept Traps for the Capture of Longhorned Beetles (Coleoptera: Cerambycidae) from the Subfamilies Lamiinae and Cerambycinae*. *PLOS ONE, Public Library of Science*. 2014. **9**(3): p. e93203
58. Eyre, D. e Haack, R., *Invasive cerambycid pests and biosecurity measures*. 2017, CRC Press, **13**: p. 563-607
59. Wilkins, R., *Controlled Release Formulation, Agricultural*, em *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*. 2004, John Wiley & Sons, Inc
60. Asbahani, A.E., et al., *Essential oils: From extraction to encapsulation*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2015. **483**(1): p. 220-243
61. Turek, C. e Stintzing, F.C., *Stability of Essential Oils: A Review*. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2013. **12**(1): p. 40-53
62. Moretti, M.D.L., et al., *Essential oil formulations useful as a new tool for insect pest control*. *AAPS PharmSciTech*, 2002. **3**(2): p. 64-74
63. Torr, S.J., et al., *Methods for dispensing odour attractants for tsetse flies (Diptera: Glossinidae)*. *Bulletin of Entomological Research*, 2009. **87**(3): p. 299-311.
64. Ghaderi-Ghahfarokhi, M., et al., *Nanoencapsulation Approach to Improve Antimicrobial and Antioxidant Activity of Thyme Essential Oil in Beef Burgers During Refrigerated Storage*. *Food and Bioprocess Technology*, 2016. **9**(7): p. 1187-1201
65. Libs, E.R.S. e Salim, E.R.A. *Formulation of Essential Oil Pesticides Technology and their Application*. *Agricultural Research & Technology*, 2017. **9**(2)
66. Blagoeva, R. e Assen, N., *Monolithic Controlled Delivery Systems: Part I. Basic Characteristics and Mechanisms*. *Bioautomation*, 2006. **4**: p. 80-88

67. Giannoni, P., et al., *Design and characterization of a tissue-engineered bilayer scaffold for osteochondral tissue repair*. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 2015. **9**(10): p. 1182-92
68. Braga, M.E.M., et al., *Active ingredient release from porous matrices to control the insect vector of pine wilt disease, em 12th International Symposium on Supercritical Fluids (12th ISSF 2018)*. 2018: Antibes-Juan-Les-Pins, France
69. Canal, C., et al., *Drug delivery properties of macroporous polystyrene solid foams*. Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences, 2012. **15**(1): p. 197-207
70. Cobby, J. et al. *Influence of Shape Factors on Kinetics of Drug Release from Matrix Tablets I: Theoretical*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 1974. **63**(5): p. 725-732
71. Arancibia, M., et al., *Biodegradable films containing clove or citronella essential oils against the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae)*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013. **3**(3): p. 1-7
72. Sanders, W.R., et al., *Applications and mechanisms of wax-based semiochemical dispenser technology for disruption of grape root borer mating*. Journal of Economic Entomology, 2011. **104**(3): p. 939-46
73. Stelinski, L., et al. *Efficacy and Release Rate of Reservoir Pheromone Dispensers for Simultaneous Mating Disruption of Codling Moth and Oriental Fruit Moth (Lepidoptera: Tortricidae)*. Journal of Economic Entomology, 2009. **102**(1): p. 315-23
74. Tiboni, A. et al. *Evaluation of porous silica glasses as insect pheromone dispensers*. Journal of the Brazilian Chemical Society, 2008,. **19**(8): p. 1634-1640
75. Stipanovic, A.J., et al., *Microparticle Dispensers for the Controlled Release of Insect Pheromones*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004. **52**(8): p. 2301-2308
76. van Steenwyk, R.A. e Oatman, E.R. *Mating Disruption of Tomato Pinworm (Lepidoptera: Gelechiidae) as Measured by Pheromone Trap, Foliage, and Fruit Infestation*. Journal of Economic Entomology, 1983. **76**(1): p. 80-84
77. Shorey, H.H. e Gerber, R.G. *Disruption of Pheromone Communication through the Use of Puffers for Control of Beet Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) in Tomatoes*. Environmental Entomology, 1996. **25**(6): p. 1401-1405
78. Liu, P.S. e Chen, G.F., *General Introduction to Porous Materials, em Porous Materials*. Editores: Liu, P.S. e Chen, G.F. 2014, Boston. p. 1-20

79. Svec, F. e Frechet, J.M.J., *Kinetic Control of Pore Formation in Macroporous Polymers. Formation of "Molded" Porous Materials with High Flow Characteristics for Separations or Catalysis*. Chemistry of Materials, 1995. **7**(4): p. 707-715
80. Rathbone, M.J., et al., *Mechanisms of drug release from veterinary drug delivery systems*, em *Controlled Release Veterinary Drug Delivery*. Editores: Rathbone, M.J. e Gurny, R. 2000, Elsevier, Amsterdão. p. 17-50
81. Boone, C. et al., *Cerambycidae attracted to semiochemicals used as lures for Monochamus spp. in the Sonian Forest, Brussels-Capital Region, Belgium (Insecta: Coleoptera)*. Bulletin de la Société royale belge d'Entomologie, 2015. **151**: p. 122-133
82. Leeke, G.A. et al., *Solubility of Supercritical Carbon Dioxide in Polycaprolactone (CAPA 6800) at 313 and 333 K*. Journal of Chemical & Engineering Data, 2006. **51**(5): p. 1877-1879
83. Gardyne, S.J. et al., *The application of co-melt-extruded poly(ϵ -caprolactone) as a controlled release drug delivery device when combined with novel bioactive drug candidates: Membrane permeation and Hanson dissolution studies*. Results in Pharma Sciences, 2011. **1**(1): p. 80-87
84. Lyons, J.G. et al., *Preparation of monolithic matrices for oral drug delivery using a supercritical fluid assisted hot melt extrusion process*. International Journal of Pharmaceutics, 2007. **329**(1): p. 62-71
85. Varona, S. et al., *Encapsulation of Lavandin Essential Oil in Poly-(ϵ -caprolactones) by PGSS Process*. Chemical Engineering & Technology, 2013. **36**(7): p. 1187-1192.
86. Martín, Á. et al., *Encapsulation and co-precipitation processes with supercritical fluids: Fundamentals and applications*. The Journal of Supercritical Fluids, 2009. **47**(3): p. 546-555
87. Palmer, M.V. e Ting, S.S.T., *Applications for supercritical fluid technology in food processing*. Food Chemistry, 1995. **52**(4): p. 345-352
88. Hrnčič, M.K. et al., *Application of supercritical and subcritical fluids in food processing*. Food Quality and Safety, 2018. **2**(2): p. 59-67
89. Tsutsumi, C. et al., *Supercritical Fluid Impregnation of Essential Bark Oil in Copolymers of L-Lactide with 7-Membered Cyclic Compounds*. Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology, 2014. **5**: p. 159-172

90. Tsutsumi, C. et al., *Impregnation of poly(L-lactide-ran-cyclic carbonate) copolymers with useful compounds with supercritical carbon dioxide*. Journal of Applied Polymer Science, 2011. **121**(3): p. 1431-1441
91. Roy, A. et al., *Controlled pesticide release from biodegradable polymers*. Central European Journal of Chemistry, 2014. **12**(4): p. 453-469
92. Bansal, V. et al., *Applications of Chitosan and Chitosan Derivatives in Drug Delivery*. Advances in Biological Research, 2011. **5**(1): p. 28-37
93. Martins, S.P., *Preparação e caracterização de micro/nanopartículas de quitosano para libertação de cisplatina*. (Tese de Mestrado). 2013, Instituto Superior de Engenharia de Coimbra
94. Zhang, Z. et al., *Biodegradable Polymers*, em *Principles of Tissue Engineering (Fourth Edition)*. Editores: Lanza, R. et al. 2014, Academic Press: Boston. p. 441-473
95. Coimbra, P.M.A., *Preparação e caracterização de sistemas de libertação controlada de fármacos com base em polímeros de origem natural*. (Tese de Doutoramento), 2010, Universidade de Coimbra
96. Sopena, F. et al., *Controlled release formulations of herbicide based on micro-encapsulation*. Ciência e Investigação Agrária, 2009. **35**(1): p. 27-42
97. Markočič, E. et al., *Effect of Temperature and Pressure on the Behavior of Poly(ϵ -caprolactone) in the Presence of Supercritical Carbon Dioxide*. Industrial & Engineering Chemistry Research, 2013. **52**(44): p. 15594-15601
98. Salerno, A. et al., *The effect of ethyl-lactate and ethyl-acetate plasticizers on PCL and PCL-HA composites foamed with supercritical CO₂*. The Journal of Supercritical Fluids, 2014. **95**: p. 394-406
99. Salerno, A. et al., *Supercritical CO₂ foamed polycaprolactone scaffolds for controlled delivery of 5-fluorouracil, nicotinamide and triflusal*. International Journal of Pharmaceutics, 2015. **496**(2): p. 654-663
100. Bilia, A.R. et al., *Essential oils loaded in nanosystems: a developing strategy for a successful therapeutic approach*. Evidenced-Based Complementary Alternative Medicine, 2014. **2014**: p. 651593
101. Wanakule, P. e Krishmendu, R., *Drug Delivery*, em *Tissue Engineering: Principles and Practices*. Editores: Fisher, J.P. et al., 2013, CRC Press

102. Cooper, A.I. e Holmes, A.B. *Synthesis of Molded Monolithic Porous Polymers Using Supercritical Carbon Dioxide as the Porogenic Solvent*. *Advanced Materials*, 1999. **11**(15): p. 1270-1274
103. Slodowicz, M.P., et al., *Physicochemical Properties and Field Evaluation of Monolithic Wax Formulations for the Controlled Release of a Forest Pest Pheromone*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2017. **28**: p. 348-359
104. McInnes, S., et al., *Controlled drug delivery from composites of nanostructured porous silicon and poly(L-lactide)*. Vol. 7. 2012. 995-1016
105. Rhodes, C.T. e Porter, S.C. *Coatings for Controlled-Release Drug Delivery Systems*. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 1998. **24**(12): p. 1139-1154
106. Alvarez, G., et al., *Effective traps for live trapping of PWN vectors *Monochamus spp.** em REPHRAME International Conference on Pine Wilt Disease, 2013
107. Gangolli, S. *The Dictionary of Substances and Their Effects: O-S*. Royal Society of Chemistry, 1999
108. Budisa, N. and D. Schulze-Makuch, *Supercritical carbon dioxide and its potential as a life-sustaining solvent in a planetary environment*. *Life (Basel)*, 2014. **4**(3): p. 331-40
109. Boehm, A.L. et al. *Poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles containing a poorly soluble pesticide: Formulation and stability study*. *Journal of Microencapsulation*, 2000. **17**(2): p. 195-205
110. Salmieri, S. e Lacroix, M. *Physicochemical Properties of Alginate/Polycaprolactone-Based Films Containing Essential Oils*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006. **54**(26): p. 10205-10214
111. Ammala, A., *Biodegradable polymers as encapsulation materials for cosmetics and personal care markets*. *International Journal of Cosmetic Science*, 2013. **35**(2): p. 113-24
112. Boehm, A.L., et al., *Nanoprecipitation technique for the encapsulation of agrochemical active ingredients*. *Journal of Microencapsulation*, 2003. **20**(4): p. 433-441
113. Churro, R.M.M., *Preparação de compósitos a base de polímeros e sílica mesoporosa para aplicação em engenharia de tecidos duros utilizando a técnica de foaming por tecnologia supercrítica*. (Tese de Mestrado). 2015, Universidade de Coimbra
114. Rosa, A.B.S., *Poly(ϵ -caprolactone)/SBA-15 composite biomaterials plasticized with greener additives*. (Tese de Mestrado). 2013, Universidade de Coimbra

115. Matos, M.B.C., et al., *Dexamethasone-loaded poly(ϵ -caprolactone)/silica nanoparticles composites prepared by supercritical CO₂ foaming/mixing and deposition*. International Journal of Pharmaceutics, 2013. **456**(2): p. 269-281
116. Tsutsumi, C., et al., *Study of impregnation of poly(l-lactide-ran- ϵ -caprolactone) copolymers with useful compounds in supercritical carbon dioxide*. Journal of Materials Science, 2009. **44**(13): p. 3533-3541
117. INETI, *Guia técnico do Sector da Industria da madeira e do mobiliário*. 2000: Lisboa. Acedido em: 9 de Setembro de 2018
118. Tinto, W.F., et al., *Waxes*, in *Pharmacognosy*. 2017, Academic Press: Boston. p. 443-455
119. Macheras, P. e Iliadis, Athanassios.2016. *Modeling in Biopharmaceutics, Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. Homogeneous and Heterogeneous Approaches*. p.60
120. Schrader, W. et al., *Degradation of α -Pinene on Tenax during Sample Storage: Effects of Daylight Radiation and Temperature*. Environmental Science & Technology, 2001. **35**(13): p. 2717-2720
121. ICNF, *Plano de Gestão Florestal do Perímetro Florestal da Charneca do Nicho. Divisão de Gestão Operacional e Fiscalização*. 2014: Marinha Grande. Acedido em: 15 de Maio de 2018
122. Lam, C.X. et al., *Dynamics of in vitro polymer degradation of polycaprolactone-based scaffolds: accelerated versus simulated physiological conditions*. Biomed Mater, 2008. **3**(3): p. 034108
123. Rödel, M. et al., *Bioceramics as drug delivery systems*, em *Fundamental Biomaterials: Ceramics*. Editores: Thomas, S. et al. 2018, Woodhead Publishing. p. 153-194
124. Di Maio, E. e Kiran, E. *Foaming of polymers with supercritical fluids and perspectives on the current knowledge gaps and challenges*. The Journal of Supercritical Fluids, 2018. **134**: p. 157-166
125. Bezerra, F. et al., *Controlled release of microencapsulated citronella essential oil on cotton and polyester matrices*. Cellulose, 2016. **23**(2): p. 1459-1470
126. Huang, X. e Brazel, C.S., *On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems*. Journal of Controlled Release, 2001. **73**(2): p. 121-136

127. Bernardo, F.P. e Braga, M.E.M., *Mass transfer model to study active ingredient release in a wind tunnel, Internal report of the research project EcoVector (PTDC/AGR-TEC/3049/2014)*. 2018
128. Chiumarelli, M. e Hubinger, M.D. *Evaluation of edible films and coatings formulated with cassava starch, glycerol, carnauba wax and stearic acid*. Food Hydrocolloids, 2014. **38**: p. 20-27
129. Auras, R., et al., *Production and Properties of Spin-Coated Cassava-Starch-Glycerol-Beeswax Films*. Starch - Stärke, 2009. **61**(8): p. 463-471
130. Adams, R. P. *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry*. Ed. 4, 2007, Departamento de Biologia da Universidade de Baylor

Anexos

Anexo I – Materiais testados para o revestimento das matrizes poliméricas

Tabela I.1 - Materiais testados para o revestimento das matrizes poliméricas

Material	Formulação	Preparação	Resultados
Mistura de cera de carnaúba e α-pineno	Razão cera/óleo testada: 1. (1:0) 2. (1:0,5) 3. (1:1)	Fusão	<ul style="list-style-type: none"> - Requer o uso de alta temperatura dado o elevado ponto de fusão da cera, que é superior ao ponto de fusão da PCL. Risco de fusão do difusor durante o recobrimento - Formam-se filmes quebradiços e a fragilidade aumenta com o teor em α-pineno
Emulsão amido/cera de carnaúba	- Amido: 3,50% - Glicerol: 1,00% - Cera de Carnaúba: 0,40% - Ácido Oleico: 0,60% - Água: 94,50%	Emulsão	<ul style="list-style-type: none"> - O revestimento fica quebradiço - É o revestimento mais difícil de preparar
Adotado de Chiumarelli e Hubinger, (2014), e Auras et al., (2009) [128, 129]	Razão polvilho/cera testada: 1. (1:0,57) 2. (1:0,86) 3. (1:1,71)		<ul style="list-style-type: none"> - Com o aumento do teor de cera, o filme formado fica menos quebradiço e mais espesso - Requer síntese demorada em laboratório - Obtiém-se soluções muito viscosas. Dificuldade em revestir o difusor por imersão - Longo tempo de secagem, que aumenta com o aumento da quantidade de cera, chegando a ser superior a 12 h
Parafina e estearina	Razão parafina/estearina (10:1)	Fusão	<ul style="list-style-type: none"> - Os filmes formados são menos quebradiços; - Embora a temperatura necessária não seja tão elevada (~60 °C) como para a mistura de carnaúba e α-pineno, continua a ser superior à temperatura de fusão da PCL, podendo ocorrer a fusão do difusor de α-pineno - Requer manipulação em laboratório e um longo tempo de secagem (~12 h)
Cera Paradip™ Red L2 (Paramelt)	Cera	Fusão	<ul style="list-style-type: none"> - Requer o uso de alta temperatura. Risco de fusão do difusor durante o recobrimento
Resina Polidisp 6320 (Resiquímica)	Resina/água (5:1)	Diluição	<ul style="list-style-type: none"> - Fácil aplicação. Revestimento uniforme e não quebra ao longo do tempo
Resina Ceska®WL (CSK)	Resina	-	<ul style="list-style-type: none"> - Fácil aplicação. Revestimento uniforme mas bastante espesso. Pode oferecer demasiada resistência à saída do α-pineno

Anexo II – Análise da cera de carnaúba, da serradura de pinheiro e da resina por GC/MS

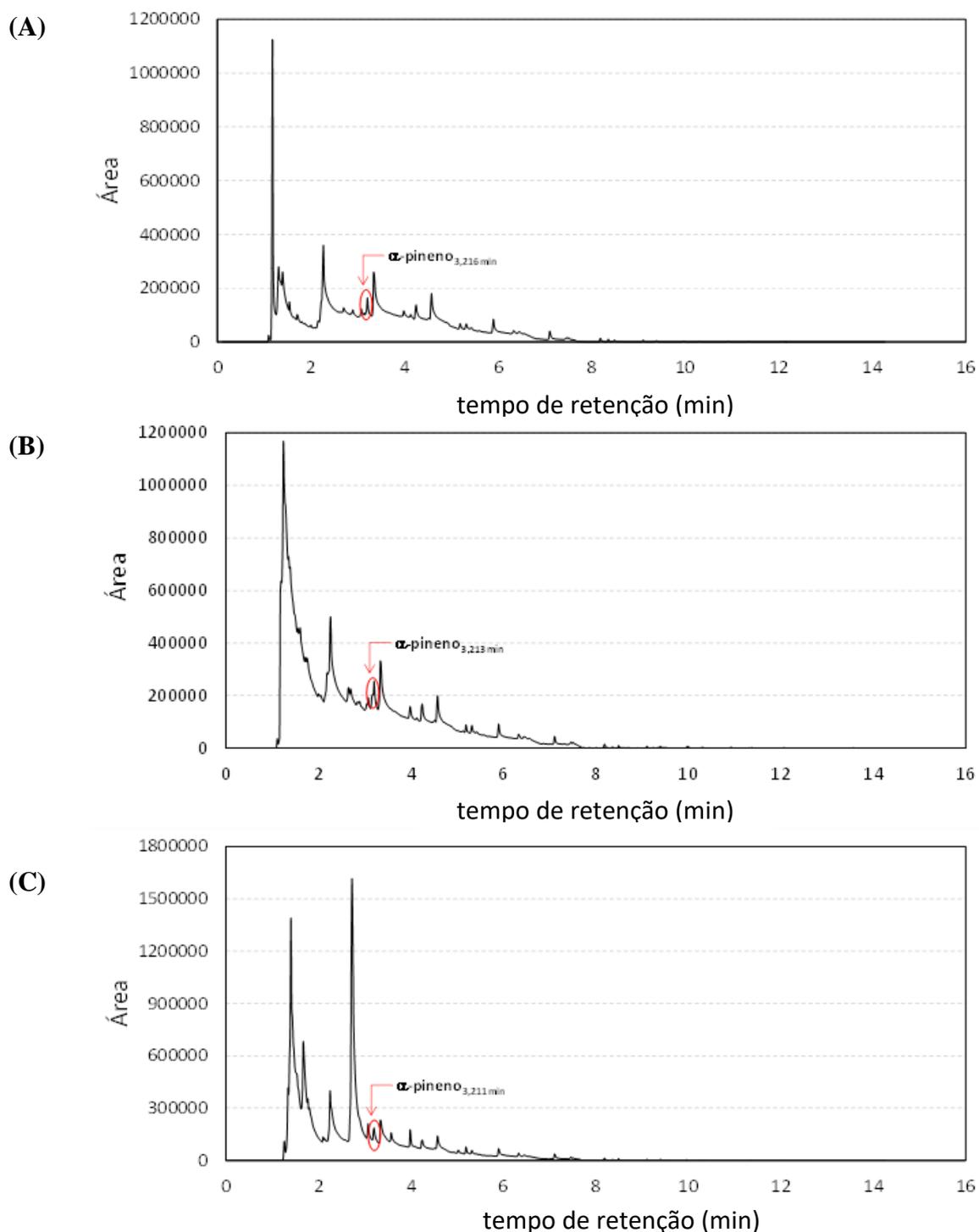


Figura II.1 - Espectros obtido por microextração em fase sólida (SPME) e análise cromatográfica com o GC/MS. Cera de carnaúba (A), serradura de pinheiro (B), resina (C).

Anexo III – Análise diferencial térmica simultânea (SDT)

Na Figura III.1 e III.2 estão representados exemplos de perfis obtidos por SDT para a formulação (1: 0 : 0 : 0), sem α -pineno, e para os difusores de α -pineno com diferentes composições. As temperaturas e entalpias de fusão e degradação foram determinadas como exemplificado na Figura III.2.

A partir da entalpia de degradação determinada por SDT e da cristalinidade da PCL a 100% descrita na literatura, foi possível calcular a cristalinidade das matrizes poliméricas, tal como no trabalho de Churro (2015) [113].

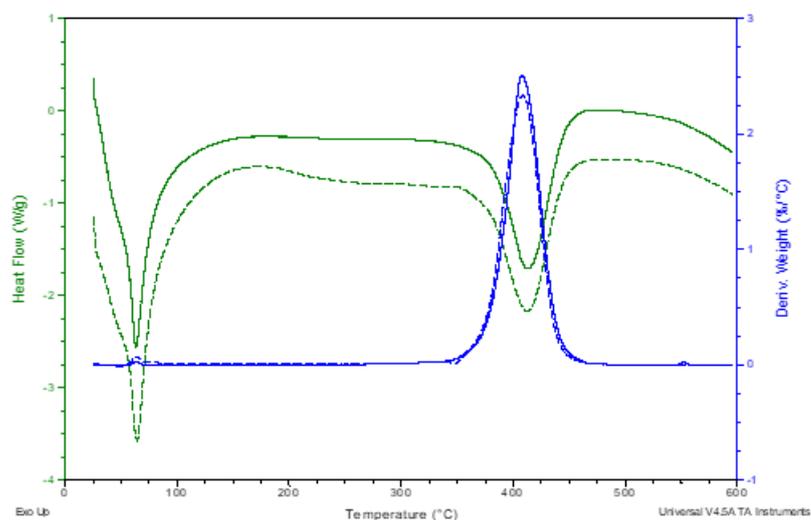
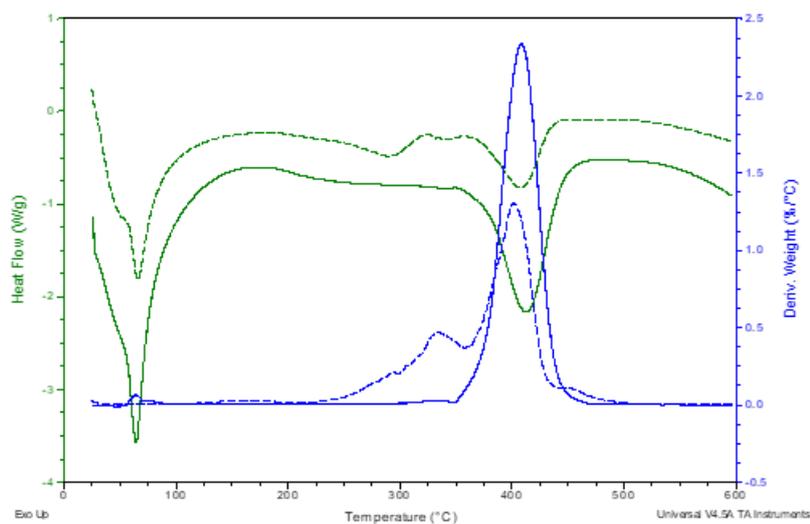
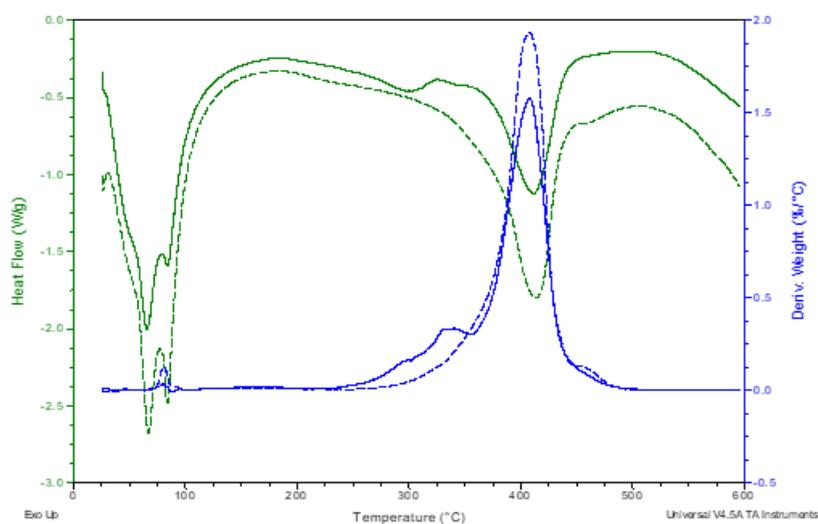


Figura III.1 - Exemplo dos perfis obtidos por análise diferencial térmica simultânea para as formulações (1 : 0 : 0 : 0) (—) e (1 : 0 : 0 : 1,02) (-----). Derivada do peso (■) e fluxo de calor (■) em função da temperatura.

A)



B)



C)

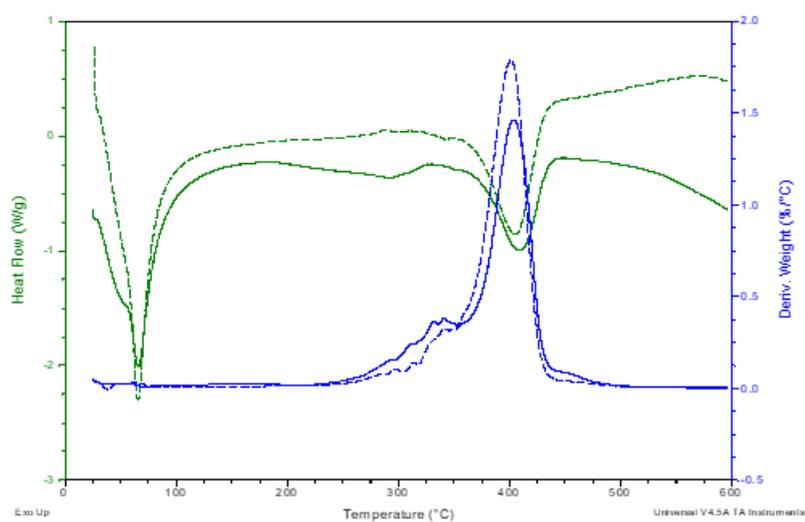


Figura III.2 - Exemplo dos perfis obtidos por análise diferencial térmica simultânea para os difusores de α -pineno com uma base sólida de PCL pura (A), PCL + Cera (B) e PCL + Serradura (C), com (-----) e sem (—) revestimento. Derivada do peso (■) e fluxo de calor (■) em função da temperatura.

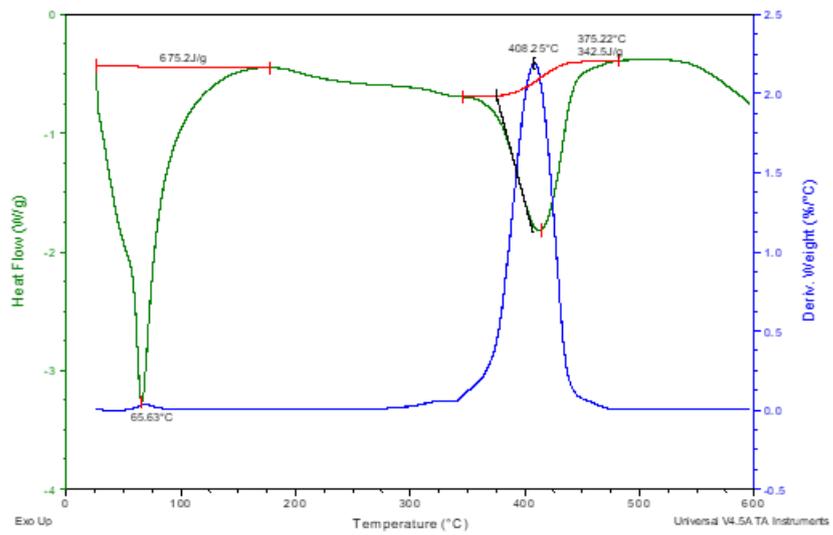


Figura III.3 - Exemplo da determinação das temperaturas de fusão e de degradação e da entalpia de degradação utilizada no cálculo da cristalinidade das formulações.

Anexo IV – Intrusão de mercúrio e adsorção de azoto

Tabela IV.1 - Compilação dos resultados obtidos pelas técnicas de intrusão de mercúrio e adsorção de azoto.

Formulação (PCL :cera: serradura : α -pineno)	Densidade da mistura ¹ (g.cm ⁻³)	Intrusão de Mercúrio				Adsorção de azoto			
		Densidade <i>skeletal</i> aparente (g.cm ⁻³)	Densidade <i>bulk</i> (g.cm ⁻³)	Porosidade (%)	Área total de poros (m ² .g ⁻¹)	Área de Superfície (BET) (m ² .g ⁻¹)	Volume de poros x 10 ³ (cm ³ .g ⁻¹)	Densidade média (g.cm ⁻³)	
(1 : 0 : 0 : 0)	0,28 ± 0,00	1,15 ± 0,04	0,43 ± 0,01	62,56 ± 0,20	16,09 ± 15,26	1,57 ± 0,30	1,51 ± 0,30	1,20 ± 0,02	
(1 : 0 : 0 : 1,02)	0,17 ± 0,01	1,20 ± 0,13	0,69 ± 0,04	42,80 ± 3,00	26,27 ± 1,35	1,04 ± 0,37	5,51 ± 0,36	1,21 ± 0,03	
(1 : 0 : 0 : 1,02)*	0,25 ± 0,04	0,98 ± 0,22	0,68 ± 0,21	30,92 ± 5,49	26,74 ± 2,30	1,04 ± 0,15	2,78 ± 1,69	1,18 ± 0,01	
(0,70 : 0,30 : 0 : 1,02)	0,25 ± 0,08	1,09 ± 0,04	0,67 ± 0,04	38,91 ± 0,82	26,02 ± 1,08	0,72 ± 0,21	1,46 ± 0,53	1,18 ± 0,03	
(0,70 : 0,30 : 0 : 1,02)*	0,45 ± 0,07	1,16 ± 0,01	0,90 ± 0,01	22,39 ± 0,96	20,66 ± 2,98	0,39 ± 0,12	0,58 ± 0,07	1,15 ± 0,01	
(0,85 : 0 : 0,15 : 1,02)	0,21 ± 0,01	1,10 ± 0,03	0,72 ± 0,05	34,42 ± 2,15	25,54 ± 3,63	0,80 ± 0,04	3,10 ± 2,44	1,23 ± 0,01	
(0,85 : 0 : 0,15 : 1,02)*	0,38 ± 0,06	1,20 ± 0,05	0,89 ± 0,07	25,85 ± 2,85	13,24 ± 5,57	0,53 ± 0,03	2,83 ± 0,16	1,20 ± 0,01	
(0,80 : 0 : 0,25 : 0,25)	0,18 ± 0,00	1,23 ± 0,02	0,86 ± 0,04	30,34 ± 1,65	28,86 ± 2,54	1,28 ± 0,92	5,05 ± 0,90	1,26 ± 0,04	
(0,75 : 0 : 0,15 : 1,02)	0,25 ± 0,00	1,12 ± 0,04	0,71 ± 0,02	36,24 ± 0,96	26,55 ± 3,87	0,87 ± 0,05	4,95 ± 0,78	1,27 ± 0,03	

¹ Estes valores foram calculados a partir da massa da formulação libertada de α -pineno e das dimensões das matrizes apresentadas na Tabela 7

Tabela IV.2 - Área total de poros para cada intervalo de tamanho de poros obtido por intrusão de mercúrio.

Diâmetro de poros (µm)	Área total de poros (m ² .g ⁻¹)									
	(1:0:0:0)	(1:0:0:1,02)	(1:0:0:1,02)*	(0,70:0,30:0:1,02)	(0,70:0,30:0:1,02) 1,02)*	(0,70:0,30:0:0)	(0,85:0:0,15:1,02)	(0,85:0:0,15:1,02)*	(0,80:0:0,25:0,25)	(0,75:0:0,15:1,02)
360-100	0,01 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
100-10	0,08 ± 0,1	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,02	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00
10-1	0,01 ± 0,02	0,17 ± 0,01	0,17 ± 0,12	0,05 ± 0,07	0,06 ± 0,07	0,19 ± 0,07	0,11 ± 0,05	0,05 ± 0,01	0,20 ± 0,07	0,20 ± 0,07
1-0,1	0,15 ± 0,01	1,62 ± 0,28	0,99 ± 0,28	0,66 ± 0,89	0,95 ± 0,03	1,46 ± 0,13	0,85 ± 0,09	0,35 ± 0,02	1,64 ± 0,13	1,64 ± 0,13
0,1-0,01	2,85 ± 4,04	10,70 ± 1,57	9,88 ± 0,45	4,42 ± 5,84	7,55 ± 1,73	10,71 ± 1,01	6,73 ± 0,71	9,01 ± 1,36	9,37 ± 2,79	9,37 ± 2,79
0,01-0,055	12,91 ± 11,25	13,76 ± 2,64	15,67 ± 2,34	8,54 ± 11,71	12,09 ± 1,22	13,17 ± 4,70	7,71 ± 3,08	19,44 ± 1,16	15,32 ± 1,28	15,32 ± 1,28

Anexo V - Degradação dos bioativos

Tabela V.1 - Gama de referência de intensidades definida a partir dos controles 1 e 2.

Composto	Intensidade		I _{média,ref}
	Controlo 1	Controlo 2	
Tricyclene	79901	80186	80044 ± 202
α -pinene	13160624	13878012	13519318 ± 507270
Δ -3-Carene	329095	314075	321585 ± 10621
Limonene	11252	11897	11575 ± 456
trans-3-caren-2-ol	9772	11324	10548 ± 1097
α -pinene oxide	35786	32105	33946 ± 2603
trans-3-Pinen-2-ol [2,6,6-trimethylbicyclo[3.1.1].hept-3-en-2-ol]	50900	59978	55439 ± 6419
1(7),3,8-o-Menthatriene	10930	-	[0-10930]
α -Campholenal	23426	26772	25099 ± 2366
trans-Pinocarveol	12955	14568	13762 ± 1141
trans-Verbenol	57729	68067	62898 ± 7310
cis-Pinocarveol	18396	-	[0-18396]
Pinocarvone	-	21663	[0-21663]
Myrtenal	18626	18837	18732 ± 149
Verbenone	22461	24083	23272 ± 1147
1,3,5-tris(methylene)-Cycloheptane	-	20129	[0-20129]

É de notar que para os compostos que foram apenas encontrados num dos controlos, considerou-se a referência como um intervalo entre zero (não foi detetado o composto) e a intensidade do pico desse composto no controlo em que foi detetado.

Tabela 18 - Identificação dos compostos obtidos nos espectros de α -pineno.

Composto	Temperatura												Radiação UV			
	25°C						40°C									
	1 dia	1 semana	1 mês	1 dia	1 semana	2 semanas	1 mês	1 mês e 6 dias	1 dia	1 semana	1 mês	1 mês e 6 dias	1 dia	1 semana	1 mês	
Tricyclene	0 - 64790	0 - 74351	52491 ± 12859	0 - 70091	75769	65694 ± 9872	65959 ± 8878	-	0 - 78176	0 - 75226	-	-	0 - 78176	0 - 75226	-	-
α -pinene	7573052 ± 2225824	7812798 ± 116602	5840700 ± 57018	7202544 ± 3507579	11473055	8389752 ± 2060767	7312568 ± 1708625	1985348 ± 2134981	7730824 ± 410480	7787781 ± 418455	6580242 ± 2288966	7730824 ± 410480	7787781 ± 418455	7730824 ± 410480	7787781 ± 418455	6580242 ± 2288966
Δ -3-Carene	0 - 243807	-	0 - 248439	-	-	0 - 256868	-	-	0 - 201501	0 - 247507	0 - 122746	-	0 - 201501	0 - 247507	0 - 122746	0 - 122746
Limonene	0 - 8591	-	-	-	10327	-	-	-	0 - 12172	-	-	-	0 - 12172	-	-	-
trans-3-carene-2-ol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α -pinene oxide	0 - 7318	-	-	-	40984	30988 ± 9239	31802 ± 4414	0 - 9105	-	10707	-	-	-	10707	-	-
trans-3-Pinen-2-ol...	-	-	33900 ± 8320	11141 ± 9566	62035	-	49963 ± 9564	18542 ± 24085	29977 ± 4398	0 - 47086	-	-	29977 ± 4398	0 - 47086	-	-
1(7),3,8-o-Menthatriene	-	-	-	-	-	0 - 7449	134120 ± 2750	-	-	-	0 - 8950	-	-	-	0 - 8950	-
α -Campholenal	0 - 12712	15606 ± 1107	0 - 22180	11705 ± 5514	40758	33724 ± 11104	42253 ± 13657	23338 ± 30866	19718 ± 3246	0 - 18131	-	-	19718 ± 3246	0 - 18131	-	-
Isopinocarveol	-	-	17452 ± 733	0 - 9428	30713	20579 ± 12999	29928 ± 8531	0 - 21720	-	-	-	-	-	-	-	-
Trans-verbenol	13665 ± 11601	30121 ± 14631	48931 ± 2524	16348 ± 11662	93593	70638 ± 30476	79237 ± 19895	38836 ± 52783	-	-	-	-	-	-	-	-
Pinocarveol	-	-	-	-	-	-	-	-	15798 ± 2037	0 - 27458	11064 ± 462	-	15798 ± 2037	0 - 27458	11064 ± 462	11064 ± 462
Pinocarvone	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Myrtenol	0 - 4146	4678 ± 581	14738 ± 346	0 - 4846	27696	20986 ± 9016	20214 ± 5083	8909 ± 10459	0 - 11211	10784 ± 289	5006 ± 1163	-	10784 ± 289	10784 ± 289	5006 ± 1163	5006 ± 1163
Verbenone / l-verbenona	3619 ± 1101	5391 ± 418	17466 ± 1394	4002 ± 2789	34819	27077 ± 10271	24643 ± 5318	10728 ± 13031	7191 ± 607	0 - 10579	-	-	7191 ± 607	0 - 10579	-	-
tris(methylene) - Cycloheptane, 1,3,5-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Anexo VI - Degradação do produto final

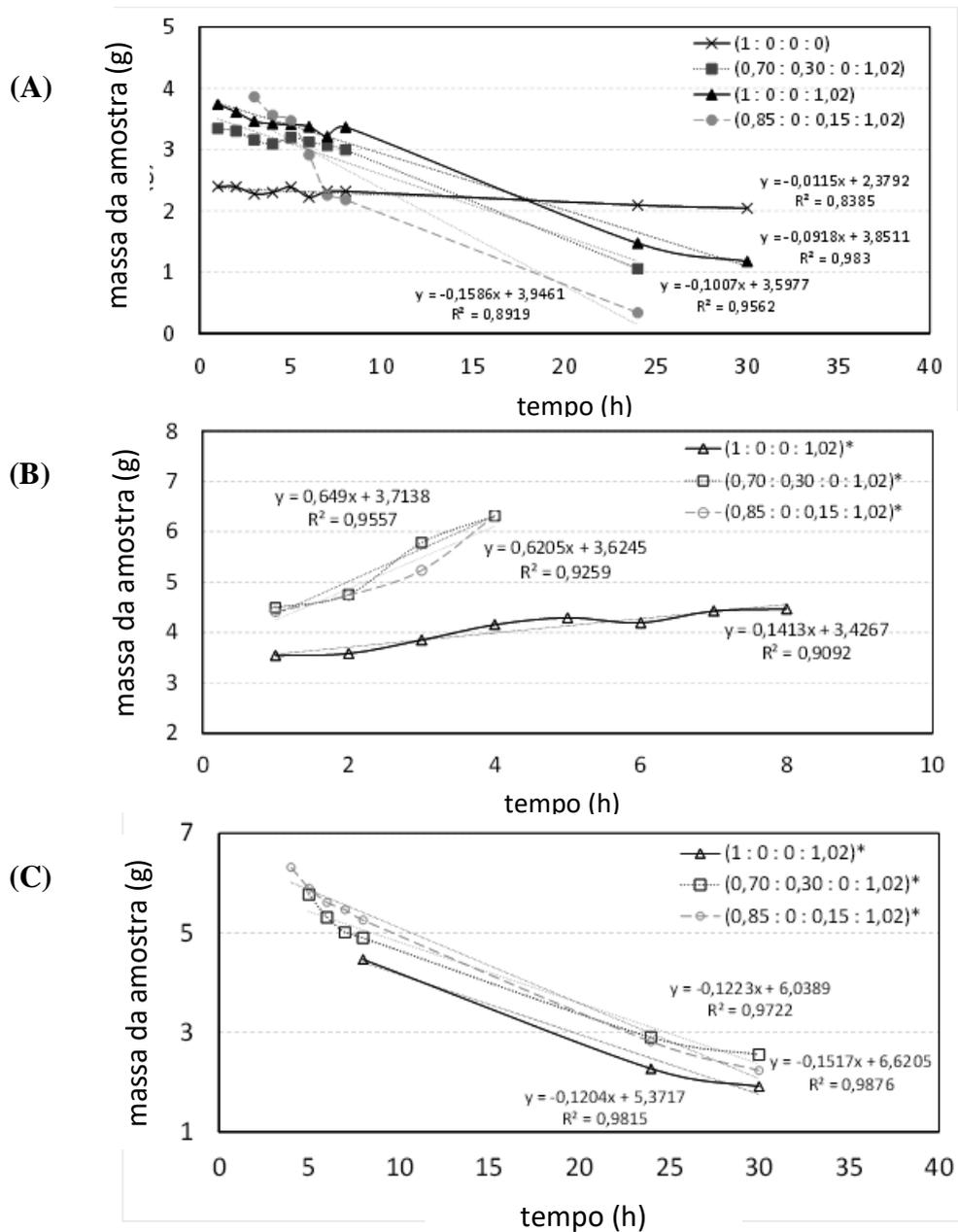


Figura VI.1 - Linearização da cinética de perda de massa durante a fase de degradação dos difusores sem revestimento (A), a fase de inchaço dos difusores com revestimento (B), a fase de degradação dos difusores com revestimento (C).

Anexo VII – Cinética de libertação de α -pineno

Tabela VII.1 - Massa inicial, voláteis e α -pineno libertados pelas amostras analisadas por gravimetria. Resultados compilados na Figura 7.

Formulação (PCL: cera : serradura : α -pineno)	M _{inicial média} (g)	M _{voláteis libertados} (g)	M _{α-pineno libertado} (g)
(1 : 0 : 0)	0,9774 ± 0,0140	0,0109 ± 0,0172	0,0000 ± 0,0000
(1 : 0 : 1,02)	1,4526 ± 0,0203	0,4884 ± 0,0216	0,4884 ± 0,0216
(1 : 0 : 1,02)*	2,8865 ± 0,1435	1,1913 ± 0,1383	0,5014 ± 0,1383
(0,70 : 0,30 : 0 : 1,02)	1,5599 ± 0,0280	0,5708 ± 0,0236	0,5708 ± 0,0236
(0,70 : 0,30 : 0 : 1,02)*	3,2353 ± 0,7287	1,3383 ± 0,4737	0,6484 ± 0,4737
(0,85 : 0 : 0,15 : 1,02)	1,5687 ± 0,0311	0,5848 ± 0,0305	0,5848 ± 0,0305
(0,85 : 0 : 0,15 : 1,02)*	0,4339 ± 1,2094	1,4011 ± 0,2513	0,7111 ± 0,2513
(0,80 : 0 : 0,25 : 0,25)	1,1480 ± 0,0067	0,0861 ± 0,006	0,0861 ± 0,006
(0,75 : 0 : 0,15 : 1,02)	1,4912 ± 0,0211	0,5860 ± 0,0178	0,5860 ± 0,0178

Tabela VII.2 – Resultados da linearização das curvas de libertação obtidas por análise gravimétrica para as amostras sem revestimento em diferentes intervalos de tempo.

Formulação (PCL: cera: serradura : α -pineno)	0 - 3h			3 - 6h			6 - 24h		
	Eq. linear	n	R ²	Eq. linear	n	R ²	Eq. linear	n	R ²
(1 : 0 : 0 : 1,02)	y = -0,0666x + 1,4422	-0,0666	0,9825	y = -0,0301x + 1,3392	-0,0301	0,9929	y = -0,0064x + 1,1936	-0,0064	0,9892
(0,70 : 0,30 : 0 : 1,02)	y = -0,0759x + 1,5506	-0,0759	0,9866	y = -0,0376x + 1,4424	-0,0376	0,9925	y = -0,0077x + 1,2588	-0,0077	0,9892
(0,80 : 0 : 0,25 : 0,25)	y = -0,0073x + 1,1471	-0,0073	0,9882	y = -0,0056x + 1,1424	-0,0056	0,9966	y = -0,0012x + 1,1159	-0,0012	0,9956
(0,75 : 0 : 0,15 : 1,02)	y = -0,0593x + 1,4836	-0,0593	0,988	y = -0,0379x + 1,4239	-0,0379	0,997	y = -0,0117x + 1,2606	-0,0117	0,995
(0,85 : 0 : 0,15 : 1,02)	y = -0,0625x + 1,5616	-0,0625	0,9909	y = -0,0368x + 1,4871	-0,0368	0,9932	y = -0,0117x + 1,3318	-0,0117	0,9952

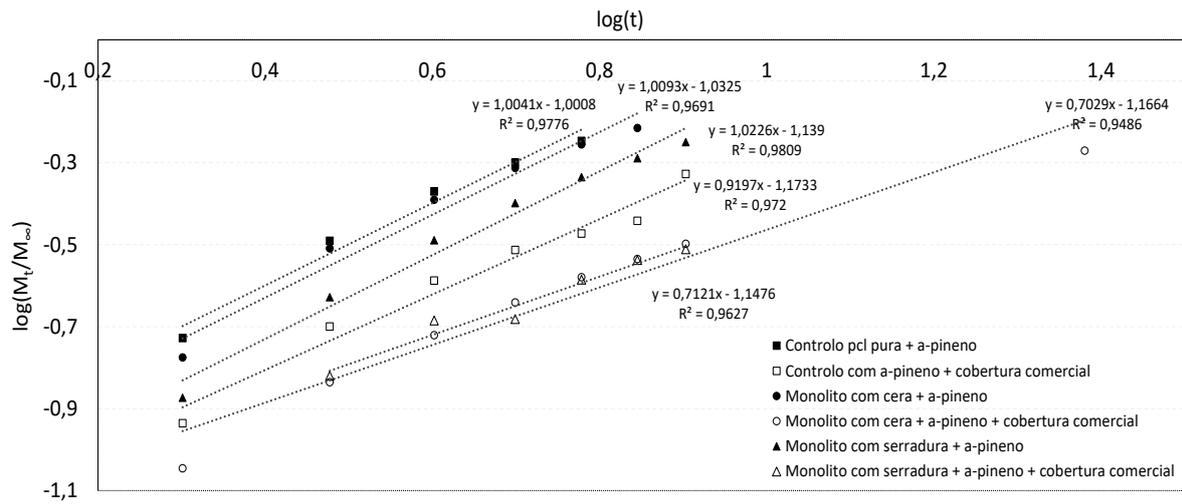


Figura VII.1 - Representação gráfica da linearização das cinéticas de libertação obtidas.

Tabela VII.3 - Concentração de α -pineno libertado no túnel de vento ao longo do tempo.

t (h)	Concentração $\times 10^3$ (ng/mL)					
	(1 : 0 : 0 : 1,02)	(1 : 0 : 0 : 1,02)*	(0,70 : 0,30 : 0 : 1,02)	(0,70 : 0,30 : 0 : 1,02)*	(0,85 : 0 : 0,15 : 1,02)	(0,85 : 0 : 0,15 : 1,02)*
Túnel	0,021	Não foi medido	Limpo	Limpo	0,028	0,004
0,02	10,535	0,013	6,609	0,164	3,572	0,024
1	1,320	0,012	0,075	0,096	1,526	-0,004
2	0,631	0,027	0,648	0,013	0,692	0,000
3	0,096	0,016	0,175	0,049	0,397	-0,004
4	0,181	0,013	0,090	0,093	0,270	0,000
5	0,092	0,009	0,166	0,095	0,184	0,003
6	0,069	0,015	0,110	0,089	0,131	0,010
7	0,032	0,019	0,053	0,095	0,071	0,000
8	-0,004	0,027	0,071	0,112	0,015	0,012
24	0,013	0,032	0,003	0,066	-0,019	0,012
25	0,011	0,012	0,004	0,036	-0,022	0,000
26	0,000	0,012	0,002	0,034	-0,021	0,008
27	0,013	0,010	0,005	0,061	-0,023	0,000
28	0,011	0,013	0,001	0,040	-0,023	0,010
29	0,008	0,028	b	b	-0,018	0,000
30	0,011	0,011	b	b	-0,022	0,001
31	0,011	0,025	b	b	-0,025	0,011
32	0,005	0,026	0,001	0,075	-0,025	0,000
48	-0,007	0,011	0,001	0,008	-0,025	0,000
49	-0,002	0,026	0,001	0,064	-0,014	0,000
50	-0,007	0,012	0,001	0,054	-0,015	0,007
51	-0,007	0,020	0,001	0,038	-0,016	0,010
52	-0,006	0,008	0,001	0,047	-0,005	0,000
53	-0,010	0,007	0,001	0,027	-0,012	0,005
54	-0,002	0,007	0,001	0,017	0,001	0,002
55	-0,002	0,010	0,002	0,019	-0,008	0,000
56	0,000	0,008	b	b	0,005	0,000
120	0,000	0,005	0,006	0,001	0,001	0,000
144	0,000	0,007	0,000	-0,006	0,000	0,000

^a Com o desconto do α -pineno adsorvido às paredes do túnel de vento, alguns resultados ficaram negativos e não foram considerados na representação gráfica (Figura 9A, B e C).

^b Não foi possível fazer a análise destes pontos de amostragem devido a uma contaminação com outros voláteis na sala onde decorria o ensaio.

Anexo VIII – Frases H/P de saúde e segurança

Tabela VIII.1 – Frases H/P de saúde e segurança^a.

Produto	Precaução	Perigo	Cuidados no manuseamento
PCL	NA	NA	Providenciar uma adequada ventilação em locais onde se formem poeiras.
Acetona	P210; P280; P304+P340+P312; P305+P351+P338; P337+P313; P403+P235	H225; H319; H336	Evitar o contacto com a pele e os olhos. Evitar a inalação do vapor ou da névoa. Manter afastado de qualquer chama ou fonte de ignição -
α-pineno	P210; P280; P301+P310; P331; P370+P378	H226; H304; H315; H317; H400	Não fumar. Tome medidas para impedir a formação de electricidade estática.
Eucaliptol	P210; P403+P235	H226	Evitar a inalação do vapor ou da névoa. Manter afastado de qualquer chama ou fonte de ignição - Não fumar. Tome medidas para impedir a formação de electricidade estática.
Metanol	P210; P280; P302+P352+P312; P304+P340+P311; P370+P378; P403+P235	H225; H301+H311+H331; H370	Evitar o contacto com a pele e os olhos. Evitar a inalação do vapor ou da névoa. Manter afastado de qualquer chama ou fonte de ignição -
Acetato de etilo	P210; P305+P351+ P338; P370+P378; P403+P235	H225; H319; H336	Não fumar. Tome medidas para impedir a formação de electricidade estática.
CO₂	P410+P403	H280	NA

^aSigma Aldrich, <https://www.sigmaaldrich.com>. Acedido em 01 de Outubro de 2018

NA – Não aplicável

Frases H

- **H225** - Líquido e vapor facilmente inflamáveis.
- **H226** - Líquido e vapor inflamáveis.
- **H280** - Contém gás sob pressão; risco de explosão sob a ação do calor.
- **H301+H311+H331** - Tóxico por ingestão, inalação e em contacto com a pele.
- **H304** - Pode ser mortal por ingestão e penetração nas vias respiratórias.
- **H315** - Provoca irritação cutânea.
- **H317** - Pode provocar uma reação alérgica cutânea.
- **H319** - Provoca irritação ocular grave.
- **H336** - Pode provocar sonolência ou vertigens.
- **H370** - Afeta os órgãos.
- **H400** – Muito tóxico para os organismos aquáticos

Frases P

- **P210** - Manter afastado do calor, superfícies quentes, faísca, chama aberta e outras fontes de ignição. Não fumar.
- **P280** - Usar luvas de proteção / proteção ocular/ proteção facial/ vestuário de proteção.
- **P301+P310** - Em caso de ingestão: contacte imediatamente um centro de informação antivenenos/médico.
- **P302+P352+P312** - Se entrar em contacto com a pele: lavar abundantemente com água. Caso sinta indisposição, contacte um centro de informação antivenenos/médico.
- **P303+P361+P353** - Em caso de contacto com a pele (ou o cabelo): retirar imediatamente toda a roupa contaminada. Enxaguar a pele com água/tomar um duche.
- **P304+P340+P311** - Em caso de inalação: retirar a pessoa para uma zona ao ar livre e mantê-la numa posição que não dificulte a respiração. Caso sinta indisposição, contacte um centro de informação antivenenos/médico.
- **P305+P351+P338** - Se entrar em contacto com os olhos: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continuar a enxaguar.
- **P331** - Não provocar o vômito.
- **P370+P378** – Em caso de incêndio: para extinguir utilizar pó seco ou areia seca.

- **P403+P235** – Armazenar em local bem ventilado. Conservar em ambiente fresco.
- **P410+P403** – Manter ao abrigo da luz solar. Armazenar em local bem ventilado.