

Michele Junkherr Rodrigues

**ANÁLISE DA EFICIÊNCIA DE TECNOLOGIAS LIMPAS  
BASEADAS NA ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO E NA  
CROMATOGRAFIA PARA RECONHECIMENTO DA  
QUALIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE MELALEUCA**

Dissertação ou Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Ambiental - Mestrado, Universidade de Santa Cruz do Sul - UNISC, como requisito parcial para o título de Mestre em Tecnologia Ambiental.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rosana de Cassia de Souza Schneider

Co-orientador: Prof. Dr. Valeriano Antonio Corbellini

Santa Cruz do Sul

2025

Dedico aos meus,  
que sempre estiveram do meu lado,  
oferecendo apoio incondicional e  
compreensão diante da minha ausência  
enquanto trilhei o caminho do conhecimento.

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade de Santa Cruz do Sul - UNISC e ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Ambiental - PPGTA pela acolhida e por ter me proporcionado tamanho aprendizado, possibilitando assim, minha titulação e a CAPES pela bolsa de mestrado concedida.

À minha orientadora Rosana, pela paciência, dedicação, disponibilidade e orientação, pela amizade e por ter acreditado em mim.

Ao meu coorientador Valeriano, pela amizade, disponibilidade, e grande ajuda no trabalho.

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Ambiental - PPGTA Ana Cláudia Seibel Schuh e Carina Maruvia por todas as solicitações atendidas.

Professores Nádia de Monte Baccar, Ana Lúcia Becker Rohlfes e Ênio Leandro Machado, Sandro Hillebrand por serem inspiração, incentivadores e acima de tudo apoiadores!

Betina Mariela Barreto e Cléria Janice de Mello, obrigada pela amizade e parceria de sempre. Aos meus queridos bolsistas Natália Spindler e Arthur Behm por toda ajuda. Agradeço a todos que direta ou indiretamente me auxiliaram nesta jornada.

## RESUMO

O controle de qualidade de óleos essenciais é realizado, principalmente, por cromatografia gasosa, com o objetivo de identificar sua composição química e detectar possíveis adulterações com substâncias sintéticas ou outros óleos. Neste estudo, trinta e seis amostras comerciais de Óleo Essencial de *Melaleuca sp.* foram analisadas quanto à composição química e às propriedades físico-químicas. Foram identificados quinze componentes principais, sendo *Terpinen-4-ol*,  *$\alpha$ -Terpineno*, *Terpinoleno* e *p-Cimeno* os mais abundantes. Para fins comparativos, um Óleo Essencial controle foi extraído por hidrodestilação utilizando o método *Clevenger* e caracterizado, assim como as amostras comerciais, por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS). O índice de refração das amostras foi correlacionado com os resultados obtidos por espectroscopia no infravermelho (FTIR), permitindo a identificação de amostras adulteradas por meio de análise multivariada. Além disso, foi realizada a otimização da análise cromatográfica do Óleo Essencial diretamente das folhas de *Melaleuca sp.* por meio da técnica de *Headspace*, possibilitando a quantificação de seus compostos majoritários. Os resultados indicam que tanto a espectroscopia, para detecção de adulteração, quanto a técnica de *Headspace*, para análise direta das folhas, são ferramentas promissoras para a caracterização rápida do Óleo Essencial. Essas abordagens se mostram alternativas mais ágeis, ambientalmente responsáveis e potencialmente mais limpas para o controle de qualidade desse produto. Estudos futuros poderão ser direcionados à caracterização de compostos minoritários do óleo diretamente das folhas e por espectroscopia, bem como à melhoria no controle de qualidade de adulterações, utilizando métodos físico-químicos rápidos correlacionados com espectroscopia.

Palavras-chave: *Melaleuca*, cromatografia gasosa, espectrometria de infravermelho, Óleo Essencial, controle de qualidade.

## ABSTRACT

**CLEAN TECHNOLOGIES BASED ON INFRARED SPECTROSCOPY TO PREDICT THE QUALITY OF MELALEUCA ESSENTIAL OIL.** Quality control of essential oils is carried out mainly by gas chromatography, aiming to identify their chemical composition and detect possible adulterations with synthetic substances or other oils. In this study, thirty-six commercial samples of *Melaleuca* sp. essential oil were analyzed for their chemical composition and physicochemical properties. Fifteen main components were identified, with Terpinen-4-ol,  $\alpha$ -Terpinene, Terpinolene, and p-Cymene being the most abundant. For comparative purposes, a control essential oil was extracted by hydrodistillation using the Clevenger method and characterized, along with the commercial samples, by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS). The refractive index of the samples was correlated with the results obtained by infrared spectroscopy (FTIR), allowing the identification of adulterated samples through multivariate analysis. Additionally, the optimization of chromatographic analysis of the essential oil directly from *Melaleuca* sp. leaves was performed using the Headspace technique, enabling the quantification of its major compounds. The results indicate that both spectroscopy, for adulteration detection, and the Headspace technique, for direct leaf analysis, are promising tools for the rapid characterization of essential oil. These approaches prove to be faster, more environmentally responsible, and potentially cleaner alternatives for the quality control of this product. Future studies may focus on the characterization of minor compounds in the oil directly from the leaves and by spectroscopy, as well as improving adulteration quality control using rapid physicochemical methods correlated with spectroscopy.

Keywords: Tea tree, gas chromatography, infrared spectrometry, essential oil, quality control.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 4-1. Metodologia geral do desenvolvimento da pesquisa. ....	29
Figura 4-2. Mapa de origem das amostras. Estados em tons de verde representam as regiões com fornecedores de amostras de Óleo Essencial de <i>Melaleuca</i> sp. no Brasil.....	30
Figura 4-3. Extrator <i>Clevenger</i> utilizado nas extrações de Óleo Essencial de <i>Melaleuca</i> sp.....	33
Figura 5-1. Índice de refração das amostras comerciais analisadas. ....	42
Figura 5-2. Espectro do perfil do óleo de <i>Melaleuca</i> sp. por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	43
Figura 5-3 Espectro da amostra de Óleo Essencial de <i>Melaleuca</i> sp. ....	44
Figura 5-4 Representação gráfica do RMSEC versus número de variáveis latentes.....	46
Figura 5-6 Figura de mérito do modelo ATR/OPLS para predição de índice de refração em amostras de óleo de <i>Melaleuca</i> sp. (A): variação de RMSECV (conjunto total de calibração e conjunto de treinamento) e de RMSEP (conjunto de predição) com o número de variáveis latentes. (B): Variações no coeficiente de correlação dos respectivos modelos de A. (C): Ajuste linear para amostras em conjunto de treinamento e conjunto de predição usando modelo com 6 variáveis latentes e respectivo vetor de regressão (D). ....	49
Figura 6-1. Cromatograma do Óleo Essencial extraído por hidrodestilação.....	59
Figura 6-2. Gráficos de Pareto das condições estudadas para cada componente majoritário do óleo de melaleuca, onde A) Terpinen-4-ol; B) $\alpha$ -Terpineno, C) p-Cimeno, D) $\alpha$ -Terpinoleno; e, E) $\gamma$ -Terpineno. ....	61
Figura 6-3. Gráficos 3D das variáveis utilizadas no planejamento, onde os gráficos da linha com a letra A corresponde ao composto Terpinen-4-, letra B o composto $\alpha$ -Terpineno, letra C o composto p-Cimeno, letra D o composto $\alpha$ -Terpinoleno e letra E o composto $\gamma$ -Terpineno.....	69

## LISTA DE TABELAS

Tabela 4-1. Padrões analíticos utilizados para a identificação dos compostos por GC/MS e GC/FID. ....	34
Tabela 6-2. Áreas relativas obtidas por GC/MS dos componentes das folhas submetidas a extração por <i>Headspace</i> e do óleo extraído por hidrodestilação. ....	72

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	OBJETIVOS.....	15
2.1	Objetivo Geral.....	15
2.2	Objetivos específicos.....	15
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	16
3.1	Óleos Essenciais.....	16
3.2	<i>Melaleuca</i> sp.....	16
3.2.1	Melaleuca Alternifolia.....	18
3.3	Técnicas analíticas para determinação de óleos essenciais.....	18
3.3.1	Extração e análise de óleo de <i>Melaleuca</i> sp.....	21
4	METODOLOGIA.....	29
4.1	Espectroscopia no Infravermelho e Análise Multivariada.....	31
4.2	Análise do Índice de Refração.....	31
4.3	Análise Direta da Folha de <i>Melaleuca</i> sp. por HS-GC/MS.....	32
4.4	Extração do Óleo Essencial.....	32
4.5	Cromatografia Gasosa para Avaliação da Composição.....	33
4.6	Padrões Analíticos.....	34
5	MANUSCRITO 1 – TECNOLOGIAS LIMPAS BASEADAS NA ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO PARA PREDIÇÃO DA QUALIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE MELALEUCA.....	35
5.1	Introdução.....	36
5.2	Materiais e Métodos.....	37
5.2.1	Cromatografia Gasosa.....	38
5.2.2	Espectroscopia no Infravermelho.....	38
5.2.3	Determinação do Índice de refração.....	39
5.2.4	Análise multivariada de dados.....	39
5.3	Resultados e discussão.....	39

5.3.1	Caracterização das amostras por Cromatografia gasosa com detecção de espectrometria de massas (GC/MS) .....	39
5.3.2	Análise do Índice de refração (IR) das amostras .....	41
5.3.3	Caracterização por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	42
5.3.4	Análise multivariada de dados de FTIR x GC/MS .....	44
5.3.5	Análise multivariada de dados de IR x FTIR.....	48
5.4	Conclusão .....	50
5.5	Referências .....	51
6	MANUSCRITO 2. DETERMINAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE MELALEUCA SP. DIRETAMENTE NA FOLHA POR HS/GC/MS.....	53
6.1	Introdução.....	54
6.2	Materiais e Métodos .....	56
6.2.1	Coleta e preparo do material vegetal.....	56
6.2.2	Planejamento experimental e tratamento estatístico .....	56
6.2.3	Extração e análise cromatográfica .....	58
6.3	Resultados e Discussão .....	58
6.3.1	Resultados preliminares .....	58
6.3.2	Resultados do Planejamento experimental.....	60
6.4	Conclusão .....	75
6.5	Referencias .....	75
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	77
8	TRABALHOS FUTUROS .....	80
9	ATIVIDADES REALIZADAS DURANTE O MESTRADO.....	81
10	REFERÊNCIAS .....	82

## 1 INTRODUÇÃO

O óleo de *Melaleuca* sp., também conhecido como *Tea Tree Oil*, possui propriedades medicinais e terapêuticas valiosas. Ademais, pode ser uma opção interessante para diversificar a produção agrícola em regiões de cultivo de tabaco, desde que haja uma demanda de mercado, que os agricultores estejam dispostos a investir em conhecimento técnico e manejo adequado, e que a viabilidade econômica seja comprovada, bem como, em especial para este trabalho, a caracterização química do óleo seja reconhecida. Melhorar a análise do óleo pode aumentar a eficiência do cultivo, tornando-o mais atrativo para os agricultores locais.

O apelo ao cultivo desta planta se deve aos benefícios terapêuticos. A ampla aplicabilidade do Óleo Essencial de *Melaleuca* sp. está relacionada com suas propriedades antisséptica, citotóxica, antibacteriana, antifúngica, anti-inflamatória, atividade antioxidante, anticancerígena e antiviral (Johnson *et al.*, 2022).

Neste sentido, a análise desse óleo pode garantir a qualidade e a eficácia dos produtos derivados, como óleos essenciais, loções e cremes, que podem ser utilizados para tratar uma variedade de condições de saúde. Também pode contribuir para levar a descobertas científicas e inovações tecnológicas na área da medicina, da agricultura e da indústria de cosméticos (Gallart-Mateu *et al.*, 2018).

O Óleo Essencial de *tea tree* (*Melaleuca alternifolia*) é amplamente utilizado nas indústrias cosmética e farmacêutica, mas seu alto valor comercial tem levado ao aumento de fraudes, como diluição, adição de compostos sintéticos e substituição por óleos mais baratos. Essas adulterações comprometem a eficácia, segurança e autenticidade do produto, gerando prejuízos econômicos e riscos à saúde. Embora métodos cromatográficos como GC-MS sejam eficazes na detecção, são caros e geram resíduos. Por isso, novas abordagens analíticas, como o uso de espectroscopia no infravermelho (NIR e ATR-FTIR), estão sendo desenvolvidas como alternativas rápidas, sustentáveis e acessíveis para o controle de qualidade e autenticação do Óleo Essencial de *Melaleuca* (Gallart-Mateu *et al.*, 2018).

Atualmente o sensoriamento remoto e os métodos diretos aplicados sem qualquer tratamento químico da amostra estão entre as maneiras mais interessantes de resolver problemas analíticos de forma precisa e segura. O desenvolvimento de novas metodologias tem sido particularmente importante para serem usados para diagnóstico de doenças e controle de produtos farmacêuticos de saúde (Esteve-Turrillas *et al.*, 2024).

As metodologias analíticas aplicadas na caracterização de amostras complexas, como os óleos essenciais, devem atender critérios rigorosos para garantir a exatidão qualitativa e quantitativa dos compostos-alvo. Para isso, é essencial que ofereçam alta seletividade, sensibilidade suficiente, robustez, precisão e representatividade — obtida por meio de programas de amostragem bem definidos. No entanto, aspectos práticos como velocidade de análise, custo e robustez operacional também são fundamentais e impactam diretamente na viabilidade de aplicação em larga escala (Esteve-Turrillas *et al.*, 2024).

A Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massas (GC/MS) é um método analítico que combina a separação de compostos por cromatografia gasosa (GC) com a identificação e quantificação por espectrometria de massas (MS). A GC separa os compostos com base em sua volatilidade e interação com a fase estacionária, enquanto o MS os identifica e quantifica pela medição da razão massa-carga. No estudo, o GC/MS foi utilizado para determinar terpenos no óleo essencial empregando condições específicas de GC (temperatura de entrada, razão de divisão, volume de injeção, tipo de coluna e programa de temperatura) e MS (temperatura, energia eletrônica) para otimizar a separação, detecção e quantificação dos terpenos (Güzel *et al.*, 2023).

A análise do índice de refração é uma técnica utilizada para identificar compostos, determinar sua pureza e analisar a composição de misturas binárias homogêneas (Ospina *et al.*, 2016). Diante disso, cresce a importância da análise verde, que considera a minimização dos impactos ambientais e a segurança do operador como critérios igualmente relevantes na seleção de metodologias. Um método analítico é considerado "verde" quando reduz o uso de reagentes tóxicos, o consumo de energia e a geração de resíduos, sem comprometer a qualidade analítica. De acordo com esse conceito, o método mais verde é aquele capaz de resolver o problema analítico com o menor impacto ambiental possível (Hüsnü *et al.*, 2007).

O método de *headspace* por cromatografia gasosa em colunas capilares é uma análise rápida e direta. Isso é alcançado através da incorporação de um estágio de concentração utilizando uma pré-coluna empacotada convencional, o que possibilita a detecção de componentes minoritários em vapores de *Headspace*. Neste método, os vapores de *headspace* são direcionados da amostra para uma coluna de cromatografia resfriada, onde os componentes voláteis são retidos e concentrados. O fluxo de gás é controlado para direcionar o *headspace* para a pré-coluna e, após a condensação suficiente dos voláteis, a amostra é transferida para a coluna capilar para análise. Essa abordagem direta minimiza o manuseio da amostra e a possibilidade de formação de artefatos, além de ser rápida e exigir um mínimo de preparação da amostra (Martendal *et al.*, 2011).

A Química Analítica Verde como a aplicação de técnicas e procedimentos de química analítica com o objetivo de diminuir ou eliminar o uso de solventes, reagentes e outros materiais que apresentam perigo para a saúde humana ou para o meio ambiente, promovendo assim, metodologias analíticas que sejam rápidas, eficientes em termos de energia e que, ao mesmo tempo, mantenham os padrões de qualidade analítica. Essa abordagem enfatiza a responsabilidade dos químicos analíticos em minimizar o impacto ambiental de suas atividades (Imam e Abdelrahman, 2023).

Nesse cenário, observa-se uma tendência crescente no uso de métodos diretos e não destrutivos, como a espectroscopia no infravermelho (NIR e ATR-FTIR), que dispensam tratamentos químicos e são aplicáveis na análise de óleos essenciais com rapidez, segurança e eficiência ambiental. Embora em certos casos ainda seja necessário realizar pré-tratamentos de amostra, isso tem impulsionado o desenvolvimento de técnicas de extração verde, visando atender aos desafios analíticos atuais sem comprometer a sustentabilidade do processo (Tankeu *et al.*, 2014).

Para avaliar o desempenho ambiental dessas novas abordagens, ferramentas como o *AGREeprep greenmetric* vêm sendo empregadas para estimar e comparar o grau de “greenness” de métodos de preparo de amostras, consolidando o paradigma da análise química ambientalmente consciente (Baser e Buchbauer, 2010).

Podemos evidenciar que a Química Analítica está crescendo profundamente focado no desenvolvimento de e metodologias de extração seguras, seguindo os princípios da Química Analítica Verde (Machado *et al.*, 2019).

A incorporação de estratégias de tratamento de amostras verdes baseadas em miniaturização, automação, redução do consumo de energia, a substituição de derivados de petróleo e o uso de materiais descartáveis são mais evidentes dia a dia. Além disso, o tratamento desenvolvido para metodologias de amostras verdes geralmente proporcionam altos rendimentos de extração, maior seleção produtividade e maior velocidade de análise (Hernandez-Martinez, 2021).

Entre as técnicas instrumentais a serem utilizadas destaca-se a importância de aplicar a espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR, sigla em inglês), que é não destrutiva e promove a redução de resíduos químicos por mínimo processamento da amostra. Ao contrário de algumas técnicas analíticas que envolvem a utilização de reagentes químicos que geram resíduos tóxicos, a espectroscopia no infravermelho com FTIR, não requer a introdução de substâncias químicas adicionais, minimizando assim a geração de resíduos perigosos. Além de ser reconhecida como uma técnica rápida e passível de automação, pode ser utilizada como uma técnica de análise em tempo real, desempenhando um papel importante na análise de amostras de forma limpa, contribuindo para a preservação do meio ambiente, economia de recursos e eficiência analítica em uma variedade de aplicações científicas e industriais (Kucharska-Ambrożej e Karpinska, 2020).

Com relação a interação com a linha de pesquisa do PPGTA, o presente estudo está atrelado à linha de pesquisa “Microbiologia Aplicada a Tecnologia Ambiental”, uma vez que a caracterização é um passo relevante para reconhecer o *Melaleuca* sp. como potencial para desenvolvimento de novos produtos biotecnológicos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Este estudo visa avaliar e comparar diferentes metodologias para realizar a caracterização do Óleo Essencial de *Melaleuca* sp. por meio da utilização de espectroscopia no infravermelho, cromatografia gasosa e determinação do índice de refração visando um controle mais limpo de qualidade deste óleo promovendo práticas analíticas mais ecologicamente corretas e menos prejudiciais à saúde humana, refletindo a crescente preocupação com a sustentabilidade na química analítica.

### 2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a qualidade dos óleos essenciais de *Melaleuca* sp. proveniente de vários lugares do Brasil, através de métodos analíticos como cromatografia gasosa com detectores de espectrometria de massas (GC/MS), espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e índice de refração.
- Utilizar amostras de óleo de *Melaleuca* sp. para o desenvolvimento de métodos quimiométricos de caracterização e discriminação baseado em tratamento de dados multivariados para predição da qualidade do Óleo Essencial.
- Propor modificações metodológicas para o controle de qualidade do Óleo Essencial de *Melaleuca* sp., utilizando a técnica de extração *Headspace*, permitindo a análise direta do óleo presente nas folhas, sem a necessidade de etapas adicionais de extração.

### 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1 Óleos Essenciais

A recente tendência de uso de compostos naturais em medicamentos e conservação de alimentos tem levado a um crescente interesse em aplicação de Óleos Essenciais (OEs). Os OEs e seus componentes também possuem propriedades antibacterianas, antifúngicas, antivirais, inseticidas e antioxidantes. Essas atividades podem ser mediadas por compostos únicos ou grupos de compostos, e essas atividades secundárias metabólitos têm funções biológicas nas plantas de onde se originam, como proteção contra predadores e patógenos microbianos, bem como o envolvimento em mecanismos de defesa contra o estresse abiótico (Bassolé e Juliani, 2012).

#### 3.2 *Melaleuca* sp.

Nos últimos anos, o interesse por substâncias biologicamente ativas nas plantas vegetais tem aumentado nos países europeus, Japão e EUA (Puvača *et al.*, 2019). As características específicas da família *Myrtaceae* são úteis para destilação de óleos essenciais. A *Melaleuca* sp. tem sido usada como planta medicinal alternativa há quase um século na Austrália, como espécie primária para produções comerciais de Óleo Essencial (Carson *et al.*, 2006). O Óleo Essencial de *Melaleuca* sp. é comumente usado como um antisséptico tópico e antibacteriano devido às suas características antimicrobianas distintas. Reduz inflamação e pode ser eficaz em tratamentos de infecções fúngicas (Hammer *et al.*, 2006).

A crescente demanda por espécies medicinais pela população indica o surgimento de um mercado com alto potencial de consumo, necessitando de matéria prima de alta qualidade, com oferta regular e de fácil disponibilidade. O problema da qualidade do fitoterápico tem início na identificação correta da espécie e, posteriormente, no plantio, na colheita, no beneficiamento e no preparo dos medicamentos. Diversos fatores influenciam a qualidade final do produto, como variação climática, tipo de solo, época da colheita, características genéticas das plantas, condições de secagem, tempo de armazenamento, etc. (Castro e Ferreira, 2000).

O Óleo Essencial de *Melaleuca sp.* é uma fonte potencialmente útil de compostos antimicrobianos. No entanto, é importante reconhecer que a composição dos óleos essenciais pode variar significativamente dependendo de diversos fatores, como regiões geográficas, variedade ou idade das plantas e métodos de secagem e extração do óleo (Cakir *et al.*, 2004), o que dificulta a comparação direta de resultados entre diferentes estudos. Essa variabilidade na composição destaca a necessidade de um controle de qualidade rigoroso e padronizado, especialmente considerando que os compostos majoritários, ou seja, as substâncias químicas que ocorrem em maior concentração dentro da composição do óleo, são cruciais para suas propriedades e aplicações. Na Tabela 3-1 apresenta-se a lista de compostos identificados no Óleo Essencial de *Melaleuca sp.* conforme a International Organization for Standardization (ISO 4730, 2017), servindo como referência para a composição esperada deste óleo essencial.

Tabela 3-1. Componentes Principais do Óleo Essencial de *Melaleuca sp.* (*Tea Tree*) segundo a *International Organization for Standardization* (ISO 4730:2017).

<b>Composto</b>	<b>Concentração</b>
Terpinen-4-ol	35-48%
$\gamma$ -Terpineno	14-28%
$\alpha$ -Terpineno	6-12%
1,8-Cineole	<0,01-10%
p-Cimeno	0,5-8%
Terpinoleno	1,5-5%
$\alpha$ -terpineol	2-5%
$\alpha$ -pineno	1-4%
Sabineno	<0,01-3,5%
Aromadendreno	0,2-3%
$\delta$ -cadineno	0,2-3%
Ledeno	0,1-3%
Limoneno	0,5-1,5%
Globulol	<0,01-1%
Viridiflorol	<0,01-1%

### 3.2.1 *Melaleuca Alternifolia*

A *Melaleuca alternifolia*, popularmente conhecida como "tea tree" ou árvore do chá, é uma planta medicinal pertencente à família *Myrtaceae* e é nativa das regiões dos rios do norte de Nova Gales do Sul, na Austrália. Esta espécie tem um histórico de uso tanto por povos indígenas tradicionais quanto por colonizadores europeus na Austrália. Ao longo dos anos, a *Melaleuca alternifolia* ganhou destaque comercial, com um aumento significativo na produção anual de seu óleo essencial, que é amplamente exportado (Schafer *et al.*, 2022).

O óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* é caracterizado por uma composição complexa, onde os compostos voláteis, como o terpinen-4-ol,  $\alpha$ -pineno e 1,8-cineole, são os mais estudados. O terpinen-4-ol, em particular, é reconhecido como um dos principais componentes ativos, sendo que a qualidade do óleo é definida por padrões internacionais que estabelecem teores mínimos e máximos desse composto, além de limites para outros, como o 1,8-cineole (Voelker *et al.*, 2023).

### 3.3 Técnicas analíticas para determinação de óleos essenciais

A variabilidade dos óleos essenciais da mesma espécie botânica é determinada pela composição química influenciada por fatores geográficos e climáticos, e principalmente pelo método de extração e purificação. Assim, a confirmação da identidade do Óleo Essencial é uma questão complexa (Kustrin *et al.*, 2020).

Embora a análise cromatográfica permita obter informações claras sobre a composição quantitativa ou qualitativa, o ensaio envolve a preparação da amostra em várias etapas: extração, purificação dos extratos obtidos e pré-concentração. Uma desvantagem adicional da análise cromatográfica é o seu longo tempo. Geralmente, o uso de técnicas avançadas de separação é demorado e trabalhoso, o que as torna difíceis de usar, especialmente quando é necessário o exame rápido de um grande número de amostras (Ren *et al.*, 2020).

Portanto, a busca por métodos que sejam mais rápidos e econômicos ainda é uma questão em aberto. Os avanços nas técnicas espectroscópicas, bem como os custos relativamente mais baixos de equipamentos e uso, e seu caráter ambiental, tornam as ferramentas espectroscópicas uma alternativa muito mais atraente aos métodos cromatográficos. A crescente popularidade dos métodos baseados na análise quimiométrica da

espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), é confirmada pelo crescente número de artigos publicados, nos quais os autores os utilizam para resolver diversos problemas analíticos. Todos os anos são publicados dezenas de artigos dedicados ao uso de uma combinação de análise espectral (Kucharska-Ambrożej e Karpinska, 2020).

A qualidade e a composição dos óleos essenciais dependem das características da planta, origem, estágio de desenvolvimento, parte da planta utilizada, idade, época e condição de colheita da planta. Além de todos estes fatores, o método de extração, as condições de análise e o tipo de solvente utilizado é fundamental para a escolha do método adequado (Zhang *et al.*, 2019).

Os métodos clássicos de extração são baseados na destilação pelo aquecimento do material vegetal com a água, recuperando assim os compostos voláteis presentes, conhecido por hidrodestilação e arraste a vapor, que representam em torno de 93% do Óleo Essencial que é produzido (Ye *et al.*, 2023). A destilação por arraste à vapor pode ser combinada com outros métodos de extração, afim de aumentar a eficiência, exemplo disso é a utilização de métodos que auxiliam na extração baseados no uso de micro-ondas e ultrassom. Estas associações podem fornecer extração mais rápida, baixando os custos e fornecendo um produto semelhante ao hidrodestilado convencional (Ye *et al.*, 2023).

O sistema de hidrodestilação é equipado com um dispositivo do tipo *Clevenger*. Neste processo, o material vegetal imerso em água é aquecido em um balão, a água evapora e é direcionada ao condensador onde é obtido o Óleo Essencial, apesar de ser uma técnica eficiente e altamente utilizada, ela requer grandes quantidades de energia e suas altas temperaturas podem causar alterações nos compostos, com possíveis degradações (Ye *et al.*, 2023).

A técnica usando hidrodifusão por micro-ondas e gravidade é um método de extração sem solvente, baseado na perfuração de glândulas de óleo e drenagem deste óleo por gravidade (Chen *et al.*, 2021). Para a extração com solvente direto do material vegetal, são usados os solventes orgânicos como n-hexano, álcool, clorofórmio e acetona, os quais proporcionam eficiente recuperação do Óleo Essencial, de material lipídico e pigmentos (Pavlič *et al.*, 2015).

Para auxiliar na tarefa de extrair com solvente, o extrator *Soxhlet* é um dos procedimentos mais antigos de extração. O solvente é recirculado na amostra até que todo o conteúdo lipossolúvel seja completamente removido (De Castro e Priego-Capote, 2010). Dentre as grandes desvantagens do *Soxhlet* estão o tempo médio de extração que pode levar até 72 horas, os solutos são obtidos em alto volume de solvente, precisando serem concentrados antes

da análise. Os solventes impactam pelo valor de mercado daqueles que são de alta pureza e pela toxicidade (Yousefi *et al.*, 2019).

Além disso, a extração seletiva, na maioria dos casos, ocorre por meio de mudanças nos parâmetros do processo e pode operar em temperaturas e pressões elevadas, reduzindo o tempo de extração (Bubalo *et al.*, 2018). Em relação a métodos alternativos, fluídos pressurizados sob condições subcríticas ou supercríticas são indicados como uma técnica promissora para a extração de compostos com alta pureza (Ye *et al.*, 2023). A extração por líquido pressurizado é outra técnica alternativa que apresenta resultados satisfatórios em relação ao tempo de recuperação e extração do óleo, quando comparada aos métodos convencionais. Nesta técnica, não há necessidade de etapas de filtração, pois os compostos são dissolvidos no solvente e podem permanecer dentro do extrator (Nieto *et al.*, 2010).

Na extração por ultrassonicação, é promovido uma maior taxa de penetração de solvente na amostra, causadas por bolhas de cavitação formadas durante a aplicação de ondas sônicas. Em geral, o uso de ultrassom causa vibrações na matriz, aumentando assim a superfície de contato entre a matriz e o solvente resultando em uma maior recuperação de solvente em curto período de tempo (Kusuma *et al.*, 2023).

Dentre os métodos alternativos destaca-se, também, a extração assistida por micro-ondas, que melhora a recuperação de material e reduz o tempo e a energia necessários no processo. Ela usa radiação de micro-ondas como fonte de aquecimento instantâneo no processo de extração, levando assim a extrações mais rápidas (Chen *et al.*, 2021).

A amostragem por *Headspace* de uma matriz sólida é um processo de várias etapas nas quais a distribuição do analito ocorre entre a matriz, o *Headspace* e a fase de extração. Os analitos devem ser liberados da matriz porosa da amostra e difundir através dos poros da matriz para difundir através da fase gasosa e adsorver na fase de extração da superfície (Koonani e Ghiasvand, 2023).

Antes da extração, a maioria das moléculas do analito está dentro do substrato sólido e imobilizado por forças intermoleculares. Alguns deles são colocadas nas cavidades/poros adsorventes com movimento devido à colisão com a parede e outras moléculas. Uma parte dessas moléculas que escapam da matriz sólida entram no *Headspace* e são adsorvidos na fase de extração por difusão na fase gasosa. Reduzir a pressão perturba o equilíbrio, diminuindo o número de moléculas no *Headspace*. Isso faz com que mais moléculas desorvam da matriz

sólida, entrando nas cavidades e difundindo no *Headspace* para criar um novo equilíbrio (Yang e Liu, 2020).

A análise de terpenos e terpenóides em plantas e outros produtos geralmente envolve a extração de solventes orgânicos de materiais vegetais seguida de injeção direta e análise por cromatografia gasosa (GC), acoplada a detectores de ionização de chama (FID) ou espectrometria de massa (MS). Embora eficazes na obtenção de um perfil químico da complexa matriz orgânica dos materiais vegetais, várias etapas de extração usando solventes orgânicos e concentração de amostra podem ser necessárias. Por outro lado, técnicas de amostragem *Headspace* são frequentemente empregadas para análise de compostos com pressões de vapor adequadas (Nguyen *et al.*, 2020).

O conceito *Green Analytical Chemistry* (química analítica verde) representa uma metodologia ambientalmente correta no campo da análise química. Seu objetivo é mitigar os efeitos prejudiciais das técnicas analíticas no ambiente natural e saúde humana (Yahaya *et al.*, 2024). A química verde, também conhecida como química sustentável, concentra-se em projetar produtos e processos que minimizam o impacto ambiental reduzindo o desperdício, conservando energia e usando substâncias mais seguras (Kaya *et al.*, 2022).

A importância das ferramentas verdes é maior para os países em desenvolvimento que enfrentam dificuldades econômicas e problemas ambientais mais intensamente do que o resto do mundo. Tais ferramentas de avaliação são usadas para evitar maiores contribuições de contaminação para o meio ambiente, que já está em nível crítico, para reduzir custos dentro de oportunidades orçamentárias limitadas e para reduzir o consumo de energia e geração de resíduos (Nowak *et al.*, 2021).

### **3.3.1 Extração e análise de óleo de *Melaleuca sp.***

Realizando uma pesquisa bibliométrica na Base de dados *Web of Science* do Periódicos Capes, com as palavras (“*tea tree*” OR “*melaleuca*”) AND (“*chemical analysis*” OR “*chromatography*” OR “*spectroscopy*”), considerando os anos de 2018 a 2025, somente artigos em inglês, artigos originais de pesquisa, excluindo anais de eventos e revisões, foi possível obter 495 documentos representados nos *clusters* da Figura 3-1, obtida no *software* Citespace 6.4.R1 da *Chaomei Chem*. Nesta Figura observa-se que os *clusters* foram Óleo Essencial de

melaleuca, melaleuca cajuputi, atividade larvicida, antibacteriana, terpenos, biomateriais, semioquímicos, espectroscopia infravermelha média de refletância total atenuada e *Juniperus communis*. Destes, destaca-se a importância do uso da Cromatografia e Espectroscopia para reconhecer a composição do óleo.

Para investigar as tendências e o foco das pesquisas sobre o óleo essencial de *Melaleuca* sp., especialmente no que se refere às técnicas de análise química, foi realizada uma pesquisa bibliométrica na base de dados *Web of Science* do Periódicos Capes. A busca utilizou as palavras-chave (“*tea tree*” OR “*melaleuca*”) AND (“*chemical analysis*” OR “*chromatography*” OR “*spectroscopy*”), restringindo os resultados a artigos em inglês, artigos originais de pesquisa, publicados entre 2018 e 2025, e excluindo anais de eventos e revisões. Essa pesquisa resultou em 495 documentos, cujos temas foram organizados em clusters representados na Figura 3-1, obtida no software *Citespace* 6.4.R1 da *Chaomei Chem*. A análise desses clusters revelou as principais áreas de estudo, incluindo Óleo Essencial de melaleuca, melaleuca cajuputi, atividade larvicida, antibacteriana, terpenos, biomateriais, semioquímicos, espectroscopia infravermelha média de refletância total atenuada e *Juniperus communis*. Entre esses temas, a pesquisa bibliométrica destacou a importância central da Cromatografia e Espectroscopia como ferramentas para o reconhecimento da composição do óleo.

*Melaleuca* sp. é uma planta nativa da Austrália, produz um Óleo Essencial com alto valor comercial para a indústria, especialmente para seu uso em aplicações farmacêuticas e cosméticas, como ingrediente em desodorantes, loções corporais, pomadas e remédios fitoterápicos. Esta ampla aplicabilidade do Óleo Essencial de *Melaleuca* sp. está relacionada com suas propriedades antisséptica, citotóxica, antibacteriana, antifúngica, anti-inflamatória (Gallart-Mateu *et al.*, 2018).

Normalmente, a composição do Óleo Essencial de *Melaleuca* sp. é regulada pela norma ISO 4730 (2017), na tentativa de padronizar a composição do mercado comercial óleo de *Melaleuca* sp. e fornecer alguma clareza às bioatividades esperadas deste produto, que especifica as faixas de concentração para os 15 terpenos mais relevantes encontrados nas amostras e suas propriedades. A composição química e a proporção de terpenos estão correlacionadas com o quimiotipo da planta, o rico em Terpinen-4-ol é mais adequado para a produção de óleo de *Melaleuca* sp. comercial (ISO 4730, 2017).

Recentemente, a *Melaleuca* sp. tem atraído crescente atenção para sua função bioprotetora contra patógenos fúngicos. Pulverização foliar com Óleo Essencial de *Melaleuca*

em bananeiras infectadas no campo obtiveram proteção induzida contra *Foc race 1* (fungo patogênico característico de uma variedade de banana) nas plantas jovens (Paramalingam *et al.*, 2023).

O Óleo Essencial de *Melaleuca* sp. ganhou popularidade nas formulações cosméticas pela sua atividade antioxidante, sozinho ou em combinações com outros óleos, que produzem efeitos sinérgicos. Queimaduras solares, fotodermatoses, hiperpigmentação, fotoenvelhecimento da pele e lesões pré-cancerosas e os cânceres são todos efeitos colaterais da exposição aos raios UV. A capacidade antioxidante e fator de proteção solar do Óleo Essencial de *Melaleuca* sp. são atribuídos principalmente ao Terpinen-4-ol, um dos seus principais constituintes, como resultado, o teor de Terpinen-4-ol foi limitado a 30% sem limite superior para maximizar a atividade antienvhecimento. Em contraste, um limite superior de 15% foi estabelecido para o 1,8-cineol, por muitos anos, o cineol foi erroneamente considerado irritante para a pele e as membranas mucosas, que alimentaram os esforços para reduzir sua concentração no Óleo Essencial de *Melaleuca* sp. (Malik e Upadhyay, 2022).

Os métodos mais comumente empregados na análise do Óleo Essencial de *Melaleuca* sp., do ponto de vista analítico, são as técnicas de cromatografia, especialmente cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC/MS) ou detecção de ionização em chama (FID). Estes são aceitos como uma ferramenta analítica para análise de controle de qualidade (Gallart-Mateu *et al.*, 2018).

BASER, K. H. C.; BUCHBAUER, G. **Handbook Of Essential Oils: Science, Technology, And Applications**. 2010. 978-1-4200-6315-8.

BASSOLÉ, I. H. N.; JULIANI, H. R. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. **Molecules**, v. 17, n. 4, p. 3989–4006, 2012.

BUBALO, M. C. *et al.* New perspective in extraction of plant biologically active compounds by green solvents. **Food and Bioproducts Processing**, v. 109, p. 52–73, 2018.

CAKIR, A. *et al.* Composition and antifungal activity of essential oils isolated from *Hypericum hyssopifolium* and *Hypericum heterophyllum*. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 19, p. 62–68, 2004.

CARSON, C. F.; HAMMER, K. A.; RILEY, T. V. *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. **Clinical microbiology reviews**, v. 19, n. 1, p. 50–62, 2006.

CASTRO, H. D.; FERREIRA, F. Contribuição ao estudo das plantas medicinais: carqueja (*Baccharis genistelloides*). **Viçosa: UFV, 2000. 102p**, v. 2000.

CHEN, G. *et al.* Enhanced extraction of essential oil from *Cinnamomum cassia* bark by ultrasound assisted hydrodistillation. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 36, p. 38–46, 2021.

DE CASTRO, M. L.; PRIEGO-CAPOTE, F. Soxhlet extraction: Past and present panacea. **Journal of chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2383–2389, 2010.

ESTEVE-TURRILLAS, F. A.; GARRIGUES, S.; DE LA GUARDIA, M. Green extraction techniques in green analytical chemistry: A 2019–2023 up-date. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 170, p. 117464, 2024.

GALLART-MATEU, D. *et al.* Fast authentication of tea tree oil through spectroscopy. **Talanta**, v. 189, p. 404–410, 2018.

GÜZEL, B.; CANLI, O.; MURAT HOCAOĞLU, S. Method development and validation for accurate and sensitive determination of terpenes in bio-based (citrus) oils by single quadrupole gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS). **Microchemical Journal**, v. 191, p. 108903, 2023.

HAMMER, G. *et al.* Models for navigating biological complexity in breeding improved crop plants. **Trends in plant science**, v. 11, n. 12, p. 587–593, 2006.

HERNANDEZ-MARTINEZ, A. R. Chapter 10 - Remote sensing for environmental analysis: Basic concepts and setup. *In*: INAMUDDIN;BODDULA, R., *et al* (Ed.). **Green Sustainable Process for Chemical and Environmental Engineering and Science**: Elsevier, 2021. p. 209–224.

HÜSNÜ, K.; BAŞER, C.; DEMIRCI, F. Chemistry of Essential Oils. *In*: BERGER, R. G. (Ed.). **Flavours and Fragrances: Chemistry, Bioprocessing and Sustainability**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2007. p. 43–86.

IMAM, M. S.; ABDELRAHMAN, M. M. How environmentally friendly is the analytical process? A paradigm overview of ten greenness assessment metric approaches for analytical methods. **Trends in Environmental Analytical Chemistry**, v. 38, p. e00202, 2023.

ISO 4730. **Oil of Melaleuca terpin-4-ol type (Tea tree oil)**. . International Organization for Standardization, 2017.

JOHNSON, J. B. *et al.* Mid-infrared spectroscopy for the rapid quantification of eucalyptus oil adulteration in Australian tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*). **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 283, p. 121766, 2022.

KAYA, S. I.; CETINKAYA, A.; OZKAN, S. A. Green analytical chemistry approaches on environmental analysis. **Trends in Environmental Analytical Chemistry**, v. 33, p. e00157, 2022.

- KOONANI, S.; GHASVAND, A. A comprehensive theory for vacuum-assisted headspace extraction of solid samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1712, p. 464465, 2023.
- KUCHARSKA-AMBROŹEJ, K.; KARPINSKA, J. The application of spectroscopic techniques in combination with chemometrics for detection adulteration of some herbs and spices. **Microchemical Journal**, v. 153, p. 104278, 2020.
- KUSTRIN, S. *et al.* Essential Oil Quality and Purity Evaluation via FT-IR Spectroscopy and Pattern Recognition Techniques. **Applied Sciences**, v. 10, p. 7294, 2020.
- KUSUMA, H. S.; IZZAH, D. N.; LINGGAJATI, I. W. L. Microwave-assisted drying of *Ocimum sanctum* leaves: analysis of moisture content, drying kinetic model, and techno-economics. **Applied Food Research**, v. 3, n. 2, p. 100337, 2023.
- MACHADO, R. *et al.* Solid sampling: advantages and challenges in atomic spectrometry — a critical review. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 35, p. 54–77, 2019.
- MALIK, P.; UPADHYAY, P. GC-MS Chemical Profile, Antioxidant activity, and Sun Protection Factor of Essential oil of Tea Tree (*Melaleuca alternifolia*) and Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). **Oriental Journal of Chemistry**, v. 38, n. 5, 2022.
- MARTENDAL, E. *et al.* Use of different sample temperatures in a single extraction procedure for the screening of the aroma profile of plant matrices by headspace solid-phase microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 24, p. 3731–3736, 2011.
- NGUYEN, T.-D. *et al.* Quantitation of select terpenes/terpenoids and nicotine using gas chromatography–mass spectrometry with high-temperature headspace sampling. **ACS omega**, v. 5, n. 10, p. 5565–5573, 2020.
- NIETO, A. *et al.* Pressurized liquid extraction: A useful technique to extract pharmaceuticals and personal-care products from sewage sludge. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 7, p. 752–764, 2010.
- NOWAK, P. M.; WIETECZA-POSŁUSZNY, R.; PAWLISZYN, J. White Analytical Chemistry: An approach to reconcile the principles of Green Analytical Chemistry and functionality. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 138, p. 116223, 2021.
- OSPINA, J. D. *et al.* Relationship between refractive index and thymol concentration in essential oils of *Lippia origanoides* Kunth. **Chilean journal of agricultural & animal sciences**, v. 32, p. 127–133, 2016.
- PARAMALINGAM, P. *et al.* Antifungal Potential of *Melaleuca alternifolia* against Fungal Pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Tropical Race 4. **Molecules**, v. 28, n. 11, p. 4456, 2023.

PAVLIĆ, B. *et al.* Isolation of coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil by green extractions versus traditional techniques. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 99, p. 23–28, 2015.

PUVAČA, N. *et al.* Tea tree (*Melaleuca alternifolia*) and its essential oil: antimicrobial, antioxidant and acaricidal effects in poultry production. **World's Poultry Science Journal**, v. 75, n. 2, p. 235–246, 2019.

REN, G. *et al.* Using near-infrared hyperspectral imaging with multiple decision tree methods to delineate black tea quality. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 237, p. 118407, 2020.

SCHAFER, J. J.; SOUTHWELL, I. A.; LIU, L. Isolation and Identification of Acylphloroglucinols in the Medicinal Plant, *Melaleuca alternifolia* (Australian Tea Tree). **Chem Biodivers**, v. 19, n. 3, p. e202100944, 2022.

TANKEU, S. *et al.* Vibrational Spectroscopy as a Rapid Quality Control Method for *Melaleuca alternifolia* Cheel (Tea Tree Oil). **Phytochemical Analysis**, v. 25, n. 1, p. 81–88, 2014.

VOELKER, J.; MAULEON, R.; SHEPHERD, M. The terpene synthase genes of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) and comparative gene family analysis among Myrtaceae essential oil crops. **Plant Systematics and Evolution**, v. 309, 2023.

YAHAYA, N. *et al.* Green analytical chemistry metrics for evaluation of microextraction methods: Fascinating or essential tools in real-world applications? **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 172, p. 117587, 2024.

YANG, Y.; LIU, S. Review of Shale Gas Sorption and Its Models. **Energy & Fuels**, v. 34, n. 12, p. 15502–15524, 2020.

YE, R. *et al.* Extraction process optimization of essential oil from *Melissa officinalis* L. using a new ultrasound-microwave hybrid-assisted Clevenger hydrodistillation. **Industrial Crops and Products**, v. 203, p. 117165, 2023.

YOUSEFI, M. *et al.* Supercritical fluid extraction of essential oils. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 118, p. 182–193, 2019.

ZHANG, R. *et al.* Recent advances in valorization of *Chaenomeles* fruit: A review of botanical profile, phytochemistry, advanced extraction technologies and bioactivities. **Trends in Food Science & Technology**, v. 91, p. 467–482, 2019.

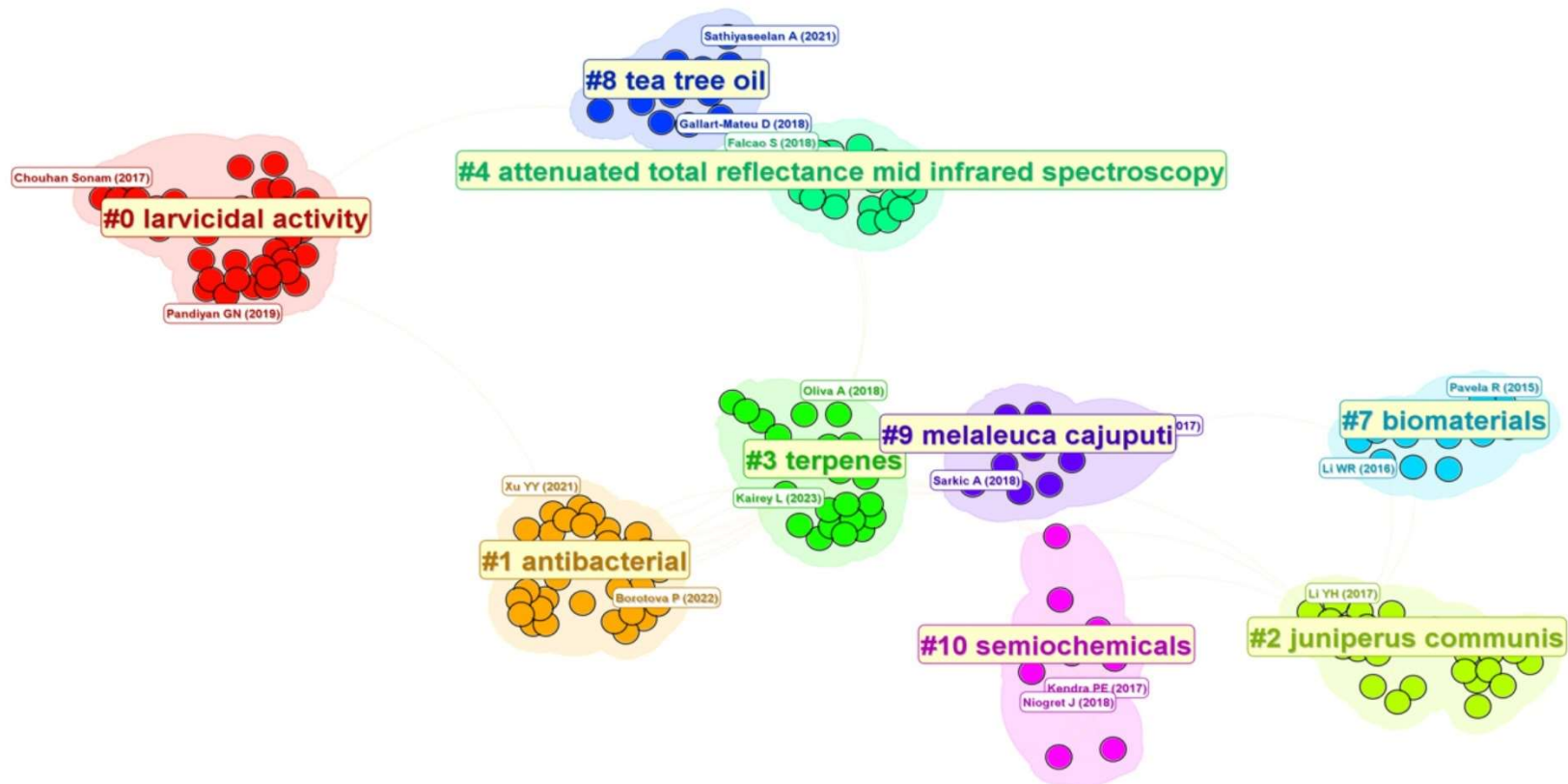


Figura 3-1. Clusters formados na análise bibliométrica relacionada ao óleo de *Melaleuca* e análises química obtida no software Citespace 6.4 R1.

Após a primeira publicação sobre a composição do Óleo Essencial de *Melaleuca* sp., em 1926, houve mais de 50 publicações sobre os constituintes deste óleo. No entanto, a cromatografia gasosa é um dos métodos analíticos mais dispendiosos e demorados, e também exige profissionais altamente treinados para operá-lo. Conseqüentemente, há um interesse crescente no uso de abordagens rápidas e não destrutivas para a autenticação e análise de qualidade do óleo de *Melaleuca* sp., como têm sido usados em uma ampla gama de medicamentos e produtos alimentares (Johnson *et al.*, 2022).

O Óleo Essencial de folhas frescas é extraído por destilação a vapor utilizando um aparelho de vidro *Clevenger* por aproximadamente 3 h e a dinâmica e eficiência da extração do Óleo Essencial via destilação a vapor são influenciados por um conjunto complexo de parâmetros que variam com cada destilação e entre as colheitas. Como resultado, o ponto em que a qualidade do Óleo Essencial de *Melaleuca* sp. diminui no final de uma corrida (lote de destilação), indicado por uma queda acentuada no teor de Terpinen-4-ol, não pode ser determinado com alta precisão. Essa situação levou a uma troca entre qualidade e quantidade, onde os destiladores interrompem a corrida prematuramente para que a qualidade do óleo não seja prejudicada. Uma maneira eficaz de otimizar a destilação seria através do controle de *feedback* direto em cada corrida, permitindo que destilações continuem até que as concentrações de Terpinen-4-ol caiam, maximizando assim a quantidade sem comprometer a qualidade (Jaramillo *et al.*, 2024).

Uma solução potencial é fornecida pela espectroscopia Raman, a qual obteve significativo sucesso em sua aplicação para prever a composição química em óleos essenciais. A técnica usa o espectro criado quando a luz interage com as moléculas de um gás, líquido ou sólido, a maior parte dos fótons é dispersa ou propagada com a mesma energia que os fótons incidentes. Esse fenômeno é descrito como difusão elástica ou difusão Rayleigh. Uma pequena parte desses fótons, cerca de 1 fóton em 10 milhões, é propagada em uma frequência diferente da frequência do fóton incidente. Esse processo é chamado de difusão inelástica ou efeito Raman, em homenagem a Sir C.V. Raman, que descobriu o fenômeno e ganhou o Prêmio Nobel em Física em 1930 pelo seu trabalho (Gloerfelt-Tarp *et al.*, 2022).

## 4 METODOLOGIA

Na Figura 4-1 é apresentado a metodologia geral para o desenvolvimento da pesquisa considerando a etapa de estudo da espectroscopia com análise multivariada para determinar a qualidade do Óleo Essencial de *Melaleuca* sp. comercial e a etapa de análise da qualidade do mesmo óleo empregando extração seguida de análise direto da folha, por *Headspace* e cromatografia gasosa. Os resultados organizados nesta dissertação estão divididos em dois artigos, o primeiro intitulado “Tecnologias limpas baseadas na espectroscopia no infravermelho para predição da qualidade do Óleo Essencial” e o segundo artigo “Determinação de Óleo Essencial de *Melaleuca* diretamente na folha por HS/GC/MS”.

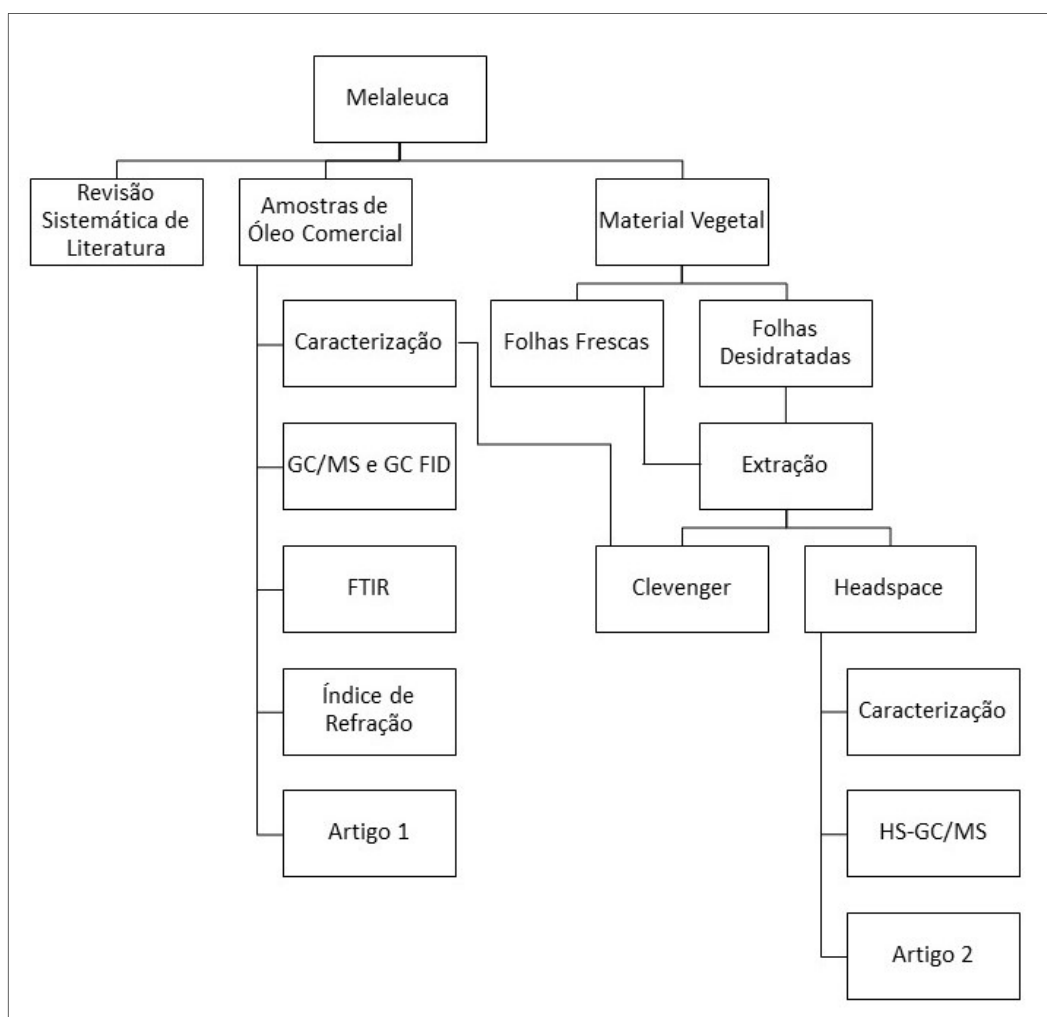


Figura 4-1. Metodologia geral do desenvolvimento da pesquisa.

As duas abordagens adotadas nesta pesquisa foram planejadas para otimizar a análise e minimizar o uso de insumos e o tempo de processamento. A primeira abordagem foca no



#### 4.1 Espectroscopia no Infravermelho e Análise Multivariada

A espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foi aplicada para desenvolver um protocolo analítico e construir modelos de calibração multivariada capazes de identificar adulterações e caracterizar a composição do Óleo Essencial (*Melaleuca* sp.). Os espectros foram obtidos por Reflectância Total Atenuada na faixa de 4000-650  $\text{cm}^{-1}$ , com varredura de 4 scans.

A análise exploratória foi realizada no *software* Pirouette 4.0, onde os espectros foram normalizados e analisados por *Principal Component Analysis* (PCA) e *Partial Least Squares* (PLS). O desempenho foi avaliado pelo coeficiente de correlação (R) e pelo erro médio de validação cruzada (RMSECV). A quimiometria, através de algoritmos de análise exploratória e de regressão, evidencia a robustez destes métodos e oferecendo um avanço na pesquisa sobre qualidade de OE, trazendo um impacto importante na fitoquímica e na indústria farmacêutica, e é uma área de pesquisa, que utiliza métodos matemáticos e métodos técnicos estatísticos para extrair as informações relevantes em qualquer tipo de dados, incluindo as informações químicas dos espectros e correlacionando-se com a qualidade parâmetros ou propriedades físicas de uma amostra. Esta técnica envolve métodos de análise não supervisionados, como análise exploratória, ou métodos supervisionados, como classificação ou predição de propriedades quantitativas se baseiam em medições químicas ou físicas de referência (Badaró *et al.*, 2022). Foi realizada uma investigação sobre diferentes modelos PLS, observando-se a necessidade de aplicar técnicas de pré-processamento, incluindo centragem na média, transformação de variável e aplicação de componentes de correção de sinal ortogonal.

#### 4.2 Análise do Índice de Refração

O índice de refração (IR) foi determinado como parâmetro de pureza do Óleo Essencial de *Melaleuca* sp., correlacionando-se com análises cromatográficas e espectroscópicas. As medições foram realizadas a 20°C em um refratômetro digital RUDOLPH J47. Aproximadamente 30 mg de Óleo Essencial (~3 gotas) foram analisados em triplicata na célula de safira do equipamento, garantindo reprodutibilidade e precisão.

### **4.3 Análise Direta da Folha de *Melaleuca* sp. por HS-GC/MS**

A análise direta das folhas foi realizada por cromatografia gasosa com *Headspace* (HS-GC/MS) e espectroscopia no infravermelho, evitando a extração prévia do óleo. A desidratação das folhas ocorreu a 23°C por sete dias. O planejamento experimental considerou quatro variáveis em dois níveis: tipo de suporte (NaCl ou sílica), condição da folha (fresca ou desidratada), presença ou ausência de água ultrapura no vial, e massa da amostra (0,1 g ou 0,2 g). As amostras maceradas foram analisadas no forno do Headspace AOC 5000 acoplado ao cromatógrafo a gás Shimadzu GCMS-QP2010 plus. A extração foi realizada a 90°C por 10 minutos com agitação periódica de 250 rpm.

### **4.4 Extração do Óleo Essencial**

A extração do Óleo Essencial foi conduzida por hidrodestilação em aparelho *Clevenger* (Figura 4.3), utilizando 325 g de folhas frescas em 1,0 L de água destilada por três horas. O rendimento do óleo foi de 0,95%, calculado pela relação entre a massa do óleo e a massa do material vegetal seco.



Figura 4-3. Extrator *Clevenger* utilizado nas extrações de Óleo Essencial de *Melaleuca* sp.

#### 4.5 Cromatografia Gasosa para Avaliação da Composição

A composição química do Óleo Essencial foi determinada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS). O equipamento utilizado foi um Shimadzu GC2010 plus, operando com gás hélio como fase móvel. A análise foi realizada com uma coluna ZB-5MS, utilizando um gradiente de temperatura de 60°C a 260°C. A identificação dos compostos foi baseada em bibliotecas espectrais (NIST17.L), padrões externos e índices de retenção publicados.

#### 4.6 Padrões Analíticos

Para validação da identificação dos compostos, foram utilizados padrões de referência de monoterpenos como eucaliptol, limoneno, sabineno-hidratado, terpinen-4-ol,  $\alpha$ -pineno,  $\gamma$ -terpineno e outros, adquiridos de fornecedores como Sigma-Aldrich e Supelco. Esses padrões (Tabela 4-2) garantiram a precisão na determinação da composição química do Óleo Essencial.

Tabela 4-1. Padrões analíticos utilizados para a identificação dos compostos por GC/MS e GC/FID.

<b>Padrão Analítico</b>	<b>Marca</b>	<b>Código Produto</b>	<b>Peso Molecular</b>	<b>Fórmula</b>	<b>CAS</b>
<b>Eucalyptol (1,8 cineol)</b>	Sigma-Aldrich	C80601	154,25	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	470-82-6
<b>Limoneno</b>	Sigma-Aldrich	183164	136,23	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	5989-27-5
<b>Sabinene hydrate</b>	Supelco	96573	154,25	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	546-79-2
<b>Terpinen-4-ol</b>	Sigma-Aldrich	11584	154,25	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	20126-76-5
<b>Terpineol</b>	Sigma-Aldrich	86480	154,25	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	8000-41-7
<b>Terpinoleno</b>	Sigma-Aldrich	W304603	136,23	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	586-62-9
<b><math>\alpha</math>-pinene</b>	Sigma-Aldrich	268070	136,23	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	7785-70-8
<b><math>\alpha</math>-terpineno</b>	Sigma-Aldrich	86473	136,23	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	99-86-5
<b><math>\alpha</math>-terpineol</b>	Supelco	30627	154,25	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	98-55-5
<b><math>\gamma</math>-terpinene</b>	Supelco	86476	136,23	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	99-85-4
<b><math>\rho</math>-cimeno</b>	Sigma-Aldrich	C121452	134,22	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub>	99-87-6
<b>Alcanos C8-C20</b>	Supelco	04070			

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo concentrou-se em avaliar e comparar diversas metodologias para a caracterização do Óleo Essencial de *Melaleuca sp.*. O objetivo central foi propor um controle de qualidade mais "limpo" e ambientalmente sustentável por meio da utilização de técnicas modernas como a espectroscopia no infravermelho, a cromatografia gasosa e a determinação do índice de refração. Foi realizada uma avaliação abrangente da qualidade do óleo, estabelecendo-se com sucesso a relação entre as variáveis obtidas por meio da cromatografia gasosa com detectores de espectrometria de massas (GC/MS) e de ionização em chamas (FID), da espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e do índice de refração (IR).

O trabalho demonstrou a eficácia do desenvolvimento de métodos quimiométricos de caracterização e discriminação. Tais métodos, baseados no tratamento de dados multivariados, são poderosos para a predição da qualidade do Óleo Essencial e, por serem robustos, podem ser prontamente adaptados e utilizados no controle de qualidade de outras espécies vegetais. A abordagem HS-GC/MS é uma técnica promissora para o desenvolvimento de metodologias rápidas e eficientes de análise dos componentes químicos de amostras de plantas.

A utilização da extração *Headspace* é somente uma das várias técnicas analíticas atuais para se trabalhar o conceito de química verde, possibilitando outras associações de métodos para o controle de qualidade de óleos essenciais. Os resultados obtidos neste estudo representam uma contribuição significativa para o campo da tecnologia ambiental aplicada à análise de óleos essenciais, especialmente no que se refere ao desenvolvimento de metodologias analíticas mais limpas, rápidas e acessíveis. A aplicação da espectroscopia FTIR, integrada à análise multivariada, demonstrou elevada capacidade de discriminação entre amostras autênticas e adulteradas de óleo essencial de *Melaleuca sp.*, com excelente correlação com dados obtidos por métodos convencionais como GC-MS. Essa abordagem não apenas garante confiabilidade nos resultados, mas também promove a redução do uso de solventes tóxicos e do tempo de análise, refletindo diretamente nos pilares da Química Analítica Verde.

A introdução da técnica de *Headspace* acoplada à GC-MS para análise direta das folhas, sem necessidade de extração prévia do óleo, representa uma inovação metodológica com elevado potencial de aplicação industrial. Essa estratégia reduz etapas laboratoriais, diminui o

consumo de reagentes e energia, e pode ser adaptada a rotinas de monitoramento em tempo real, favorecendo cadeias produtivas mais sustentáveis.

Do ponto de vista do campo científico, o trabalho reforça a importância de investir em tecnologias analíticas que conciliem desempenho técnico com responsabilidade ambiental, alinhando-se às demandas globais por métodos mais sustentáveis, especialmente em setores como o farmacêutico, cosmético e agrícola, nos quais a rastreabilidade e autenticidade de compostos naturais são fundamentais. Além disso, ao propor métodos acessíveis e replicáveis em laboratórios de menor infraestrutura, a pesquisa amplia a democratização da análise de qualidade de óleos essenciais, fortalecendo o controle sobre fraudes comerciais e contribuindo para o desenvolvimento de produtos naturais confiáveis e competitivos no mercado.

As descobertas deste estudo apresentam implicações práticas diretas para o setor de controle de qualidade de óleos essenciais, especialmente para produtores, laboratórios e indústrias que dependem da autenticidade e pureza desses compostos. A comprovação da eficácia da espectroscopia FTIR associada à análise quimiométrica e ao índice de refração oferece uma alternativa viável às técnicas tradicionais, como GC-MS, promovendo a substituição de métodos mais onerosos, demorados e ambientalmente agressivos por estratégias mais acessíveis, rápidas e sustentáveis. Essa mudança pode favorecer a implementação de protocolos de análise de rotina em larga escala, inclusive por pequenos produtores ou cooperativas, promovendo maior segurança no mercado e proteção ao consumidor.

No plano teórico, o estudo reforça e amplia o conceito de Química Analítica Verde, demonstrando que é possível manter a eficiência e precisão analítica mesmo com métodos menos invasivos e mais sustentáveis. A utilização bem-sucedida de técnicas espectroscópicas e de análise multivariada fortalece a integração entre abordagens instrumentais modernas e estatística aplicada, encorajando o desenvolvimento de novos modelos preditivos baseados em dados espectrais para caracterização de outras substâncias naturais. Além disso, a proposta inovadora de utilizar *Headspace* acoplado à GC-MS diretamente nas folhas, sem extração prévia, abre um novo caminho metodológico para estudos futuros, sugerindo possibilidades de caracterização em tempo real no campo, rastreabilidade da matéria-prima desde a origem, e aplicações no monitoramento ambiental ou biotecnológico.

Com isso, espera-se que os resultados deste trabalho influenciem novos estudos focados na miniaturização, automação e digitalização das análises químicas, promovendo um avanço no desenvolvimento de tecnologias limpas e inteligentes aplicadas à fitoquímica, à indústria de produtos naturais e à agricultura sustentável.

## 8 TRABALHOS FUTUROS

O início do planejamento do projeto de pesquisa focava em 4 artigos que serão continuados juntamente com a proposta de pesquisa do doutorado, que será avaliar a qualidade dos óleos essenciais de plantas nativas através da Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa como método controle, utilizando técnicas de extração por *Headspace* e SPME, analisando as amostras pela técnica de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier no modo Reflectância Total Atenuada MIR e NIR.

SPME é uma técnica de preparação de amostras que provou ser valiosa na análise de uma ampla gama de metabólitos em diferentes matrizes. SPME consiste na extração de analitos de uma matriz de amostra de uma forma não destrutiva. O número de analitos extraídos é diretamente proporcional às suas concentrações na matriz da amostra. Após o término do processo de extração, o analitos são liberados do material de revestimento, sendo submetidos a altas temperaturas ou empregando um solvente que tenha um forte atração pelas moléculas desejadas o uso de uma matriz transportadora aquosa em SPME para aumentar a solubilidade de traços de componentes orgânicos e aumentar a concentração de analitos no revestimento de fibra para fins de detecção dos vestígios orgânicos.

O diferencial é a inclusão para amostras de óleo de plantas nativas do bioma pampa e caatinga, aplicando ferramentas de avaliação de impacto ambiental para estudar as potencialidades do emprego de espectroscopia no infravermelho em substituição ou em conjunto com a cromatografia em fase gasosa.

## 9 ATIVIDADES REALIZADAS DURANTE O MESTRADO

- Co-autoria no manuscrito “Caracterização, discriminação e controle de qualidade de *L. dentata* e *L. Angustifolia* por FTIR e quimiometria supervisionada por GC/MS “com a colega Francielle Pasqualotti Meinhardt que está em preparação.
- Condução de aula online sobre Análises Cromatográficas de Óleos Essenciais no curso de Formação Profissional em Aromaterapia Clínica - Professora Liane Baccar.
- Apresentação do pôster de trabalho para 11º Simpósio Brasileiro Óleos Essenciais: ANÁLISE DE PERFIL QUÍMICO DE HIDROLATO DE ALECRIM APÓS EXTRAÇÃO POR SOLVENTE E POR HEADSPACE.
- Conclusão do Curso de Escrita em Inglês, realizado pela UNISC totalizando 30h.