



Universidade do Minho
Escola de Ciências

Carolina Mota Natal

**Derivados de compostos naturais com
potencial aplicação como biopesticidas**

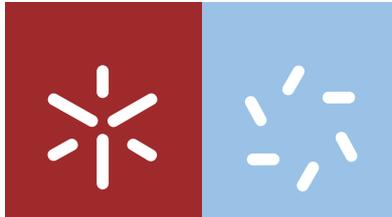
FCT

Fundação
para a Ciência
e a Tecnologia

Cofinanciado por:



UNIÃO EUROPEIA
Fundo Social Europeu



Universidade do Minho
Escola de Ciências

Carolina Mota Natal

**Derivados de compostos naturais com
potencial aplicação como biopesticidas**

Dissertação de Mestrado
Mestrado em Técnicas de Caracterização e Análise Química

Trabalho efetuado sob a orientação da
Professora Doutora Maria do Sameiro Torres Gonçalves

DIREITOS DE AUTOR E CONDIÇÕES DE UTILIZAÇÃO DO TRABALHO POR TERCEIROS

Este é um trabalho académico que pode ser utilizado por terceiros desde que respeitadas as regras e boas práticas internacionalmente aceites, no que concerne aos direitos de autor e direitos conexos.

Assim, o presente trabalho pode ser utilizado nos termos previstos na licença abaixo indicada.

Caso o utilizador necessite de permissão para poder fazer um uso do trabalho em condições não previstas no licenciamento indicado, deverá contactar o autor, através do RepositóriUM da Universidade do Minho.

Licença concedida aos utilizadores deste trabalho



Atribuição-NãoComercial-SemDerivações
CC BY-NC-ND

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Chega ao fim uma das etapas mais marcantes e importantes da minha vida, que só foi possível com o apoio de algumas pessoas. Quero agradecer-lhes, do fundo do meu coração!

À professora Sameiro Gonçalves por ter aceite ser minha orientadora. Pela delicadeza, disponibilidade e ajuda que sempre demonstrou na resolução de problemas. Por todos os conhecimentos que me transmitiu, que levo comigo para a vida e pela oportunidade de participar neste projeto.

À Escola de Ciências da Universidade do Minho, nomeadamente Departamento de Química e Centro de Química pelas instalações disponibilizadas e facilidades concedidas que permitiram a realização desta dissertação. À Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT-Portugal) e FEDER pelo financiamento do projeto PTDC/ASP-AGR/30154/2017.

À Dra. Elisa e Dra. Vânia pelo profissionalismo, disponibilidade e rapidez na realização dos espetros de RMN.

À minha mãe, a pessoa que mais me apoia e que nunca me largou a mão, que sempre me incentivou ao longo de todo o meu percurso, pela educação e valores que sempre me transmitiu.

À Maria José por toda a paciência que teve comigo, pelo tanto que aprendi com ela, pelo profissionalismo e por todos os momentos de descontração.

Ao professor David Pereira e restante equipa da REQUIMTE, Universidade do Porto, pela realização dos estudos de atividade biológica.

À minha irmã, pai, avó, tios (João e Xana) e primos (JP e Miguel) pelo carinho que sempre me deram, pelas conversas e momentos de descontração.

Aos meus amigos, Ema, Mariana, Joana, Rui Paulo e Chris por estarem sempre quando eu mais precisei, por me ouvirem e por, mesmo à distância, acompanharem esta jornada comigo.

À Cátia pelo bom ambiente que sempre proporcionou no laboratório, pela ajuda e amizade.

À Alexandra e à Rita pelos 5 anos que percorremos juntas, pelo companheirismo e amizade que ficou.

A todos os que fizeram parte deste caminho, o meu muito obrigada!

Declaração de integridade

Declaro ter atuado com integridade na elaboração do presente trabalho académico e confirmo que não recorri à prática de plágio nem a qualquer forma de utilização indevida ou falsificação de informações ou resultados em nenhuma das etapas conducente à sua elaboração.

Mais declaro que conheço e que respeitei o Código de Conduta Ética da Universidade do Minho.

Derivados de compostos naturais com potencial aplicação como biopesticidas

A necessidade de redução ou até substituição dos pesticidas sintéticos, que desenvolvem resistência e ameaçam a saúde humana e o meio ambiente, têm motivado estudos de atividade pesticida de produtos à base de plantas. Os biopesticidas botânicos são uma das alternativas verdes ao uso dos pesticidas sintéticos.

Os óleos essenciais são metabolitos secundários de composição complexa produzidos pelas plantas, com propriedades interessantes devido ao seu amplo espectro de ação, podendo ser isolados e purificados, através de técnicas de extração habitualmente utilizadas, e, posteriormente, analisados.

A investigação ao nível dos pesticidas alternativos aos pesticidas sintéticos tem incidido particularmente na modificação molecular de substâncias naturais biologicamente ativas, de forma a otimizar a atividade biológica dos compostos e reduzir eventuais impactos negativos. A atividade inseticida está, maioritariamente, relacionada com a posição e natureza de grupos funcionais e/ou substituintes introduzidos na estrutura do composto.

Neste trabalho sintetizaram-se dezasseis derivados de compostos naturais, nomeadamente sete derivados de carvacrol, seis derivados de timol, um derivado de mentol e dois derivados da 6-hidroxiflavanona. Os derivados de carvacrol e timol obtidos por *O*-alquilação possuem um grupo éter com cadeias carbonadas alifáticas de diferentes tamanhos, variando entre três e vinte átomos de carbono ou cadeias propílicas com um átomo de cloro ou um grupo hidroxilo como terminais. Como precursor análogo ao timol, mas completamente saturado, foi usado o mentol e obtido o derivado correspondente com uma ligação éter a cloropropilo. No caso da 6-hidroxiflavanona foram sintetizados os derivados *O*-alquilados contendo o grupo propilo e cloropropilo. Na caracterização estrutural recorreu-se às técnicas analíticas habituais. Todos os compostos obtidos foram alvo de estudos de atividade biológica na linha celular de insetos *Sf9*, *Spodoptera frugiperda*, de forma a avaliar o seu potencial como biopesticidas. Foram também efetuados estudos em queratinócitos de modo a verificar a eventual toxicidade dos compostos que revelaram maior atividade em *Sf9*. Os resultados promissores obtidos contribuem para o estabelecimento de uma relação estrutura-atividade que permitirá direcionar estudos futuros.

Palavras-Chave: bioinseticidas, biopesticidas, compostos naturais, óleos essenciais, *Spodoptera frugiperda*

Derivatives of natural compounds with potential application as biopesticides

The necessity of reducing or even replace synthetic pesticides, which develop resistance and threaten human health and the environment, has motivated studies of pesticide activity of natural products based on plants. Botanical biopesticides are one of the green alternatives to the use of synthetic pesticides.

Essential oils are secondary metabolites of complex composition synthesized by plants, with interesting properties due to their broad spectrum of action which can be isolated and purified through extraction techniques commonly used and, subsequently, analyzed.

The investigation on alternative pesticides to synthetic pesticides has been focused on the molecular modification of biologically active natural substances, in order to optimize the biological activity of the compounds and reduce negative impacts. The insecticidal activity is mainly related to the position and nature of functional groups and/or substituents introduced in the structure of the compound.

In the present work, sixteen derivatives of natural compounds were synthesized, namely seven derivatives of carvacrol, six derivatives of thymol, one derivative of menthol and two derivatives of 6-hydroxyflavanone. The carvacrol and thymol derivatives synthesized by *O*-alkylation have an ether group with aliphatic carbon chains of different sizes, between three and twenty carbon atoms or propyl chains with a chlorine atom or a hydroxyl group as terminal. As a precursor analogous to thymol but completely saturated, menthol was used and the corresponding derivative with an ether and chloropropyl bond was obtained. In structural characterization, usual analytical techniques were used. All the compounds obtained were the target of studies of biological activity in *Sf9* (*Spodoptera frugiperda*) insect cell line, in order to evaluate their potential as biopesticides. Studies were also carried out on keratinocytes in order to assess the toxicity of the compounds that revealed greater activity in *Sf9*. The promising results seek to contribute to establishment of a structure-activity relationship that allows directing future studies.

Keywords: bioinsecticides, biopesticides, natural products, essential oil, *Spodoptera frugiperda*

Declaração.....	ii
Agradecimentos	iii
Declaração de integridade	iv
Resumo	v
Abstract	vi
Índice.....	vii
Índice de figuras.....	x
Índice de tabelas	xii
Índice de esquemas	xiii
Lista de abreviaturas e símbolos.....	xiv
Nota introdutória	xvi
Atas em encontros científicos internacionais	xvi
Comunicações em encontros científicos internacionais.....	xvi
Artigos científicos em preparação	xvi
Capítulo 1 – Introdução Teórica.....	1
1.1 Introdução	2
1.2 Plantas como fontes de fitoquímicos.....	2
1.3 Classificação dos fitoquímicos	3
1.3.1 Alcaloides	4
1.3.2 Compostos fenólicos	5

1.3.3 Terpenóides	13
1.4 Óleos Essenciais	15
1.4.1 Carvacrol	18
1.4.2 Timol	18
1.4.3 Mentol	19
1.4.4 6-Hidroxiflavanona.....	19
1.5 Métodos de isolamento e caracterização de compostos naturais	20
1.5.1 Processos de extração.....	20
1.5.1.1 Processos de extração convencionais/clássicos.....	22
1.5.1.2 Processos de extração avançados/inovadores	26
1.6 Biopesticidas.....	27
1.7 Biopesticidas botânicos	29
1.8 Biopesticidas botânicos comerciais.....	31
1.9 Mecanismos de atuação dos biopesticidas botânicos	34
1.10 Pesticidas semissintéticos	36
1.11 Formulação dos biopesticidas.....	38
1.12 Conservantes alimentares à base de plantas.....	39
1.12.1 Mecanismos de ação de terpenóides e polifenóis contra microorganismos	41
1.13 Planos e objetivos	43
Capítulo 2 - Resultados e Discussão.....	44
2.1 Síntese dos derivados <i>O</i> -alquilados do carvacrol 2a-g	45
2.2 Síntese dos derivados <i>O</i> -alquilados do timol 4a-f	47

2.3 Síntese do derivado <i>O</i> -alquilado do mentol 6	49
2.4 Síntese dos derivados <i>O</i> -alquilados da 6-hidroxi flavanona 8a,b	50
2.5 Ensaio de atividade biológica dos compostos 2a-d, 2f,g, 4a-c, 4e,f, 6 e 8a,b	51
2.5.1 Ensaio em <i>Sf9</i>	52
2.5.2 Ensaio em queratinócitos.....	56
Capítulo 3 - Conclusão e Perspetivas Futuras.....	58
Capítulo 4 - Secção Experimental.....	61
4.1 Procedimentos Gerais	62
4.2. Síntese dos derivados <i>O</i> -alquilados do carvacrol 2a-g	63
4.3. Síntese dos derivados <i>O</i> -alquilados do timol 4a-f	69
4.4 Síntese do derivado <i>O</i> -alquilado do mentol 6	74
4.5. Síntese dos derivados <i>O</i> -alquilados da 6-hidroxi flavanona 8a,b	75
Capítulo 5 – Referências Bibliográficas	77

Figura 1 – Estruturas químicas de alguns alcaloides: morfina 1 , nicotina 2 , cafeína 3 e cocaína 4 ...	5
Figura 2 – Estrutura química do fenol 5	6
Figura 3 – Estrutura básica de um flavonóide.....	7
Figura 4 – Estruturas do ácido benzóico 15 e ácido cinâmico 16	10
Figura 5 – Estrutura química do resveratrol 25	13
Figura 6 – Exemplos típicos de monoterpênoides: carvacrol 26 , timol 27 , mentol 28 , linalol 29 e geraniol 30	15
Figura 7 – Exemplos típicos de sesquiterpenóides: artemisinina 31 e farnesol 32	15
Figura 8 – Estrutura química do carvacrol 26	18
Figura 9 – Estrutura química do timol 27	19
Figura 10 – Estrutura química do mentol 28	19
Figura 11 – Estrutura química da 6-hidroxi flavanona 33	20
Figura 12 – Esquema da extração por Soxhlet, adaptado da referência 76.....	23
Figura 13 – Esquema representativo da hidrodestilação (A) e extração líquido-líquido (B), adaptado da referência 77.	24
Figura 14 – Representação esquemática da destilação a vapor de óleos essenciais, adaptado da referência 78.	25
Figura 15 – Estruturas químicas da octopamina 34 , acetilcolina 35 e ácido γ -aminobutírico 36	34
Figura 16 - Estruturas químicas do <i>p</i> -cimeno 37 e éter metílico 38 do carvacrol.....	36
Figura 17 – Estruturas químicas do mentol 28 e derivados (propionato de mentilo 39 , formato de mentilo 40 , benzoato de mentilo 41 e cinamato de mentilo 42).	37

Figura 18 - Representação esquemática dos mecanismos de ação antimicrobianos de terpenóides e polifenóis, adaptado da referência 36.	42
Figura 19 – Viabilidade celular, em percentagem, do carvacrol 1 e derivados 2a-d e 2f,g ; C - controlo. Os resultados correspondem à média ± DP de pelo menos três ensaios independentes.	53
Figura 20 - Viabilidade celular, em percentagem, do timol 3 e derivados 4a-c e 4e,f ; C - controlo. Os resultados correspondem à média ± DP de pelo menos três ensaios independentes.	54
Figura 21 - Viabilidade celular, em percentagem, do mentol 5 e derivado 6 ; C - controlo. Os resultados correspondem à média ± DP de pelo menos três ensaios independentes.	55
Figura 22 - Viabilidade celular, em percentagem, da 6-hidroxiflavanona 7 e derivados 8a,b ; C - controlo. Os resultados correspondem à média ± DP de pelo menos três ensaios independentes.	56

Tabela 1 – Principais classes de compostos fenólicos nas plantas.	6
Tabela 2 - Exemplos de flavonóis, flavonas, flavanonas, isoflavonas, flavanóis e antocianinas e as respectivas estruturas químicas.	8
Tabela 3 – Estruturas químicas básicas das cumarinas, auronas e chalconas.....	10
Tabela 4 – Estruturas químicas de exemplos de ácidos fenólicos derivados do ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico e ácido hidroxicinâmico.....	11
Tabela 5 – Classificação dos terpenos de acordo com o número de átomos de carbono.....	14
Tabela 6 – Principais constituintes de alguns óleos essenciais de plantas comuns.	16
Tabela 7 - Vantagens e desvantagens do uso de pesticidas botânicos.....	30
Tabela 8 – Exemplos de pesticidas botânicos comerciais classificados de acordo com o princípio ativo, designação comercial e aplicação, adaptado das referências 74 e 96.	32

Índice de esquemas

Esquema 1 – Classificação dos fitoquímicos: alcaloides, compostos fenólicos e terpenóides.	4
Esquema 2 – Mecanismos propostos dos OEs na indução de toxicidade nos insetos, adaptado da referência 9; IGR – Regulador de crescimento de insetos.....	35
Esquema 3 – Oxidação e proteção antioxidante por antioxidantes preventivos e antioxidantes de rutura de cadeia, adaptado da referência 41.....	41
Esquema 4 – Síntese dos derivados <i>O</i> -alquilados do carvacrol 2a-g	46
Esquema 5 - Síntese dos derivados <i>O</i> -alquilados do timol 4a-f	48
Esquema 6 - Síntese do derivado <i>O</i> -alquilado do mentol 6	49
Esquema 7 - Síntese dos derivados <i>O</i> -alquilados da 6-hidroxi flavanona 8a,b	50

Lista de abreviaturas e símbolos

δ	Desvio químico
η	Rendimento (em %)
d	Dupleto
ACN	Acetonitrilo
ATP	Adenosina trifosfato
DCM	Diclorometano
dd	Duplo dupleto
DEPT	Aumento sem distorção por transferência de polarização (do inglês <i>distortionless enhancement by polarization transfer</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucléico (do inglês <i>desoxyribonucleic acid</i>)
DP	Desvio padrão
EPA	Agência de proteção ambiental dos Estados Unidos (do inglês <i>Environmental Protection Agency</i>)
ESI-TOF	Espectrometria de massa com ionização por <i>electrospray</i> - tempo de voo (do inglês <i>electrospray ionization - time-of-flight</i>)
equiv	Equivalente(s)
GC	Cromatografia gasosa (do inglês <i>gas chromatography</i>)
HMBC	Correlação heteronuclear através de múltiplas ligações (do inglês <i>heteronuclear multiple bond correlation</i>)
HMQC	Correlação heteronuclear quântica múltipla (do inglês <i>heteronuclear multiple quantum correlation</i>)
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês <i>high performance liquid chromatography</i>)
Hz	Hertz
IGR	Regulador de crescimento de insetos (do inglês <i>insect growth regulators</i>)
IUPAC	União internacional de química pura e aplicada (do inglês <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>)
J	Constante de acoplamento (em Hz)
m	Multiplete

MAE	Extração assistida por microondas (do inglês <i>microwave assisted extraction</i>)
MASD	Destilação por arraste de vapor acelerada por microondas (do inglês <i>microwave accelerated steam distillation</i>)
m/z	Relação carga/massa (espetrometria de massa)
OE s	Óleos essenciais
P_c	Pressão crítica
Ph	Fenil
PIPs	Protetores incorporados em plantas (do inglês <i>plant-incorporated-protectants</i>)
PM s	Peneiros moleculares
ppm	Partes por milhão
quint	Quinteto
R_f	Fator de retenção (do inglês <i>retention factor</i>)
RMN ¹H	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de próton
RMN ¹³C	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de carbono
ROS	Espécies reativas de oxigénio (do inglês <i>reactive oxygen species</i>)
s	Singleto
SAR	Relação estrutura-atividade (do inglês <i>structure-activity relationship</i>)
sext	Sexteto
SFE	Extração por fluidos supercríticos (do inglês <i>super-critical fluid extraction</i>)
SFME	Extração por microondas sem solvente (do inglês <i>solvent free microwave extraction</i>)
t	Tripleto
t.a.	Temperatura ambiente
TBAI	Iodeto de tetrabutílamónio (do inglês <i>tetrabutylammonium iodide</i>)
T_c	Temperatura crítica
TLC	Cromatografia em camada fina (do inglês <i>thin layer chromatography</i>)
TMS	Tetrametilsilano
UAE	Extração assistida por ultrassons (do inglês <i>ultrasound-assisted extraction</i>)
UV/Vis	Ultravioleta/visível

A numeração dos compostos do Capítulo 1 é independente da numeração dos compostos dos restantes capítulos. A numeração das figuras, tabelas e esquemas é contínua ao longo da dissertação.

Alguns dos resultados do trabalho experimental desta dissertação constam de atas e comunicações em encontros científicos internacionais. Encontra-se também em preparação um artigo científico para submissão numa revista internacional.

Atas em encontros científicos internacionais

C. M. Natal, D. M. Pereira, R. B. Pereira, M. J. G. Fernandes, A. G. Fortes, E. M. S. Castanheira, M. S. T. Gonçalves, “Carvacrol derivatives with potential insecticidal activity”, *Proceedings of the 24th International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry*, Sciforum Electronic Conference Series, MDPI AG, J. A. Seijas, M. P. V. Tato (Eds), *Chemistry Proceedings 2020*, doi:10.3390/ecsoc-24-08334; <https://sciforum.net/paper/view/conference/8334>, *in press*.

Comunicações em encontros científicos internacionais

C. M. Natal, D. M. Pereira, R. B. Pereira, M. J. G. Fernandes, A. G. Fortes, E. M. S. Castanheira, M. S. T. Gonçalves, “Carvacrol derivatives with potential insecticidal activity”, comunicação eletrónica, *24th International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry (ECSOC 24)*, 15 novembro-15 dezembro 2020, <https://ecsoc-24.sciforum.net/>; <https://sciforum.net/paper/view/conference/8334>.

Artigos científicos em preparação

C. M. Natal, M. J. G. Fernandes, R. B. Pereira, D. M. Pereira, S. Sousa, A. G. Fortes, E. M. S. Castanheira, M. S. T. Gonçalves, “New carvacrol and thymol derivatives: synthesis, insecticidal activity and nanoencapsulation”, em preparação.

Ao meu querido Avô

Capítulo 1 – Introdução Teórica

1.1 Introdução

Nas últimas décadas, os agricultores e muitas empresas do setor alimentar utilizaram produtos químicos sintéticos para produzir, processar e preservar os alimentos, assim como para melhorar a produção agrícola.¹

Nos próximos 20 anos é estimado que a produção agrícola aumente de forma a acompanhar as necessidades da população mundial. As atividades destrutivas de inúmeras pragas, como fungos, bactérias, insetos e ervas daninhas têm levado a uma drástica diminuição dos rendimentos da agricultura, podendo também comprometer a segurança alimentar.^{2,3,4} Acresce a necessidade da monitorização de pragas, devido à crescente pressão sobre a agricultura para produzir mais com menos terra e de forma a aumentar a segurança alimentar.^{5,6}

As perdas na produção das principais culturas mundiais são cerca de 27 a 42%, enquanto, sem a proteção de culturas, os números aumentariam para 48 a 83%.^{6,7} A monitorização de pragas permite reduzir perdas conduzindo assim a um aumento da disponibilidade alimentar, através do uso intensivo de pesticidas químicos sintéticos.⁵

Os pesticidas sintéticos estão associados a problemas no meio ambiente e na saúde humana, como doenças pulmonares, da próstata, pele e garganta, cancro, leucemia e hipertensão.¹ A legislação mais restritiva sobre o uso de pesticidas sintéticos e o aumento da resistência nas populações das pragas têm resultado num declínio do seu uso.² Assim, é imperativo a substituição deste tipo de produtos nocivos por compostos mais sustentáveis e cuja ação continue a ser a proteção das colheitas.^{5,8}

Atualmente, assiste-se a um crescente interesse e avaliação de inseticidas botânicos como alternativa no controlo de pragas, devido ao facto de estes compostos não possuírem efeitos adversos significativos nos organismos não-alvo, ecossistemas e saúde humana.^{9,10}

Na presente dissertação sintetizaram-se e estudaram-se novos derivados de compostos naturais de origem botânica com potencial aplicação como biopesticidas, designadamente inseticidas semissintéticos. A correlação entre a estrutura dos compostos sintetizados e a sua atividade como potenciais princípios ativos em biopesticidas é fundamental, de forma a direcionar a investigação e permitir avanços futuros nesta área.

1.2 Plantas como fontes de fitoquímicos

Desde tempos antigos, as plantas aromáticas têm sido utilizadas pelas suas propriedades conservantes e medicinais, para além de serem agentes aromatizantes alimentares. As plantas produzem uma vasta gama de metabolitos secundários – substâncias que não estão envolvidas no

metabolismo primário, mas que desempenham um papel fundamental em estratégias de defesa contra outros organismos.¹¹ Muitos dos metabolitos secundários presentes nas plantas contribuem para odores, sabores e cores, para além de possuírem um papel importante na defesa contra herbívoros, pestes e patógenos.^{12,13} Estas propriedades são, em parte, atribuídas aos óleos essenciais, que serão abordados mais à frente na presente dissertação. Estes compostos químicos ou componentes bioativos das plantas são frequentemente referidos como fitoquímicos (“fito” do grego que significa planta) ou fitoconstituintes e são responsáveis por proteger a planta contra infeções microbianas ou pragas. O estudo de produtos naturais, por outro lado, é designado de fitoquímica.¹⁴

Os metabolitos secundários são derivados de metabolitos primários, quer por vias sintéticas modificadas a partir do metabolito primário quer através da partilha de substratos de origem do metabolito primário. Estes compostos são produzidos na planta induzidos por fatores bióticos (por exemplo, patógenos) ou abióticos (por exemplo, condições climáticas).¹⁵ Os metabolitos secundários são moléculas geralmente de baixa massa molecular e podem ser lipossolúveis, solúveis em água e/ou voláteis.¹⁶

A composição dos metabolitos secundários varia de acordo com os órgãos vegetais e com o tempo de maturação da planta e a sua síntese pode não ser realizada por todas as células vegetais ou consistentemente ao longo do tempo. A maioria das plantas concentra este tipo de compostos em certos órgãos ou partes da planta, sendo que os locais de acumulação máxima de metabolitos não são necessariamente os locais da sua síntese.^{16,17}

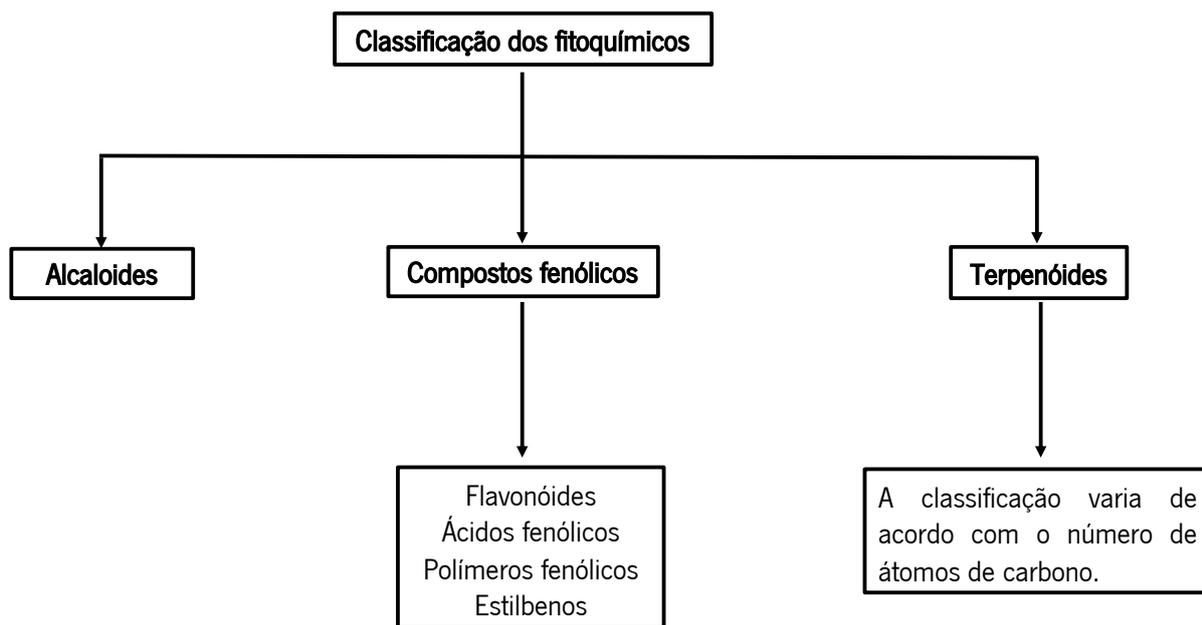
Após a extração dos fitoquímicos, cuja abordagem se encontra desenvolvida mais adiante, este grupo de compostos pode ser analisado de forma qualitativa e quantitativa através de técnicas de cromatografia como o HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência) e GC (cromatografia gasosa).^{18,19} Os fitoquímicos são moléculas orgânicas complexas que, normalmente, são identificadas por espectrometria de massa e espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN). A identidade dos fitoquímicos deve ser realizada por comparação dos espectros de massa e/ou RMN com os espectros de padrões da literatura.²⁰

1.3 Classificação dos fitoquímicos

Os fitoquímicos podem ser classificados com base na sua estrutura química, origem botânica, biossíntese ou propriedades biológicas. A presença de grupos característicos ou funções químicas determina a sua classe específica. Para além disso, estes compostos têm diferentes efeitos bioquímicos e fisiológicos associados.²¹

É importante referir que alguns fitoquímicos podem ser classificados em múltiplas categorias. Por exemplo, alguns terpenos fenólicos podem ser classificados como terpenos ou compostos fenólicos, pois contêm subestruturas para as duas classes diferentes. Alternativamente, fitoquímicos estruturalmente diferentes podem ser classificados na mesma categoria.²⁰

Na presente dissertação, os metabolitos secundários são classificados em três grupos principais: alcaloides, compostos fenólicos e terpenóides (Esquema 1).



Esquema 1 – Classificação dos fitoquímicos: alcaloides, compostos fenólicos e terpenóides.

1.3.1 Alcaloides

Os alcaloides são o grupo de constituintes químicos que contêm átomos de nitrogénio na sua estrutura e são derivados de aminoácidos.²² Os compostos desta classe, além de serem constituídos por átomos de carbono, hidrogénio e nitrogénio, são também constituídos por elementos de oxigénio, enxofre e, raramente, podem apresentar na sua estrutura cloro, bromo e fósforo.¹⁵ Uma definição simples de alcaloides foi sugerida por Pelletier: “um alcaloide é um composto cíclico contendo átomos de nitrogénio num estado de oxidação negativo, com distribuição limitada em organismos vivos”, podendo os átomos de nitrogénio serem ou não parte integrante do anel heterocíclico.²³

Os alcaloides são produzidos em vários organismos, como bactérias, fungos e animais mas, maioritariamente, estes compostos são produzidos por plantas na forma de metabolitos secundários.¹⁵ A ação destes compostos nas plantas está relacionada com a polonização, desempenhando um papel

importante nas interações das plantas com os animais. Além disso, estes compostos são parte integrante de um sistema de defesa químico em plantas.²³

Estes compostos nitrogenados são frequentemente encontrados no interior do vacúolo e existem mecanismos complexos para a sua captação e subsequente sequestro. Estes mecanismos permitem que níveis potencialmente tóxicos de alcaloides sejam armazenados em segurança, longe do citoplasma.²³

A maioria dos alcaloides é facilmente solúvel em álcool e moderadamente em água, sendo as suas soluções intensamente amargas. Estes compostos intervêm na defesa das plantas contra herbívoros e patógenos e são amplamente explorados como produtos farmacêuticos, estimulantes, narcóticos e venenos devido às suas potentes atividades biológicas.¹⁴ Na Figura 1 encontram-se alguns exemplos de alcaloides 1-4.

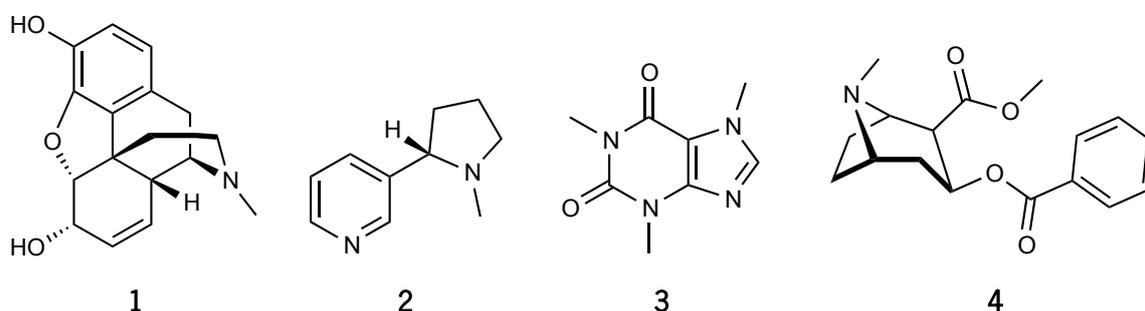


Figura 1 – Estruturas químicas de alguns alcaloides: morfina 1, nicotina 2, cafeína 3 e cocaína 4.

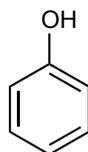
1.3.2 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são uma ampla família de metabolitos secundários. Atualmente, são conhecidas mais de 8000 moléculas, sendo que estão envolvidas nas respostas a fatores bióticos e abióticos.¹⁶ Alguns compostos fenólicos são amplamente distribuídos, enquanto outros são específicos de determinadas famílias de plantas, localizados em certos órgãos ou estágios de desenvolvimento da planta.²⁴

Os polifenóis desempenham funções importantes no crescimento das plantas, polinização e proteção contra a luz UV, assim como contra patógenos.²⁵ Além disso, estão presentes na formação de pigmentos, determinando a cor, e nas características sensoriais e nutricionais dos frutos e vegetais. Estes compostos possuem vários benefícios como anti-inflamatórios, anticancerígenos, atuam na eliminação de radicais livres e apresentam atividade antimicrobiana.^{25,26}

Os compostos fenólicos são estruturalmente constituídos por um anel aromático com um ou mais grupos hidroxilo, sendo o fenol (C_6H_5OH) o composto mais simples (Figura 2).^{17,26}

O termo polifenol é, frequentemente, utilizado como sinónimo de composto fenólico, mas deve ser restrito a moléculas com, pelo menos, dois anéis fenólicos.²⁴



5

Figura 2 – Estrutura química do fenol 5.

Na presente dissertação, os compostos fenólicos são divididos nos seguintes grupos fundamentais: flavonóides, ácidos fenólicos, polímeros fenólicos e estilbenos. Os flavonóides são o maior grupo de compostos fenólicos e os mais estudados. Os ácidos fenólicos incluem compostos derivados do ácido hidroxibenzoico e hidroxicinâmico. Os polímeros fenólicos, comumente conhecidos como taninos, são compostos de elevada massa molecular, que se dividem em duas classes: taninos hidrolisáveis e condensados.¹⁷ Apresentam-se, na Tabela 1, as principais classes de compostos fenólicos nas plantas.²⁷

Tabela 1 – Principais classes de compostos fenólicos nas plantas.

Classe	Número de átomos de carbono	Esqueleto carbonado
Fenóis simples, Benzoquinonas	6	C_6
Ácidos fenólicos	7	C_6-C_1
Acetofenonas, Derivados tirosina	8	C_6-C_2
Ácido hidroxicinâmico, Cumarinas	9	C_6-C_3
Naftoquinonas	10	C_6-C_4
Xantonas	13	$C_6-C_1-C_6$
Estilbenos	14	$C_6-C_2-C_6$
Flavonóides	15	$C_6-C_3-C_6$
Lignanós	18	$(C_6-C_3)_2$
Bioflavonóides	30	$(C_6-C_3-C_6)_2$
Taninos	n	$(C_6-C_3-C_6)_n$

Flavonóides

Os flavonóides são compostos polifenólicos que contêm na estrutura quinze átomos de carbono ($C_6-C_3-C_6$), na qual dois anéis aromáticos A e B estão interligados por uma ponte de três carbonos na forma de anel central de pirano (C) (Figura 3).^{22,26,28}

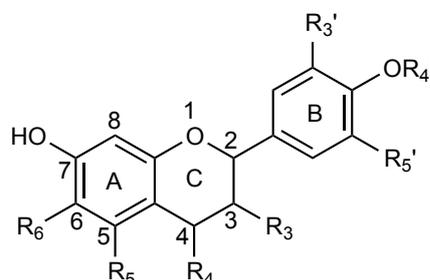


Figura 3 – Estrutura básica de um flavonóide.

Na literatura estão descritos mais de 4000 flavonóides.¹⁴ Estudos realizados indicam o seu uso como antioxidantes, sequestradores de radicais livres, anti-inflamatórios, reguladores de enzimas e antimutagênicos.²² Os flavonóides são subdivididos em seis subclasses: flavonóis, flavonas, flavanonas, isoflavonas, flavanóis e antocianinas.

Os flavonóis possuem um grupo hidroxilo na posição 3 (R_3) do anel C e contêm um grupo cetônico. Os flavonóis mais estudados são a quercetina **6**, miricetina, rutina, morina, fisetina, galangina, entre outros. Estes compostos possuem ação anti-inflamatória, antioxidante e interferem em importantes vias de sinalização, prevenindo doenças.²²

As flavonas são caracterizadas pela presença de uma ligação dupla entre as posições 2 e 3 do anel C e por um grupo cetônico na posição 4. Geralmente, está localizado um grupo hidroxilo na posição 5 do anel A (R_5) e a hidroxilação noutras posições pode ser distinta. Os compostos comuns neste grupo são a apigenina **7**, tangeretina, baicaléina, crisina, diosmina, entre outros. As flavonas provocam danos no DNA e interferem no ciclo celular, induzindo a apoptose.²²

As flavanonas são estruturalmente semelhantes às flavonas, com a diferença de que a ligação dupla entre as posições 2 e 3 do anel C é saturada em flavanonas. Estes compostos estão, geralmente, presentes em frutas cítricas e os mais comuns são a hesperetina **8**, naringina, naringenina, eriodictiol. As flavanonas têm importante ação na eliminação de radicais livres.²²

As isoflavonas são um subgrupo grande e muito distinto de flavonóides. Estes compostos diferem das flavonas devido à localização do grupo fenilo e têm ação semelhante às hormonas de estrogénio,

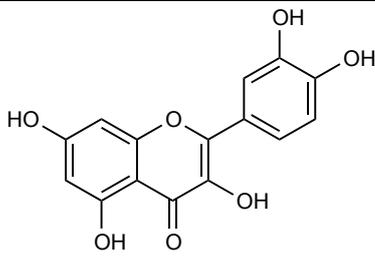
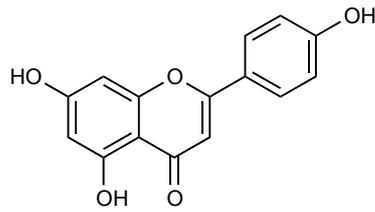
sendo também designados de fitoestrogénios. Este subgrupo inclui compostos como genisteína **9**, gliciteína, irilona, luteona, prinetina, entre outros.²²

Os flavanóis são derivados 3-hidroxi das flavanonas, nos quais existe um grupo hidroxilo na posição 3 do anel C e não possuem ligação dupla entre as posições 2 e 3. Estes compostos têm elevada ação anti-inflamatória. Os flavanóis comumente conhecidos são a catequina **10**, galocatequina, epicatequina, epigalocatequina, entre outros.²²

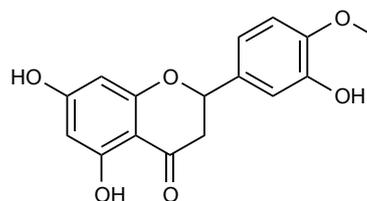
As antocianinas apresentam uma estrutura química específica, uma vez que possuem um défice de eletrões, tornando-se extremamente reativas a radicais livres. Estes compostos apresentam uma unidade heterocíclica de benzopirano e um componente fenilo (B).²⁹ As antocianinas são pigmentos vegetais bioativos que a pH ácido possuem cor, enquanto que a pH alcalino são incolores, possuindo atividade antioxidante, antimicrobiana e eficácia no tratamento de várias doenças, nomeadamente não transmissíveis. Cianidina **11**, malvidina, peidina, apigeninidina são alguns compostos pertencentes a esta subclasse.²²

Na Tabela 2 encontram-se as estruturas químicas de exemplos representativos das subclasses flavonóis, flavonas, flavanonas, isoflavonas, flavanóis e antocianinas.

Tabela 2 - Exemplos de flavonóis, flavonas, flavanonas, isoflavonas, flavanóis e antocianinas e as respetivas estruturas químicas.

Classificação química	Estrutura química
Flavonóis	 <p>Quercetina</p> <p>6</p>
Flavonas	 <p>Apigenina</p> <p>7</p>

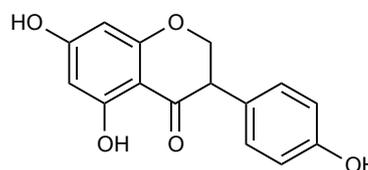
Flavanonas



Hesperetina

8

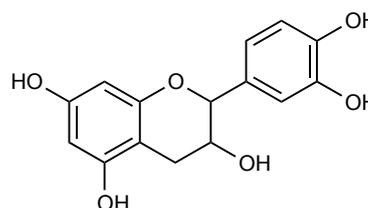
Isoflavonas



Genisteína

9

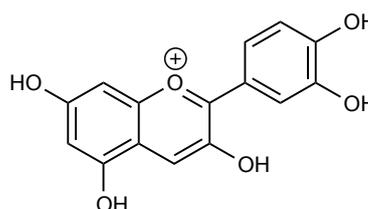
Flavanóis



Catequina

10

Antocianinas



Cianidina

11

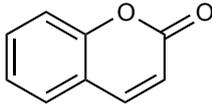
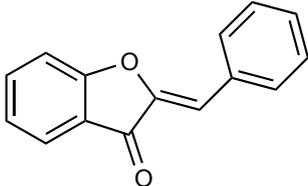
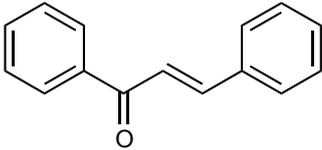
Outros tipos de flavonóides encontrados em pequenas quantidades incluem cumarinas, auronas e chalconas (Tabela 3).

As cumarinas são constituídas por um anel de benzeno fundido com um anel α -pirano, apresentando um sistema conjugado rico em elétrons e propriedade de transporte de carga. A bioatividade destes compostos está relacionada com mecanismos de defesa contra herbívoros e microorganismos.³⁰

As auronas são flavonóides tricíclicos com um núcleo de benzofurano e um grupo fenilo ligado por uma ligação dupla carbono-carbono exocíclica.³¹ Estes compostos apresentam proteção vegetal eficiente contra a podridão e insetos.³²

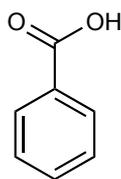
As chalconas são flavonóides de cadeia aberta, nos quais dois anéis aromáticos se encontram ligados por um sistema carbonílico α, β -insaturado de três carbonos. Estes compostos foram estudados em ensaios clínicos para o tratamento do cancro, doenças virais e cardiovasculares, assim como em preparações cosméticas.³³

Tabela 3 – Estruturas químicas básicas das cumarinas, auronas e chalconas.

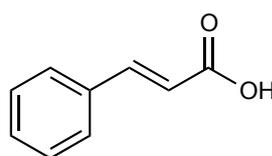
Classificação química	Estrutura química básica
Cumarinas	 12
Auronas	 13
Chalconas	 14

Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos são, em geral, fenóis que possuem um grupo funcional ácido carboxílico. Estes compostos estão amplamente distribuídos na natureza e consistem, principalmente, em dois subgrupos: ácido hidroxibenzoico (derivados do ácido benzóico) e ácido hidroxicinâmico (derivados do ácido cinâmico) (Figura 4).^{26,34}



15

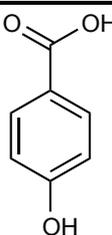
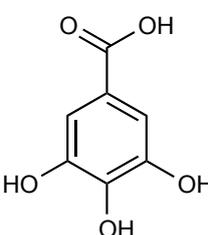
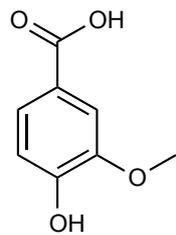
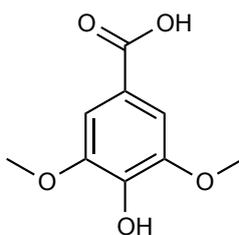


16

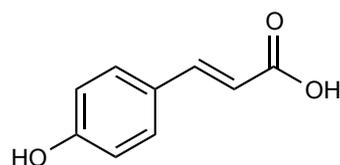
Figura 4 – Estruturas do ácido benzóico 15 e ácido cinâmico 16.

Na Tabela 4 encontram-se exemplos de ácidos fenólicos derivados do ácido *p*-hidroxibenzóico e ácido hidroxicinâmico e respectivas estruturas químicas.²⁶

Tabela 4 – Estruturas químicas de exemplos de ácidos fenólicos derivados do ácido *p*-hidroxibenzóico e ácido hidroxicinâmico.

Classificação química	Estrutura química
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico	 <p>17</p>
Derivado do ácido hidroxibenzóico	 <p>Ácido gálico</p> <p>18</p>
Derivado do ácido hidroxibenzóico	 <p>Ácido vanílico</p> <p>19</p>
Derivado do ácido hidroxibenzóico	 <p>Ácido siringico</p> <p>20</p>

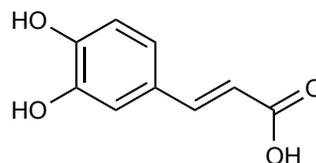
Ácido hidroxicinâmico



Ácido *p*-cumárico

21

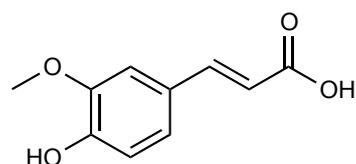
Derivado do ácido hidroxicinâmico



Ácido caféico

22

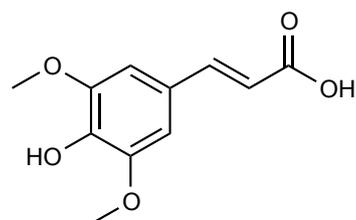
Derivado do ácido hidroxicinâmico



Ácido ferúlico

23

Derivado do ácido hidroxicinâmico



Ácido sinápico

24

Polímeros fenólicos

Os taninos são polímeros polifenólicos, geralmente de massa molecular elevada, e encontram-se divididos em dois subgrupos: taninos hidrolisáveis e taninos condensados.^{16,26,34} Estes compostos podem formar complexos reversíveis e irreversíveis com proteínas, polissacáridos, alcaloides, ácidos nucleicos e minerais.¹⁷

Os taninos hidrolisáveis são polifenóis complexos que podem ser degradados em açúcares e ácidos fenólicos através da alteração de pH, hidrólise enzimática ou não-enzimática.³⁴ Estes compostos estão essencialmente presentes nas folhas das árvores e demonstraram ser antagonistas eficazes contra vírus,

bactérias e microorganismos eucariotas.¹⁶ Os ésteres do ácido gálico **18** são um exemplo de taninos hidrolisáveis.²⁶

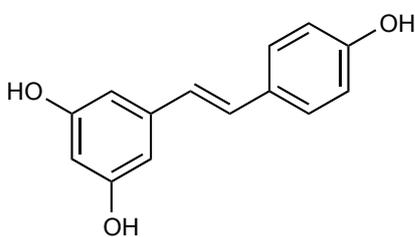
As proantocianidinas, também designadas como taninos condensados, são dímeros, oligómeros ou polímeros de catequinas **10**.³⁵ Os taninos condensados são frequentemente encontrados em folhas e sementes, por exemplo nas folhas dos legumes, e estão confinados a vacúolos intracelulares, sendo compostos não reativos até serem libertados pela rutura celular, resultando em ligações extensivas às proteínas, protegendo-as de possíveis degradações por micróbios e produção de NH₃.¹⁶

No sistema biológico, os taninos são os principais agentes quelantes dos iões metálicos e são responsáveis pela precipitação de proteínas.²⁶ Os taninos são solúveis em água e álcool e são encontradas maioritariamente na raiz, casca, caule e camadas externas do tecido da planta.¹⁴

Estilbenos

Moléculas isoméricas com fórmulas e sequências moleculares semelhantes, variando nas orientações tridimensionais, são denominadas estereoisómeros. Os estilbenos possuem dois estereoisómeros, o isómero *trans* *E*-estilbeno e o isómero *cis* *Z*-estilbeno. A estabilidade do *Z*-estilbeno é menor do que a do *E*-estilbeno e o *Z*-estilbeno é solúvel em solventes orgânicos, sendo possível a conversão fotoquímica da forma *trans* para a *cis*.²²

Os derivados hidroxilados de estilbeno são estilbenóides, com uma estrutura química C₆-C₂-C₆. Os estilbenóides são encontrados em plantas e bactérias, sendo o resveratrol **25** (Figura 5) uma fonte rica em estilbenóides.²²



25

Figura 5 – Estrutura química do resveratrol **25**.

1.3.3 Terpenóides

Os terpenóides compreendem uma vasta família de produtos naturais sendo os mais abundantes e amplamente distribuídos na natureza, existindo em quase todos os organismos e exercendo importantes funções fisiológicas, metabólicas, de comunicação e defesa. Os terpenóides são compostos químicos

modificados dos terpenos ($(C_5H_8)_n$), cuja unidade básica de terpeno, o isopreno (C_5H_8), foi adicionada a moléculas de oxigénio ou removido um grupo metilo, formando derivados terpenóides incluindo álcoois, ésteres, aldeídos, cetonas, éteres, fenóis e epóxidos. Os terpenos podem ser classificados, de acordo com o número de átomos de carbono (Tabela 5), em hemi- (C_5), mono- (C_{10}), sesqui- (C_{15}), di- (C_{20}), sester- (C_{25}), tri- (C_{30}), tetra- (C_{40}) e politerpenos ($C_{>40}$), dependendo do número de unidades de isopreno.^{14,28}

Tabela 5 – Classificação dos terpenos de acordo com o número de átomos de carbono.

Número de carbonos	Designação
C_5	Hemiterpeno
C_{10}	Monoterpeno
C_{15}	Sesquiterpeno
C_{20}	Diterpeno
C_{25}	Sesterterpenos
C_{30}	Triterpenos
C_{40}	Tetraterpeno
$C_{>40}$	Politerpenos

Os monoterpenos (C_{10}) têm um papel fundamental na defesa das plantas contra patógenos, apresentando atividade inseticida para muitos insetos, tais como abelhas, vespas, besouros e borboletas. Este tipo de compostos é empregue em vários inseticidas comerciais por apresentarem baixa toxicidade para os mamíferos.²⁸ Os sesquiterpenos (C_{15}) estão presentes em óleos essenciais e atuam como fitoalexinas, compostos antibióticos produzidos durante o ataque microbiano.²⁸ Vários compostos biologicamente ativos como saponinas, esteróis, ácidos biliares, hormonas sexuais, glicósidos cardioativos e corticosteroides resultam de modificações esqueléticas de cadeias laterais de triterpenos (C_{30}).²⁸

Nas Figuras 6 e 7 apresentam-se exemplos típicos de monoterpenóides e sesquiterpenóides, respetivamente.³⁶

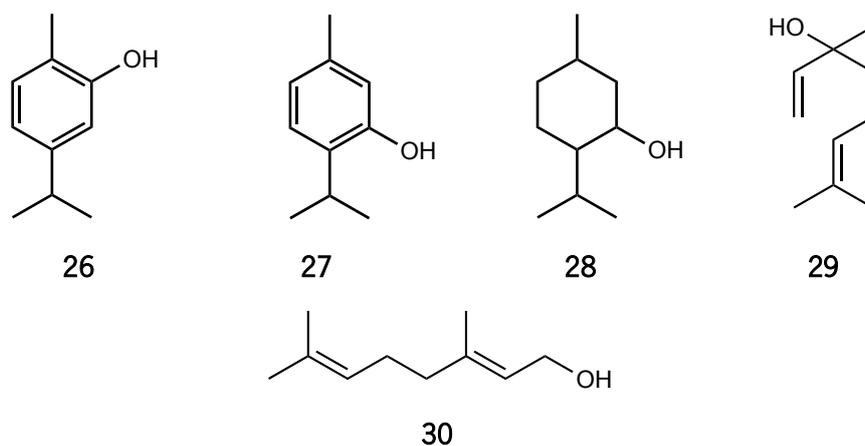


Figura 6 – Exemplos típicos de monoterpenóides: carvacrol **26**, timol **27**, mentol **28**, linalol **29** e geraniol **30**.

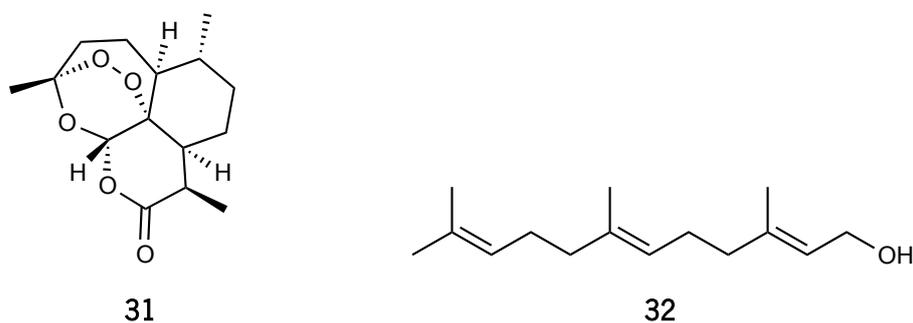


Figura 7 – Exemplos típicos de sesquiterpenóides: artemisinina **31** e farnesol **32**.

Os monoterpenóides presentes em óleos essenciais e tipicamente lipofílicos apresentam elevado potencial de interferência tóxica em processos bioquímicos básicos, com consequências fisiológicas e comportamentais nos insetos.³⁷

1.4 Óleos Essenciais

Nas últimas décadas, os óleos essenciais (OEs) têm sido muito estudados devido às suas diversas atividades biológicas interessantes e características físico-químicas, que os tornam potencialmente úteis em variadas aplicações.^{38,39} Estes compostos estão presentes nas plantas aromáticas na forma de misturas de compostos voláteis, sintetizados como metabolitos secundários.⁹

De acordo com a 7^a Edição de Farmacopeia Europeia, um óleo essencial é definido como: “Produto odorante, geralmente de composição complexa, obtido a partir de uma matéria-prima vegetal definida, seja por destilação a vapor ou água ou por um método mecânico adequado sem aquecimento. Um óleo essencial é geralmente separado da fase aquosa por um método físico que não induz alterações

significativas na sua composição química”. Os OEs podem ser submetidos a um tratamento adicional apropriado.³⁹ Devido à sua natureza hidrofóbica e à sua densidade geralmente menor do que a da água, estes compostos são normalmente lipofílicos, solúveis em solventes orgânicos e imiscíveis com a água, sendo facilmente separáveis da fase aquosa por decantação.^{9,39}

Os OEs são particularmente interessantes devido ao seu amplo espectro de ação e, geralmente, são constituídos por duas frações: os hidrocarbonetos, nomeadamente monoterpenos (C₁₀H₁₆) e sesquiterpenos (C₁₅H₂₄), e os componentes oxigenados como álcoois, aldeídos alifáticos e ésteres.^{36,40,41} Os monoterpenos representam 90% dos óleos essenciais e têm uma estrutura química variável, relacionando-se entre si por possuírem dez carbonos na sua composição. Estas estruturas químicas podem ser divididas em: (1) álcoois acíclicos, como o linalol, geraniol e citronelol; (2) álcoois cíclicos, como o mentol, isopulegol e terpeniol; (3) álcoois bicíclicos, como o borneol e verbenol; (4) compostos fenólicos, como o timol e carvacrol; (5) cetonas, como a carvona, mentona e tujona; (6) aldeídos, como o citronelal e citral; (7) ácidos, como ácido crisantémico e (8) éteres, como o cineol.^{9,42}

Na Tabela 6 encontram-se os constituintes principais de alguns óleos essenciais de plantas comuns.⁴³

Tabela 6 – Principais constituintes de alguns óleos essenciais de plantas comuns.

Plantas	Constituinte(s) principal(is) dos OEs
Alecrim	1,8-cineol, α -pineno, cânfora, β -pineno
Hortelã-pimenta	Mentol, mentona
Cravo-da-Índia	Eugenol
Canela	Cinamaldeído
Tomilho	Timol, p -cimeno, γ -terpineno
Erva príncipe	Geraniol, neral
Eucalipto	1,8-Cineol
Laranja	β -Limoneno

Apesar de os óleos essenciais serem constituídos por várias centenas de compostos orgânicos voláteis aromáticos, os compostos principais dos OEs estão presentes em concentrações elevadas (20-85%), enquanto os outros compostos estão presentes em quantidades vestigiais.^{16,44} O facto de a sua composição química ser complexa, permite que os OEs possuam um amplo espectro de atividade biológica e antimicrobiana (antibacteriano, antifúngico, antimofo, antiviral, controlo de pragas, repelentes de insetos, etc.). Por exemplo, estes compostos são utilizados em ambiente medicinal devido às suas

propriedades biocidas (bactericidas, virucidas e fungicidas) e medicinais. Numerosos estudos destacaram o efeito antimicrobiano dos OEs mesmo contra bactérias multirresistentes. Além disso, o uso destes compostos como conservantes de alimentos também foi descrito.³⁹ Recentemente, mostraram um potencial particular como inseticidas, sendo promissor o seu uso no controle de insetos na agricultura.^{8,38,45,46} Dado que ocorrem na natureza como misturas complexas é, por isso, menos provável que a resistência aos microorganismos se torne um problema, como acontece em compostos sintéticos.⁴⁷

Os OEs podem ser sintetizados em diferentes órgãos vegetais como metabolitos secundários, designadamente em flores, ervas, brotos, folhas, frutas, galhos, casca, raspas, sementes, raízes, etc.^{13,39,48} Após serem sintetizados, os OEs são libertados na forma de aroma através das células epidérmicas das pétalas ou acumulados e armazenados em diferentes partes anatómicas da planta como por exemplo, células secretoras intracelulares, tricomas glandulares ou canais secretores.⁴² Estudos realizados comprovaram que existe uma variação química natural na composição dos óleos essenciais que pode ser consequência de influências genéticas, geográficas, sazonais, climáticas ou outras.^{43,49}

Os OEs possuem pontos de ebulição relativamente baixos e a diversidade química dos seus constituintes influencia a sua estabilidade oxidativa.⁴¹ Podem ser facilmente degradados, por oxidação, aquecimento e luz se não estiverem protegidos de fatores externos.⁴² A proteção dos OEs a estes fatores pode ser efetuada recorrendo ao encapsulamento, o que prolonga a sua ação e possibilita uma libertação controlada.^{39,50}

A indústria alimentar apresenta uma crescente procura de OEs devido às suas potenciais aplicações como conservantes alimentares, incluindo ao nível de embalagens inovadoras de alimentos e combate a patógenos que geram intoxicação alimentar perigosa.^{39,47} As propriedades antioxidantes dos óleos essenciais resultam principalmente da capacidade inerente de alguns dos seus componentes, nomeadamente dos fenóis em interromperem ou retardarem a oxidação aeróbica da matéria orgânica.⁴¹ Fenóis como timol e carvacrol, hidrocarbonetos monocíclicos como terpinoleno e γ -terpineno, estão entre os antioxidantes naturais mais ativos encontrados nos óleos essenciais.⁴⁶

A literatura disponível indica que as substâncias naturais têm efeito positivo na redução da ocorrência de pragas; muitos são os estudos que comprovam a eficiência destes compostos biologicamente ativos. Os OEs podem afetar parâmetros biológicos como a mortalidade, taxa de crescimento, expectativa de vida e fertilidade dos insetos.⁴⁴ Devido à atividade inseticida, bactericida e fungicida dos óleos essenciais, estes compostos têm sido objeto de estudo no desenvolvimento de novos produtos.

1.4.1 Carvacrol

O carvacrol **26** (Figura 8), designado pelo nome IUPAC 5-isopropil-2-metilfenol, é um fenol constituído por uma cadeia com dez carbonos e fórmula molecular $C_{10}H_{14}O$.^{51,52} Este composto é o principal constituinte do óleo de orégão e é encontrado na forma líquida.^{53,54} Relativamente à toxicidade nos humanos, não existem relatos de possíveis efeitos tóxicos, sendo consumido na dieta alimentar humana.⁵²

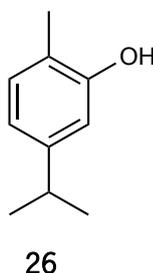


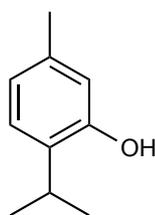
Figura 8 – Estrutura química do carvacrol **26**.

O carvacrol **26** é um composto incolor e confere aos orégãos um sabor levemente picante. Este composto exibe excelentes propriedades antibacterianas, úteis na formulação de cosméticos e conservantes de alimentos, assim como no tratamento de doenças.⁵² Para além da atividade antibacteriana, foi descrita para o composto atividade antifúngica, anti-inflamatória, inseticida e antioxidante.^{54,55,56,57}

Estudos realizados demonstraram a eficiência do carvacrol no controlo de várias pragas de origens diversas.^{44,52} Por conseguinte, a investigação em novos derivados de carvacrol tornou-se útil no sentido de avaliar a sua potencial utilização numa ampla variedade de pragas agrícolas, sendo o estudo destes compostos promissor como um agente inseticida.^{52,58}

1.4.2 Timol

O timol **27** (Figura 9), designado pelo nome IUPAC 2-isopropil-5-metilfenol, é um composto monoterpénico fenólico e ocorre naturalmente sob a forma cristalina e incolor com um odor característico.^{51,54} Este composto é um isómero do carvacrol e o principal ingrediente ativo do óleo extraído da espécie *Thymus vulgaris*, comumente designada por tomilho. A utilização do tomilho remonta a milhares de anos, na Roma Antiga, onde se acreditava que esta planta era um antídoto: comer tomilho antes ou durante as refeições protegia do veneno. Esta crença tornou o tomilho uma das ervas preferidas dos imperadores.⁵⁹



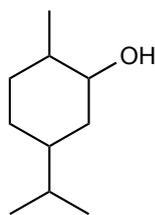
27

Figura 9 – Estrutura química do timol 27.

Atualmente, o timol tem sido reportado a nível biológico, como gastroprotetor, anti-hipertensivo, anti-inflamatório, antioxidante, anti-bacteriano e analgésico.⁵⁴ A atividade inseticida foi, também, demonstrada.^{58,60,61}

1.4.3 Mentol

O mentol **28** (Figura 10), designado pelo nome IUPAC 2-isopropil-5-metilcicloexanol, é um álcool monoterpénico cíclico e está presente nos óleos essenciais da *Mentha canadensis* L. e *Mentha x piperita* L., comumente designadas de hortelã e hortelã-pimenta, respetivamente. Este composto é o responsável pelo sabor e cheiro mentolado refrescante das plantas e apresenta atividade antimicrobiana, anti-inflamatória, analgésica e inseticida.^{62,63,64}

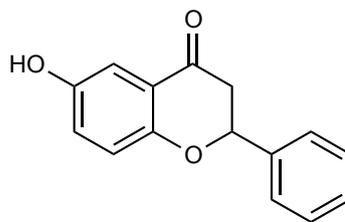


28

Figura 10 – Estrutura química do mentol 28.

1.4.4 6-Hidroxiflavanona

A 6-hidroxiflavanona **33** (Figura 11), designada pelo nome IUPAC 6-hidroxi-2-fenilcroman-4-ona, é uma monoidroxiflavanona pertencente à subclasse das flavanonas, substituída por um grupo hidroxilo na posição 6.^{65,66,67} As flavanonas pertencem à classe dos flavonóides e são frequentemente encontradas em plantas cítricas.^{68,69} Estes compostos possuem atividade antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória e inseticida.⁷⁰



33

Figura 11 – Estrutura química da 6-hidroxi flavanona 33.

1.5 Métodos de isolamento e caracterização de compostos naturais

Os constituintes das plantas são, na sua maioria, misturas complexas de vários compostos químicos, pelo que a avaliação biológica de um componente específico, requer processos de extração, purificação, isolamento, identificação e caracterização do mesmo.¹⁵

O processo de extração de compostos bioativos de várias espécies de plantas é um processo complicado que envolve várias etapas. A primeira etapa é a seleção de uma espécie de planta relevante, com base na literatura disponível, o tipo particular de metabolitos secundários e os seus usos tradicionais. O segundo procedimento é a recolha e a identificação do material vegetal.⁷¹

Dependendo da primeira etapa, é selecionada uma planta específica ou as suas partes, como folhas, caule, casca, flores, sementes ou raízes e são recolhidas para posterior análise e identificação. O processo de recolha é influenciado por vários fatores, incluindo a idade da planta, condições ambientais, hora do dia da recolha (por exemplo, se é diurna ou noturna) e a estação do ano.⁷¹

Após a recolha e a identificação dos extratos das plantas, estes são submetidos a um processo de secagem e moagem.⁷¹ A redução do tamanho das partículas aumenta a superfície de contacto entre as amostras e os solventes de extração, uma vez que a capacidade de homogeneização é superior.⁷²

Segue-se o processo de extração e este é o primeiro passo crítico, sendo um processo fundamental, uma vez que envolve a remoção e a obtenção dos compostos bioativos das plantas na forma de misturas de composição variada, podendo ser mais ricas num ou mais componentes, seguida da identificação desses componentes, geralmente através de técnicas cromatográficas, juntamente com a espectrometria de massa e espectroscopia de ressonância magnética nuclear.^{9,71}

1.5.1 Processos de extração

A extração consiste na separação de frações de compostos ativos da planta utilizando para o efeito solventes seletivos através de procedimentos padrão. O objetivo da extração é separar os metabolitos

solúveis da planta dos insolúveis (resíduos).⁷² Assim, os componentes desejados do material vegetal são isolados e, posteriormente, caracterizados.⁷³

O processo de extração é crítico e determinante para a bioatividade dos fitoquímicos pelo facto das plantas possuírem uma mistura complexa de numerosos compostos. A qualidade e a quantidade dos compostos ativos são influenciadas pela técnica de extração, a parte da planta utilizada, os solventes e o tipo de equipamento utilizado.⁷⁴

De forma a dissolver completamente o soluto de interesse durante o processo de extração, os solventes utilizados devem de ter uma polaridade semelhante à do soluto, sendo que as suas características químicas podem variar de não polares a polares. Por exemplo, os compostos bioativos hidrofílicos exigem solventes polares como o metanol, etanol ou acetato de etilo; de modo semelhante, o isolamento de compostos fenólicos, assim como de metabolitos secundários das plantas exige a seleção de solventes polares com pontos de ebulição baixos como o metanol, etanol, acetona pura ou mistura de acetona/água.⁷³

O conceito verde incorpora a criação e pesquisa de novas formas modernas de extrair compostos, a fim de apoiar o crescimento sustentável. Deste modo, os princípios da extração verde incluem: (1) escolha adequada da fonte; (2) minimização do uso de solventes orgânicos; (3) redução do consumo de energia; (4) obtenção de subprodutos em vez de resíduos de alto valor agregado; (5) redução dos tempos de extração; (6) recuperação e segurança do extrato natural. Estudos demonstraram que, em escala industrial, a aplicação destes princípios verdes contribui para uma produção mais sustentável, reduzindo o consumo de água, solventes e energia fóssil.⁷⁵

Os processos de extração podem ser classificados em duas categorias: métodos convencionais/clássicos e métodos avançados/inovadores. Nas últimas décadas, a investigação de novas tecnologias (ultrassom, micro-ondas, entre outras) induziu o aparecimento de processos de extração inovadores e mais eficientes, reduzindo o tempo de extração e consumo de energia, aumentando o rendimento de extração e a qualidade dos óleos essenciais.³⁹

A seleção do método de extração a usar é fundamental para a composição do extrato obtido, que posteriormente é sujeito a elucidação estrutural e estudos de atividade biológica. A diversidade estrutural e as propriedades físico-químicas dos compostos bioativos são fatores que podem determinar a técnica de extração adequada.⁷³

1.5.1.1 Processos de extração convencionais/clássicos

As técnicas básicas de extração incluem procedimentos simples e comuns de extração.⁷¹ Nestes métodos, os solventes desempenham um papel fundamental. No entanto, os solventes orgânicos constituem um problema, uma vez que são usados em elevadas quantidades e é necessário proceder à sua eliminação de forma adequada.⁷²

Em comparação com os processos de extração inovadores, os processos de extração clássicos são métodos de baixo custo, no qual são utilizadas fontes de calor e/ou agitação e, que geralmente, pretendem aumentar a solubilidade dos compostos alvo, melhorando a transferência de massa. A extração por Soxhlet, a destilação a vapor e a hidrodestilação são as técnicas mais utilizadas para a extração de óleos essenciais das plantas.⁷⁵

Maceração

A técnica de maceração envolve a imersão de materiais vegetais, em pedaços ou pó, num recipiente fechado com solvente que é deixado em repouso por um longo período de tempo (mínimo três dias), à temperatura ambiente, com agitação.^{71,72}

O objetivo do processo é amolecer e romper a parede celular da planta de forma a libertar os fitoquímicos solúveis. Após esse período, a mistura é decantada ou filtrada. Neste método, o calor é transferido por convecção e condução, e a escolha do solvente determina o tipo de composto(s) extraído(s) da matéria vegetal.^{71,72}

Decocção e infusão

Ambos os processos são baseados no mesmo princípio da maceração, em que o solvente utilizado é a água fria ou fervida. O período de imersão na infusão é mais curto e a amostra é fervida num volume específico de água. A decocção tem exatamente o mesmo princípio, mas com um período de tempo definido.^{71,72}

A decocção é adequada para extrair compostos estáveis ao calor, como por exemplo materiais duros (raízes e cascas) de plantas e, geralmente, resulta em compostos mais solúveis em óleo em comparação com a maceração e a infusão.^{71,72}

Digestão

É um processo semelhante à maceração, embora a extração das amostras ocorra fervendo a matéria vegetal a temperaturas mais elevadas.⁷¹

Percolação

É utilizado um percolador no qual a amostra é introduzida e é adicionada água a ferver, durante 2 horas. O processo de percolação é, geralmente, efetuado a uma velocidade moderada, por exemplo, 6 gotas/min, até que a extração seja concluída antes da evaporação para obter extratos concentrados.^{71,72}

É um procedimento de extração eficaz, uma vez que envolve a substituição constante dos solventes saturados por solventes “frescos”.^{71,72}

Extração por Soxhlet

Neste método, a amostra é colocada num cartucho poroso ou de celulose, dentro do aparelho de Soxhlet. O solvente de extração é aquecido no balão inferior, que está em contacto com uma manta de aquecimento, vaporiza, condensa no condensador e quando atinge o braço do sifão é novamente introduzido no balão e o procedimento volta-se a repetir. Após várias passagens pelo material sólido, a mistura/composto é concentrado no balão e o solvente é posteriormente evaporado. A porção não solúvel mantém-se no cartucho poroso e é descartada.^{71,72} A representação da extração por Soxhlet encontra-se na Figura 12.

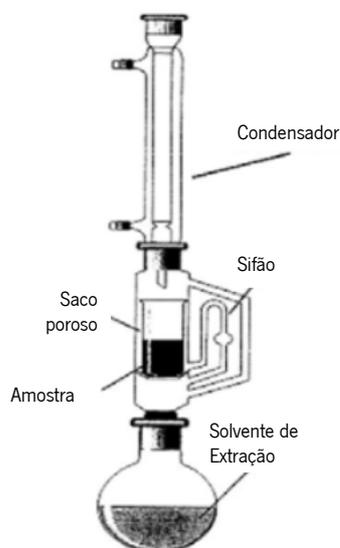


Figura 12 – Esquema da extração por Soxhlet, adaptado da referência 76.

Este método requer uma quantidade menor de solvente em comparação com a maceração. No entanto, a extração por Soxhlet apresenta desvantagens, como a exposição a solventes orgânicos, líquidos perigosos e inflamáveis, com potenciais emissões tóxicas durante a extração. Os solventes utilizados no sistema de extração devem ser de elevado grau de pureza, o que pode aumentar os custos.

A amostra ideal para a extração em Soxhlet é limitada a um sólido seco e finamente dividido, e fatores como a temperatura e velocidade de agitação devem ser considerados neste método.^{71,72}

Hidrodestilação

A hidrodestilação é o método mais simples e antigo utilizado para a extração de óleos essenciais. O material vegetal é imerso diretamente em água, dentro de um balão e é levado à ebulição. O dispositivo de extração inclui uma fonte de aquecimento, seguida de um balão onde é colocada a água e o material vegetal, um condensador e um recipiente para coletar os OEs.^{9,39} A representação da hidrodestilação encontra-se na Figura 13A.

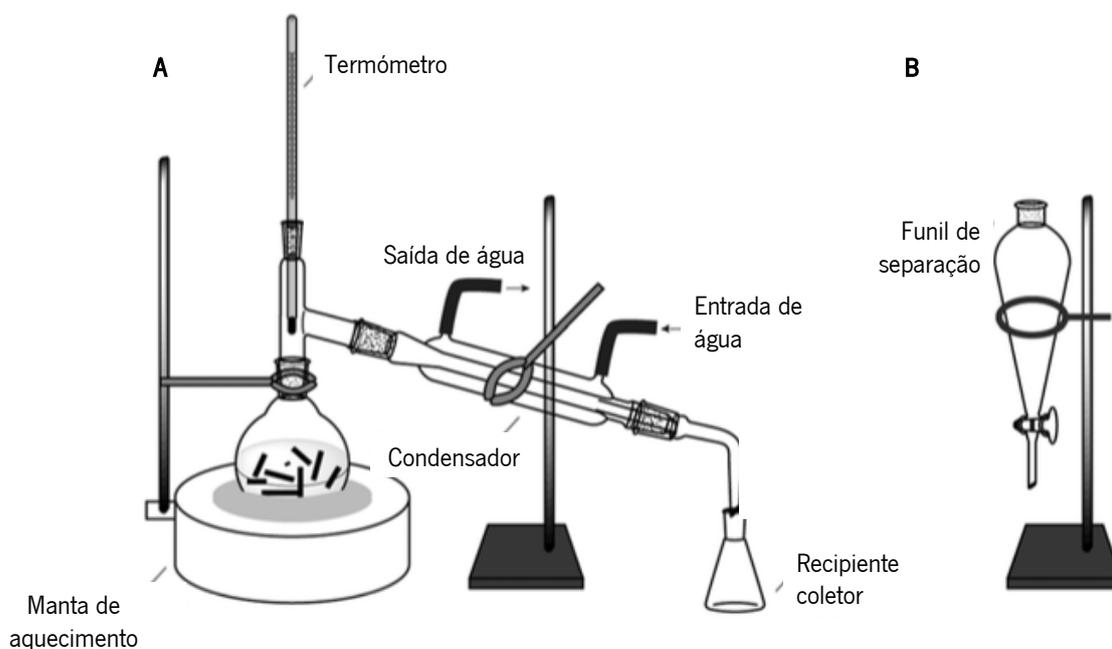


Figura 13 – Esquema representativo da hidrodestilação (A) e extração líquido-líquido (B), adaptado da referência 77.

O princípio da extração centra-se na destilação azeotrópica, na qual à pressão atmosférica e durante o aquecimento, as moléculas de água e óleo essencial formam uma mistura heterogénea que atinge o seu ponto de ebulição próximo de 100 °C, permitindo desta forma a obtenção dos OEs, cujos componentes têm ponto de ebulição mais elevados. A vantagem da utilização de água como solvente deve-se ao facto de ser imiscível com a maioria das moléculas terpénicas dos OEs e, portanto, após a condensação, os óleos essenciais podem ser facilmente separados da água por extração líquido-líquido (Figura 13B).³⁹

No entanto, a hidrodestilação tem algumas desvantagens, como longos tempos de extração, possível alteração química das moléculas terpénicas por contacto prolongado com água à ebulição (hidrólise, ciclização, entre outras), superaquecimento e perda de algumas moléculas polares na separação da água.³⁹

Destilação a vapor

É um dos métodos convencionais para a obtenção de óleos essenciais e é amplamente utilizado. O princípio subjacente é idêntico ao da hidrodestilação, com a diferença de que não há contacto direto entre a matéria vegetal e a água. O tempo de extração é curto, reduzindo deste modo as possíveis alterações químicas. Os OEs são mais ou menos densos que a água e formam duas fases imiscíveis, podendo ser facilmente separados.⁷⁸ Na Figura 14 encontra-se a representação esquemática de uma destilação a vapor de óleos essenciais.

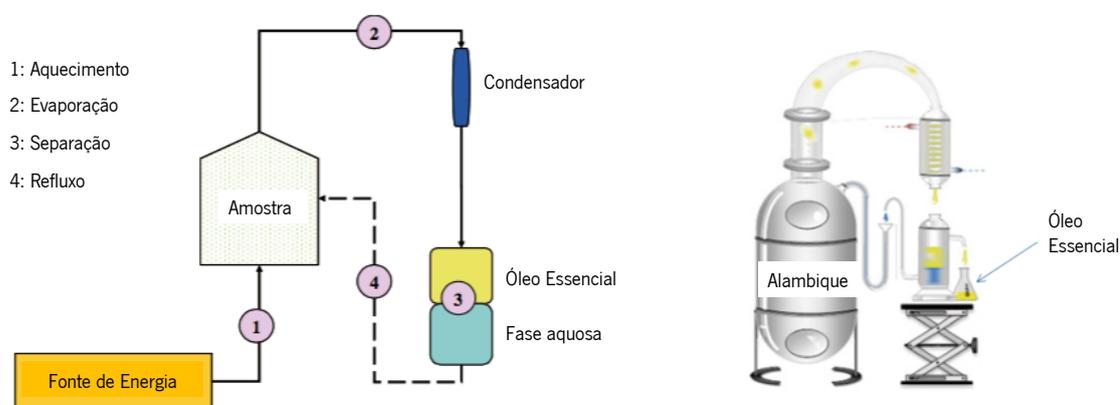


Figura 14 – Representação esquemática da destilação a vapor de óleos essenciais, adaptado da referência 78.

Existem variantes deste método de extração: a hidrodestilação por vapor, a destilação a vapor e a hidrodifusão. Na hidrodestilação por vapor, o equipamento usado mantém a matéria vegetal suspensa acima do nível da água, não permitindo o contacto direto com a água. A extração é feita por injeção de vapores de água que atravessam a matéria vegetal de baixo para cima e que arrastam os compostos voláteis. O tempo de extração é reduzido, assim como a perda de moléculas polares. A destilação a vapor possui os mesmos princípios e vantagens da hidrodestilação por vapor, mas a geração de vapores ocorre no exterior do equipamento de destilação. A hidrodifusão é um caso particular da destilação a vapor, no qual o fluxo de vapores ocorre para baixo.³⁹

Sob certas condições de destilação, podem ocorrer reações indesejadas, incluindo isomerização, saponificação e outras que induzem alterações na composição do(s) composto(s) bioativo(s) isolado(s).⁹

1.5.1.2 Processos de extração avançados/inovadores

Uma das desvantagens das técnicas convencionais de extração está relacionada com o facto dos óleos essenciais de um determinado composto serem termolábeis, sofrendo alterações químicas (hidrólise, isomerização, oxidação) devido às elevadas temperaturas aplicadas. A qualidade dos OEs extraídos é, portanto, afetada, principalmente se o período de extração for longo.³⁹

É importante que os métodos de extração possam preservar a composição química dos óleos essenciais no seu estado natural. Novas técnicas de extração devem possibilitar o uso de menores tempos de extração, consumos de energia mais baixos e uso de solventes verdes.⁷⁵

Extração com fluidos supercríticos (SFE)

O estado supercrítico de um fluido é atingido em condições muito bem definidas de pressão crítica (Pc) e temperatura crítica (Tc). O fluido supercrítico ou também denominado de gás denso apresenta propriedades físicas intermédias dos estados físicos gasoso e líquido, tais como baixa viscosidade, densidade próxima dos líquidos e elevado poder de difusão.⁷⁹

A extração com fluidos supercríticos é rápida e eficaz, requerendo para o efeito temperaturas moderadas, eliminando etapas de limpeza e evitando o uso de solventes orgânicos prejudiciais. O dióxido de carbono é um solvente ideal para extrair e isolar OEs de plantas, pois não é explosivo, não é agressivo para moléculas termolábeis, não é tóxico, está disponível num elevado grau de pureza, a um custo relativamente baixo e é facilmente eliminado dos produtos extraídos.⁸⁰

A extração supercrítica é caracterizada por mudanças de temperatura e pressão, pelo uso e reciclagem de fluidos em etapas repetidas de compressão/descompressão. Sob elevada compressão e aquecimento, o CO₂ atinge o seu estado supercrítico e transporta a matéria volátil, os óleos essenciais. Na etapa de descompressão, o extrato é encaminhado para um ou mais separadores onde o CO₂ é gradualmente descomprimido, perdendo assim o poder de solvente. A desvantagem da utilização deste método reside nos custos elevados do equipamento, instalações e operações de manutenção.^{39,71}

Sonicação

A sonicação é também denominada por extração assistida por ultrassom (UAE) e envolve o uso de ultrassom na gama dos 20 a 2000 kHz.^{71,72} A matéria-prima vegetal é imersa em água ou outro solvente

e, ao mesmo tempo, é submetida à ação do ultrassom. O efeito mecânico da cavitação acústica do ultrassom aumenta a superfície de contacto solvente/amostra e a permeabilidade das paredes celulares. As propriedades físicas e químicas dos materiais submetidos ao ultrassom são alteradas e perturbam a parede celular, facilitando a libertação de compostos bioativos no solvente circundante.^{71,72} Este processo permite uma redução no tempo de extração e consumo de solvente, sendo considerada uma técnica de extração verde.⁸¹

Extração assistida por microondas (MAE)

As microondas são ondas eletromagnéticas com frequências entre 300 e 300000 MHz e comprimento de onda entre 1 cm e 1 m. A frequência comumente usada é 2450 MHz, o que corresponde a um comprimento de onda de 12,2 cm. O uso de MAE intensificou-se com o desenvolvimento do conceito de extração verde e a necessidade de novos métodos de extração com economia de energia.^{39,79}

A extração assistida por microondas tornou-se rapidamente num dos métodos de extração dos OEs mais potentes, sendo uma das técnicas de vanguarda promissoras, uma vez que apresenta elevada reprodutibilidade em tempos mais curtos, manipulação simplificada, consumo reduzido de solvente e energia.³⁹

Existem variantes deste método de extração: a hidrodestilação assistida por microondas, extração por microondas sem solvente (SFME), destilação a vapor acelerada por microondas (MASD), hidrodifusão por microondas, entre outras.³⁹

1.6 Biopesticidas

Segundo a EPA (Agência de proteção ambiental dos Estados Unidos), biopesticidas são “certos tipos de pesticidas derivados de materiais naturais como animais, plantas, bactérias e certos minerais”.⁸²

Os biopesticidas abrangem uma ampla gama de organismos vivos e não-vivos que diferem nas propriedades básicas como, por exemplo, a composição, o modo de ação e a influência no meio ambiente. A sua ação é reconhecida pelo controlo de pragas, conferindo, desta forma, proteção às plantas, sendo uma alternativa sustentável aos pesticidas químicos sintéticos usualmente utilizados.^{5,10,83}

De acordo com a EPA, os biopesticidas podem ser divididos em três categorias principais.^{84,85}

- Pesticidas bioquímicos – são substâncias naturais que controlam pragas por mecanismos não tóxicos. Ao contrário dos pesticidas sintéticos que matam ou inativam diretamente a praga, os pesticidas bioquímicos interferem na reprodução das pragas. Por vezes, torna-se

difícil avaliar se um pesticida natural pode controlar a praga por um modo de ação não tóxico. A EPA estabeleceu um *comité* para determinar se um pesticida atende os critérios específicos de pesticida bioquímico.^{2,10,85}

- Pesticidas microbianos - consistem em microorganismos (por exemplo bactérias, fungos, vírus ou protozoários) que atuam como componentes ativos. Os pesticidas microbianos permitem controlar diferentes tipos de pragas, sendo que cada componente ativo é específico para uma determinada praga. Por exemplo, existem fungos que controlam certas ervas daninhas e outros que matam insetos.^{2,10,85}
- Protetores incorporados às plantas (PIPs) – são plantas geneticamente modificadas. Pela modificação do genoma, os produtos naturais agem como espécies resistentes a insetos. Por exemplo, o gene da proteína Bt, naturalmente produzida pela bactéria *Bacillus thuringiensis*, introduzido no material genético da planta, induz na planta a produção da substância. A Bt não é tóxica, é ambientalmente aceitável e dirigida apenas a espécies específicas de pragas.⁸⁶

Os biopesticidas são, geralmente, menos tóxicos que os pesticidas convencionais e apenas afetam a praga alvo e organismos intimamente relacionados, em contraste com o amplo espectro de ação dos pesticidas convencionais que podem afetar organismos tão diferentes como pássaros, insetos e mamíferos.⁸⁴ Além da seletividade, os biopesticidas, na sua grande maioria, são eficazes em quantidades muito pequenas e decompõem-se rapidamente, resultando em menores tempos de exposição, evitando assim problemas de poluição.⁸² Os custos associados ao desenvolvimento de biopesticidas são significativamente mais baixos quando comparados com os dos pesticidas químicos sintéticos e podem ser aplicados com os equipamentos de pulverização usualmente utilizados pelos agricultores.^{2,5}

Os biopesticidas apresentam, contudo, algumas desvantagens, como por exemplo o facto de exigirem uma identificação exata da praga, uma vez que a sua especificidade é elevada. Devido à lenta velocidade de ação, os biopesticidas geralmente não são adequados para tratar de forma imediata um surto de praga e a taxa de morte das pragas é menor quando comparada com a taxa de morte observada com os pesticidas químicos convencionais.^{2,5} Alguns biopesticidas são eficazes apenas em estágios específicos de pragas, de forma a reduzir a sua população.⁸⁷ Por vezes, a suscetibilidade a condições ambientais desfavoráveis é um impedimento à aplicação de biopesticidas.^{2,5} Estes compostos devem ser usados apenas conforme indicado no rótulo, que fornece informações críticas acerca do seu manuseamento e segurança.⁸⁸

Na presente dissertação, dar-se-á ênfase aos biopesticidas de origem botânica, uma vez que a investigação decorrente da dissertação incidiu sobre a síntese e a avaliação da atividade de derivados de compostos naturais.

1.7 Biopesticidas botânicos

A designação pesticidas botânicos refere-se aos pesticidas desenvolvidos com base em recursos vegetais, sendo referidos como uma das alternativas verdes mais atraentes para substituição de pesticidas sintéticos.⁸⁹ O uso de pesticidas botânicos em atividades agrícolas, em vez de pesticidas sintéticos, é geralmente considerada uma opção ecológica, devido às características inerentes dos materiais botânicos, que normalmente se degradam e, potencialmente, têm um impacto negativo inferior a longo prazo no meio ambiente e nos organismos não-alvo.^{74,90} Embora, nos dias de hoje, os pesticidas botânicos não substituam completamente os pesticidas sintéticos, estes contribuem significativamente para a redução de muitos problemas causados pelo uso excessivo de pesticidas sintéticos.⁷⁴

O desenvolvimento de biopesticidas botânicos baseia-se, principalmente, na utilização de metabolitos secundários de plantas, como flavonóides, alcaloides, entre outros compostos.⁹¹ Os extratos botânicos induzem atividade inseticida, repelência e toxicidade a pragas, efeitos que impedem a alimentação e crescimento de insetos, propriedades antifúngicas, antivirais e anti-bacterianas.⁹²

As formulações de pesticidas de origem botânica podem incluir misturas de compostos ativos permitindo, deste modo, controlar as pragas por diferentes mecanismos de ação. Devido à sua origem natural e rápida degradação, estes compostos geralmente apresentam baixa toxicidade para os mamíferos. Outra vantagem da sua utilização reside no facto de serem, na sua maioria, biodegradáveis, ou seja, não persistem no meio ambiente durante longos períodos.⁹³ A mesma planta pode ter várias aplicações e o facto de existir uma vasta gama de plantas e metabolitos promissores resulta na obtenção de uma variedade de compostos.⁷⁴

Contudo, o uso de pesticidas botânicos apresenta determinadas limitações entre elas o facto de estes compostos naturais poderem ser facilmente degradados por fatores ambientais, como a luz solar e temperatura; após aplicação, pode ter um impacto negativo em organismos não-alvo, particularmente em predadores e parasitas encontrados no local de aplicação; a quantidade e qualidade dos compostos ativos podem variar de acordo com a região e fatores abióticos; a baixa estabilidade e o curto prazo de validade das formulações podem criar limitações ao seu armazenamento; os processos de extração são geralmente caros.^{74,93}

Na Tabela 7 encontram-se compiladas as principais vantagens e desvantagens do uso de pesticidas botânicos.

Tabela 7 - Vantagens e desvantagens do uso de pesticidas botânicos.

Vantagens	Desvantagens
Mistura de compostos ativos que podem controlar as pragas por diferentes modos de ação.	Podem ser facilmente degradados por fatores ambientais, como a luz solar, temperatura, etc.
Apresentam baixa toxicidade para os mamíferos devido à sua origem natural e rápida degradação.	Toxicidade em organismos não-alvo.
Na sua maioria, são biodegradáveis, não persistindo no meio ambiente.	A quantidade de composto ativo pode variar conforme a região e fatores abióticos.
Abundância de uma vasta gama de plantas e metabólitos promissores como pesticidas botânicos.	A baixa estabilidade e o curto prazo de validade das formulações podem criar limitações no seu armazenamento.
A mesma planta pode ter várias aplicações.	Os processos de extração são geralmente caros.

A formulação de um biopesticida deve possuir as características seguintes: elevada eficiência, baixa toxicidade para os organismos não-alvo, não contaminação dos solos nem água, mínimo desenvolvimento de resistência a pragas, fácil armazenamento, baixo custo e viabilidade econômica.⁷⁴

Por outro lado, os critérios de seleção de plantas como fonte para biopesticidas devem ter em consideração os aspectos seguintes:⁹⁴

- ser perene;
- ter uma ampla distribuição e estar presente em elevado número na natureza, caso contrário deve ser possível o cultivo por procedimentos agrícolas como culturas de tecidos e engenharia genética;
- serem usadas partes removíveis da planta: folhas, flores ou frutos;
- a colheita não deve significar destruição da planta (evitar o uso de raízes ou cascas);
- as plantas devem exigir um pequeno espaço, gestão reduzida, pouca água e fertilização;
- as plantas podem ter usos adicionais, por exemplo, uso medicinal;

- as plantas utilizadas não devem ter um elevado valor económico;
- os ingredientes ativos devem ser preferencialmente eficazes em baixas concentrações.

No que respeita à qualidade torna-se difícil a padronização de biopesticidas, uma vez que a quantidade de metabolitos secundários das plantas pode diferir de acordo com a localização geográfica e a estação do ano.⁷⁴

Embora seja conhecido, desde há muitos anos, que os óleos essenciais possuem ações inseticidas, a comercialização de pesticidas com base em óleos essenciais comuns em plantas remonta a menos de duas décadas.⁴³

1.8 Biopesticidas botânicos comerciais

A indústria de pesticidas botânicos tem vindo a crescer nos últimos anos. Este facto deve-se principalmente a preocupações crescentes com a contaminação de alimentos com resíduos de pesticidas sintéticos juntamente com controlos de importação/exportação mais rigorosos, mudando o foco para novas alternativas mais seguras.⁷⁴

Vários compostos derivados de plantas e utilizados tradicionalmente na agricultura são comercializados como pesticidas botânicos. A investigação científica nesta área tem permitido a identificação e isolamento de substâncias ativas específicas, algumas das quais têm sido usadas na produção de pesticidas botânicos.^{74,95} Um exemplo é o óleo de Nim, amplamente utilizado na Índia para o controlo de pragas agrícolas e, atualmente, um dos pesticidas botânicos mais vendidos em todo o mundo. O óleo das sementes e outras partes da árvore do Nim contém vários metabolitos bioativos, incluindo a azadiractina, usada em vários produtos botânicos para controlo de pragas.^{74,92}

A comercialização de pesticidas botânicos já é uma realidade, embora estes pesticidas não sejam ainda substitutos completos de pesticidas sintéticos. No entanto, o setor agrícola já está a beneficiar da coexistência desses produtos, embora os produtos botânicos sejam produzidos numa escala relativamente menor.⁷⁴

Na Tabela 8 encontram-se exemplos de pesticidas botânicos comerciais, classificados de acordo com o princípio ativo, designação comercial e aplicação.

Tabela 8 – Exemplos de pesticidas botânicos comerciais classificados de acordo com o princípio ativo, designação comercial e aplicação, adaptado das referências 74 e 96.

Princípio ativo	Designação comercial	Aplicação
Óleo de Nim <i>Azadirachta indica</i> Juss. (Meleaceae)	<i>BioNeem, DalNeem, OzoNeem Oil, Margasom, Triact70EC, Molt-X, Neemix 4.5</i>	Ampla espectro de ação contra mais de 300 espécies de insetos, incluindo os seguintes efeitos: inibição da alimentação, regulador de crescimento de insetos, inibição da reprodução, repelente de insetos e outros efeitos fisiológicos.
Óleo de alho <i>Allium sativum</i> L. (Liliaceae)	<i>EcoA-Z, L'EcoMix, CapsiAlil, Garlic Barrier, Biorepel</i>	Repelente natural de pássaros, ácaros e várias pragas de insetos.
Óleo essencial de <i>Chenopodium ambrosioides</i>	<i>Requiem EC</i>	Inseticida aplicado na zona foliar para o uso numa variedade de frutas e vegetais cultivados.
Rotenona	<i>5% Rotenone ME, Rotenone Dust</i>	Inseticida de amplo espectro com ação não seletiva.
Óleo essencial de tomilho	<i>EcoViaWD</i>	Inseticida de amplo espectro contra formigas, besouros, pulgas, moscas, aranhas e outros insetos.
Óleo de cravo-da-Índia	<i>Ant Out</i>	Pesticida para formigas; mata todos os tipos de formigas e controla todos os estágios da vida (ovo, larva, pupa e adulto); também é eficaz contra aranhas, grilos e outras pragas de insetos comuns.
Óleo de jojoba	<i>Eco E-Rase</i>	Eficaz contra mosca branca.

Limoneno	<i>Demize EC, Prev-Am</i>	Atividade inseticida e fungicida.
Alecrim, tomilho e cravo da-Índia	<i>Sporatec</i>	Controlo de ácaros e insetos.
Óleo de cravo-da-Índia, alecrim e hortelã-pimenta	<i>EF400</i>	Atividade fungicida de amplo espectro contra mofo, bolores, podridões e ferrugem.
Tomilho, cravo-da-Índia, canela, hortelã-pimenta e óleos de alho	<i>BacStop</i>	Atividade bactericida/fungicida.
Hortelã-pimenta, canela e óleo de sésamo	<i>Flying Insect Killer</i>	Eficaz contra moscas, mosquitos e outras pragas.
Óleo de alecrim, hortelã-pimenta e geraniol	<i>Essentria IC-3</i>	Eficaz contra formigas, baratas, pulgas, moscas, mosquitos, aranhas, vespas e mais 30 outras pragas.
Óleo de lavandina e geraniol	<i>Swine Clear</i>	Eficaz contra todas as pragas voadoras, incluindo mosquitos, moscas, piolhos e todos os tipos de ácaros.

Um pesticida com baixo impacto ambiental e na saúde, ou qualquer outra característica desejável – biopesticida, não terá sucesso no mercado se não for competitivo em termos de custos com outros pesticidas disponíveis para o utilizador. Este é, especialmente, o caso dos pesticidas utilizados na agricultura ou por profissionais de controlo de pragas, onde os volumes utilizados são elevados e os custos de aplicação significativos. O que faz com que os custos dos óleos essenciais sejam baixos o suficiente para serem atraentes para o seu uso em biopesticidas é o comércio internacional em larga escala desses óleos como mercadorias para o uso na indústria de aromas e fragrâncias. Estas indústrias determinam os preços; até agora, o uso de biopesticidas tem sido um mercado alternativo pequeno para produtores, sendo que ainda precisa de crescer o suficiente para influenciar os preços. Os preços dos

principais óleos essenciais tendem a ser relativamente estáveis. A maior fonte de perturbações no preço são as falhas ocasionais das culturas numa região de fornecimento principal, como resultado de eventos climáticos anormais.⁴³

Além das questões óbvias de custo e disponibilidade, há vários desafios para os produtores de biopesticidas com base em óleos essenciais de plantas. O primeiro é a estabilidade a longo prazo no armazenamento e transporte de uma formulação contendo óleos essenciais. Normalmente, é esperado que um produto destes permaneça estável até dois anos em condições de armazenamento adequadas. Embora relativamente estáveis, alguns óleos essenciais são suscetíveis à oxidação na ausência de antioxidantes, mesmo que tenham sido relatados como possuindo propriedades antioxidantes. Outro fator é a volatilidade de muitos constituintes dos óleos essenciais e, por isso, o material de embalagem usado deve manter a estabilidade química do produto e deve ser quimicamente inerte.⁴³

1.9 Mecanismos de atuação dos biopesticidas botânicos

A aplicação inadequada de pesticidas geralmente desencadeia alterações moleculares nas culturas, o que inadvertidamente perturba os metabolitos e afeta a qualidade das culturas. Portanto, entender o mecanismo dos pesticidas nas culturas é essencial para avaliar o potencial impacto ambiental.⁹⁷

A atividade biológica dos OEs e seus componentes ativos têm sido investigadas. Estes compostos podem perturbar a fisiologia dos insetos de diversas formas, sendo que a sua atividade principal parece ocorrer no sistema nervoso do inseto.^{98,99} Este efeito inclui a ação neurotóxica dos EOs pela inibição da acetilcolinesterase (AChE) ou bloqueio dos recetores de octopamina e/ou recetores GABA (ácido γ -aminobutírico).^{98,100} Por exemplo, alguns monoterprenos como a tujona podem induzir efeitos neurotóxicos afetando os recetores GABA em insetos. Além do modo de ação descrito anteriormente, foram relatados alguns efeitos nas hormonas, feromonas e monooxigenase do citocromo P450.⁹ Na Figura 15 encontram-se as estruturas químicas de neurotransmissores presentes nos insetos.

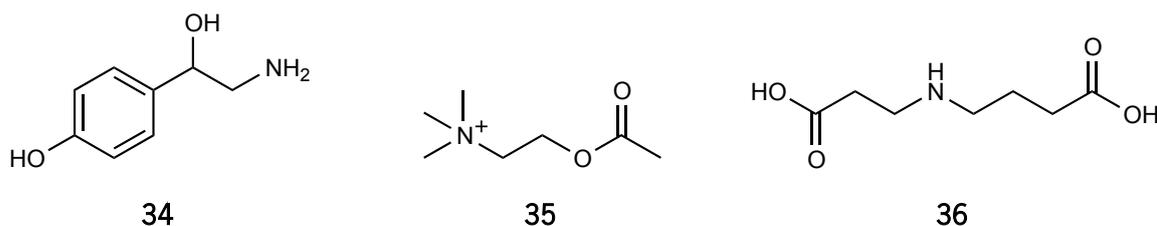
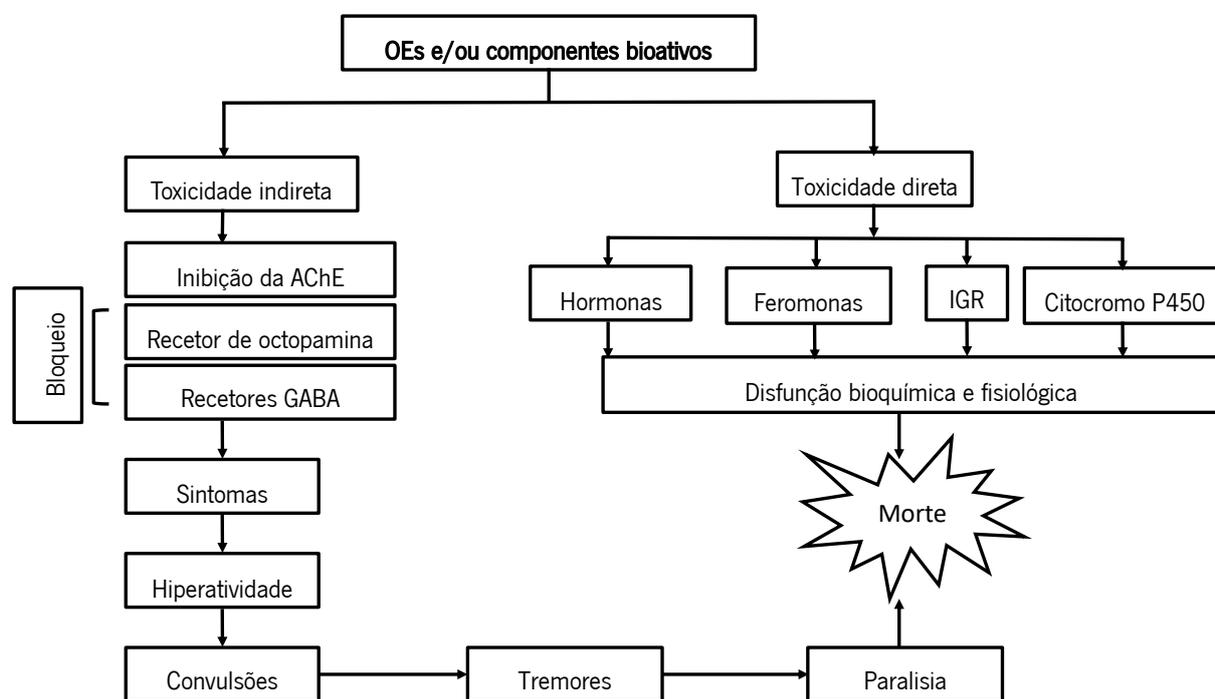


Figura 15 – Estruturas químicas da octopamina **34**, acetilcolina **35** e ácido γ -aminobutírico **36**.

Os recetores de octopamina são um dos alvos dos componentes dos OEs.¹⁰¹ A octopamina é um neurotransmissor, neuro-hormona e neuromodulador, cuja interrupção resulta num défice no sistema nervoso do inseto. O recetor de octopamina não está presente em vertebrados, pelo que os OEs com ação bioinseticida apresentam toxicidade seletiva no caso dos mamíferos. O mecanismo de ação envolvido na inibição da acetilcolinesterase (AChE) por parte dos OEs é semelhante aos induzidos por inseticidas organofosfatados e carbamatos. Os sintomas manifestam-se através da hiperatividade, convulsões e paralisia. Estudos efetuados descrevem que os OEs e monoterpénoides induzem a mortalidade através da inibição da atividade da AChE em insetos. Para além do referido, outros estudos também relataram que os monoterpénos podem afetar vários alvos em insetos, resultando em diferentes mecanismos de toxicidade.⁹

Em síntese, o mecanismo proposto anteriormente da toxicidade induzida por OEs nos insetos encontra-se ilustrado no Esquema 2.



Esquema 2 – Mecanismos propostos dos OEs na indução de toxicidade nos insetos, adaptado da referência 9; IGR – Regulador de crescimento de insetos.

Os pesticidas botânicos inibem o crescimento de patógenos, modificam as suas estruturas e morfologia celulares e exibem neurotoxicidade em insetos. Além disso, podem suprimir a oviposição e a alimentação dos insetos.¹⁰²

1.10 Pesticidas semissintéticos

A utilização de óleos essenciais brutos como pesticidas constitui um enigma para as autoridades reguladoras devido à sua potencial variação química, à probabilidade da toxicidade não poder ser atribuída a um único constituinte principal e ao facto de, pelo menos, para uso como ingredientes ativos de pesticidas não existir definição química rigorosa de um óleo essencial específico.⁴³

Geralmente, as preparações brutas que contêm misturas de ácidos gordos, óleos essenciais e extratos apresentam problemas relacionados com o efeito combinado das propriedades biológicas dos seus constituintes, que apenas são revelados após a sua separação.⁸⁸

A modificação molecular de substâncias biologicamente ativas que ocorre naturalmente é uma das principais estratégias para melhorar os efeitos biológicos bem como para reduzir eventuais efeitos prejudiciais.^{103,104} Contudo, existem inconvenientes que limitam a aplicação de pesticidas semissintéticos como, por exemplo, a complexidade da síntese ou a fácil decomposição de ingredientes ativos.⁸⁹

As alterações na estrutura molecular podem induzir modificações na atividade biológica do composto em estudo. A atividade dos OEs e seus constituintes são dependentes do grupo funcional presente (natureza e posição) e propriedades físico-químicas como a volatilidade e massa molecular.⁹

Estudos realizados no composto bioativo carvacrol **26** sugeriram que a atividade biológica está relacionada com o grupo funcional, sendo a posição do grupo hidroxilo e a configuração molecular determinantes. A ausência da atividade antimicrobiana no composto *p*-cimeno **37** e éter metílico **38** do carvacrol, nos quais o grupo hidroxilo não está presente ou foi substituído por um grupo éter, respetivamente, demonstra a importância do grupo OH no anel fenólico (Figura 16).⁵⁷

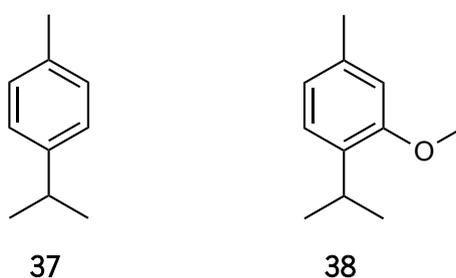


Figura 16 - Estruturas químicas do *p*-cimeno **37** e éter metílico **38** do carvacrol.

A investigação de possíveis compostos promissores baseados no carvacrol **26** com ação inseticida passa pela síntese de derivados e análogos através de procedimentos sintéticos simples e pelo estabelecimento de relações estrutura-atividade. O carvacrol **26**, tal como ocorre na natureza, pode sofrer modificações estruturais de forma a potenciar a atividade inseticida inerente, obtendo-se assim

compostos específicos e viáveis para o alvo em estudo, sendo uma estratégia biorracional para o controle de pragas.⁵²

Estudos reportaram que o bloqueio do grupo fenólico do timol **27** e consequente formação de éter retém a atividade antimicrobiana e inseticida.⁶⁰

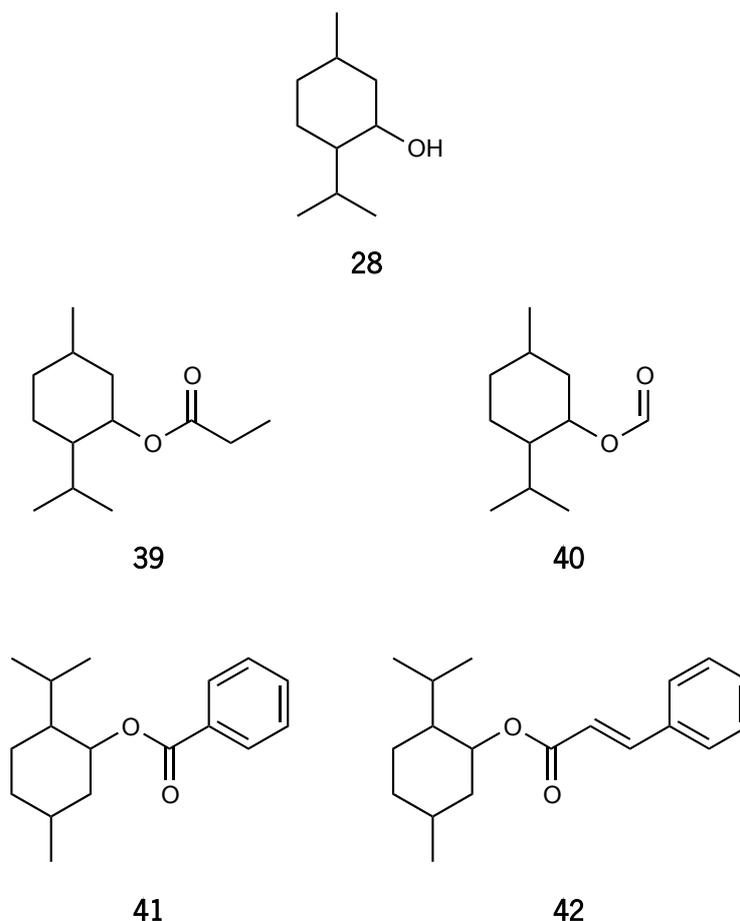


Figura 17 – Estruturas químicas do mentol **28** e derivados (propionato de mentilo **39**, formato de mentilo **40**, benzoato de mentilo **41** e cinamato de mentilo **42**).

Estudos reportados com o mentol **28** e o derivado propionato de mentilo **39** mostraram elevada atividade inseticida, sendo que o derivado **39** possuía atividade superior ao mentol **28** (Figura 17). O aumento da atividade no propionato de mentilo **39** pode estar relacionada com a introdução de uma cadeia carbonada que provoca uma diminuição da carga positiva e consequente aumento da carga negativa no átomo de carbono do grupo carbonilo.^{9,105} Por exemplo, a baixa atividade inseticida do derivado de formato **40** (Figura 17) foi motivada pela ausência da cadeia carbonada. No benzoato de mentilo **41** (Figura 17) foi observada fraca atividade inseticida, uma vez que o anel de benzeno está diretamente ligado ao carbono do grupo carbonilo e há ausência de uma cadeia carbonada. Contudo, no

cinamato de mentilo **42** (Figura 17) verificou-se atividade inseticida moderada; o anel de benzeno não se encontra diretamente ligado ao átomo de carbono do grupo funcional e possui uma ligação dupla.⁹ Globalmente, a cadeia carbonada ligada diretamente ao grupo carbonilo parece ser significativa na atividade observada nos derivados, em comparação com o mentol.¹⁰⁵

A síntese química parcial ou total de um derivado de origem natural pode ser complexa. A obtenção da estrutura base do composto, a introdução de grupos funcionais em certas posições e a estereoquímica das moléculas são os principais desafios da investigação nesta área em estudo. No entanto, é relativamente simples gerar uma “biblioteca” de estruturas químicas semelhantes, usando as vias químicas e bioquímicas. A avaliação da atividade biológica desses compostos permitirá estabelecer uma relação estrutura-atividade (SAR). O estudo da SAR permite uma comparação qualitativa das estruturas químicas semelhantes e baseia-se no conhecimento de que essas moléculas podem ter atividades biológicas semelhantes. Os potenciais efeitos tóxicos de compostos desconhecidos com estruturas químicas semelhantes são previstos utilizando esta abordagem, sendo que é importante compreender de que forma é que as alterações na estrutura química afetam a magnitude e o tipo de efeito biológico.¹⁰⁶

Futuramente, é exetável que o controlo sustentável de pragas agrícolas seja efetuado recorrendo a produtos isolados de origem botânica e aos seus derivados semissintéticos, com base em estudos de relação estrutura-atividade.

1.11 Formulação dos biopesticidas

Na maior parte dos casos, os ingredientes ativos dos biopesticidas são formulados como os pesticidas sintéticos, de modo a que os agricultores utilizem os mesmos equipamentos de aplicação. Dependendo do estado físico da formulação do biopesticida, aos ingredientes ativos são adicionados estabilizadores, dispersantes, adesivos, surfactantes, corantes, anticongelantes, nutrientes, dispersantes e agentes de fusão. Em geral, os biopesticidas são preparados como formulações secas para aplicações diretas ou formulações líquidas.²

A volatilidade, solubilidade em água e oxidação dos OEs desempenham um papel importante na atividade biopesticida, sendo fundamental a sua resolução de forma a permitirem a aplicação de biopesticidas como uma alternativa aos pesticidas sintéticos no controlo de pragas.⁹ O uso da nanotecnologia na formulação de biopesticidas permite incrementos na biodisponibilidade, estabilidade, proteção contra a rápida degradação e solubilidade.^{8,12,74,96} Além disso, permite a proteção dos princípios ativos contra a degradação enzimática, a ação do pH e temperatura, ou a sua libertação apenas em

condições específicas de pH, temperatura, enzimas, etc. Assim, as nanoformulações possibilitam também uma maior estabilidade do composto ativo durante o seu armazenamento.⁷⁴

O uso de formulações nanoencapsuladas, embora permita um aumento da eficiência, pode reduzir substancialmente a quantidade de composto ativo presente e o efeito tóxico pela limitação à sua exposição.⁷⁴

1.12 Conservantes alimentares à base de plantas

A segurança alimentar é uma preocupação importante para a indústria alimentar. Apesar de todos os avanços tecnológicos de produção alimentar, os casos de intoxicação alimentar em todo o mundo continuam a crescer. Além disso, podem ocorrer reações químicas no próprio alimento e induzir a sua degradação.³⁶

Os microorganismos, nomeadamente espécies de *Salmonella* e *Campylobacter*, são a principal fonte de intoxicação alimentar. De forma a combater este problema, vários antimicrobianos sintéticos, como nitratos, benzoatos, ácido sórbico, sulfitos, lactato de potássio e ácido cítrico são utilizados como conservantes de alimentos. Contudo, a sua utilização apresenta um risco tóxico para a saúde humana e animal, havendo uma necessidade urgente da sua substituição por conservantes naturais de alimentos, que não comprometam a segurança alimentar dos consumidores. Estudos efetuados demonstraram que os terpenóides e os polifenóis, extraídos das plantas, apresentam elevada atividade antimicrobiana.^{36,56}

A ocorrência de reações químicas nas proteínas pode provocar a degradação dos alimentos. Durante a produção, processamento e armazenamento, os alimentos entram em contacto com o oxigénio molecular na forma gasosa ou dissolvido na fase líquida dos alimentos. O oxigénio molecular não é muito reativo com os constituintes alimentares, no entanto pode ser convertido em espécies mais reativas designadas de espécies reativas de oxigénio (ROS). As espécies reativas podem ser de natureza radicalar, como o radical hidroxilo (HO^\cdot), o anião radicalar superóxido (O_2^\cdot) e o radical hidroperoxilo (HOO^\cdot); ou de natureza não radicalar como o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e o oxigénio singleto ($^1\text{O}_2$). Estas espécies são formadas nos alimentos por irradiação, foto-oxidação, reações enzimáticas e catálise através de iões de metais de transição.¹⁰⁷

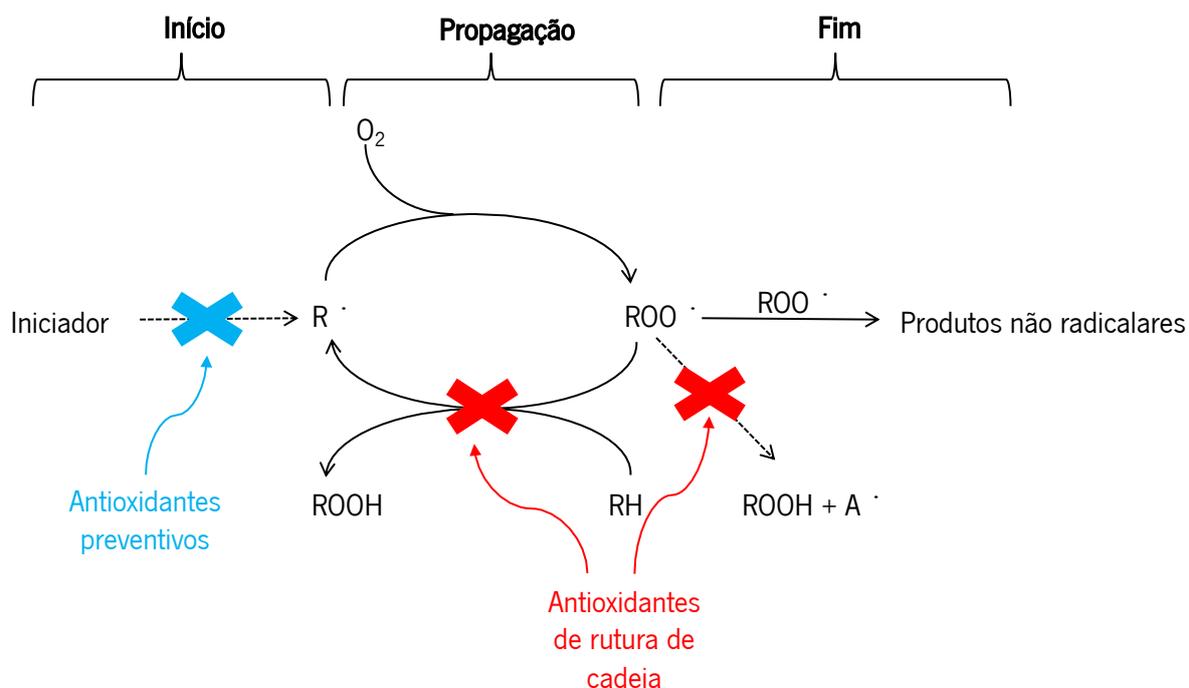
No estudo de compostos naturais, é prática comum identificar os antioxidantes como moléculas capazes de reagir com radicais ou moléculas com poder redutor de forma a neutralizar o *stress* oxidativo causado pelos radicais.⁴¹ Os antioxidantes são frequentemente adicionados aos alimentos como forma de prevenir a formação de radicais nas reações de oxidação, atuando como inibidores nas etapas de iniciação e propagação, induzindo a reação de terminação e retardando o processo de oxidação. Por

questões de segurança dos compostos sintéticos, a indústria alimentar tem-se focado essencialmente na procura de antioxidantes naturais de forma a substituir os antioxidantes sintéticos. Além disso, há uma preferência crescente dos consumidores por antioxidantes naturais, impulsionando assim a exploração de fontes de antioxidantes naturais.¹⁴

Os compostos que interferem com a reação de oxidação são denominados de antioxidantes diretos e são divididos em dois grupos principais, designadamente antioxidantes preventivos e antioxidantes de rutura de cadeia, dependendo do mecanismo de interferência. Os antioxidantes preventivos interferem no processo de iniciação, isto é, retardam a formação inicial de espécies de radicais. Os antioxidantes de rutura de cadeia diminuem a oxidação, competindo com as reações de propagação, ou seja, estes antioxidantes reagem mais rapidamente que o substrato oxidável com radicais peróxido para formarem espécies que não propagam a cadeia de oxidação. Os antioxidantes preventivos são completamente ineficazes após o início do processo, sendo os antioxidantes de rutura de cadeia os antioxidantes diretos mais importantes, dado que a sua eficácia se relaciona principalmente com a cinética da reação com os radicais peróxido.⁴¹

O facto de um composto poder reagir com algumas espécies de radicais não significa que seja um antioxidante, a menos que: (i) a espécie radicalar esteja envolvida no transporte da cadeia oxidativa, ou seja, um radical peróxido; (ii) a reação seja muito mais rápida que a reação do radical com o alimento a proteger; (iii) os produtos da reação sejam espécies incapazes de propagar a reação em cadeia. Os fenóis são exemplos de antioxidantes típicos de rutura de cadeia.⁴¹

O Esquema 3 apresenta o processo referido anteriormente. A reação é iniciada por algumas espécies que, independentemente da sua estrutura e origem, são capaz de reagir com o substrato alimentar para produzir um radical alquilo (R^\cdot) que reagirá a uma taxa controlada por difusão com o oxigénio para formar um radical peróxido (ROO^\cdot). Ciclicamente, o ROO^\cdot ataca outra molécula do substrato para produzir um hidroperóxido ($ROOH$) e outro radical. A reação em cadeia prossegue por vários ciclos até que as duas espécies radicalares se extinguem numa etapa final.⁴¹



Esquema 3 – Oxidação e proteção antioxidante por antioxidantes preventivos e antioxidantes de rutura de cadeia, adaptado da referência 41.

1.12.1 Mecanismos de ação de terpenóides e polifenóis contra microorganismos

Os mecanismos de ação de terpenóides e polifenóis contra microorganismos (Figura 18) ainda não são totalmente conhecidos, sendo que existem alguns mecanismos fundamentais amplamente aceites: (1) destabilização da membrana citoplasmática e da mitocôndria devido à natureza lipofílica do esqueleto hidrocarbonatado e consequentemente saída de iões, (2) colapso da força motriz dos protões, diminuição do *pool* de ATP e perda de macromoléculas, causada pela presença de grupos hidroxilo e eletrões deslocalizados e (3) inibição do metabolismo energético, da síntese de DNA e atividade enzimática.^{36,54}

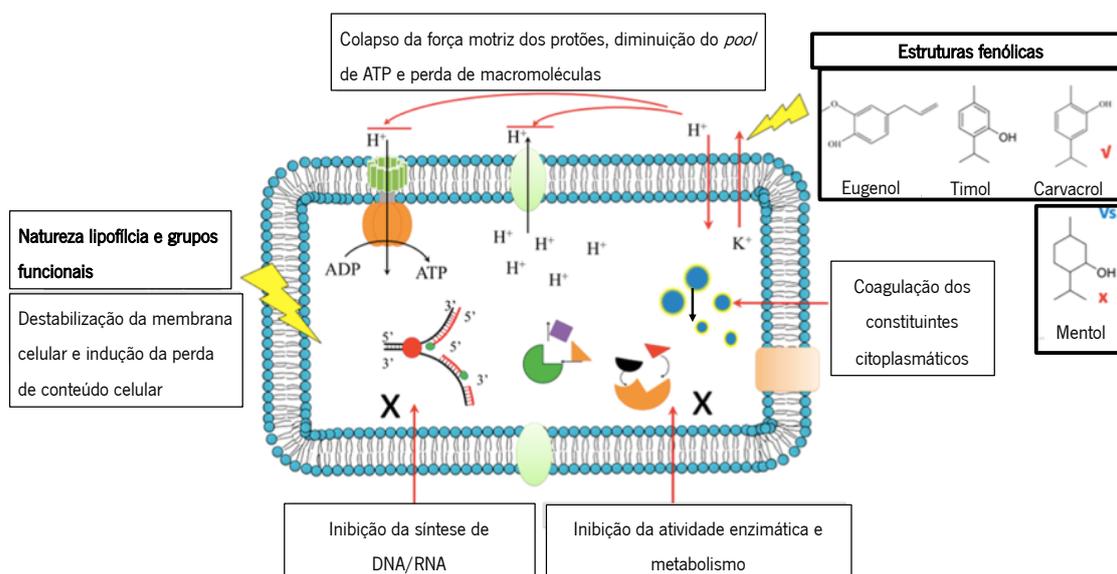


Figura 18 - Representação esquemática dos mecanismos de ação antimicrobianos de terpenóides e polifenóis, adaptado da referência 36.

A natureza lipofílica do esqueleto de hidrocarbonetos dos terpenóides e polifenóis desempenha um papel importante nas suas propriedades antimicrobianas, pois interfere com a estrutura das membranas biológicas, destabilizando-as e permitindo a saída de íons importantes no mecanismo celular. Além da natureza lipofílica do esqueleto de hidrocarbonetos, os grupos funcionais específicos influenciam também as propriedades antimicrobianas, sendo os compostos fenólicos os que apresentam maior atividade, seguidos por aldeídos, cetonas e álcoois, éteres e hidrocarbonetos.³⁶

Estrutura fenólica (incluindo terpenóides fenólicos e polifenóis). Os compostos químicos representativos mais comuns são o carvacrol, timol e eugenol. A estrutura hidrofóbica de hidrocarbonetos cíclicos, assim como um anel de benzeno destabiliza a membrana biológica. Além disso, estes compostos agem como transportadores de cátions monovalentes, transportando íons H^+ para o citoplasma e íons K^+ para o meio extracelular. Isto induz uma redução no gradiente de pH através da membrana citoplasmática, devido à presença do grupo hidroxilo e aos elétrons deslocalizados. A atividade celular é comprometida devido ao colapso da força motriz dos prótons, diminuição do pool de ATP e perda de macromoléculas, podendo induzir a morte celular.⁹⁸ A combinação de um grupo hidroxilo e elétrons deslocalizados é importante neste mecanismo antimicrobiano. A comparação do mentol e carvacrol é um exemplo desse mesmo facto.³⁶

O mentol não possui na sua estrutura elétrons deslocalizados (ligações duplas) e o grupo hidroxilo não tem a capacidade de libertar o seu próton. Devido a este facto, o mentol possui menor atividade

antimicrobiana que o carvacrol. Além disso, a posição relativa do grupo OH no anel de benzeno também influencia a atividade antimicrobiana dos compostos fenólicos.³⁶

Grupos aldeído, especialmente aldeídos insaturados (-C=C-CHO) (citral, linalol). Um grupo aldeído interfere com as proteínas associadas à membrana ou integradas, interrompendo a sua produção ou atividade. Estudos de atividade antifúngica de componentes de óleos essenciais mostraram que os grupos CHO em conjugação com uma ligação dupla têm maior efeito antifúngico.³⁶

Grupos cetona, especialmente cetonas insaturadas (-CO-C=C-). A presença de um grupo cetona na estrutura dos terpenóides aumenta as propriedades antimicrobianas. O mecanismo dos grupos cetona na inibição de microorganismos ainda não é conhecido.³⁶

Grupos acetato ou álcool. A presença de grupos acetato ou álcool na estrutura química pode aumentar a atividade antimicrobiana. Por exemplo, no caso do geraniol, a substituição do grupo OH por COOH conduz a um aumento na atividade do acetato de geraniol; enquanto os terpenóides álcool exibem maior atividade antimicrobiana que os alquilo terpenóides, agindo como agentes desnaturantes de proteínas ou desidratantes.³⁶

1.13 Planos e objetivos

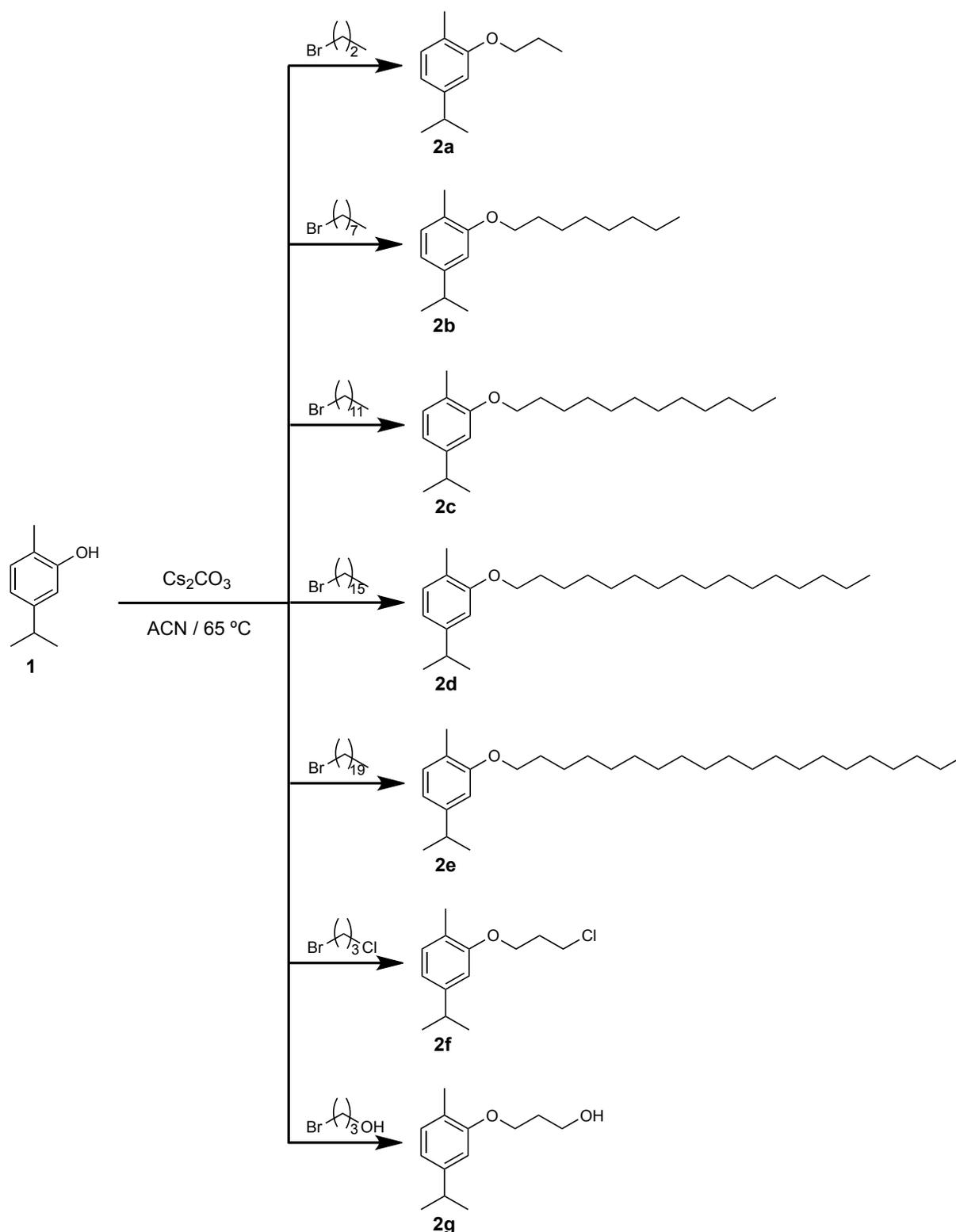
Com o objetivo de desenvolver e estudar novos derivados de compostos naturais com potencial aplicação como biopesticidas, sintetizaram-se novas moléculas usando como precursores compostos naturais, nomeadamente carvacrol, timol, mentol e 6-hidroxi-flavanona. Todos os derivados foram sintetizados através de reações de alquilação do grupo hidroxilo, no qual se introduziram cadeias carbonadas com diferentes tamanhos, ou seja, variando o número de carbonos e, também, com diferentes grupos terminais. Os compostos obtidos foram usados em ensaios de atividade biológica, no âmbito de uma colaboração com a REQUIMTE, Universidade do Porto e os resultados são discutidos. O potencial inseticida foi avaliado usando linhas celulares de insetos *Sf9*. A toxicidade em mamíferos dos compostos que revelaram maior atividade em *Sf9* foram efetuados em queratinócitos humanos.

Com esta metodologia, pretendeu-se verificar o efeito da variação do número de carbonos da cadeia alquílica e/ou terminais na atividade biológica dos compostos, e contribuir para o estabelecimento de uma relação estrutura-atividade dos compostos de forma a conduzir futuras atividades de investigação nesta área.

Capítulo 2 - Resultados e Discussão

2.1 Síntese dos derivados *O*-alquilados do carvacrol **2a-g**

Os compostos **2a-g** foram obtidos através da reação de alquilação do carvacrol **1**, designação convencional de 5-isopropil-2-metilfenol, em meio básico, com diferentes reagentes alquilantes, possuindo cadeias alquílicas de diferentes tamanhos, desde três a vinte átomos de carbono, ou três átomos de carbono com terminais contendo o átomo de cloro ou o grupo hidroxilo. Por reação do 5-isopropil-2-metilfenol **1** com 1-bromopropano, na presença de carbonato de cézio, em acetonitrilo, com aquecimento a 65°C, durante 24 horas obteve-se o 4-isopropil-1-metil-2-propoxibenzeno **2a**. Partindo novamente do composto **1**, em condições reacionais idênticas (tempos de aquecimento entre 5 e 6 horas) e usando 1-bromooctano, 1-bromododecano, 1-bromoexadecano, 1-bromoeicosano, 1-bromo-3-cloropropano ou 3-bromo-1-propanol foram obtidos os derivados *O*-alquilados correspondentes, designadamente 4-isopropil-1-metil-2-(octiloxi)benzeno **2b**, 2-(dodeciloxi)-4-isopropil-1-metilbenzeno **2c**, 2-(hexadeciloxi)-4-isopropil-1-metilbenzeno **2d**, 2-(icosiloxi)-4-isopropil-1-metilbenzeno **2e**, 2-(3-cloropropoxi)-4-isopropil-1-metilbenzeno **2f** ou 3-(5-isopropil-2-metilfenoxi)propan-1-ol **2g**, respectivamente. As reações foram monitorizadas por TLC e, em determinados compostos (**2c**, **2f** e **2g**), foi necessário realizar purificação por cromatografia em coluna. Estes derivados de carvacrol foram obtidos como óleos ou sólidos e com rendimentos compreendidos entre 8 e 62% (Esquema 4).



Esquema 4 – Síntese dos derivados *O*-alquilados do carvacrol **2a-g**.

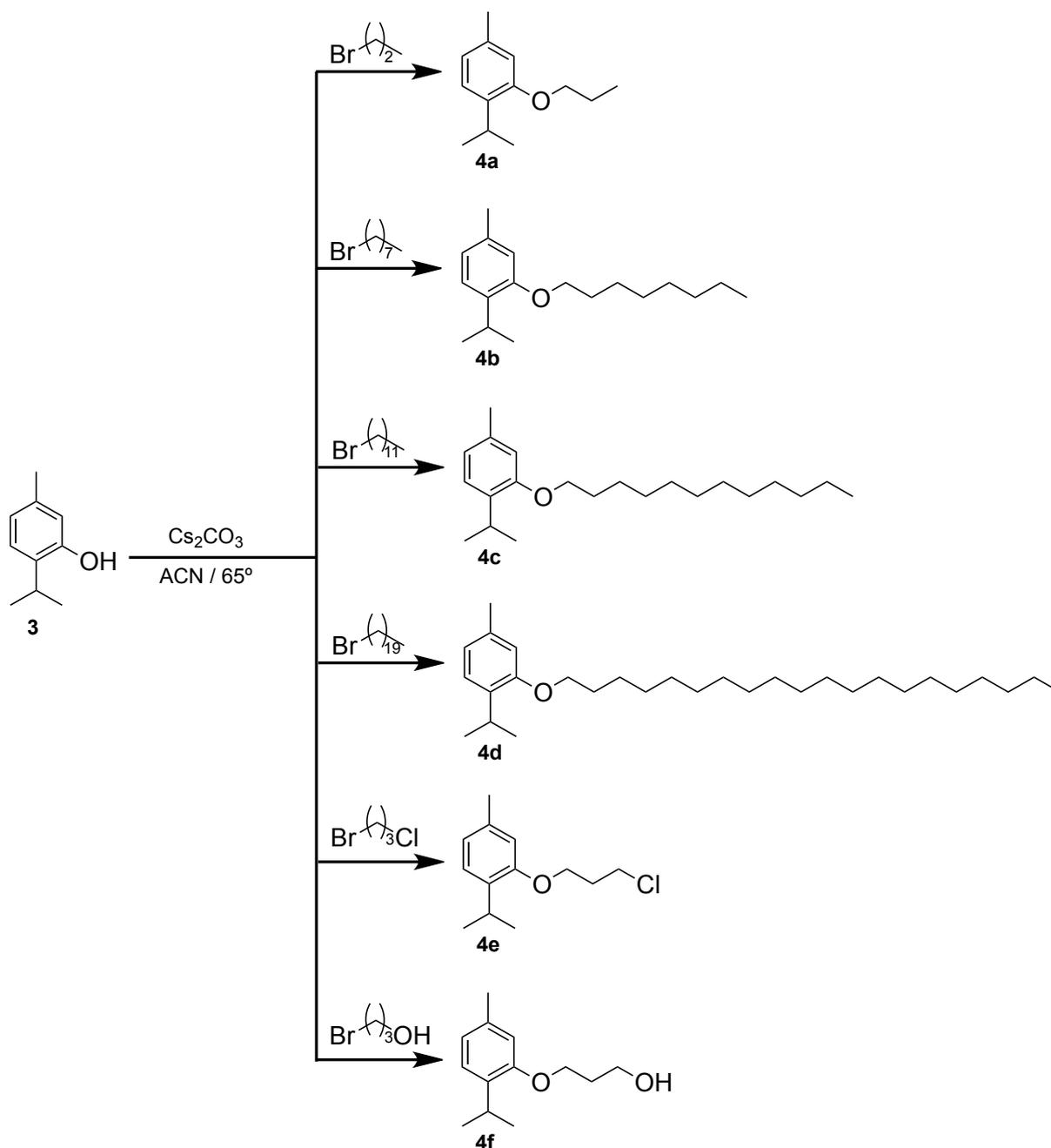
A estrutura dos compostos **2a-g** foi confirmada por RMN de ¹H e ¹³C. Nos espectros correspondentes de ¹H surgem os sinais dos prótons aromáticos, para os compostos **2a-g**, H-3 (H-6 para o composto **2g**), H-5 (H-4 para o composto **2g**) e H-6 (H-3 para o composto **2g**) como duplete ou duplo-duplete (H-5 ou

H-4 para o composto **2g**) (δ 6,69-6,78 ppm, H-3; δ 6,73-6,82 ppm, H-5; δ 7,06-7,15 ppm, H-6). Os prótons do grupo metilo ligados diretamente ao anel aromático surgem na forma de singletos (δ 2,20-2,29 ppm) ou integrado num multipletos (δ 2,15-2,22 ppm; **2g**), os prótons do grupo isopropilo, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ e $\text{CH}(\text{CH}_3)$ surgem na forma de multipletos (δ 2,81-3,00 ppm) e dupletos (δ 1,23-1,35 ppm), respetivamente. Os grupos metilo terminais das cadeias alquílicas da ligação éter introduzidas nas reações de *O*-alquilação surgem como tripletos (δ 0,90-1,14 ppm) ou multipletos (δ 0,90-0,95 ppm, **2c**), para os compostos **2a-e**. Os prótons metilénicos, designadamente OCH_2 , OCH_2CH_2 e $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ surgem na forma de triplo (δ 3,98-4,07 ppm), multipletos (δ 1,79-1,94 ppm) e outro multipletos (δ 1,49-1,62 ppm), respetivamente, para os compostos **2a-e**. No caso dos compostos **2f,g**, os prótons metilénicos, designadamente OCH_2 , OCH_2CH_2 e $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ surgem na forma de triplo (δ 4,13-4,40 ppm), multipletos (δ 2,15-2,31 ppm) e triplo (δ 3,78-4,10 ppm), respetivamente. Os restantes grupos metilénicos presentes nas moléculas surgem como multipletos (δ 1,29-1,53 ppm).

Nos espetros de ^{13}C dos compostos **2a-g** surgem os sinais dos carbonos aromáticos (δ 109,32-157,19 ppm); o grupo metilo ligado diretamente ao anel aromático (δ 15,76-15,82 ppm); os carbonos do grupo isopropilo, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ e $\text{CH}(\text{CH}_3)$ (δ 34,12-34,16 e δ 24,11-24,14 ppm, respetivamente); os grupos metilo terminais das cadeias alquílicas da ligação éter introduzidas nas reações de *O*-alquilação (δ 10,68-14,11 ppm); os carbonos metilénicos, designadamente OCH_2 (δ 64,16-69,36 ppm); os restantes carbonos metilénicos (22,68-32,56 ppm). Para os compostos **2f** e **2g**, o carbono metilénico $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ surge a δ 41,70 e 63,77 ppm, respetivamente.

2.2 Síntese dos derivados *O*-alquilados do timol **4a-f**

Os compostos **4a-f** foram obtidos através da reação de alquilação do timol **3**, designação convencional de 2-isopropil-5-metilfenol, em meio básico, usando carbonato de cézio, em acetonitrilo. Assim, por reação do timol **3** com 1-bromopropano, 1-bromooctano, 1-bromododecano, 1-bromoeicosano, 1-bromo-3-cloropropano e 3-bromo-1-propanol, tal como anteriormente referido para o caso dos derivados de carvacrol, resultaram o 1-isopropil-4-metil-2-propoxibenzeno **4a**, 4-isopropil-4-metil-2-(octiloxi)benzeno **4b**, 2-(dodeciloxi)-1-isopropil-4-metilbenzeno **4c**, 2-(icosiloxi)-1-isopropil-4-metilbenzeno **4d**, 2-(3-cloropropoxi)-1-isopropil-4-metilbenzeno **4e** e 3-(2-isopropil-5-metilfenoxi)propan-1-ol **4f**, respetivamente. As reações foram monitorizadas por TLC e, em determinados compostos (**4d**, **4e** e **4f**), foi necessário realizar purificação por cromatografia em coluna. Estes derivados do timol foram obtidos como óleos ou sólidos, com rendimentos compreendidos entre 13 e 93% (Esquema 5).



Esquema 5 - Síntese dos derivados *O*-alquilados do timol **4a-f**.

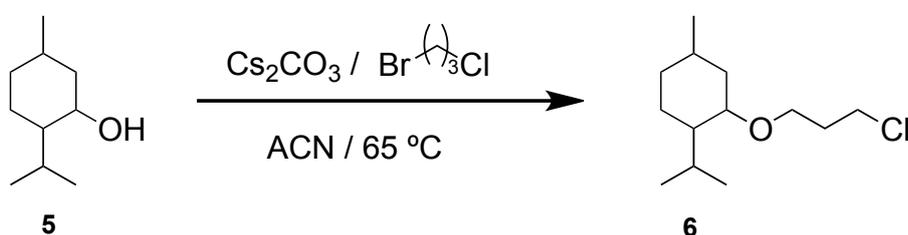
A estrutura dos compostos **4a-f** foi confirmada por RMN de ^1H e ^{13}C . Nos espectros correspondentes de ^1H surgem os sinais aromáticos, para os compostos **4a-e**, H-3 (H-6 para o composto **4f**), H-5 (H-4 para o composto **4f**) e H-6 (H-3 para o composto **4f**) como dupletos ou duplo-dupletos (H-5 ou H-4 para o composto **4f**) (δ 6,67-6,83 ppm, H-3; δ 6,76-6,91 ppm, H-5; δ 7,10-7,27 ppm, H-6). Os prótons do grupo metilo ligados diretamente ao anel aromático surgem na forma de singletos (δ 2,33-2,50 ppm), os prótons do grupo isopropilo $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ e $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ surgem na forma de multipletos (δ 3,23-3,54 ppm) e dupletos (δ 1,20-1,41 ppm), respetivamente. Os prótons metilénicos, designadamente OCH_2 , OCH_2CH_2 e

$\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ surgem na forma de tripleto (δ 3,97-4,13 ppm), multiplete (δ 1,82-2,01 ppm) e outro multiplete (δ 1,50-1,68 ppm) ou quinteto (δ 1,67 ppm, **4b**), respetivamente, para os compostos **4a-e**. No caso dos compostos **4f,g**, os prótons metilénicos, designadamente OCH_2 , OCH_2CH_2 e $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ surgem na forma de tripleto (δ 4,16-4,40 ppm), quinteto (δ 2,30-2,36 ppm, **4e**) ou multiplete (δ 2,16-2,23 ppm, **4f**) e tripleto (δ 3,83-4,09 ppm), respetivamente. Os restantes grupos metilénicos presentes nos compostos **4b-e** surgem como multipletos (δ 1,32-1,59 ppm).

Nos espetros de ^{13}C dos compostos **4a-f** surgem os sinais dos carbonos aromáticos (δ 112,01-156,23 ppm); o grupo metilo ligado diretamente ao anel aromático (δ 21,20-21,34 ppm); os carbonos do grupo isopropilo, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ e $\text{CH}(\text{CH}_3)$ (δ 26,48-26,67 e δ 22,54-22,75 ppm, respetivamente); os grupos metilo terminais das cadeias alquílicas da ligação éter introduzidas nas reações de *O*-alquilação (δ 10,60-14,12 ppm); os carbonos metilénicos, designadamente OCH_2 (δ 64,11-69,19 ppm) e os restantes carbonos metilénicos (22,65-32,39 ppm). Para os compostos **4e** e **4f**, os carbonos metilénicos $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ surgem a δ 41,67 e 63,80 ppm, respetivamente.

2.3 Síntese do derivado *O*-alquilado do mentol **6**

O 2-(3-cloropropoxi)-1-isopropil-4-metilcicloexano **6** foi obtido através da reação de alquilação do mentol **5**, designação convencional de 2-isopropil-5-metilcicloexanol, em meio básico, usando carbonato de céσιο, em acetonitrilo, com 1-bromo-3-cloropropano como reagente alquilante. Após purificação por cromatografia em coluna, obteve-se o composto **6** como um óleo, com baixo rendimento (Esquema 6).



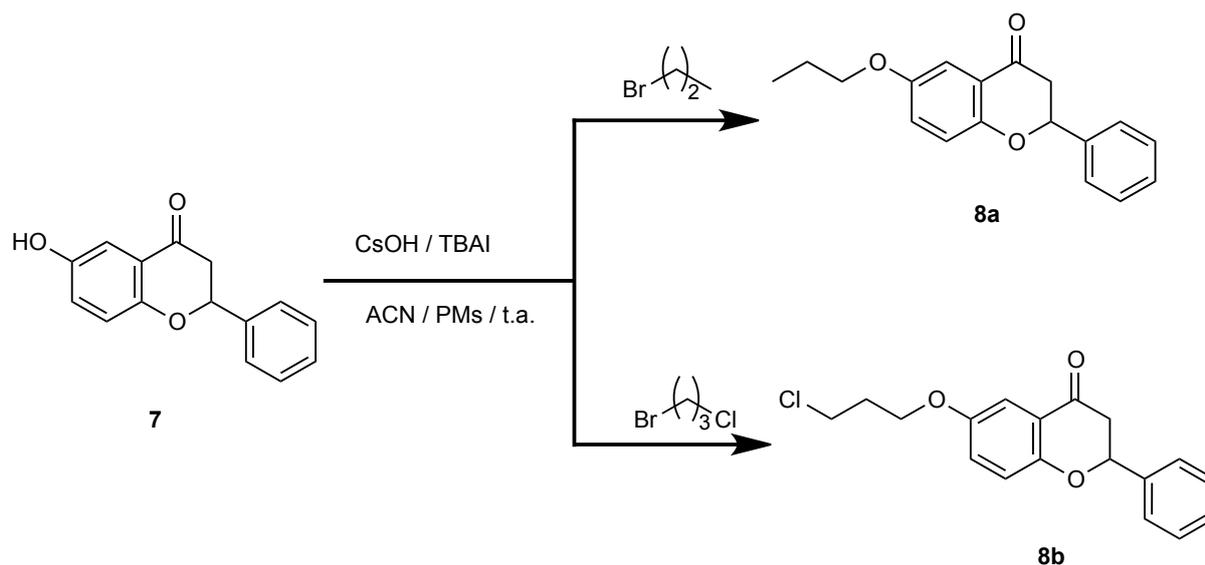
Esquema 6 - Síntese do derivado *O*-alquilado do mentol **6**.

A confirmação da estrutura do composto **6** obtido foi efetuada por RMN de ^1H e ^{13}C . No espetro de ^1H RMN surgem os prótons relativos ao grupo metilo como duplete (δ 0,80 ppm) e os prótons dos grupos metilénicos da cadeia alquílica da ligação éter ao cicloexano, designadamente OCH_2 , OCH_2CH_2 e $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$, na forma de tripleto (δ 3,64 ppm), quinteto (δ 2,14 ppm) e multiplete (δ 4,24-4,33 ppm), respetivamente.

No espectro de ^{13}C de RMN surge o carbono do grupo metilo (δ 16,25 ppm), os sinais dos carbonos dos grupos metilénicos da cadeia alquímica da ligação éter ao cicloexano, designadamente OCH_2 (δ 64,27 ppm), OCH_2CH_2 (δ 31,67 ppm) e $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ (δ 40,74 ppm).

2.4 Síntese dos derivados *O*-alquilados da 6-hidroxi flavanona **8a,b**

Os compostos 2-fenil-6-propoxicroman-4-ona **8a** e 6-(3-cloropropoxi)-2-fenilcroman-4-ona **8b** foram obtidos através da reação de alquilação da 6-hidroxi flavanona **7**, designação convencional de 6-hidroxi-2-fenilcroman-4-ona, em meio básico e temperatura ambiente (t.a.), usando hidróxido de céσιο e iodeto de tetrabutilamónio (TBAI), em acetonitrilo, contendo peneiros moleculares (PMs), com dois reagentes alquilantes, nomeadamente 1-bromopropano e 1-bromo-3-cloropropano, respetivamente. Destaca-se o facto da reação de *O*-alquilação da 6-hidroxi flavanona **7** não ter ocorrido na presença de carbonato de céσιο e nas condições reacionais anteriormente descritas para a síntese dos derivados de carvacrol **2a-g**, timol **4a-f** e mentol **6**, provavelmente devido ao efeito eletroretirador resultante da deslocalização eletrónica com o grupo carbonilo do anel de piranona. As reações foram monitorizadas por TLC e realizou-se purificação por cromatografia em coluna. Estes derivados da 6-hidroxi flavanona **8a,b** foram obtidos como sólidos e com rendimentos de 15 e 19%, respetivamente (Esquema 7).



Esquema 7 - Síntese dos derivados *O*-alquilados da 6-hidroxi flavanona **8a,b**.

A estrutura dos compostos **8a** e **8b** foi confirmada por RMN de ^1H e ^{13}C . Nos espectros correspondentes de ^1H surgem os sinais aromáticos dos cinco prótons do fenilo e H-5 na forma de multiplete (δ 7,39-7,47 ppm) e duplete (δ 7,36 ppm), respetivamente, no caso do composto **8a**, ou juntos num multiplete (δ 7,38-7,50 ppm), no caso do **8b**. Os prótons H-3, H-2, H-8 e H-7 surgem como

multipletos (δ 2,86-3,12 ppm, H-3; δ 5,30-5,47 ppm, H-2), dupletos (δ 6,99-7,02 ppm, H-8) e duplos-dupletos (δ 7,12-7,15 ppm, H-7). Os grupos metilénicos da cadeia alquílica com ligação éter, designadamente OCH_2 , OCH_2CH_2 e $OCH_2CH_2CH_2$ (composto **8b**) surgem na forma de tripletos (δ 3,92-4,15 ppm), multipletos (δ 1,77-1,86 ppm, **8a** e δ 2,23-2,28 ppm, **8b**) e tripleto (δ 3,75 ppm, **8b**), respetivamente. No composto **8a**, os prótons do grupo metilo da extremidade da cadeia alquílica surgem na forma de tripleto (δ 1,05 ppm).

Nos espetros de ^{13}C dos compostos **8a,b** surgem os carbonos C-6, C-8a, C-4 (δ 153,30-192,11 ppm), o carbono C-2 (δ 79,68-79,69 ppm), e o C-3 (δ 44,53-44,61 ppm); os carbonos dos grupos metilénicos da cadeia alquílica com ligação éter, designadamente OCH_2 (δ 64,93-70,17 ppm), OCH_2CH_2 (δ 22,50-32,15 ppm) e $OCH_2CH_2CH_2$ (δ 41,37 ppm, **8b**); no caso do composto **8a**, surge o carbono do grupo metilo da extremidade da cadeia alquílica (δ 10,47 ppm).

2.5 Ensaio de atividade biológica dos compostos **2a-d**, **2f,g**, **4a-c**, **4e,f**, **6** e **8a,b**

Os ensaios da atividade biológica dos compostos **2a-d**, **2f,g**, **4a-c**, **4e,f**, **6** e **8a,b**, realizados em células *Spodoptera frugiperda* (*Sf9*) e queratinócitos foram efetuados na REQUIMTE da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, no âmbito do projeto *BioP&FoodP – Biopesticides and Food Preservatives from Nanoencapsulated Plant Extracts: Biological Evaluation, Molecular Modelling and Synthesis*, no qual a presente dissertação está integrada. Todos os estudos foram realizados com a mesma concentração de composto (100 μ g/mL), de forma a ser possível a comparação direta de todos os resultados. Esses resultados são apresentados com base na perda de viabilidade celular, em percentagem (%).

Os ensaios de viabilidade celular permitem analisar a proliferação celular, determinar as células metabolicamente ativas numa cultura celular e são frequentemente realizados para identificar moléculas que possuem efeitos na proliferação celular ou efeitos tóxicos que, eventualmente, podem induzir a morte celular.¹⁰⁸

Em ambos os estudos, os resultados dos compostos **2e** e **4d**, que, estruturalmente, são semelhantes por possuírem como substituinte éter um esqueleto carbonado com vinte átomos de carbono, não são apresentados devido a dificuldades de solubilização nas condições experimentais dos ensaios efetuados. Desta forma, não surgem os valores correspondentes na discussão dos resultados em *Sf9* e queratinócitos.

2.5.1 Ensaio em *Sf9*

O estudo da atividade inseticida dos compostos sintetizados **2a-d**, **2f,g**, **4a-c**, **4e,f**, **6** e **8a,b** foi realizado em culturas bidimensionais (2D) de células *Sf9*, que são derivadas de células de ovários de *Spodoptera frugiperda*, uma peste comum. Nestes ensaios é esperado que o composto apresente uma percentagem baixa para a viabilidade celular, ou seja, quanto menor for a percentagem de viabilidade associada maior a perda de viabilidade, sendo o composto mais tóxico, possuindo maior atividade inseticida.

Compostos **2a-d** e **2f,g**

O reagente de partida deste grupo de compostos, carvacrol **1**, apresenta uma percentagem de perda de viabilidade celular de cerca de 40%, em *Sf9*. Quando comparado com os seus derivados sintetizados **2a-d** e **2f,g**, os derivados apresentam menor atividade, refletindo-se numa percentagem de perda de viabilidade celular menor, entre 0 e 30%. Na Figura 19 surge o gráfico de viabilidade celular, em percentagem, do carvacrol **1** e dos seus derivados **2a-d** e **2f,g** em estudo.

De entre todos os derivados de carvacrol sintetizados, o composto **2f**, cuja estrutura da cadeia alquílica inclui três grupos metilénicos e como terminal um átomo de cloro, é o composto que apresenta maior toxicidade em *Sf9*, ou seja, uma percentagem de perda de viabilidade celular maior (aproximadamente 30%), quando comparado com a viabilidade celular dos restantes derivados.

Com base nos estudos realizados aos compostos **2a-d** para aferir o tamanho mais adequado da cadeia carbonada presente no substituinte éter para a melhor atividade biológica, o composto **2b**, cuja cadeia alquílica é composta por oito átomos de carbono, é aquele que apresenta maior toxicidade em *Sf9*, ou seja, perda de viabilidade celular superior, de cerca de 20%. Os restantes compostos apresentam perda de viabilidade celular entre 0 e 10%, ou seja, a toxicidade em *Sf9* é praticamente inexistente.

O composto **2g**, cuja estrutura da cadeia alquílica inclui três grupos metilénicos e um grupo hidroxilo terminal, não apresenta perda de viabilidade significativa.

Os resultados deste estudo sugerem que compostos cuja cadeia alquílica do substituinte éter é próxima de oito carbonos e, principalmente possuem o átomo de cloro como grupo terminal de uma cadeia de três carbonos, são propícios à obtenção de melhores resultados de atividade em *Sf9*.

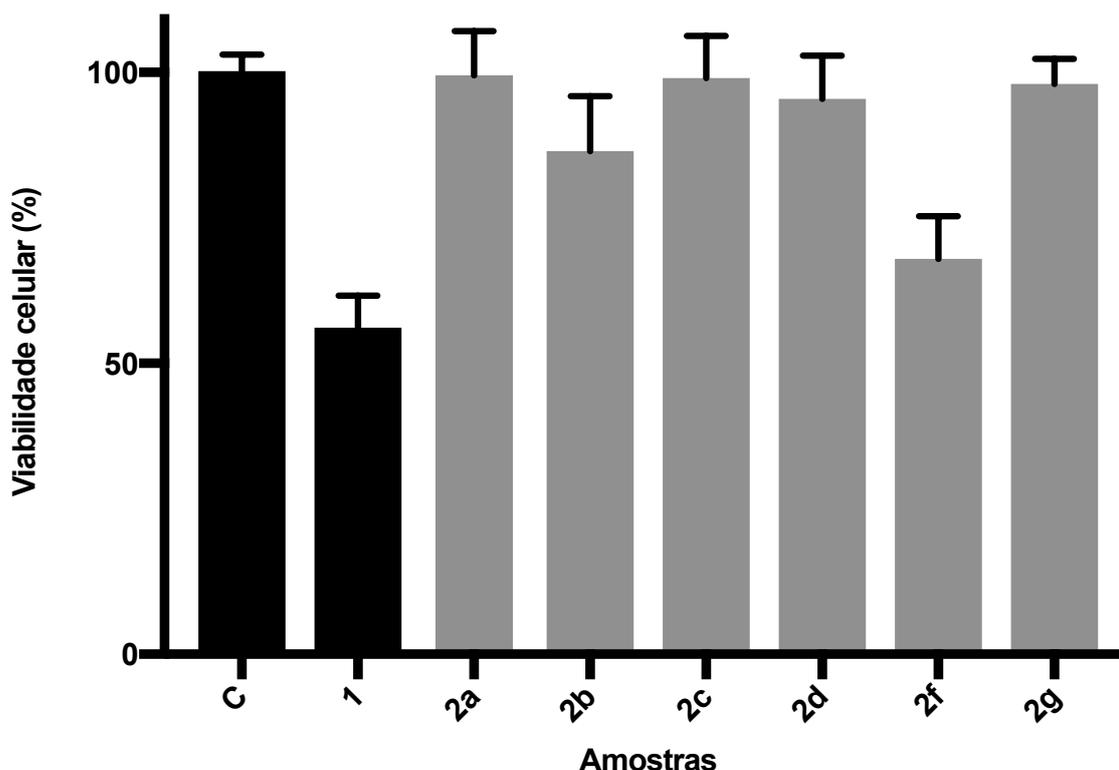


Figura 19 – Viabilidade celular, em percentagem, do carvacrol **1** e derivados **2a-d** e **2f,g**; C - controlo. Os resultados correspondem à média \pm DP de pelo menos três ensaios independentes.

Compostos **4a-c** e **4e,f**

O precursor para a síntese deste grupo de compostos foi o timol **3**, apresentando atividade em *Sf9* correspondente a uma perda de viabilidade celular de cerca de 60%. Quando comparado com os seus derivados sintetizados **4a-c** e **4e,f**, os derivados apresentam menor atividade, refletindo-se numa perda de viabilidade celular menor, entre 0 e 40%. Na Figura 20 surge o gráfico de viabilidade celular, em percentagem, do timol **3** e dos seus derivados **4a-c** e **4e,f**.

De entre todos os derivados de timol sintetizados, o composto **4e**, estruturalmente constituído por uma cadeia alquílica com três grupos metilénicos e como terminal o átomo de cloro, é o composto que, quando comparado com os restantes, apresenta maior toxicidade em *Sf9*, ou seja, uma perda de viabilidade celular de aproximadamente 40%.

Com base nos estudos realizados aos compostos **4a-c**, de forma a aferir o tamanho mais adequado da cadeia carbonada para conferir a melhor atividade biológica, não foi possível verificar uma diferença significativa nas correspondentes perdas de viabilidade celular dos compostos, sendo esta praticamente inexistente, ou seja, estes compostos não apresentam atividade biológica em *Sf9*.

O composto **4f**, que possui uma cadeia alquílica constituída por três grupos metilénicos e um grupo hidroxilo terminal, não apresenta perda de viabilidade significativa.

Assim, desta série é possível destacar o composto **4e** como o mais relevante em termos de atividade biológica em *Sf9*.

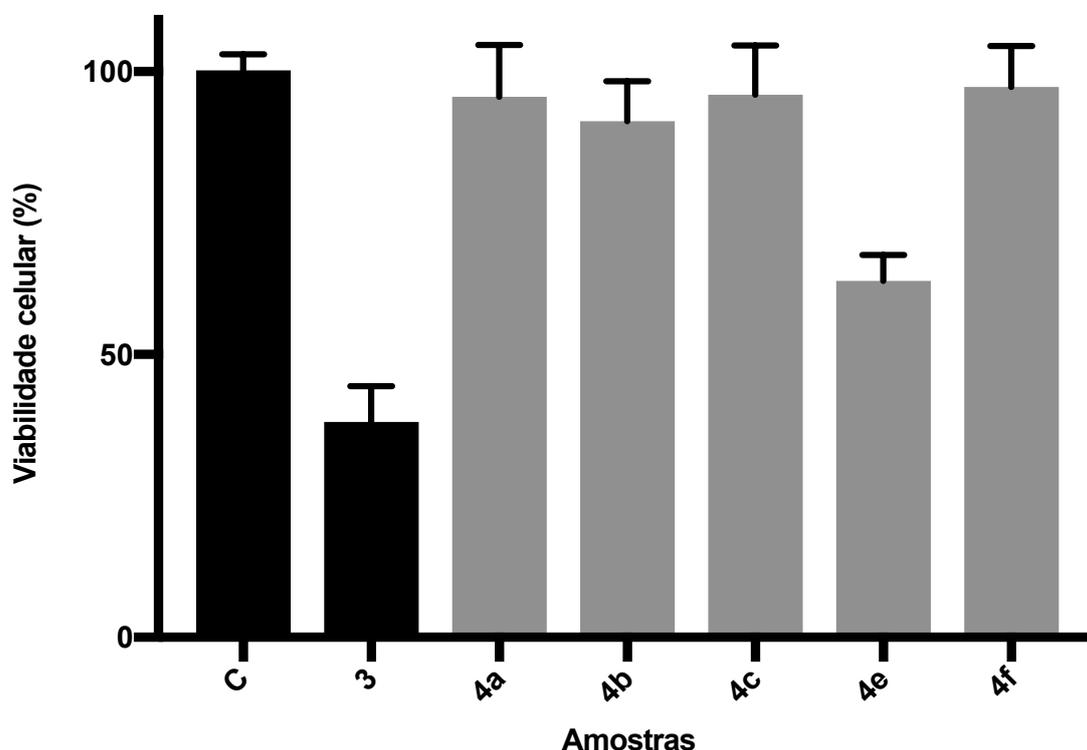


Figura 20 - Viabilidade celular, em percentagem, do timol **3** e derivados **4a-c** e **4e,f**; C - controlo. Os resultados correspondem à média \pm DP de pelo menos três ensaios independentes.

Composto 6

O mentol **5** apresenta uma atividade em *Sf9* correspondente à perda de viabilidade celular de cerca de 20%. O derivado **6** não apresenta perda de viabilidade celular (0%), ou seja, a toxicidade em *Sf9* é inexistente.

Na Figura 21 surge o gráfico de viabilidade celular, em percentagem, do mentol **5** e derivado **6** correspondente.

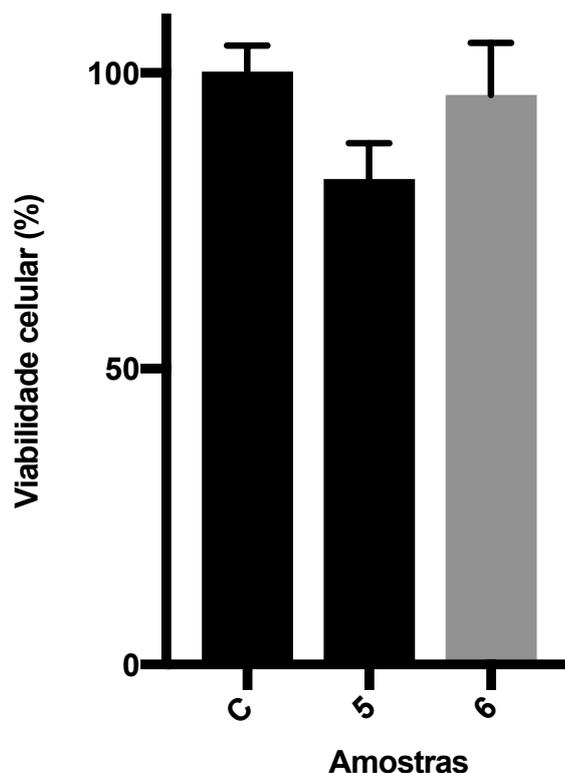


Figura 21 - Viabilidade celular, em percentagem, do mentol **5** e derivado **6**; C - controlo. Os resultados correspondem à média \pm DP de pelo menos três ensaios independentes.

Compostos **8a,b**

O precursor para a síntese deste grupo de compostos foi a 6-hidroxi flavanona **7**, apresentando atividade em *Sf9* correspondente a uma perda de viabilidade celular ligeiramente inferior a 20%. Quando comparada com os seus derivados sintetizados **8a,b**, os derivados não diferem muito da atividade do precursor (**7**), apresentando, contudo, maior atividade, refletindo-se numa perda de viabilidade celular ligeiramente superior a 20%.

Na Figura 22 surge o gráfico de viabilidade celular, em percentagem, da 6-hidroxi flavanona **7** e dos derivados correspondentes **8a,b**.

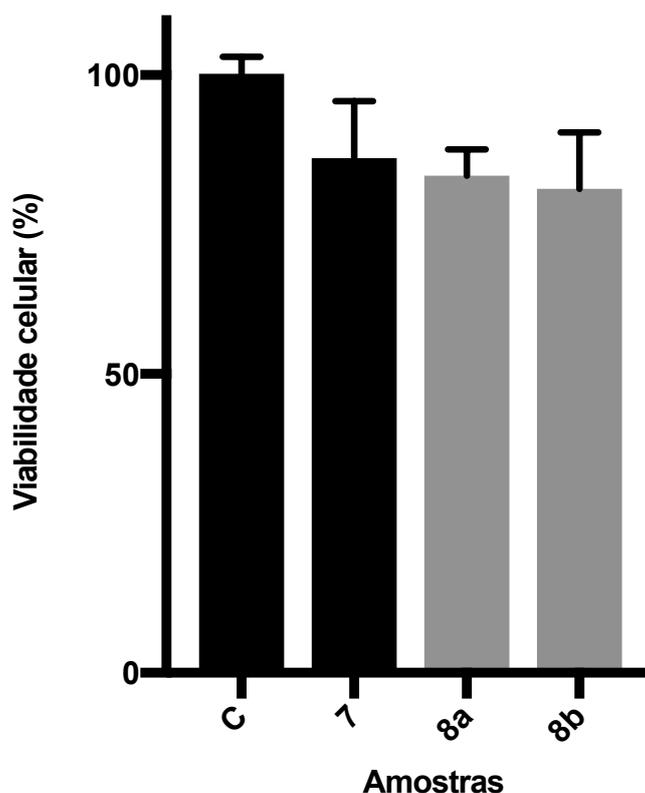


Figura 22 - Viabilidade celular, em percentagem, da 6-hidroxiflavanona **7** e derivados **8a,b**; C - controlo. Os resultados correspondem à média \pm DP de pelo menos três ensaios independentes.

2.5.2 Ensaio em queratinócitos

No desenvolvimento de novos compostos para atuarem como princípios ativos em (bio)pesticidas é fundamental que estes sejam tóxicos para o organismo alvo, neste contexto em estudo os insetos, mas é importante atender ao facto de que estes compostos devem ser caracterizados por apresentarem um perfil toxicológico seguro para os mamíferos. Assim, foram realizados ensaios em queratinócitos humanos, especificamente da pele, uma vez que esta é a via de contacto mais frequente com os pesticidas.

A toxicidade em queratinócitos, usando a linha celular HaCaT, foi testada para todos os compostos, mas neste trabalho decidiu-se apresentar apenas a toxicidade dos compostos cuja atividade biológica em *Sf9* foi interessante. Nos ensaios em queratinócitos quanto menor for a perda de viabilidade celular, menor a toxicidade para os mamíferos.

Compostos 2a-d e 2f,g

Os compostos anteriormente apresentados com atividade biológica em *Sf9* foram **2b** e **2f**, com uma perda de viabilidade celular de aproximadamente 20 e 30%, respetivamente. Os ensaios de toxicidade com estes compostos em queratinócitos mostraram uma perda de viabilidade celular de 40 e 50%.

A análise conjunta dos resultados em *Sf9* e queratinócitos mostra que os compostos **2b** e **2f** apresentam valores de atividade em *Sf9* considerável, mas, simultaneamente, toxicidade em queratinócitos num valor ligeiramente superior.

Compostos 4a-c e 4e,f

O composto **4e**, que apresentou atividade biológica em *Sf9*, aproximadamente 40% de perda de viabilidade celular, foi usado nos ensaios em queratinócitos e revelou uma perda de viabilidade celular superior a 40%.

A análise conjunta dos resultados em *Sf9* e queratinócitos no composto **4e** revela atividade em *Sf9*, mas também toxicidade em mamíferos.

Composto 6

Como não ocorreu perda de viabilidade celular em *Sf9* com este composto, não é discutido o resultado de atividade biológica em queratinócitos.

Compostos 8a,b

Os compostos **8a** e **8b** apresentam atividade biológica em *Sf9*, aproximadamente 20% de perda de viabilidade celular, e em queratinócitos revelaram perda de viabilidade celular de 60 e 35%, respetivamente.

Tal como nos compostos anteriormente referidos, os compostos **8a** e **8b** revelaram atividade biológica em *Sf9* e também em queratinócitos.

Capítulo 3 - Conclusão e Perspetivas Futuras

Com a realização do trabalho experimental conducente a esta dissertação, sintetizaram-se vários derivados de compostos de origem natural, nomeadamente, carvacrol, timol, mentol e 6-hidroxiiflavanona, possuindo o grupo hidroxilo transformado em éter com diferentes tamanhos de cadeia carbonada alifática ou uma cadeia propílica com um átomo de cloro ou grupo hidroxilo como terminais. Todos os compostos sintetizados foram submetidos a ensaios da atividade biológica em *Sf9*, em comparação com os precursores correspondentes, de forma a avaliar a sua aplicação como potenciais (bio)inseticidas.

Os resultados sugerem que nos isómeros carvacrol **1** e timol **3** a posição relativa dos grupos hidroxilo é relevante. O timol **3** apresenta melhor atividade em *Sf9*, com uma perda de viabilidade celular de aproximadamente 60%.

Relativamente aos derivados de carvacrol (**2a-d** e **2f,g**) e timol (**4a-c** e **4e,f**) obtidos, o tamanho da cadeia alquímica no substituinte éter parece afetar a atividade em *Sf9*, mas deverão ser estudados derivados possuindo tamanhos de cadeia entre cinco e onze átomos de carbono de modo a aferir-se este feito.

A presença do átomo de cloro como terminal da cadeia alquímica de três carbonos (**2f** e **4e**) é muito significativa dado que confere atividade, em comparação com os derivados correspondentes com uma cadeia alquímica de três carbonos (**2a** e **4a**), com uma perda de viabilidade celular de 30% (**2f**) ou 40% (**4e**), sendo os derivados com melhor atividade em *Sf9*. Atendendo a este aspeto, seria interessante, com o tamanho da cadeia alquímica mais adequado, testar-se o efeito conjunto da presença de um átomo de cloro terminal.

Os estudos envolvendo o mentol **5** confirmam a importância da conjugação, ou seja, da presença do benzeno em vez do anel saturado de cicloexano na atividade em *Sf9*, dado que o mentol **5** é o análogo insaturado do timol **3** e a atividade deste é muito menor (timol **3** 60% de perda de viabilidade celular, mentol **5** 20% de perda de viabilidade celular). A presença da cadeia de cloropropilo no éter substituinte (composto **6**) suprimiu a atividade (aproximadamente 0% de perda de viabilidade). Este facto demonstra a importância da presença do grupo OH livre, em comparação com a sua substituição por um grupo éter.

O trabalho efetuado com a 6-hidroxiiflavanona **7** permitiu verificar que a presença do substituinte éter na cadeia lateral de três carbonos (composto **8a**) aumenta ligeiramente a atividade em *Sf9*, sendo que a presença do átomo de cloro terminal (composto **8b**) é pouco pronunciada. Estes resultados sugerem a realização de outros estudos com a 6-hidroxiiflavanona **7**, mas também com outros isómeros nos quais o grupo hidroxilo esteja noutras posições na molécula ou exista mais do que um grupo hidroxilo que

permita alterações sintéticas com vista ao aumento da sua atividade em *Sf9* e possível utilização como biopesticidas.

Os ensaios efetuados em queratinócitos com os compostos que apresentaram melhores resultados em *Sf9* permitiram avaliar a toxicidade destes em mamíferos. Os resultados mostraram que estes derivados apresentam toxicidade podendo, posteriormente, ser mitigada com o nanoencapsulamento e consequente libertação controlada.

Globalmente, prevê-se, num futuro próximo, prosseguir com o *design* e síntese de novos derivados com estruturas direcionadas pela combinação dos resultados experimentais de atividade em *Sf9* e queratinócitos com estudos computacionais em curso, assim como efetuar os ensaios de nanoencapsulamento e libertação controlada correspondentes.

Deste modo, pretende-se contribuir para o desenvolvimento de derivados de compostos de origem botânica que funcionem como alternativas promissoras aos inseticidas sintéticos atualmente disponíveis.

Paralelamente, serão prosseguidos os estudos recentemente iniciados relativos à avaliação do potencial de compostos de origem natural, como carvacrol, timol, mentol, 6-hidroxi-flavanona, e seus derivados, obtidos no âmbito desta dissertação, como conservantes alimentares.

Capítulo 4 - Secção Experimental

4.1 Procedimentos Gerais

Os espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C foram obtidos no aparelho Bruker Avance III 400 numa frequência de 400 MHz para ^1H e 100,6 MHz para ^{13}C , usando como padrão interno o tetrametilsilano (TMS), a 25°C. Os desvios químicos (δ) são referidos em partes por milhão (ppm), utilizando como referência o valor $\delta_{\text{Me}_4\text{Si}}=0$ ppm, e as constantes de acoplamento (J) surgem em Hertz (Hz). A atribuição dos sinais de ^1H e ^{13}C foi efetuada por comparação dos desvios químicos, multiplicidade dos picos e valores de J . A atribuição dos sinais dos átomos de carbono primários, secundários e terciários foi feita utilizando a sequência de DEPT (aumento sem distorção por transferência de polarização) com um pulso de 135°. A atribuição completa dos sinais de próton e carbono foi efetuada usando técnicas de correlação espectroscópica heteronuclear bidimensional, nomeadamente HMQC (correlação heteronuclear quântica múltipla) e HMBC (correlação heteronuclear através de múltiplas ligações). O solvente deuterado usado foi o clorofórmio da Euriso-top®.

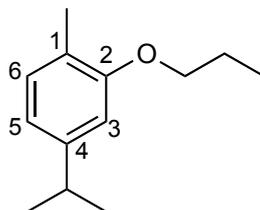
As cromatografias em camada fina (TLC) foram realizadas em placas sílica de gel 60 com indicador de fluorescência F_{254} (Merck) e reveladas pela incidência de radiação UV/Vis ($\lambda_{\text{máx}}$ 254 e 365 nm) numa câmara CN-6 (Vilber-Lourmart). Nas cromatografias em coluna utilizou-se sílica gel 60 (0,035-0,070 mm) (Acros Organics).

Todo o material de vidro e metálico foi seco na estufa, à temperatura de, aproximadamente, 50°C.

Os reagentes e solventes utilizados foram adquiridos comercialmente (Sigma-Aldrich, Acros Organics, Fisher Chemical e Panreac).

4.2. Síntese dos derivados *O*-alquilados do carvacrol 2a-g

[2a] 4-Isopropil-1-metil-2-propoxibenzeno



A uma solução de carvacrol **1**, 5-isopropil-2-metilfenol, (105 μL ; 0,7 mmol; 1 equiv) em acetonitrilo (4 mL) adicionou-se carbonato de cézio (1,09 g; 3,3 mmol; 5 equiv) e 1-bromopropano (67 μL ; 0,7 mmol; 1,1 equiv). A mistura reacional foi agitada, à temperatura de 65°C, durante 24 horas, sendo a reação monitorizada por TLC em éter de petróleo. Após esse período, filtrou-se a mistura reacional, lavou-se o sólido com acetonitrilo e evaporou-se o solvente a pressão reduzida. O composto **2a** foi obtido como um óleo alaranjado.

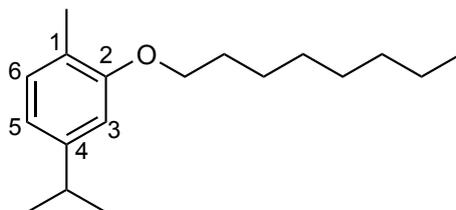
η = 54% (0,069g)

R_f = 0,56 (éter de petróleo)

δ_{H} (CDCl_3 , 400 MHz): 1,12 (t, J = 7,2 Hz, 3H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1,30 (d, J = 6,8 Hz, 6H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1,84-1,93 (m, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 2,26 (s, 3H, PhCH_3), 2,88-2,95 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 3,99 (t, J = 6,4 Hz, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 6,75 (d, J = 1,2 Hz, 1H, H-3), 6,78 (dd, J = 7,6 e 1,6 Hz, 1H, H-5), 7,11 (d, J = 7,2 Hz, 1H, H-6) ppm.

δ_{C} (CDCl_3 , 100,6 MHz): 10,68 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 15,77 (PhCH_3), 22,80 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 24,13 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 34,14 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 69,36 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 109,45 (C-3), 117,76 (C-5), 124,13 (C-1), 130,32 (C-6), 147,79 (C-4), 157,15 (C-2) ppm.

m/z (ESI-TOF) Valor obtido: $[\text{M}^+ + 1]$ 193,1592. Valor calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{O}$: 193,1587.

[2b] 4-Isopropil-1-metil-2-(octiloxi)benzeno

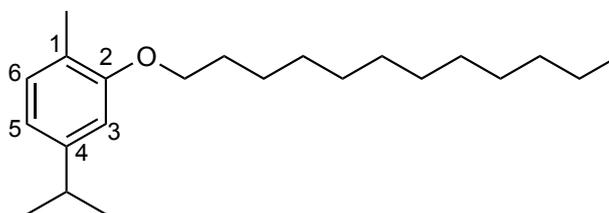
A uma solução de carvacrol **1**, 5-isopropil-2-metilfenol, (105 μL ; 0,7 mmol; 1 equiv) em acetonitrilo (4 mL) adicionou-se carbonato de césio (1,09 g; 3,3 mmol; 5 equiv) e 1-bromooctano (120 μL ; 0,7 mmol; 1,1 equiv). A mistura reacional foi agitada, à temperatura de 65°C, durante 6 horas, sendo a reação monitorizada por TLC em éter de petróleo. Após esse período, filtrou-se a mistura reacional, lavou-se o sólido com acetonitrilo e evaporou-se o solvente a pressão reduzida. O composto **2b** foi obtido como um óleo amarelo claro.

η = 57% (0,099g)

R_f = 0,83 (éter de petróleo)

δ_{H} (CDCl₃, 400 MHz): 1,00 (t, J = 7,2 Hz, 3H, OCH₂CH₂CH₂(CH₂)₄CH₃), 1,34 (d, J = 6,8 Hz, 6H, CH(CH₃)₂), 1,39-1,49 (m, 8H, OCH₂CH₂CH₂(CH₂)₄CH₃), 1,55-1,62 (m, 2H, OCH₂CH₂CH₂(CH₂)₄CH₃), 1,86-1,94 (m, 2H, OCH₂CH₂CH₂(CH₂)₄CH₃), 2,29 (s, 3H, PhCH₃), 2,90-3,01 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 4,06 (t, J = 6,4 Hz, 2H, OCH₂CH₂CH₂(CH₂)₄CH₃), 6,78 (d, J = 1,2 Hz, 1H, H-3), 6,81 (dd, J = 7,6 e 1,6 Hz, 1H, H-5), 7,14 (d, J = 7,2 Hz, 1H, H-6) ppm.

δ_{C} (CDCl₃, 100,6 MHz): 14,09 (O(CH₂)₇CH₃), 15,80 (PhCH₃), 22,68 (CH₂), 24,13 (CH(CH₃)₂), 26,19 (CH₂), 29,29 (CH₂), 29,39 (CH₂), 29,46 (CH₂), 31,85 (CH₂), 34,16 (CH(CH₃)₂), 67,83 (OCH₂(CH₂)₆CH₃), 109,39 (C-3), 117,73 (C-5), 124,10 (C-1), 130,31 (C-6), 147,75 (C-4), 157,19 (C-2) ppm.

[2c] 2-(Dodeciloxi)-4-isopropil-1-metilbenzeno

A uma solução de carvacrol **1**, 5-isopropil-2-metilfenol, (105 μL ; 0,7 mmol; 1 equiv) em acetonitrilo (4 mL) adicionou-se carbonato de césio (1,09 g; 3,3 mmol; 5 equiv) e 1-bromododecano (175 μL ; 0,7 mmol; 1,1 equiv). A mistura reacional foi agitada, à temperatura de 65°C, durante 6 horas, sendo a reação monitorizada por TLC em éter de petróleo. Após esse período, filtrou-se a mistura reacional, lavou-se o sólido com acetonitrilo, evaporou-se o solvente a pressão reduzida e com o resíduo obtido efetuou-se cromatografia em coluna, usando éter de petróleo e DCM, misturas de polaridade crescente, como eluente. O composto **2c** foi obtido como um óleo incolor.

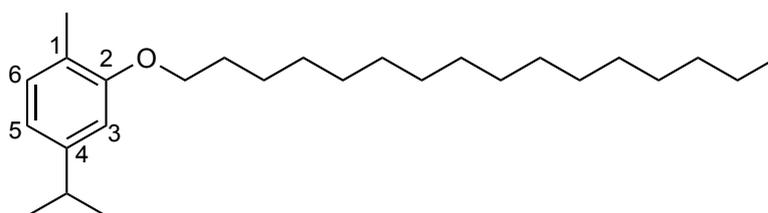
η = 62% (0,131g)

R_f = 0,78 (éter de petróleo)

δ_{H} (CDCl₃, 400 MHz): 0,90-0,95 (m, 3H, OCH₂CH₂CH₂(CH₂)₈CH₃), 1,29 (d, 6H, J = 6,8 Hz, CH(CH₃)₂), 1,35-1,42 (m, 16H, OCH₂CH₂CH₂(CH₂)₈CH₃), 1,49-1,56 (m, 2H, OCH₂CH₂CH₂(CH₂)₈CH₃), 1,80-1,87 (m, 2H, OCH₂CH₂CH₂(CH₂)₈CH₃), 2,23 (s, 3H, PhCH₃), 2,85-2,95 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 4,00 (t, J = 6,8 Hz, 2H, OCH₂CH₂CH₂(CH₂)₈CH₃), 6,73 (d, J = 1,6 Hz, 1H, H-3), 6,76 (dd, J = 7,6 e 1,6 Hz, 1H, H-5), 7,09 (d, J = 7,6 Hz, 1H, H-6) ppm.

δ_{C} (CDCl₃, 100,6 MHz): 14,11 (O(CH₂)₁₁CH₃), 15,81 (PhCH₃), 22,69 (CH₂), 24,13 (CH(CH₃)₂), 26,18 (CH₂), 29,36 (CH₂), 29,42 (CH₂), 29,45 (CH₂), 29,62 (2xCH₂), 29,66 (CH₂), 29,69 (CH₂), 31,93 (CH₂), 34,15 (CH(CH₃)₂), 67,86 (OCH₂(CH₂)₁₀CH₃), 109,43 (C-3), 117,73 (C-5), 124,12 (C-1), 130,30 (C-6) 147,77 (C-4), 157,18 (C-2) ppm.

[2d] 2-(Hexadeciloxi)-4-isopropil-1-metilbenzeno



A uma solução de carvacrol **1**, 5-isopropil-2-metilfenol, (105 μL ; 0,7 mmol; 1 equiv) em acetonitrilo (5 mL) adicionou-se carbonato de césio (1,07 g; 3,3 mmol; 5 equiv) e 1-bromoexadecano (230 μL ; 0,7 mmol; 1,1 equiv). A mistura reacional foi agitada, à temperatura de 65°C, durante 6 horas, sendo a reação monitorizada por TLC em DCM/éter de petróleo (1:1). Após esse período, filtrou-se a mistura

reacional, lavou-se o sólido com acetonitrilo e evaporou-se o solvente a pressão reduzida. O composto **2d** foi obtido como um sólido branco.

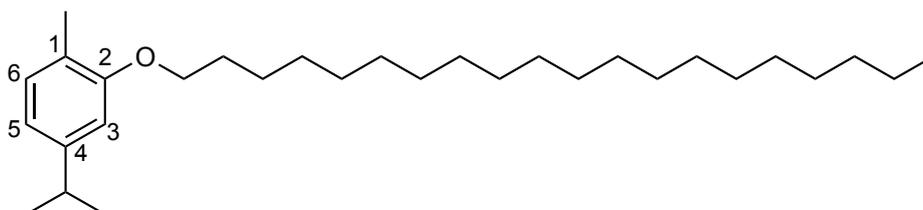
$\eta = 43\%$ (0,111g)

$R_f = 0,91$ (DCM/éter de petróleo 1:1)

δ_H (CDCl₃, 400 MHz): 0,95 (t, $J = 6,4$ Hz, 3H, OCH₂CH₂CH₂(CH₂)₁₂CH₃), 1,31 (d, $J = 6,8$ Hz, 6H, CH(CH₃)₂), 1,33-1,46 (m, 24H, OCH₂CH₂CH₂(CH₂)₁₂CH₃), 1,51-1,58 (m, 2H, OCH₂CH₂CH₂(CH₂)₁₂CH₃), 1,82-1,89 (m, 2H, OCH₂CH₂CH₂(CH₂)₁₂CH₃), 2,25 (s, 3H, PhCH₃), 2,87-2,97 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 4,02 (t, $J = 6,4$ Hz, 2H, OCH₂CH₂CH₂(CH₂)₁₂CH₃), 6,75 (d, $J = 1,6$ Hz, 1H, H-3), 6,78 (dd, $J = 7,6$ e $1,6$ Hz, 1H, H-5), 7,11 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H, H-6) ppm.

δ_C (CDCl₃, 100,6 MHz): 14,11 (O(CH₂)₁₅CH₃), 15,81 (PhCH₃), 22,71 (CH₂), 24,14 (CH(CH₃)₂), 26,19 (CH₂), 29,39 (CH₂), 29,44 (CH₂), 29,47 (CH₂), 29,64 (CH₂), 29,69 (CH₂), 29,72 (6xCH₂), 31,95 (CH₂), 34,16 (CH(CH₃)₂), 67,84 (OCH₂(CH₂)₁₄CH₃), 109,41 (C-3), 117,73 (C-5), 124,11 (C-1), 130,31 (C-6), 147,75 (C-4), 157,19 (C-2) ppm.

[**2e**] 2-(Icosiloxi)-4-isopropil-1-metilbenzeno



A uma solução de carvacrol **1**, 5-isopropil-2-metilfenol, (105 μ L; 0,7 mmol; 1 equiv) em acetonitrilo (4 mL) adicionou-se carbonato de céσιο (1,09 g; 3,3 mmol; 5 equiv) e 1-bromoeicosano (0,265 g; 0,7 mmol; 1,1 equiv). A mistura reacional foi agitada, à temperatura de 65°C, durante 5 horas, sendo a reação monitorizada por TLC em éter de petróleo. Após esse período, filtrou-se a mistura reacional, lavou-se o sólido com acetonitrilo e evaporou-se o solvente a pressão reduzida. O composto **2e** foi obtido como um sólido amarelo.

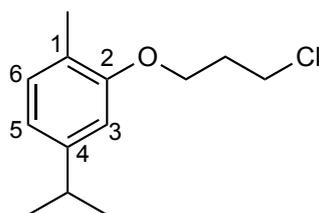
$\eta = 25\%$ (0,070g)

$R_f = 0,70$ (éter de petróleo)

δ_{H} (CDCl₃, 400 MHz): 0,91 (t, J = 6,4 Hz, 3H, OCH₂CH₂(CH₂)₁₇CH₃), 1,27 (d, J = 7,2 Hz, 6H, CH(CH₃)₂), 1,29-1,53 (m, 34H, OCH₂CH₂(CH₂)₁₇CH₃), 1,79-1,86 (m, 2H, OCH₂CH₂(CH₂)₁₇CH₃), 2,22 (s, 3H, PhCH₃), 2,83-2,94 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 3,99 (t, J = 6,4 Hz, 2H, OCH₂CH₂(CH₂)₁₇CH₃), 6,71 (d, J = 1,6 Hz, 1H, H-3), 6,74 (dd, J = 7,6 e 1,6 Hz, 1H, H-5), 7,07 (d, J = 7,6 Hz, 1H, H-6) ppm.

δ_{C} (CDCl₃, 100,6 MHz): 14,11 ((CH₂)₁₈CH₃), 15,82 (PhCH₃), 22,70 (CH₂), 24,14 (CH(CH₃)₂), 26,18 (CH₂), 29,38 (CH₂), 29,43 (CH₂), 29,46 (CH₂), 29,63 (CH₂), 29,67 (CH₂), 29,71 (10xCH₂), 31,94 (CH₂), 34,15 (CH(CH₃)₂), 67,87 (OCH₂(CH₂)₁₈CH₃), 109,44 (C-3), 117,73 (C-5), 124,12 (C-4), 130,30 (C-6), 147,77 (C-2), 157,18 (C-1) ppm.

[2f] 2-(3-Cloropropoxi)-4-isopropil-1-metilbenzeno



A uma solução de carvacrol **1**, 5-isopropil-2-metilfenol, (210 μ L; 1,3 mmol; 1 equiv) em acetonitrilo (5 mL) adicionou-se carbonato de césio (2,13 g; 6,5 mmol; 5 equiv) e 1-bromo-3-cloropropano (140 μ L; 1,4 mmol; 1,1 equiv). A mistura reacional foi agitada, à temperatura de 65°C, durante 5 horas, sendo a reação monitorizada por TLC em éter de petróleo. Após esse período, filtrou-se a mistura reacional, lavou-se o sólido com acetonitrilo, evaporou-se o solvente a pressão reduzida e com o resíduo obtido efetuou-se cromatografia em coluna, usando éter de petróleo e DCM, misturas de polaridade crescente, como eluente. O composto **2f** foi obtido como um óleo incolor.

η = 57% (0,175g)

R_f = 0,29 (éter de petróleo)

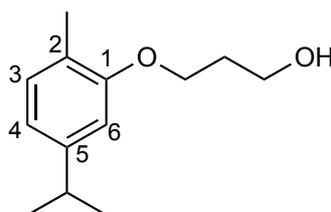
δ_{H} (CDCl₃, 400 MHz): 1,26 (d, J = 6,8 Hz, 6H, CH(CH₃)₂), 2,20 (s, 3H, PhCH₃), 2,25-2,31 (m, 2H, OCH₂CH₂CH₂Cl), 2,83-2,94 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 3,80 (t, J = 6,4 Hz, 2H, OCH₂CH₂CH₂Cl), 4,14 (t, J = 6,0 Hz, 2H, OCH₂CH₂CH₂Cl), 6,73 (d, J = 1,6 Hz, 1H, H-3), 6,77 (dd, J = 7,6 e 1,6 Hz, 1H, H-5), 7,08 (d, J = 7,6 Hz, 1H, H-6) ppm.

δ_c (CDCl₃, 100,6 MHz): 15,76 (PhCH₃), 24,11 (CH(CH₃)₂), 32,56 (OCH₂CH₂CH₂Cl), 34,13 (CH(CH₃)₂), 41,70 (OCH₂CH₂CH₂Cl), 64,16 (OCH₂CH₂CH₂Cl), 109,49 (C-3), 118,27 (C-5), 124,07 (C-4), 130,46 (C-6), 147,96 (C-2), 156,66 (C-1) ppm.

m/z (ESI-TOF) Valor obtido: [M⁺ +1] 227,1198. Valor calculado para C₁₃H₂₀³⁵ClO: 227,1197.

m/z (ESI-TOF) Valor obtido: [M⁺ +1] 229,1170. Valor calculado para C₁₃H₂₀³⁷ClO: 229,1171.

[2g] 3-(5-isopropil-2-metilfenoxi)propano-1-ol



A uma solução de carvacrol **1**, 5-isopropil-2-metilfenol, (105 μ L; 0,7 mmol; 1 equiv) em acetonitrilo (3 mL) adicionou-se carbonato de céσιο (1,04 g; 3,2 mmol; 5 equiv) e 3-bromo-1-propanol (65 μ L; 0,7 mmol; 1,1 equiv). A mistura reacional foi agitada, à temperatura de 65°C, durante 6 horas, sendo a reação monitorizada por TLC em DCM. Após esse período, filtrou-se a mistura reacional, lavou-se o sólido com acetonitrilo, evaporou-se o solvente a pressão reduzida e com o resíduo obtido efetuou-se cromatografia em coluna, usando éter de petróleo e DCM, misturas de polaridade crescente, como eluente. O composto **2g** foi obtido como um óleo incolor.

η = 8% (0,011g)

Rf = 0,40 (DCM/éter de petróleo 1:1)

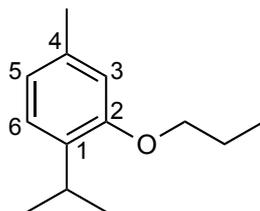
δ_H (CDCl₃, 400 MHz): 1,24 (d, J = 6,8 Hz, 6H, CH(CH₃)₂), 2,15-2,22 (m, 5H, OCH₂CH₂CH₂OH e PhCH₃), 2,81-2,91 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 4,09 (t, J = 6 Hz, 2H, OCH₂CH₂CH₂OH), 4,38 (t, J = 6 Hz, 2H, OCH₂CH₂CH₂OH), 6,69 (d, J = 1,6 Hz, 1H, H-6), 6,74 (dd, J = 7,6 e 1,6 Hz, 1H, H-4), 7,06 (d, J = 7,6 Hz, 1H, H-3) ppm.

δ_c (CDCl₃, 100,6 MHz): 15,76 (PhCH₃), 24,11 (CH(CH₃)₂), 28,85 (OCH₂CH₂CH₂OH), 34,12 (CH(CH₃)₂), 63,77 (OCH₂CH₂CH₂OH), 64,93 (OCH₂CH₂CH₂OH), 109,32 (C-6), 118,18 (C-4), 124,08 (C-2), 130,43 (C-3), 147,89 (C-5), 156,68 (C-1) ppm.

m/z (ESI-TOF) Valor obtido: [M⁺ +1] 209,1539. Valor calculado para C₁₃H₂₀O₂: 209,1536.

4.3. Síntese dos derivados *O*-alquilados do timol 4a-f

[4a] 1-Isopropil-4-metil-2-propoxibenzeno



A uma solução de timol **3**, 2-isopropil-5-metilfenol, (0,105 g; 0,7 mmol; 1 equiv) em acetonitrilo (5 mL) adicionou-se carbonato de céσιο (1,08 g; 3,3 mmol; 5 equiv) e 1-bromopropano (122 μ L; 0,7 mmol; 1,1 equiv). A mistura reacional foi agitada, à temperatura de 65°C, durante 4,5 horas, sendo a reação monitorizada por TLC em éter de petróleo. Após esse período, filtrou-se a mistura reacional, lavou-se o sólido com acetonitrilo e evaporou-se o solvente a pressão reduzida. O composto **4a** foi obtido como um óleo amarelo claro.

η = 73% (0,098g)

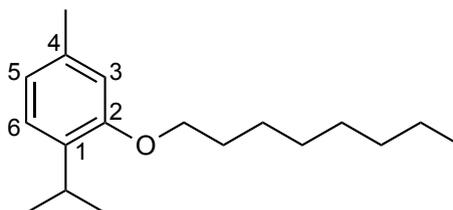
R_f = 0,78 (éter de petróleo)

δ_{H} (CDCl₃, 400 MHz): 1,14 (t, J = 7,2 Hz, 3H, OCH₂CH₂CH₃), 1,29 (d, J = 7,2 Hz, 6H, CH(CH₃)₂), 1,83-1,96 (m, 2H, OCH₂CH₂CH₃), 2,39 (s, 3H, PhCH₃), 3,33-3,44 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 3,99 (t, J = 6,4 Hz, 2H, OCH₂CH₂CH₃), 6,74 (d, J = 1,6 Hz, 1H, H-3), 6,80 (dd, J = 7,6 e 1,6 Hz, 1H, H-5), 7,16 (d, J = 7,6 Hz, 1H, H-6) ppm.

δ_{C} (CDCl₃, 100,6 MHz): 10,60 (OCH₂CH₂CH₃), 21,20 (PhCH₃), 22,54 (CH(CH₃)₂), 22,65 (OCH₂CH₂CH₃), 26,48 (CH(CH₃)₂), 69,19 (OCH₂CH₂CH₃), 112,01 (C-3), 120,67 (C-5), 125,60 (C-6), 133,82 (C-1), 135,99 (C-4), 156,02 (C-2) ppm.

m/z (ESI-TOF) Valor obtido: [M⁺ + 1] 193,1586. Valor calculado para C₁₃H₂₀O: 193,1587.

[4b] 1-Isopropil-4-metil-2-(octiloxi)benzeno



A uma solução de timol **3**, 2-isopropil-5-metilfenol, (0,120 g; 0,8 mmol; 1 equiv) em acetonitrilo (4 mL) adicionou-se carbonato de cézio (1,15 g; 3,5 mmol; 5 equiv) e 1-bromooctano (170 μ L; 0,7 mmol; 1,1 equiv). A mistura reacional foi agitada, à temperatura de 65°C, durante 5 horas, sendo a reação monitorizada por TLC em éter de petróleo. Após esse período, filtrou-se a mistura reacional, lavou-se o sólido com acetonitrilo e evaporou-se o solvente a pressão reduzida. O composto **4b** foi obtido como um óleo amarelo claro.

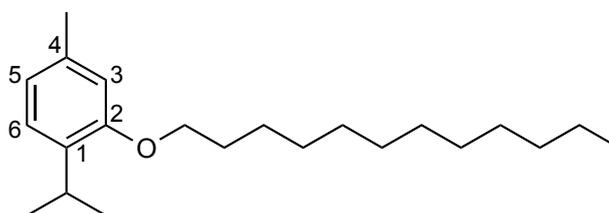
η = 90% (0,190g)

Rf = 0,84 (éter de petróleo)

δ_{H} (CDCl₃, 400 MHz): 1,09 (t, J = 7,2 Hz, 3H, OCH₂CH₂CH₂(CH₂)₄CH₃), 1,40 (d, J = 6,8 Hz, 6H, CH(CH₃)₂), 1,48-1,59 (m, 8H, OCH₂CH₂CH₂(CH₂)₄CH₃), 1,67 (quint, J = 7,2 Hz, 2H, OCH₂CH₂CH₂(CH₂)₄CH₃), 1,94-2,01 (m, 2H, OCH₂CH₂CH₂(CH₂)₄CH₃), 2,49 (s, 3H, PhCH₃), 3,44-3,54 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 4,11 (t, J = 6,4 Hz, 2H, OCH₂CH₂CH₂(CH₂)₄CH₃), 6,83 (d, J = 1,6 Hz, 1H, H-3), 6,90 (dd, J = 7,6 e 1,6 Hz, 1H, H-5), 7,26 (d, J = 7,6 Hz, 1H, H-6) ppm.

δ_{C} (CDCl₃, 100,6 MHz): 14,09 (O(CH₂)₇CH₃), 21,31 (PhCH₃), 22,69 (CH₂), 22,73 (CH(CH₃)₂), 26,24 (CH₂), 26,66 (CH(CH₃)₂), 29,30 (CH₂), 29,35 (CH₂), 29,48 (CH₂), 31,86 (CH₂), 67,76 (OCH₂(CH₂)₆CH₃), 112,11 (C-3), 120,83 (C-5), 125,75 (C-6), 134,02 (C-1), 136,10 (C-4), 156,22 (C-2) ppm.

[**4c**] 2-(Dodeciloxi)-1-isopropil-4-metilbenzeno



A uma solução de timol **3**, 2-isopropil-5-metilfenol, (0,100 g; 0,7 mmol; 1 equiv) em acetonitrilo (4 mL) adicionou-se carbonato de cézio (1,08 g; 0,7 mmol; 5 equiv) e 1-bromododecano (175 μ L; 0,7 mmol; 1,1 equiv). A mistura reacional foi agitada, à temperatura de 65°C, durante 5 horas, sendo a reação monitorizada por TLC em éter de petróleo. Após esse período, filtrou-se a mistura reacional, lavou-se o sólido com acetonitrilo e evaporou-se o solvente a pressão reduzida. O composto **4c** foi obtido como um óleo amarelo claro.

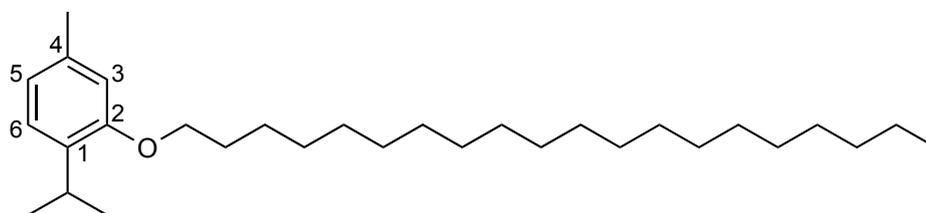
$\eta = 93\%$ (0,197g)

Rf= 0,82 (éter de petróleo)

δ_H (CDCl₃, 400 MHz): 1,05 (t, $J = 6,8$ Hz, 3H, OCH₂CH₂CH₂(CH₂)₈CH₃), 1,37 (d, $J = 6,0$ Hz, 6H, CH(CH₃)₂), 1,41-1,56 (m, 16H, OCH₂CH₂CH₂(CH₂)₈CH₃), 1,61-1,68 (m, 2H, OCH₂CH₂CH₂(CH₂)₈CH₃), 1,92-1,99 (m, 2H, OCH₂CH₂CH₂(CH₂)₈CH₃), 2,50 (s, 3H, PhCH₃), 3,41-3,51 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 4,09 (t, $J = 6,4$ Hz, 2H, OCH₂CH₂CH₂(CH₂)₈CH₃), 6,80 (d, $J = 1,6$ Hz, 1H, H-3), 6,87 (dd, $J = 7,6$ Hz, $J = 1,6$ Hz, 1H, H-5), 7,23 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H, H-6) ppm.

δ_C (CDCl₃, 100,6 MHz): 14,11 (O(CH₂)₁₁CH₃), 21,32 (PhCH₃), 22,73 (CH₂), 22,75 (CH(CH₃)₂), 26,25 (CH₂), 26,67 (CH(CH₃)₂), 29,41 (2xCH₂), 29,49 (CH₂), 29,66 (2xCH₂), 29,70 (CH₂), 29,73 (CH₂), 31,97 (CH₂), 67,78 (OCH₂(CH₂)₁₀CH₃), 112,12 (C-3), 120,84 (C-5), 125,76 (C-6), 134,03 (C-4), 136,11 (C-1), 156,23 (C-2) ppm.

[4d] 2-(Icosiloxi)-1-isopropil-4-metilbenzeno



A uma solução de timol **3**, 2-isopropil-5-metilfenol, (0,103 g; 0,7 mmol; 1 equiv) em acetonitrilo (4 mL) adicionou-se carbonato de céσιο (1,07 g; 3,3 mmol; 5 equiv) e 1-bromoeicosano (0,250 g; 0,7 mmol; 1,1 equiv). A mistura reacional foi agitada, à temperatura de 65°C, durante 5 horas, sendo a reação monitorizada por TLC em éter de petróleo. Após esse período, filtrou-se a mistura reacional, lavou-se o sólido com acetonitrilo, evaporou-se o solvente a pressão reduzida e com o resíduo obtido efetuou-se cromatografia em coluna, usando éter de petróleo e DCM, misturas de polaridade crescente, como eluente. O composto **4d** foi obtido como um sólido branco.

$\eta = 23\%$ (0,068 g)

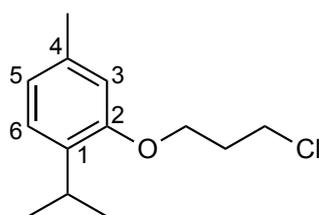
Rf= 0,91 (éter de petróleo)

δ_H (CDCl₃, 400 MHz): 0,95 (t, $J = 6,4$ Hz, 3H, O(CH₂)₁₉CH₃), 1,26 (d, $J = 6,8$ Hz, 6H, CH(CH₃)₂), 1,32-1,46 (m, 32H, OCH₂CH₂CH₂(CH₂)₁₆CH₃), 1,50-1,58 (m, 2H, OCH₂CH₂CH₂(CH₂)₁₆CH₃), 1,82-1,89 (m, 2H, OCH₂CH₂CH₂(CH₂)₁₆CH₃), 2,37 (s, 3H, PhCH₃), 3,30-3,40 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 4,00 (t, $J = 6,4$ Hz, 2H,

$\text{OCH}_2(\text{CH}_2)_{18}\text{CH}_3$), 6,71 (d, $J = 1,6$ Hz, 1H, H-3), 6,78 (dd, $J = 7,6$ e 1,6 Hz, 1H H-5), 7,14 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H, H-6) ppm.

δ_c (CDCl_3 , 100,6 MHz): 14,12 ($\text{OCH}_2(\text{CH}_2)_{18}\text{CH}_3$), 21,34 (PhCH_3), 22,71 (CH_2), 22,75 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 26,23 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 26,65 (CH_2), 29,39 (CH_2), 29,47 (CH_2), 29,63 (CH_2), 29,73 ($12 \times \text{CH}_2$), 31,95 (CH_2), 67,81 ($\text{OCH}_2(\text{CH}_2)_{18}\text{CH}_3$), 112,15 (C-3), 120,81 (C-5), 125,77 (C-6), 134,05 (C-1), 136,15 (C-4), 156,22 (C-2) ppm.

[4e] 2-(3-Cloropropoxi)-1-isopropil-4-metilbenzeno



A uma solução de timol **3**, 2-isopropil-5-metilfenol, (0,254 g; 1,7 mmol; 1 equiv) em acetonitrilo (5 mL) adicionou-se carbonato de césio (2,75 g; 8,3 mmol; 5 equiv) e 1-bromo-3-cloropropano (180 μL ; 1,8 mmol; 1,1 equiv). A mistura reacional foi agitada, à temperatura de 65°C, durante 24 horas, sendo a reação monitorizada por TLC em éter de petróleo. Após esse período, filtrou-se a mistura reacional, lavou-se o sólido com acetonitrilo, evaporou-se o solvente a pressão reduzida e com o resíduo obtido efetuou-se cromatografia em coluna, usando éter de petróleo e DCM, misturas de polaridade crescente, como eluente. O composto **4e** foi obtido como um óleo incolor.

$\eta = 30\%$ (0,116 g)

$R_f = 0,28$ (éter de petróleo)

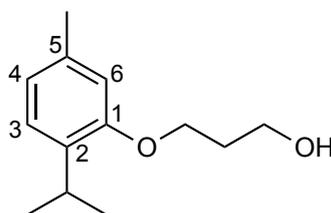
δ_H (CDCl_3 , 400 MHz): 1,29 (d, $J = 7,2$ Hz, 6H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 2,33 (quint, $J = 6,4$ Hz, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$), 2,40 (s, 3H, PhCH_3), 3,30-3,40 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 3,84 (t, $J = 6,4$ Hz, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$), 4,18 (t, $J = 6$ Hz, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$), 6,76 (d, $J = 1,6$ Hz, 1H, H-3), 6,83 (dd, $J = 7,6$ e 1,6 Hz, 1H, H-5), 7,18 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H, H-6) ppm.

δ_c (CDCl_3 , 100,6 MHz): 21,27 (PhCH_3), 22,72 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 26,57 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 32,49 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$), 41,67 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$), 64,11 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$), 112,19 (C-3), 121,31 (C-5), 125,86 (C-6), 133,93 (C-1), 136,29 (C-4), 155,63 (C-2) ppm.

m/z (ESI-TOF) Valor obtido: $[M^+ + 1]$ 227,1196. Valor calculado para $C_{13}H_{20}^{35}ClO$: 227,1197.

m/z (ESI-TOF) Valor obtido: $[M^+ + 1]$ 229,1164. Valor calculado para $C_{13}H_{20}^{37}ClO$: 229,1171.

[4f] 3-(2-Isopropil-5-metilfenoxi)propan-1-ol



A uma solução de timol **3**, 2-isopropil-5-metilfenol, (0,106 g; 0,7 mmol; 1 equiv) em acetonitrilo (3 mL) adicionou-se carbonato de céσιο (1,07 g; 3,3 mmol; 5 equiv) e 3-bromo-1-propanol (65 μ L; 0,7 mmol; 1,1 equiv). A mistura reacional foi agitada, à temperatura de 65°C, durante 6 horas, sendo a reação monitorizada por TLC em DCM. Após esse período, filtrou-se a mistura reacional, lavou-se o sólido com acetonitrilo, evaporou-se o solvente a pressão reduzida e com o resíduo obtido efetuou-se cromatografia em coluna, usando éter de petróleo e DCM, misturas de polaridade crescente, como eluente. O composto **4f** foi obtido como um óleo amarelo claro.

η = 13% (0,019 g)

Rf = 0,47 (DCM/éter de petróleo 1:1)

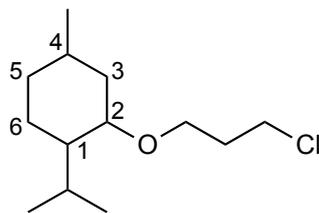
δ_H ($CDCl_3$, 400 MHz): 1,21 (d, J = 7,2 Hz, 6H, $CH(CH_3)_2$), 2,16-2,23 (m, 2H, $OCH_2CH_2CH_2OH$), 2,33 (s, 3H, $PhCH_3$), 3,23-3,33 (m, 1H, $CH(CH_3)_2$), 4,07 (t, J = 6,0 Hz, 2H, $OCH_2CH_2CH_2OH$), 4,38 (t, J = 6,4 Hz, 2H, $OCH_2CH_2CH_2OH$), 6,67 (d, J = 1,6 Hz, 1H, H-6), 6,76 (dd, J = 8,0 e 1,6 Hz, 1H, H-4), 7,10 (d, J = 8,0 Hz, 1H, H-3) ppm.

δ_C ($CDCl_3$, 100,6 MHz): 21,30 ($PhCH_3$), 22,73 ($CH(CH_3)_2$), 26,54 ($CH(CH_3)_2$), 28,87 ($OCH_2CH_2CH_2OH$), 63,80 ($OCH_2CH_2CH_2OH$), 64,94 ($OCH_2CH_2CH_2OH$), 112,11 (C-6), 121,24 (C-4), 125,87 (C-3), 134,00 (C-2), 136,28 (C-5), 155,67 (C-1) ppm.

m/z (ESI-TOF) Valor obtido: $[M^+ + 1]$ 209,1530. Valor calculado para $C_{13}H_{20}O_2$: 209,1536.

4.4 Síntese do derivado *O*-alquilado do mentol **6**

[6] 2-(3-Cloropropoxi)-1-isopropil-4-metilcicloexano

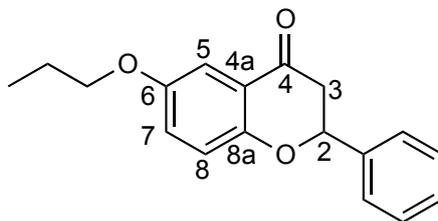


A uma solução de mentol **5**, 2-isopropil-5-metilcicloexanol, (0,192 g; 1,2 mmol; 1 equiv) em acetonitrilo (5 mL) adicionou-se carbonato de céσιο (2,09 g; 6,4 mmol; 5 equiv) e 1-bromo-3-cloropropano (140 μ L; 1,4 mmol; 1,1 equiv). A mistura reacional foi agitada, à temperatura de 65°C, durante 7 dias, sendo a reação monitorizada por ^1H RMN (CDCl_3). Após esse período, filtrou-se a mistura reacional, lavou-se o sólido com acetonitrilo, evaporou-se o solvente a pressão reduzida e com o resíduo obtido efetuou-se cromatografia em coluna, usando éter de petróleo e DCM, misturas com polaridade crescente, como eluente. O composto **6** foi obtido como um óleo incolor.

η = 5% (0,015 g)

δ_{H} (CDCl_3 , 400 MHz): 0,80 (d, J = 7,2 Hz, 3H, CH_3), 0,92 (t, J = 7,2 Hz, 6H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1,01–1,10 (m, 2H, CH_2), 1,38–1,55 (m, 3H, CH_2 e CH), 1,66–1,72 (m, 2H, CH_2), 1,90–2,01 (m, 1H, CH), 2,06–2,11 (m, 1H, CH), 2,14 (quint, J = 6,4 Hz, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$), 3,64 (t, J = 6,4 Hz, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$), 4,24–4,33 (m, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$), 4,50–4,56 (m, 1H, CH_2) ppm.

δ_{C} (CDCl_3 , 100,6 MHz): 16,25 (CH_3), 20,69 ($\text{CH}(\text{CH}_3)$), 21,95 ($\text{CH}(\text{CH}_3)$), 23,31 (C-6), 26,08 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 31,39 (C-4), 31,67 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$), 34,05 (C-5), 40,74 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$), 40,98 (C-3), 46,99 (C-1), 64,27 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$), 78,55 (C-2) ppm.

4.5. Síntese dos derivados *O*-alquilados da 6-hidroxi flavanona **8a,b****[8a]** 2-Fenil-6-propoxicroman-4-ona

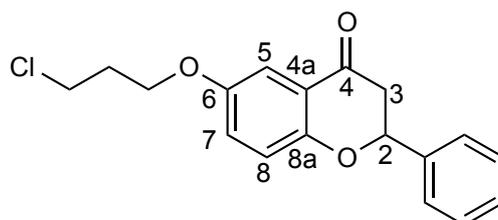
A uma solução de 6-hidroxi flavanona **7**, 6-hidroxi-2-fenilcroman-4-ona, (0,100 g; 0,4 mmol; 1 equiv) em acetonitrilo (4 mL) adicionou-se hidróxido de céσιο (0,129 g; 0,9 mmol; 2 equiv), TBAI (0,165 g; 0,4 mmol; 1,1 equiv) e 1-bromopropano (45 μ L; 0,5 mmol; 1,1 equiv), na presença de peneiros moleculares (6). A mistura reacional foi agitada, à temperatura ambiente, durante 3 dias, sendo a reação monitorizada por TLC em DCM. Após esse período, filtrou-se a mistura reacional, lavou-se o sólido com acetonitrilo, evaporou-se o solvente a pressão reduzida e com o resíduo obtido efetuou-se cromatografia em coluna, usando éter de petróleo e DCM, misturas de polaridade crescente, como eluente. O composto **8a** foi obtido como sólido castanho.

η = 15% (0,018 g)

R_f = 0,36 (DCM)

δ_H (CDCl₃, 400 MHz): 1,05 (t, J = 7,6 Hz, 3H, OCH₂CH₂CH₃), 1,77-1,86 (m, 2H, OCH₂CH₂CH₃), 2,87-2,92 (m, 1H, H-3), 3,04-3,12 (m, 1H, H-3), 3,94 (t, J = 6,8 Hz, 2H, OCH₂CH₂CH₃), 5,30-5,47 (m, 1H, H-2), 7,00 (d, J = 8,8 Hz, 1H, H-8), 7,14 (dd, J = 9,2 e 3,2 Hz, 1H, H-7), 7,36 (d, J = 3,2 Hz, 1H, H-5), 7,39-7,47 (m, 5H, H-Ph) ppm.

δ_C (CDCl₃, 100,6 MHz): 10,47 (OCH₂CH₂CH₃), 22,50 (OCH₂CH₂CH₃), 44,61 (C-3), 70,17 (OCH₂CH₂CH₃), 79,68 (C-2), 108,25 (C-5), 119,32 (C-8), 120,75 (C-4a), 125,78 (C-7), 126,12 (Ph-C2 e Ph-C6), 128,70 (Ph-C4), 128,81 (Ph-C3 e Ph-C5), 138,88 (Ph-C1), 153,75 (C-6), 156,12 (C-8a), 192,11 (C-4) ppm.

[8b] 6-(3-Cloropropoxi)-2-fenilcroman-4-ona

A uma solução de 6-hidroxi-flavanona **7**, 6-hidroxi-2-fenilcroman-4-ona, (0,050 g; 0,2 mmol; 1 equiv) em acetonitrilo (3 mL) adicionou-se hidróxido de céσιο (0,066 g; 0,4 mmol; 2 equiv), TBAI (0,082 g; 0,2 mmol; 1,1 equiv.) e 1-bromo-3-cloropropano (23 μ L; 0,2 mmol; 1,1 equiv), na presença de peneiros moleculares (6). A mistura reacional foi agitada, à temperatura ambiente, durante 24 horas, sendo a reação monitorizada por TLC em DCM). Após esse período, filtrou-se a mistura reacional, lavou-se o sólido com acetonitrilo, evaporou-se o solvente a pressão reduzida e com o resíduo obtido efetuou-se cromatografia em coluna, usando éter de petróleo e DCM, misturas de polaridade crescente, como eluente. O composto **8b** foi obtido como um sólido castanho claro.

η = 19% (0,012g)

R_f = 0,85 (DCM)

δ_{H} (CDCl₃, 400 MHz): 2,23-2,28 (m, 2H, OCH₂CH₂CH₂Cl), 2,86-2,91 (m, 1H, H-3), 3,04-3,11 (m, 1H, H-3), 3,75 (t, J = 8 Hz, 2H, OCH₂CH₂CH₂Cl), 4,14 (t, J = 8 Hz, 2H, OCH₂CH₂CH₂Cl), 5,43-5,47 (m, 1H, H-2), 7,01 (d, J = 8,8 Hz, 1H, H-8), 7,13 (dd, J = 8,8 e 3,2 Hz, 1H, H-7), 7,38-7,50 (m, 6H, Ph e H-5) ppm.

δ_{C} (CDCl₃, 100,6 MHz): 32,15 (OCH₂CH₂CH₂Cl), 41,37 (OCH₂CH₂CH₂Cl), 44,53 (C-3), 64,93 (OCH₂CH₂CH₂Cl), 79,69 (C-2), 108,46 (C-5), 119,45 (C-8), 120,78 (C-4a), 125,58 (C-7), 126,11 (C-2 Ph e C-6 Ph), 128,72 (C-4 Ph), 128,81 (C-5 Ph e C-3 Ph), 138,78 (C-1 Ph), 153,30 (C-6), 156,34 (C-8a), 191,96 (C-4) ppm.

Capítulo 5 – Referências Bibliográficas

- (1) Cornelius, G.; Lohiya, G.; Sharma, R. Biopesticides: an alternative approach for agricultural output (food) and environmental safety. *Int. J. Eng. Res. Technol.* **2019**, *8*(11), 578–580.
- (2) Tijjani, A.; Bashir, K. A.; Mohammed, I.; Muhammad, A.; Gambo, A.; Musa, H. Biopesticides for pest control: a review. *J. Biopestic. Agric.* **2016**, *3*(1), 6–13.
- (3) Teixeira, R. R.; Gazolla, P. A. R.; Silva, A. M.; Borsodi, M. P. G.; Bergmann, B. R.; Ferreira, R. S.; Vaz, B. G.; Vasconcelos, G. A.; Lima, W. P. Synthesis and leishmanicidal activity of eugenol derivatives bearing 1,2,3-triazole functionalities. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *146*, 274–286.
- (4) Gerwick, B. C.; Sparks, T. C. Natural products for pest control: an analysis of their role, value and future. *Pest Manag. Sci.* **2014**, *70*(8), 1–17.
- (5) Chandler, D.; Bailey, A. S.; Mark Tatchell, G.; Davidson, G.; Greaves, J.; Grant, W. P. The development, regulation and use of biopesticides for integrated pest management. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **2011**, *366*, 1987–1998.
- (6) Glare, T.; Caradus, J.; Gelernter, W.; Jackson, T.; Keyhani, N.; Köhl, J.; Marrone, P.; Morin, L.; Stewart, A. Have biopesticides come of age? *Trends Biotechnol.* **2012**, *30*(5), 250–258.
- (7) El-Abbassi, A.; Saadaoui, N.; Kiai, H.; Raiti, J.; Hafidi, A. Potential applications of olive mill wastewater as biopesticide for crops protection. *Sci. Total Environ.* **2017**, *576*, 10–21.
- (8) Oliveira, J. L.; Campos, E. V. R.; Camara, M. C.; Della Vechia, J. F.; Matos, S. T. S.; Andrade, D. J.; Gonçalves, K. C.; Nascimento, J.; Polanczyk, R. A.; Araújo, D. R.; Fraceto, L. F. Hydrogels containing botanical repellents encapsulated in zein nanoparticles for crop protection. *ACS Appl. Nano Mater.* **2020**, *3*, 207–217.
- (9) Mossa, A. T. H. Green pesticides: essential oils as biopesticides in insect-pest management. *J. Environ. Sci. Technol.* **2016**, *9*(5), 354–378.
- (10) Fountain, E. D.; Wratten, S. D. Conservation biological control and biopesticides in agricultural. In *Encyclopedia of Ecology*; Fath, B., Ed.; Elsevier: Nova Zelândia, 2013; pp 377–381.
- (11) Isman, M. B. Botanical insecticides: a global perspective. In *Biopesticides: State of the Art and Future Opportunities*; Gross, A. D., Coats, L. R., Duke, S. O., Seiber, J. N., Eds.; ACS Symposium Series; American Chemical Society: Washington, DC, 2014; Vol. 1172, pp 21–30.
- (12) Damalas, C. A.; Koutroubas, S. D. Current status and recent developments in biopesticide use. *Agriculture* **2018**, *8*(13), 1–6.
- (13) Garay, J.; Brennan, T.; Bon, D. Review: essential oils a viable pest control alternative. *Int. J. Ecotoxicol. Ecobiol.* **2020**, *5*(2), 13–22.
- (14) Doughari, J. Phytochemicals: extraction methods, basic structures and mode of action as potential chemotherapeutic agents. In *Phytochemicals - A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health*; Rao, V., Ed.; InTech: Croácia, 2012; pp 1–33.
- (15) Kabera, J.; Semana, E.; Mussa, A.; He, X. Plant secondary metabolites: biosynthesis, classification, function and pharmacological properties. *J. Pharm. Pharmacol.* **2014**, *2*(7), 377–392.
- (16) Poutaraud, A.; Michelot-Antalik, A.; Plantureux, S. Grasslands: a source of secondary metabolites for livestock health. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 6535–6553.
- (17) Saxena, M.; Saxena, J.; Nema, R.; Singh, D.; Gupta, A. Phytochemistry of medicinal plants. *Res. Rev. J. Pharmacogn. Phytochem.* **2013**, *1*(6), 168–182.
- (18) Banu, K. S.; Cathrine, L. General techniques involved in phytochemical analysis. *Int. J. Adv. Res. Chem. Sci.* **2015**, *2*(4), 25–32.
- (19) Altemimi, A.; Lakhssassi, N.; Baharlouei, A.; Watson, D. G.; Lightfoot, D. A. Phytochemicals: extraction, isolation, and identification of bioactive compounds from plant extracts. *Plants* **2017**, *6*(42), 1–23.
- (20) Scalbert, A.; Andres-Lacueva, C.; Arita, M.; Kroon, P.; Manach, C.; Urpi-Sarda, M.; Wishart, D. Databases on food phytochemicals and their health-promoting effects. *J. Agric. Food Chem.* **2011**,

- 59 (9), 4331–4348.
- (21) Campos-Vega, R.; Oomah, B. D. Chemistry and classification of phytochemicals. In *Handbook of Plant Food Phytochemicals: Sources, Stability and Extraction*, Tiwari, B. K., Brunton, N. P., Brennan, C. S., Eds.; Wiley-Blackwell: Reino Unido, 2013; pp 7–48.
- (22) Roy, M.; Datta, A. Fundamentals of phytochemicals - focus on phytochemicals. In *Cancer Genetics and Therapeutics*, Roy, M., Datta, A., Eds.; Singapura, 2019; pp 56–69.
- (23) Roberts, M.; Wink, M. Introduction. In *Alkaloids: Biochemistry, Ecology, and Medicinal Applications*, Roberts, M., Wink, M., Eds.; Springer Science & Business Media, 1999; pp 2–5.
- (24) Cheynier, V. Phenolic compounds: from plants to foods. *Phytochem. Rev.* **2012**, *11*, 153–177.
- (25) Topal, F.; Gulcin, I.; Dastan, A.; Guney, M. Novel eugenol derivatives: potent acetylcholinesterase and carbonic anhydrase inhibitors. *Int. J. Biol. Macromol.* **2017**, *94*, 845–851.
- (26) Singh, J.; Jayaprakasha, G. K.; Patil, B. S. Extraction, identification, and potential health benefits of spinach flavonoids: a review. In *Advances in Plant Phenolics: From Chemistry to Human Health*, Jayaprakasha, G. K., Patil, B. S., Gattuso, G., Eds.; American Chemical Society: Washington, DC, 2019; Vol. 1286, pp 107–136.
- (27) Singh, I. Antimicrobials in higher plants: classification, mode of action and bioactivities. *Chem. Biol. Lett.* **2017**, *4* (1), 48–62.
- (28) Ahmed, E.; Arshad, M.; Khan, M. Z.; Amjad, M. S.; Sadaf, H. M.; Riaz, I.; Sabir, S.; Sabaoon, N. A. Secondary metabolites and their multidimensional prospective in plant life. *J. Pharmacogn. Phytochem.* **2017**, *6* (2), 205–214.
- (29) Pervaiz, T.; Songtao, J.; Faghihi, F.; Haider, M. S.; Fang, J. Naturally occurring anthocyanin, structure, functions and biosynthetic pathway in fruit plants. *J. Plant Biochem. Physiol.* **2017**, *5* (2), 1–9.
- (30) Matos, M. J.; Santana, L.; Uriarte, E.; Abreu, O. A.; Molina, E.; Yordi, E. G. Coumarins – an important class of phytochemicals. In *Phytochemicals - Isolation, Characterisation and Role in Human Health*, Rao, V., Rao, L., Eds.; InTech: Croácia, 2015; pp 113–115.
- (31) Boucherle, B.; Peuchmaur, M.; Boumendjel, A.; Haudecoeur, R. Occurrences, biosynthesis and properties of auronones as high-end evolutionary products. *Phytochemistry* **2017**, *142*, 92–111.
- (32) Haudecoeur, R.; Boumendjel, A. Recent advances in the medicinal chemistry of auronones. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19* (18), 2861–2875.
- (33) Rozmer, Z.; Perjési, P. Naturally occurring chalcones and their biological activities. *Phytochem. Rev.* **2016**, *15* (1), 87–120.
- (34) Lu, Y.; Luthria, D. Influence of postharvest storage, processing, and extraction methods on the analysis of phenolic phytochemicals. In *Instrumental Methods for the Analysis and Identification of Bioactive Molecules*, Jayaprakasha, G. K., Patil, B. S., Pellati, F., Eds.; American Chemical Society: Washington DC, 2014; Vol. 1185, pp 3–31.
- (35) El Gharras, H. Polyphenols: food sources, properties and applications - a review. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2009**, *44* (12), 2512–2518.
- (36) Lyu, X.; Lee, J.; Chen, W. N. Potential natural food preservatives and their sustainable production in yeast: terpenoids and polyphenols. *J. Agric. Food Chem.* **2019**, *67*, 4397–4417.
- (37) Monteiro, I. N.; Ferreira, L. O. G.; Oliveira, A. K. M.; Favero, S.; Figueiredo, P. L. B.; Maia, J. G. S.; Monteiro, O. S.; Matias, R. Toxicity of the lippia gracilis essential oil chemotype, pinene-cineole-limonene, on spodoptera frugiperda (lepidoptera: noctuidae). *Int. J. Trop. Insect Sci.* **2020**.
- (38) Karpouhtsis, I.; Pardali, E.; Feggou, E.; Kokkini, S.; Scouras, Z. G.; Mavragani-Tsipidou, P. Insecticidal and genotoxic activities of oregano essential oils. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46* (3), 1111–1115.
- (39) Asbahani, A. El; Miladi, K.; Badri, W.; Sala, M.; Addi, E. H. A.; Casabianca, H.; Mousadik, A. El; Hartmann, D.; Jilale, A.; Renaud, F. N. R.; Elaissari, A. Essential oils: from extraction to

- encapsulation. *Int. J. Pharm.* **2015**, *483*, 220–243.
- (40) Vargas-Méndez, L. Y.; Sanabria-Flórez, P. L.; Saavedra-Reyes, L. M.; Merchan-Arenas, D. R.; Kouznetsov, V. V. Bioactivity of semisynthetic eugenol derivatives against spodoptera frugiperda (lepidoptera: noctuidae) larvae infesting maize in colombia. *Saudi J. Biol. Sci.* **2018**, *26* (7), 1–8.
- (41) Amorati, R.; Foti, M. C.; Valgimigli, L. Antioxidant activity of essential oils. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 10835–10847.
- (42) Dima, C.; Dima, S. Essential oils in foods: extraction, stabilization, and toxicity. *Curr. Opin. Food Sci.* **2015**, *5*, 29–35.
- (43) Isman, M. B. Pesticides based on plant essential oils: phytochemical and practical considerations. In *Medicinal and Aromatic Crops: Production, Phytochemistry, and Utilization*; Zheljzakov, V. D. J., Cantrell, C. L., Eds.; American Chemical Society: Washington, DC, 2016; Vol. 1218, pp 13–26.
- (44) Magierowicz, K.; Górská-Drabik, E.; Sempruch, C. The insecticidal activity of satureja hortensis essential oil and its active ingredient -carvacrol against acrobasis advenella (zinck.) (lepidoptera, pyralidae). *Pestic. Biochem. Physiol.* **2019**, *153*, 122–128.
- (45) Park, J. H.; Jeon, Y. J.; Lee, C. H.; Chung, N.; Lee, H. S. Insecticidal toxicities of carvacrol and thymol derived from thymus vulgaris lin. against pochazia shantungensis chou & lu., newly recorded pest. *Sci. Rep.* **2017**, *7*(40902), 1–7.
- (46) Mastelić, J.; Jerković, I.; Blažević, I.; Poljak-Blaži, M.; Borović, S.; Ivančić-Baće, I.; Smrčeki, V.; Žarković, N.; Brčić-Kostic, K.; Vikić-Topić, D.; Müller, N. Comparative study on the antioxidant and biological activities of carvacrol, thymol, and eugenol derivatives. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56* (11), 3989–3996.
- (47) Pérez-Rosés, R.; Risco, E.; Vila, R.; Peñalver, P.; Cañigueral, S. Biological and nonbiological antioxidant activity of some essential oils. *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *64* (23), 4716–4724.
- (48) Cruz, G. S.; Wanderley-Teixeira, V.; da Silva, L. M.; Dutra, K. A.; Guedes, C. A.; de Oliveira, J. V.; Navarro, D. M. A. F.; Araújo, B. C.; Teixeira, Á. A. C. Chemical composition and insecticidal activity of the essential oils of foeniculum vulgare mill., ocimum basilicum l., eucalyptus staigeriana f. muell. ex bailey, eucalyptus citriodora hook and ocimum gratissimum l. and their major components on spodopter. *J. Essent. Oil-Bearing Plants* **2017**, *20* (5), 1360–1369.
- (49) Youssefi, M. R.; Tabari, M. A.; Esfandiari, A.; Kazemi, S.; Moghadamnia, A. A.; Sut, S.; Acqua, S. D.; Benelli, G.; Maggi, F. Efficacy of two monoterpenoids, carvacrol and thymol, and their combinations against eggs and larvae of the west Nile vector culex pipiens. *Mol. Pharmacol.* **2019**, *24* (1867), 1–11.
- (50) Campos, E. V. R.; Proença, P. L. F.; Oliveira, J. L.; Pereira, A. E. S.; De Moraes Ribeiro, L. N.; Fernandes, F. O.; Gonçalves, K. C.; Polanczyk, R. A.; Pasquoto-Stigliani, T.; Lima, R.; Melville, C. C.; Della Vechia, J. F.; Andrade, D. J.; Fraceto, L. F. Carvacrol and linalool co-loaded in β -cyclodextrin-grafted chitosan nanoparticles as sustainable biopesticide aiming pest control. *Sci. Rep.* **2018**, *8* (1), 1–14.
- (51) Rajput, J. D.; Bagul, S. D.; Pete, U. D.; Zade, C. M.; Padhye, S. B.; Bendre, R. S. Perspectives on medicinal properties of natural phenolic monoterpenoids and their hybrids. *Mol. Divers.* **2018**, *22*, 225–245.
- (52) Bagul, S. D.; Rajput, J. D. Carvacrol : an excellent natural pest control agent. *Nat. Prod. Chem. Res.* **2018**, *6* (6), 1–3.
- (53) Bagul, S. D.; Rajput, J. D.; SK, P.; SB, R. Synthesis, characterization and antioxidant activity of carvacrol containing novel thiadiazole and oxadiazole moieties. *Mod. Chem. Appl.* **2016**, *4* (4), 1–4.
- (54) Baser, K. H. C. Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils. *Curr. Pharm. Des.* **2008**, *14* (29), 3106–3120.

- (55) Veldhuizen, E. J. A.; Tjeerdsma-Van Bokhoven, J. L. M.; Zweijtzer, C.; Burt, S. A.; Haagsman, H. P. Structural requirements for the antimicrobial activity of carvacrol. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54* (5), 1874–1879.
- (56) Friedman, M. Chemistry and multibeneficial bioactivities of carvacrol (4-isopropyl-2-methylphenol), a component of essential oils produced by aromatic plants and spices. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 7652–7670.
- (57) Marinelli, L.; Stefano, A. Di; Cacciatore, I. Carvacrol and its derivatives as antibacterial agents. *Phytochem. Rev.* **2018**, *17*, 903–921.
- (58) Kordali, S.; Cakir, A.; Ozer, H.; Cakmakci, R.; Kesdek, M.; Mete, E. Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from turkish origanum acutidens and its three components, carvacrol, thymol and p-cymene. *Bioresour. Technol.* **2008**, *99*, 8788–8795.
- (59) Escobar, A.; Pérez, M.; Romanelli, G.; Blustein, G. Thymol bioactivity: a review focusing on practical applications. *Arab. J. Chem.* **2020**, *13*, 9243–9269.
- (60) El-Miligy, M. M. M.; Hazzaa, A. A.; El-Zemity, S. R.; Kubeisi, A. K. Al. Synthesis of thymol derivatives as potential non-irritant antimicrobial and insecticidal agents. *Curr. Bioact. Compd.* **2018**, *14*(00), 1–13.
- (61) Conceição, C. L.; Morais, L. A. S.; Campos, D. R.; Chaves, J. K. d. O.; Santos, G. C. M.; Cid, Y. P.; Sousa, M. A. A.; Scott, F. B.; Chaves, D. S. A.; Coumendouros, K. Evaluation of insecticidal activity of thyme, oregano, and cassia volatile oils on cat flea. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2020**, *30*, 774–779.
- (62) Kamatou, G. P. P.; Vermaak, I.; Viljoen, A. M.; Lawrence, B. M. Menthol: a simple monoterpene with remarkable biological properties. *Phytochemistry* **2013**, *96*, 15–25.
- (63) Kalemba, D.; Synowiec, A. Agrobiological interactions of essential oils of two menthol mints: mentha piperita and mentha arvensis. *Molecules* **2020**, *25* (59), 1–33.
- (64) Samarasekera, R.; Weerasinghe, I. S.; Hemalal, K. P. Insecticidal activity of menthol derivatives against mosquitoes. *Pest Manag. Sci.* **2008**, *64* (3), 290–295.
- (65) <https://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:34471> (accessed Dec 14, 2020).
- (66) <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6-Hydroxyflavanone> (accessed Dec 14, 2020).
- (67) Kostrzewa-Susłow, E.; Dymarska, M.; Białońska, A.; Janeczko, T. Enantioselective conversion of certain derivatives of 6-hydroxyflavanone. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2014**, *102*, 59–65.
- (68) Kostrzewa-Susłow, E.; Dmochowska-Gładysz, J.; Białońska, A.; Ciunik, Z.; Rymowicz, W. Microbial transformations of flavanone and 6-hydroxyflavanone by aspergillus niger strains. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2006**, *39*, 18–23.
- (69) Mikell, J. R.; Herath, W.; Khan, I. A. Eleven microbial metabolites of 6-hydroxyflavanone. *Chem. Pharm. Bull.* **2015**, *63* (8), 579–583.
- (70) Piszcz, P.; Woźniak, M.; Asztemborska, M.; Głód, B. K. Comparative analysis of antioxidative activity of flavonoids using hplc-ed and photometric assays. *Food Anal. Methods* **2014**, *7*, 1474–1480.
- (71) Patra, J.; Das, G.; Lee, S.; Kang, S.; Shin, H. Selected commercial plants: a review of extraction and isolation of bioactive compounds and their pharmacological market value. *Trends Food Sci. Technol.* **2018**, *82*, 89–109.
- (72) Nn, A. A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. *Med. Aromat. Plants* **2015**, *4* (3), 1–6.
- (73) Yahya, N. A.; Attan, N.; Wahab, R. A. An overview of cosmeceutically relevant plant extracts and strategies for extraction of plant-based bioactive compounds. *Food Bioprod. Process.* **2018**, *112*, 69–85.
- (74) De Oliveira, J. L.; Campos, E. V. R.; Fraceto, L. F. Recent developments and challenges for nanoscale formulation of botanical pesticides for use in sustainable agriculture. *J. Agric. Food*

- Chem.* **2018**, *66*, 8898–8913.
- (75) Giacometti, J.; Bursać Kovačević, D.; Putnik, P.; Gabrić, D.; Bilušić, T.; Krešić, G.; Stulić, V.; Barba, F. J.; Chemať, F.; Barbosa-Cánovas, G.; Režek Jambrak, A. Extraction of bioactive compounds and essential oils from mediterranean herbs by conventional and green innovative techniques: a review. *Food Res. Int.* **2018**, *113*, 245–262.
- (76) Bhargavi, G.; Nageswara Rao, P.; Renganathan, S. Review on the extraction methods of crude oil from all generation biofuels in last few decades. *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* **2018**, *330*, 1–19.
- (77) Mahfud, M.; Darmawan, M. D.; Diamanta, D. H.; Kusuma, H. S. Extraction of essential oil from bangle (*zingiber purpureum roxb.*) by hydrodistillation and steam distillation methods. *J. Chem. Technol. Metall.* **2017**, *52* (5), 791–796.
- (78) Li, Y.; Fabiano-Tixier, A.-S.; Chemať, F. Essential oils: from conventional to green extraction. In *Essential Oils as Reagents in Green Chemistry*, Li, Y., Fabiano-Tixier, A.-S., Chemať, F., Eds.; Springer International Publishing: Suiça, 2014; pp 9–20.
- (79) Waseem, R.; Low, K. H. Advanced analytical techniques for the extraction and characterization of plant-derived essential oils by gas chromatography with mass spectrometry. *J. Sep. Sci.* **2015**, *38*, 483–501.
- (80) Youse, M.; Rahimi-nasrabadi, M.; Pourmortazavi, S. M.; Wysokowski, M.; Jesionowski, T.; Ehrlich, H.; Mirsadeghi, S. Supercritical fluid extraction of essential oils. *Trends Anal. Chem.* **2019**, *118*, 182–193.
- (81) Hashemi, S. M. B.; Mousavi Khaneghah, A.; Koubaa, M.; Barba, F. J.; Abedi, E.; Niakousari, M.; Tavakoli, J. Extraction of essential oil from *aloyisia citriodora palau* leaves using continuous and pulsed ultrasound: kinetics, antioxidant activity and antimicrobial properties. *Process Biochem.* **2018**, *65*, 197–204.
- (82) <https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/what-are-biopesticides> (accessed Apr 2, 2020).
- (83) Pang, X.; Feng, Y. X.; Qi, X. J.; Wang, Y.; Almaz, B.; Xi, C.; Du, S. S. Toxicity and repellent activity of essential oil from *mentha piperita* linn. leaves and its major monoterpenoids against three stored product insects. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2020**, *27*, 7618–7627.
- (84) Glare, T. R. Types of biopesticides. In *Biopesticides Handbook*, Nollet, L. M. L., Rathore, H. S., Eds.; CRC Press: Boca Raton, 2015; pp 8–11.
- (85) Senthil-Nathan, S. A review of biopesticides and their mode of action against insect pests. In *Environmental Sustainability*, Thangavel, P., Sridevi, G., Eds.; Springer: Nova Deli, 2015; pp 49–63.
- (86) Tangtrakulwanich, K.; Reddy, G. V. P. Development of insect resistance to plant biopesticides: an overview. In *Advances in Plant Biopesticides*, Singh, D., Ed.; Springer: Nova Deli, 2014; pp 47–62.
- (87) Nawaz, M.; Mabubu, J. I.; Hua, H. Current status and advancement of biopesticides: microbial and botanical pesticides. *J. Entomol. Zool. Stud.* **2016**, *4* (2), 241–246.
- (88) Villaverde, J.; Sandín-España, P.; Sevilla-Morán, B.; López-Goti, C.; Alonso-Prados, J. L. Biopesticides from natural products: current development, legislative framework, and future trends. *BioResources* **2020**, *11* (2), 1–36.
- (89) Liu, Y.; Song, H.; Huang, Y.; Li, J.; Zhao, S.; Song, Y.; Yang, P.; Xiao, Z.; Liu, Y.; Li, Y.; Shang, H.; Wang, Q. Design, synthesis, and antiviral, fungicidal, and insecticidal activities of tetrahydro- β -carboline-3-carbohydrazide derivatives. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 9987–9999.
- (90) Paulraj, M. G.; Ignacimuthu, S.; Gandhi, M. R.; Shajahan, A.; Ganesan, P.; Packiam, S. M.; Al-Dhabi, N. A. Comparative studies of tripolyphosphate and glutaraldehyde cross-linked chitosan-botanical pesticide nanoparticles and their agricultural applications. *Int. J. Biol. Macromol.* **2017**,

- 104, 1813–1819.
- (91) Leng, P.; Zhang, Z.; Pan, G.; Zhao, M. Applications and development trends in biopesticides. *African J. Biotechnol.* **2011**, *10* (86), 19864–19873.
- (92) Khater, H. F. Prospects of botanical biopesticides in insect pest management. *Pharmacologia* **2012**, *3*, 641–656.
- (93) Pavela, R. Limitation of plant biopesticides. In *Advances in Plant Biopesticides*; Singh, D., Ed.; Springer: Nova Deli, 2014; pp 347–359.
- (94) Oriyomi, O. Phytochemical biopesticides. In *Phytochemistry: Volume 3: Marine Sources, Industrial Applications, and Recent Advances*; Egbuna, C., Ifemeje, J. C., Kumar, S., Sharif, N., Eds.; Apple Academic Press: Boca Raton, 2018; p 309.
- (95) Sparks, T. C.; Hahn, D. R.; Garizi, N. V. Natural products, their derivatives, mimics and synthetic equivalents: role in agrochemical discovery. *Pest Manag. Sci.* **2017**, *73*, 700–715.
- (96) Pavela, R. History, presence and perspective of using plant extracts as commercial botanical insecticides and farm products for protection against insects - a review. *Plant Prot. Sci.* **2016**, *52* (4), 229–241.
- (97) Liu, N.; Zhu, L. Metabolomic and transcriptomic investigation of metabolic perturbations in oryza sativa l. triggered by three pesticides. *Environ. Sci. Technol.* **2020**, *54* (10), 6115–6124.
- (98) Pavela, R.; Benelli, G. Essential oils as ecofriendly biopesticides? challenges and constraints. *Trends Plant Sci.* **2016**, *21* (12), 1000–1007.
- (99) Dang, Q. Le; Lim, C.-H.; Kim, J.-C. Current status of botanical pesticides for crop protection. *Res. Plant Dis.* **2012**, *18* (3), 175–185.
- (100) Copping, L. G.; Duke, S. O. Natural products that have been used commercially as crop protection agents. *Pest Manag. Sci.* **2007**, *63*, 524–554.
- (101) Jankowska, M.; Lapiéd, B.; Jankowski, W.; Stankiewicz, M. The unusual action of essential oil component, menthol, in potentiating the effect of the carbamate insecticide, bendiocarb. *Pestic. Biochem. Physiol.* **2019**, *158*, 101–111.
- (102) Lengai, G. M. W.; Muthomi, J. W. Biopesticides and their role in sustainable agricultural production. *J. Biosci. Med.* **2018**, *6*, 7–41.
- (103) Silva, F. F. M.; Monte, F. J. Q.; Lemos, T. L. G.; Nascimento, P. G. G.; Medeiros Costa, A. K.; Paiva, L. M. M. Eugenol derivatives: synthesis, characterization, and evaluation of antibacterial and antioxidant activities. *Chem. Cent. J.* **2018**, *12* (34), 1–9.
- (104) Hüter, O. F. Use of natural products in the crop protection industry. *Phytochem. Rev.* **2011**, *10*, 185–194.
- (105) Aggarwal, K. K.; Tripathi, A. K.; Ahmad, A.; Frajapati, V.; Verma, N.; Kumar, S. Toxicity of l-menthol and its derivatives against four storage insects. *Insect Sci. its Appl.* **2001**, *21* (3), 229–235.
- (106) Villaverde, J. J.; Sandin-España, P.; Sevilla-Morán, B.; López-Goti, C.; Alonso-Prados, J. L. Biopesticides from natural products: current development, legislative framework, and future trends. *BioResources* **2016**, *11* (2), 5618–5640.
- (107) Hellwig, M. Analysis of protein oxidation in food and feed products. *J. Agric. Food Chem.* **2020**, *68* (46), 1–57.
- (108) Aslantürk, Ö. S. In vitro cytotoxicity and cell viability assays: principles, advantages, and disadvantages. In *Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World*; Larramendy, M., Soloneski, S., Eds.; IntechOpen: Londres, 2018; pp 1–2.