

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ – UNIOESTE
CENTRO DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO “STRICTO SENSU” EM
ENGENHARIA QUÍMICA – NÍVEL DE MESTRADO

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA TEMPERATURA E PRESSÃO NA EXTRAÇÃO
DO EUGENOL DAS FOLHAS DE CRAVO (*Syzygium aromaticum*)
UTILIZANDO CO₂ SUPERCRÍTICO E COSSOLVENTES**

PAULA CASSIANA FROHLICH

**TOLEDO – PR
Fevereiro de 2019**

PAULA CASSIANA FROHLICH

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA TEMPERATURA E PRESSÃO NA EXTRAÇÃO
DO EUGENOL DAS FOLHAS DE CRAVO (*Syzygium aromaticum*)
UTILIZANDO CO₂ SUPERCRÍTICO E COSSOLVENTES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química, área de concentração em **Desenvolvimento de Processos.**

Orientador: Prof. Dr. Edson Antônio da Silva

Coorientador: Prof. Dr. Fernando Palú

TOLEDO – PR
Fevereiro de 2019

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Frohlich, Paula Cassiana

Avaliação dos efeitos da temperatura e pressão na extração do eugenol das folhas de cravo (*Syzygium aromaticum*) utilizando CO₂ supercrítico e cossolventes / Paula Cassiana Frohlich; orientador(a), Edson Antônio da Silva; coorientador(a), Fernando Palú, 2019.

98 f.

Dissertação (mestrado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Toledo, Centro de Engenharias e Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, 2019.

1. Extração supercrítica . 2. *Syzygium aromaticum* . 3. Eugenol . 4. Folhas. I. da Silva, Edson Antônio . II. Palú, Fernando. III. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que iluminou meu caminho durante a elaboração deste trabalho.

Aos meus pais Jayme Frohlich e Nádia Lopes Frohlich bem como meus irmãos Robson Wallace Frohlich e Ribamar Willian Frohlich, os quais sempre estiveram me apoiando e incentivando em todo o desenvolvimento do trabalho.

Ao André Luís Lowe, meu esposo por ter acreditado em mim desde princípio, pela ajuda e apoio nos momentos mais difíceis, e compreensão nos momentos de ausência.

Ao meu orientador professor Edson Antônio da Silva pelo estímulo, orientação no desenvolvimento desta pesquisa e momentos de aprendizagem durante o todo o mestrado.

Às amigas, por terem me proporcionado momentos de descontração e pelas palavras certas nos momentos de desânimo. Em especial, a Katia Andressa dos Santos pela amizade construída no decorrer da realização deste trabalho e também pelo auxílio na condução dos experimentos.

A todos meus familiares, pela motivação.

A Professora Dra. Camila da Silva pela disponibilidade de realizar as análises de CG/EM.

A Professora Dra. Tatiana S. Tiuman por ter auxiliado nas análises de microbiologia.

E a todos que de forma direta ou indiretamente, contribuíram para o bom andamento deste trabalho.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Estrutura do Trabalho	2
2 OBJETIVOS	4
2.1 Objetivo Geral	4
2.2 Objetivos Específicos	4
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1 Plantas medicinais	5
3.2 Óleos essenciais	6
3.3 Cravo (<i>Syzygium aromaticum</i>)	8
3.3.1 Composições dos óleos essenciais	9
3.3.2 Eugenol	11
3.4 Métodos de Extração de óleo essencial	12
3.4.1 Extração com fluido supercrítico	14
3.4.2 Extração supercrítica com adição de cossolvente	17
3.5 Modelagem Matemática	18
3.5.1 Modelo de SOVOVÁ (1994)	18
3.6 Atividade Antioxidante	22
3.6.1 Métodos de avaliação da atividade antioxidante	24
3.7 Atividade Antimicrobiana	25
3.8 Considerações Gerais	26
4 MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1 Obtenção e preparação da amostra	28
4.1.1 Densidade real das folhas	29
4.2 Obtenção dos extratos	30
4.2.1 Extração com CO ₂ supercrítico	30

4.2.3 Extração convencional – Soxhlet.....	31
4.3 Caracterização da amostra	32
4.3.1 Cromatografia gasosa acoplado em espectro de massa (CG- EM)	32
4.3.2 Quantificação do Eugenol	32
4.4 Determinação da atividade antioxidante.....	33
4.4.1 Determinação pelo método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil).....	33
4.4.2 Determinação pela redução de ferro (FRAP)	34
4.4.3 Quantificação dos compostos fenólicos	34
4.5 Modelagem matemática	35
4.6 Avaliação da atividade antibacteriana	36
4.7 Análise estatística.....	37
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	38
5.1 Rendimento	38
5.2 Modelagem matemática da extração supercrítica	42
5.2.1 Modelagem matemática da extração supercrítica (220 bar e 40 °C) com adição de cossolvente	44
5.3 Caracterização dos extratos.....	46
5.3.1 Cromatografia gasosa com espectrômetro de massa (CG-EM).....	46
5.3.2 Concentração de Eugenol	48
5.4 Atividade Antioxidante	51
5.5 Atividade antimicrobiana	52
6 CONCLUSÕES	56
7 REFERENCIAS.....	57
8 ANEXOS	85
8.1 Anexo I – Artigo Publicado em Periódico que reporta o conteúdo desta dissertação	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Condições utilizadas para a determinação da densidade real das folhas de cravo da Índia por picnometria de gás hélio.	29
Tabela 2. Condições experimentais para modelagem da extração supercrítica do extrato das folhas de cravo da Índia.	35
Tabela 3. Condições experimentais e rendimentos obtidos na extração supercrítica com CO ₂ e Soxhlet com <i>n</i> -hexano.	39
Tabela 4. Tabela de efeitos para variáveis temperatura e pressão na extração do extrato de folhas de cravo utilizando CO ₂ supercrítico.	40
Tabela 5. Rendimentos das extrações supercríticas com CO ₂ a 40°C e 220 bar e a adição dos cossolventes etanol (EtOH) e acetato de etila (EtAc).	41
Tabela 6. Parâmetros ajustáveis para o modelo de Sovová para extrações utilizando CO ₂	43
Tabela 7. Parâmetros ajustados do modelo de Sovová para as extrações com CO ₂ supercrítico a 40°C e 220 bar e a adição dos cossolventes etanol e acetato de etila.	45
Tabela 8. Composição química (%) dos compostos identificados nas folhas de Cravo por CG/EM.	47
Tabela 9. Teor de eugenol (%) presente nos extratos de cravo obtidos por diferentes condições de extração.	49
Tabela 10. Concentrações de eugenol no extrato obtido com CO ₂ a 40°C e 220 bar e com adição de 20 e 25% dos cossolventes EtOH e EtAc às folhas de cravo. ...	49
Tabela 11. Composto fenólicos total e atividade antioxidante pelo método DPPH e FRAP dos extratos de cravo da Índia extraídos com CO ₂ supercrítico e por Soxhlet.	51
Tabela 12. Atividade antibacteriana dos extratos obtidos das folhas de cravo da Índia e do padrão de eugenol pela técnica de difusão de disco.	53
Tabela 13. Concentração inibitória mínima (MIC) do extrato das folhas de cravo da Índia, extraído com CO ₂ à 220 bar e 40 °C, e por Soxhlet (hexano), e do padrão de eugenol.	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Exemplos de Monoterpenos.....	10
Figura 2. Exemplos de fenilpropanoides.....	10
Figura 3. Estrutura molecular do Eugenol.	11
Figura 4. Diagrama de fases típico de uma substância pura.....	14
Figura 5. Módulo de extração supercrítico: A: Cilindro de gás. B: Bomba seringa; C: Extrator. D e E: Banhos termostático. F: Controlador de temperatura na válvula micrométrica. G: Coletor de óleo. V1, V2, V3 e V4 válvulas agulha.	15
Figura 6. Curva característica de extração com representação das três etapas do processo de extração.	21
Figura 7. (A) Folhas de cravo. (B) Folhas de cravo após secagem, trituração e peneiramento.	28
Figura 8. Gráfico de Pareto de efeitos para as variáveis temperatura e pressão na extração do extrato das folhas de cravo utilizando CO ₂ supercrítico.	39
Figura 9. Curvas cinéticas experimentais das extrações dos extratos das folhas de cravo com CO ₂ supercrítico com ajuste do modelo de Sovová. ■ (150 bar, 40 °C); ○ (150 bar, 60 °C); △ (185 bar, 50 °C) ● (220 bar, 40 °C); ✱ (220 bar, 60 °C). ...	44
Figura 10. Curva cinéticas experimentais das extrações dos extratos ds folhas de cravo com CO ₂ supercrítico puro e adição de cossolvente, na condição de 220 bar e 40 °C. ✱ EtOH 20%;△ EtOH 25%; ▽ EtAc 20%; ■ EtAc 25% ● CO ₂ puro.....	46

NOMENCLATURAS

F_{calc}	F calculado (teste "F")	-
F_{tab}	F tabelado (teste "F")	-
H	Altura do extrator	L
H	Coordenada na direção axial do leito	L
$J(X,Y)$	Taxa de transferência de massa	kg/m ³ .s
K	Massa de soluto depositada no interior do sólido	M
$k_F a$	Coeficiente de transferência de massa do filme externo	T ⁻¹
$k_S a$	Coeficiente de transferência de massa do sólido	T ⁻¹
$m(t)$	Massa de extrato em função do tempo	M
CG-MS	Cromatografia gasosa acoplado com espectrômetro de massa	-
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência	-
Y_S	Solubilidade do soluto no solvente	M M ⁻¹
t_{CER}	Tempo do período <i>CER</i>	T
t_{FER}	Tempo do período <i>FER</i>	T
m_S	Massa de sólido livre de extrato	M
\dot{m}_F	Vazão mássica de solvente	M T ⁻¹
DPPH	Radical 2,2-diphenil1-picrilhidrazil	ug mL ⁻¹
TCF	Teor de compostos fenólicos	µg EAG mg ⁻¹
FRAP	Potencial Antioxidante redutor de ferro	umol _{Fe2+} mg ⁻¹
IC ₅₀	Concentração capaz de inibir 50% do DPPH	-
EAG	Equivalente em ácido gálico	-
ρ_{leito}	Densidade do Leito	M L ⁻³
ρ_s	Densidade real das folhas	M L ⁻³
ε	Porosidade do leito	-
Z	Paramêtro admencional – Transferencia de massa na superfície do sólido	-
w	Paramêtro admencional – Transferencia de massa no interior do sólido	-

MIC	Concentração inibitória mínima	-
T	Temperatura	°C
P	Pressão	Bar

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA TEMPERATURA E PRESSÃO NA EXTRAÇÃO
DO EUGENOL DAS FOLHAS DE CRAVO (*Syzygium aromaticum*)
UTILIZANDO CO₂ SUPERCRÍTICO E COSSOLVENTES**

AUTORA: PAULA CASSIANA FROHLICH

ORIENTADOR: PROF. DR. EDSON ANTÔNIO DA SILVA

Dissertação de Mestrado; Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química; Universidade Estadual do Oeste do Paraná; Rua da Faculdade, 645; CEP: 85903-000- Toledo – PR, Brasil, defendida em 27 de fevereiro de 2019. 85 p.

RESUMO

As plantas aromáticas são de suma importância, devido aos seus componentes bioativos e propriedades terapêuticas que as caracterizam pelas diferentes atividades, dentre elas antioxidante, antifúngica e antimicrobiana. O cravo (*Syzygium aromaticum*) é uma árvore pertencente à família Myrtaceae, cujo o óleo essencial tem diversas aplicações, sendo em indústrias alimentícias, cosméticas e farmacêuticas. Dentre os diversos métodos de extração para óleos essenciais, além dos métodos convencionais (hidrodestilação, Soxhlet), a extração supercrítica se destaca por ter um processo livre de resíduos e não provocar a degradação térmica dos extratos. Dentro desse contexto, o presente estudo visa avaliar o efeito das condições operacionais na extração com CO₂ supercrítico das folhas de cravo no rendimento e no teor de eugenol. As condições empregadas na extração supercrítica com CO₂ foram: temperaturas de 40, 50 e 60 °C e pressões de 150, 185 e 220 bar. Os maiores valores de rendimento (1,08%) e de teor de eugenol foram obtidos na condição de 40 °C e 220 bar. Os principais componentes identificados no extrato de cravo foram o eugenol (29,73%), chavicol (13,31%), n-pentacosane (11,66%), hexacosanal (11,37%) e vitamina E (9,30%). Os extratos foram avaliados quanto à sua capacidade antioxidante pelo método DPPH e FRAP e também a quantificação dos compostos fenólicos através do método Folin-Ciocalteu. Sendo os melhores resultados da atividade antioxidante, dentre as

condições realizadas, obtidas na menor pressão e temperatura, 150 bar e 40 °C. A maior atividade antimicrobiana foi observada para o extrato obtido por CO₂ supercrítico (220 bar e 40 °C) contra *Salmonella enterica* subsp. Serovar Typhi (ATCC 06539). O modelo de Sovová aplicado para representação das cinéticas de extrações representou satisfatoriamente os dados experimentais em todas as condições empregadas.

Palavras-chave: *Syzygium aromaticum*; folhas; eugenol; extração supercrítica.

**EVALUATION OF THE EFFECTS OF TEMPERATURE AND PRESSURE ON
THE EXTRACTION OF EUGENOL FROM CLOVE (*SYZYGIUM AROMATICUM*)
LEAVES USING SUPERCRITICAL CO₂ AND COSSOLVENT**

AUTHOR: PAULA CASSIANA FROHLICH

SUPERVISOR: PROF. DR. EDSON ANTONIO DA SILVA

Master Thesis; Chemical Engineering Graduate Program; Wastem Paraná State University; Rua da Faculdade, 645; CEP: 85903-000 – Toledo – PR, Brazil, presented on February, 27th 2019, 85 p.

ABSTRACT

Aromatic plants are of great importance, due to their bioactive components and therapeutic properties that characterize them by the different activities, among them antioxidant, antifungal and antimicrobial. The clove (*Syzygium aromaticum*) is a tree which belongs to the family Myrtaceae whose essential oil has several applications, such in the food, cosmetic and pharmaceutical industries. Among the sundry extraction methods for essential oils, besides the conventional ones (hydrodistillation, Soxhlet), the supercritical extraction is notable for having a residue-free process and does not cause the thermal degradation of the extracts. In this context, the present study aims to evaluate the effect of the operational conditions on the extraction with supercritical CO₂ of clove leaves on yield and eugenol content. The conditions used in the supercritical CO₂ extraction were: temperatures of 40, 50 and 60 °C and pressures of 150, 185 and 220 bar. The highest yield (1.08%) and higher eugenol content was obtained in the condition of 40 °C and 220 bar. The main components identified in clove extract were eugenol (29.73%), chavicol (13.31%), n-pentacosane (11.66%), hexacosanal (11.37%) and vitamin E (9.30%). The extracts were evaluated for their antioxidant capacity by the DPPH and FRAP method and also the quantification of the phenolic compounds by the Folin-Ciocalteu method. The best results among the conditions were obtained at the lowest pressure and temperature, 150 bar and 40 °C. The highest anti-microbial activity was observed for the extract obtained by supercritical CO₂ (220 bar and 40 °C) against *Salmonella enterica* subsp. Serovar Typhi (ATCC 06539). The Sovová

model applied to represent kinetics of extractions satisfactorily represented the experimental data in all the conditions employed.

Keywords: *Syzygium aromaticum*; leaves; eugenol; supercritical extraction.

1 INTRODUÇÃO

O Cravo da Índia (*Syzygium aromaticum*) é uma árvore pertencente à família Myrtaceae, a qual pertencem 23 gêneros e aproximadamente 130 espécies (REZENDE et al., 2013), muitas das quais ricas em óleo essencial (HOLETZ et al., 2002; AMARAL et al., 2006; GONDIN et al., 2006). A árvore é de grande porte com copa alongada, com altura de 10 a 20 metros, possui folhas ovais, lisas, e flores avermelhadas com diversos cachos terminais agrupados no extremo das ramas. O fruto possui formato alongado, com aroma forte e penetrante. Além disso, seu ciclo vegetativo tende a chegar a mais de cem anos (KIM et al., 1998; ALMA et al., 2007).

Segundo Bizzo et al., (2009), o óleo essencial do cravo da Índia é apresentado como um dos principais de interesse no mercado mundial, devido à grande quantidade de eugenol presente em sua composição química. A produção destes tem sido crescente com destinação especialmente para indústrias alimentícias, cosmética e farmacêutica (BAGUETTA et al., 2010). O eugenol ($C_{10}H_{12}O_2$), fenilpropanoide volátil incolor, possui baixa solubilidade em água, cheiro forte e sabor ardente e picante (KHAIL et al., 2017).

O eugenol possui inúmeras propriedades farmacológicas como atividade antifúngica (RANA et al., 2010), antibacteriana (OYEDEMI et al., 2009) e antioxidante (LAGOURI & BOSKOU, 1995). Este composto, também tem atividade contra melanoma, tumores e câncer (JAGANATHAN & SUPRIYANTO, 2012). Tem sido muito utilizado como agente anti-séptico e analgésico na odontologia (PISANO et al., 2007). Além disso, é amplamente aplicado na produção de perfumes, cosméticos e aromas (RAJA et al., 2015).

Os óleos essenciais podem ser extraídos por diferentes métodos, que depende, normalmente, das características do material vegetal e da aplicação do óleo. Os óleos essenciais de plantas são extraídos por processos mais comuns, como hidrodestilação e solventes orgânicos (ERKAN et al., 2008). No entanto, pode apresentar alguns inconvenientes, tais como a degradação térmica do óleo e a presença de solventes tóxicos no mesmo (BHUIYAN et al., 2010).

Para evitar possíveis perdas e contaminação por solventes, há necessidade de buscar métodos de extração mais eficientes, como a extração com CO_2 supercrítica (OLIVEIRA et al., 2016). Para isso, é preciso a otimização do processo,

como temperatura e pressão, para melhor extração dos compostos de interesse (DELLA PORTA et al., 1998).

Diversos trabalhos avaliaram a extração com CO₂ supercrítico dos botões de cravo (*Syzygium aromaticum*) (DELLA PORTA et al., 1998; GOPALAKRISHNAN, SHANTI, NARAYANAN, 1990; REVERCON & MARRONE, 1997; YAZDANI et al., 2005; GUAN, YAN, TANG, 2007; MARTINEZ et al., 2007; IVANOVIC et al., 2011; ZABOT et al., 2014), em que obtiveram elevados rendimentos (13-23,95%) e teores de eugenol (56,97-87,41%) quando comparados aos trabalhos que empregaram a técnica convencional de hidrodestilação (GOPALAKRISHNAN, SHANTI, NARAYANAN, 1990; GUAN, YAN, TANG, 2007; SAFRUDIN, MAIMULYANTI, PRIHADI, 2015; GOLMAKANI, MAHDIEH, RAZZAGHI, 2017; JIMOH, AROWOLO, ALABI, 2017), com rendimentos de 11,5-21,2% de óleo e concentração de eugenol de 50,3-87,26%. O óleo essencial das folhas de cravo, com rendimento variando de 1 a 4% (Lomboan et al., 2014), também apresentam o eugenol, como composto principal (REIS et al., 2006; GAYLOR et al., 2016; RAINA et al., 2001; GAYLOR et al., 2014; SRIVASTAVA et al., 2005) até 90,22%, no entanto, não foram encontrados trabalhos para obter este óleo por tecnologia supercrítica.

Considerando a falta de informações sobre o extrato da folha de cravo (*Syzygium aromaticum*) obtido com CO₂ sob condições supercríticas, este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da temperatura (40, 50 e 60 °C) e pressão (150,185 e 220 bar) na extração no rendimento e na concentração de eugenol. Além de analisar a capacidade antioxidante e antimicrobiana dos extratos obtidos a partir da extração com CO₂ supercrítico e o método Soxhlet com *n*-hexano.

1.1 Estrutura do Trabalho

O trabalho está estruturado em cinco partes distintas no intuito de visualização das partes e interligação dessas, que seguem a opção formatação.

Na primeira parte faz-se uma introdução sobre o contexto panorâmico, no qual o trabalho se insere, com o objetivo de informar o leitor sobre plantas codimentares e óleo essencial. A introdução trata da justificativa da pesquisa e dos objetivos a serem alcançados no decorrer do trabalho.

Na segunda parte, coloca-se os objetivos a serem alcançados pelo presente estudo. Na terceira parte, faz-se uma revisão de literatura, dividida em oito partes, mas que juntas formam o embasamento teórico do trabalho. Primeiramente, apresenta-se a teoria sobre as plantas medicinais e óleos essenciais, abordando os conceitos, as suas características e suas importâncias. Em segundo momento trata-se de uma revisão evidenciando a composição química e as características medicinais do cravo e de seu composto majoritário, eugenol. Ressalta-se ainda, os métodos de extração com seus pontos positivos e negativos. Por fim, encerra-se essa parte, sobre as principais análises desenvolvidas em óleos obtidos de plantas medicinais.

A quarta parte trata das metodologias utilizadas no trabalho. O trabalho propõe a utilização de metodologias de extração, qualidade e qualitativa dos óleos essenciais com objetivo de identificar os melhores resultados. As metodologias levam em consideração os custos, a quantidade de extrato obtido e a quantidade do composto majoritário, além do tempo operacional de cada método.

Na quinta parte apresenta-se os resultados do problema proposto, juntamente com as análises e discussões. Por fim, a conclusão procura sumarizar o trabalho, apontando os principais indicativos e informações de forma a facilitar o que pretendeu-se identificar com o estudo avaliativo dos extratos obtidos das folhas de cravo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos de temperatura e pressão na extração com CO₂ supercrítico das folhas de cravo (*Syzygium aromaticum*), bem como comparar a composição, atividade antioxidante e antimicrobiana dos extratos obtidos por extração supercrítica e pelo método Soxhlet.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar os rendimentos das extrações do extrato das folhas de cravo obtidos em diferentes condições de temperatura e pressão por CO₂ supercrítico e pelo método Soxhlet com solvente orgânico *n*-hexano;
- Avaliar os rendimentos das extrações do extrato das folhas de cravo obtidos pela extração supercrítica (220 bar e 40 °C) com adição de cosolvente.
- Modelar as cinéticas de extração do extrato de cravo obtido pela extração supercrítica com CO₂ puro.
- Caracterizar o óleo de cravo obtido nos diferentes métodos de extração por CG-EM;
- Quantificar o composto eugenol presente no extrato de cravo obtido nas diferentes condições experimentais por CLAE;
- Avaliar a capacidade antioxidante bem como, a atividade antimicrobiana dos extratos obtidos em ambos os métodos de extração.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Plantas medicinais

As antigas civilizações, em busca de sobrevivência, descobriram plantas as quais tinham ação tóxica ou medicinal. Atualmente, o ser humano está cada vez mais utilizando as plantas medicinais como remédio para prevenção de doenças, afim de evitar os efeitos colaterais obtidos dos medicamentos sintéticos (POSER & MENTZ, 2001). Além disso, são usadas de forma contínua por países menos desenvolvidos (AJLAN, 2016).

Visto que grande parte da população mundial está em países menos desenvolvidos economicamente, estes, apresentam dificuldades relacionadas a saúde devido ao aumento populacional e carência de recursos, com isso, leva-se ao aumento da necessidade de medicamentos econômicos e acessíveis, logo destaca-se a importância das plantas medicinais. Sendo essas, utilizadas como medicamentos com objetivo de prevenir ou até mesmo curar os sintomas das doenças com menor custo para a população e aos serviços de saúde (TOLEDO et al., 2003).

As plantas são produtos naturais de suma importância, pois, estas possuem componentes bioativos e propriedades terapêuticas onde são utilizados na síntese de inúmeros fármacos (SILVA & JÚNIOR, 2010). Estão sendo amplamente utilizadas na tentativa de obter efeito mais eficaz e econômico, uma vez que os produtos naturais apresentam efeitos mais leves, porém mais duradouros do que medicamentos sintéticos (CORTÉS-ROJAS et al., 2013).

A natureza disponibiliza as plantas medicinais aos seres humanos as quais proporcionam a cura de uma infinidade de problemas. Inúmeras são as plantas e enfermidades que as mesmas viabilizam em seu próprio uso (DANIYAL, AKRAM, 2015).

Estudos mostram que estas podem ser empregadas em diferentes tratamentos como potencial de antifertilidade (DANIYAL & AKRAM, 2015), mecanismo de ação contra efeitos anticonvulsivos (JÚNIOR et al., 2008), atividade antibacteriana (RAZAFINTSALAMA et al., 2017), cura de doenças relacionadas com as diversas causas de paralisia (MIKAWLRAWNG, 2017) entre outras. O

conhecimento das propriedades benéficas destas plantas foi adquirido pelas experiências vividas do dia a dia, e transmitida através do tempo, como única forma de conhecimento sobre as propriedades medicinais (SALVAGNINI et al., 2008).

As plantas são constituídas por inúmeras substâncias ativas, relacionadas aos metabólitos secundários. Os compostos presentes em plantas medicinais podem ser divididos em dois grupos de metabólitos, sendo os primários e secundários. Os metabólitos primários são os compostos encontrados na própria natureza, ocorrendo em todos os organismos vegetais, os quais são originados à custa de energia sendo a celulose, lignina, proteínas que realizam as funções vitais da planta (DEWICK, 2002; RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007).

Os metabólitos secundários variam de acordo com a espécie vegetal e a família. Esses metabólitos são bastante influenciados pelos fatores ambientais, como por exemplo, clima, solo e época de colheita (MORAIS, 2009). Geralmente são substâncias com baixo peso molecular e produzidas em pequenas quantidades, embora com características químicas variadas e complexas (DEWICK, 2002).

Segunda Pereira (2006) os metabólitos secundários são de grande valia para o vegetal devido às atividades biológicas desenvolvidas nas plantas. Os principais grupos de metabólitos secundários encontrados nas plantas de alta capacidade biológica são os taninos, cumarinas, quinonas, flavonoides, alcaloides e óleos essenciais.

3.2 Óleos essenciais

Os óleos essenciais são destaque dentre os produtos naturais uma vez que são bastante utilizados como matéria-prima para síntese de compostos com alto valor comercial para diversas áreas industriais, tais como indústrias de perfumaria, alimentos e farmacêutica (CRAVEIRO; QUEIROZ, 1993).

Estes compostos representam pequena fração da composição de uma planta, porém são responsáveis pelas características das plantas aromáticas. Estes possuem composição complexa de substâncias voláteis lipofílicas, normalmente odoríferas e líquidas (GIORDANI et al., 2008) podendo assim conter vários componentes, principalmente os hidrocarbonetos, sendo os mais comuns os

terpenos, sesquiterpenos e compostos oxigenados como acetona, ácidos, álcoois e aldeídos. Portanto, são responsáveis pelos sabores e odores característicos das plantas (POURMORTAZAVI & HAJIMIRSADEGHI, 2007; (SIMÕES & SPITER, 2003). O aroma do óleo essencial está relacionado aos constituintes predominantes na essência, que podem variar de forma qualitativa ou quantitativa, em função de diferentes fatores como, por exemplo, as próprias estações do ano, época de floração, idade da planta, além dos fatores geográficos e principalmente fatores climáticos (NOGUEIRA et al., 2007).

Os óleos essenciais podem estar encontrados em diversas partes da planta, tais como nas flores, folhas ou ainda nas cascas dos caules, madeira, raízes, rizomas, frutos ou sementes (ARIDOGAN et al., 2002). Desta forma, dependendo do órgão submetido à extração, a composição química do óleo essencial pode variar (ANASS; AMRANI; EDDINE, 2015).

Os óleos essenciais geralmente são incolores, mas podem apresentar tons amarelados, possuem densidades que podem variar entre 0,690 e 1,118 g/cm³ (SIMÕES & SPITER, 2003), são instáveis na presença de luz, calor e umidade (VITTI & BRITO, 2003).

Os óleos essenciais podem obter várias funções para a planta, atuam como inibidores de germinação, na regulação da perda de água e contra o aumento de temperatura. Ainda, pode apresentar atividades antibacterianas, antifúngicas e antivirais (BAKKALI et al., 2008). Ainda, segundo autores são amplamente encontrados no reino vegetal principalmente nas famílias Apiaceae, Asteraceae, Lauraceae, Laminaceae e Myrtaceae.

A extração dos óleos essenciais é realizada com solventes de carácter apolar, que permite também a extração de outros compostos lipofílicos. Hoje em dia, há uma tendência de que a extração com CO₂ supercrítico venha a ser o método de extração escolhido pelas indústrias para extração de óleos essenciais. Uma vez que, esse método de extração possibilita óleos com mais aroma naturais característicos, além de não deixar que fique solvente no óleo, logo, permite recuperar um óleo mais puro do que quando extraídos por outros métodos de extração (SIMÕES & SPITER, 2003).

3.3 Cravo (*Syzygium aromaticum*)

O Cravo (*Syzygium aromaticum*) é uma árvore pertencente à família *Myrtaceae*, que compreende espécies ricas em óleo essencial, como a Pitanga (*Eugenia uniflora* L.), Eucalyptos (*Eucalyptus globulus* Labill.) e Cereja-do-mato (*E. involucrata* DC) (SENNA, 2011). A árvore de cravo é de grande porte com copa alongada, com altura de 10 a 12 metros, possui folhas ovais, lisas de 10 a 15 cm, e flores avermelhadas com diversos cachos terminais agrupados no extremo das ramas. O fruto possui formato alongado, com aroma forte e penetrante. Além disso, seu ciclo vegetativo tende a chegar a mais de cem anos (ALMA et al., 2007).

O cravo era muito disputado entre os países europeus, porém, no começo do século XIX as plantações foram transportadas para países tropicais, dentre eles o Brasil (ASCENÇÃO & FILHO, 2013). O Brasil se tornou destaque na produção de óleos essenciais, notadamente no Estado da Bahia (AFFONSO et al., 2012) e vem crescendo sua produção com destinação especialmente para as indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica (BAGETTA et al., 2010). A produção brasileira é estimada em 2500 toneladas de cravo por ano (OLIVEIRA, et. al., 2007).

Segundo Bizzo et al. (2009), o óleo essencial do cravo da Índia é apresentado como um dos principais de interesse no mercado mundial, devido à grande quantidade de eugenol presente em sua composição química.

Existem diversos trabalhos que demonstraram que o óleo essencial do cravo da Índia tem propriedades farmacológicas, tais como: anti-inflamatórios, anestésicos, cicatrizantes (SILVA; OLIVEIRA; SOUZA, 2011), antioxidantes, antimicrobiana, atividade antifúngica (SCHERER et al., 2009; RABELO, 2010, KAMATOU; VERMAAK; VILJOEN, 2012; FREIRES et al., 2015), antimutagênica (MIYAZAWA; HISAMA, 2001), antitrombótica (SRIVASTAVA; MALHOTRA, 1991), anticarcinogênica (ZHENG et al., 1992) e antiparasitas (YANG et al., 2003).

O óleo de cravo também é muito empregado para combater micoses de unha, frieira e aquelas manchas brancas nas costas (SILVA; OLIVEIRA; SOUZA, 2011). No Brasil os principais produtos provenientes do cravo da Índia são o óleo puro ou produtos derivados, cuja principal aplicação é como anestésico local utilizado na odontologia e também o botão floral seco que é comercializado como tempero (AFFONSO et al., 2012).

3.3.1 Composições dos óleos essenciais

A pesquisa referente à química dos vegetais tem a finalidade de identificar os constituintes químicos das espécies vegetais e classificar sua presença determinando quais os grupos metabólicos secundários estão presentes na planta (SIMÕES & SPITER, 2003).

Os óleos essenciais são compostos por misturas complexas de 20 a 60 componentes às vezes sendo capaz de conter mais de 100 substâncias com concentrações variadas. São compostos majoritários aqueles que apresentam concentrações de 20 a 70% e conferem características determinantes nas atividades biológicas dos óleos essenciais. As moléculas encontradas com menor porcentagem são denominadas de minoritários (BAKKALI et al., 2008; LOBO; LOURENÇO, 2007).

As classes químicas de compostos mais comumente encontradas nos óleos essenciais são os terpenóides e os fenilpropanóides. A classe dos terpenos é encontrada em grande quantidade de plantas, porém, quando é identificado fenilpropanóides, estes tornam característicos dos odores e sabores (LOBO; LOURENÇO, 2007).

Os terpenos representam a maior diversidade de compostos naturais encontrados nas plantas. Estes derivam da união de cinco átomos de carbonos, denominados de unidades isoprênicas por meio de vias bioquímicas que envolvem intermediários reativos os quais estão presentes nas raízes, tronco, folhas e flores das plantas. As unidades isoprênicas são classificadas de acordo com o número presentes na estrutura. Assim, as estruturas químicas formadas através dessa junção de duas, três, quatro, cinco unidades isoprênicas são chamadas de monoterpenos (Figura 1), sesqui, di, sester, respectivamente (FEHLBERG, 2011).

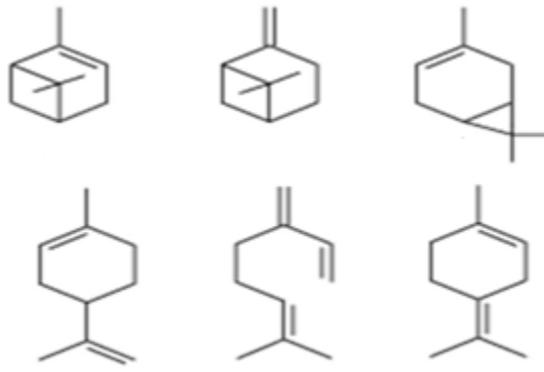


Figura 1. Exemplos de Monoterpenos.
Fonte: Júnior (2003).

Os monoterpenos e os sesquiterpenos são os mais frequentes encontrados nos óleos, aliás, podem apresentar estruturas cíclicas, alifáticas e aromáticas, como também adição de átomos de oxigênio formando álcoois, cetonas, aldeídos. Os diterpenos são apresentados em minoria (CASTRO et al., 2004).

Os fenilpropanoides (Figura 2) não são compostos muito encontrados em óleos essenciais, porém, algumas espécies as apresentam em proporções significativas, onde pode ser de grande influência no odor e sabor característicos de algumas plantas (BIASI & DESCHAMPS, 2009).

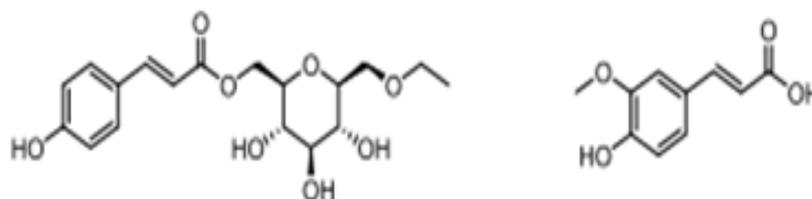


Figura 2. Exemplos de fenilpropanoides.
Fonte: DANG et al. (2017).

Esta classe apresenta em sua composição um grupo fenol, e por serem produzidos por metabólitos secundários dos vegetais desempenham várias funções. Dado que são sintetizados a partir da produção de aminoácidos aromáticos pela via do ácido chiquímico, rota esta (ácido chiquímico) que não é encontrada em animais, apenas em plantas, bactérias e fungos (LEMOS, 2006). Estudos mostram que os fenilpropanóides apresentam capacidade antioxidante, propriedades antialérgicas e antimicrobiana (HAO et al., 1996).

3.3.2 Eugenol

O Eugenol (Figura 3) possui fórmula molecular $C_{10}H_{12}O_2$ e massa molar $164,2 \text{ g.mol}^{-1}$, geralmente é um líquido incolor a amarelado em que adquire coloração escura quando exposto à luz, volátil, de baixa solubilidade em água, cheiro forte característico do cravo, sabor ardente e picante (CAI; WU, 1996; RABELO, 2010).

É um composto que pode ser encontrado em vários óleos essenciais, mas principalmente em óleos extraídos de cravo da Índia. Esse composto majoritário em óleos de cravo apresenta uma importância em tratamentos de higiene oral, por ter sabor, e propriedade sensibilizadora causando anestesia local (PAVITHRA, 2014).

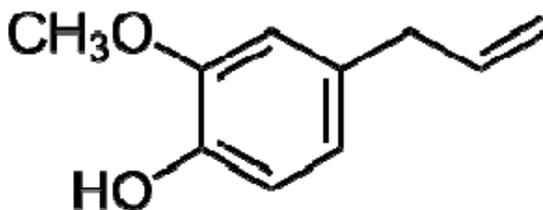


Figura 3. Estrutura molecular do Eugenol.
Fonte: SINGH et al. (2012).

Outra característica importante desse composto é a ampla capacidade de apresentar características benéficas à saúde, como atividade antioxidante, o qual impede e/ou inibe a formação de radicais livres, removendo-os antes de causar algum dano as moléculas, afim de prevenir mutações (PAVITHRA, 2014). Além de ter ação anti-inflamatória (WARGOVICH et al., 2001), antibacteriana e efeitos antivirais (DE et al., 1999). Ademais, é muito utilizado na odontologia como componente de seladores e outros antissépticos para higiene bucal, devido apresentar efeito bactericida (CHONG et al., 1997).

Dentre tantas aplicações, tem sido também empregado na produção de outros compostos fenólicos, como por exemplo, a vanilina, a qual é muito utilizada como aroma em doces, chocolates e sorvetes (PRIEFERT et al., 2001).

3.4 Métodos de Extração de óleo essencial

Dentro de produtos naturais define-se extração como a forma de retirar de maneira seletiva e completa as substâncias de interesse presente nas plantas (SONAGLIO et al., 2007).

A extração é o primeiro passo para se obter produtos naturais das matérias-primas vegetais. São vários os fatores existentes que podem influenciar no produto final obtido de uma extração, tais como: a natureza química das plantas, o solvente utilizado, o método de extração executado, o tamanho de partícula utilizado como amostra, o emprego de agitação e temperatura, o tempo de extração e também à presença substâncias interferentes, que podem estar presentes na própria composição das plantas (STALIKAS, 2007).

Os óleos essenciais podem ser obtidos por vários métodos de extração, a escolha depende da parte da planta que o mesmo se concentra, das características desejadas no produto final, assim como a finalidade de uso do mesmo, visto que a cada extração os óleos obtidos apresentam composição diferente, conseqüentemente altera as características físico-químicas e as propriedades bioativas (POURMORTAZAVI & HARJIMIRSADEGHI 2007; POVH et al., 2001).

Para obter óleos essenciais com composição química constante, o material vegetal deve ser extraído nas mesmas condições, colhido em mesmo solo, mesmo clima e na mesma época (BAKKALI et al., 2008). Os métodos de extração existentes são a enfloração, prensagem a frio, extração com solventes orgânicos, hidrodestilação e extração com fluido supercrítico.

A extração por enfloração é método antigo que era utilizado já pelos egípcios com finalidade de extrair óleo essencial de flores delicadas e com baixo teor de óleo (SIMÕES & SPITER, 2003). Já o processo de prensagem a frio é utilizado geralmente quando se tem o interesse em extrair óleo essencial de frutos cítricos (BIASI & DESCHAMPS, 2009).

O método de extração com solventes foi um dos primeiros a serem aplicados para extração de óleos essenciais (BIASSI & DESCHAMPS, 2009). Nesse método a amostra é colocada em contato direto com o solvente orgânico, depois de certo tempo, realiza-se a separação das fases sólida e líquida, onde o extrato é obtido pela evaporação do solvente presente na fase líquida. A técnica por Soxhlet é mais utilizada nesse processo com solvente orgânico (CASTRO & PRIEGO-CAPOTE,

2010). Geralmente os solventes aplicados apresentam característica apolar, como éter e hexano. Tendo em vista que, a escolha adequada do solvente é de suma importância para se obter bom rendimento de óleo (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

A vantagem de utilizar esse processo, é que este, permite um equilíbrio da transferência, pois o solvente passa em contato com a amostra diversas vezes, não precisa realizar a filtração entre a matéria-prima e o solvente no fim da extração, e também por ser um equipamento de baixo custo, esse permite realizar várias extrações ao mesmo tempo (BASER & BUCHBAUER, 2010).

Todavia, esse método de extração possui algumas desvantagens como a geração de resíduo químico, apresentar restos de solvente no próprio óleo, dificultando sua utilização posterior em fins terapêuticos, e conseqüentemente ocorre uma desvalorização comercial dos mesmos. Além disso, pode ocorrer extração de outros compostos os quais não são de interesse (SIMÕES & SPITER, 2003).

O método de extração por hidrodestilação é um dos mais utilizados para extrações de óleo essencial de plantas aromáticas. Esse processo consiste basicamente na evaporação e em seguida a condensação de um líquido. A amostra fica em contato direto com a água, durante o processo de ebulição, e posteriormente, após o óleo ser difundido é vaporizado e carregado pela corrente de vapor. Apresenta como vantagem o bom rendimento final do produto final e também uma alta pureza (BASER & BUCHBAUER, 2010).

No entanto, os métodos tradicionais de extração acabam apresentando alguns inconvenientes e restrições. Por esses processos, pode ocorrer a degradação térmica do óleo, comprometendo o perfil aromático do óleo essencial, ainda, permite a presença de solventes tóxicos nos mesmos. Além disso, requer um elevado tempo de extração. Assim sendo, esses fatores, acabaram influenciando no desenvolvimento e aplicações de novos métodos de extração, dentre esses a extração supercrítica vem sendo uma técnica promissora para obtenção de óleos essenciais (STEFFANI, 2003).

3.4.1 Extração com fluido supercrítico

Desde a antiguidade se realiza extração de substâncias a partir de vegetais, com finalidades alimentícias, farmacológicas e aromáticas (MAUL; WASICKY; BACCHI, 1986). Os estudos sobre as extrações supercríticas iniciaram-se na década de 50 por grupos de pesquisadores na antiga União Soviética, Alemanha e Estados Unidos. Na Alemanha foi montado o primeiro módulo industrial para extração supercrítica, utilizando dióxido de carbono supercrítico como solvente (MAUL, 1999).

Desde então, esta técnica é considerada uma tecnologia alternativa limpa, onde possibilita a obtenção de extratos para várias aplicações industriais, utilizado para extração de princípios amargos, aromáticos e especiarias, além de ser aplicada para remoção da nicotina do tabaco e para obter insumos farmacêuticos de plantas (DÍAZ-REINOSO et al., 2006).

Fluído supercrítico é o estado da matéria quando está acima da sua temperatura e pressão crítica (BRUNNER, 1994). A temperatura crítica é a temperatura mais alta em que o gás pode ser convertido em líquido com o aumento da pressão. Já a pressão crítica é a pressão mais alta a qual o líquido pode ser convertido em gás pelo aumento da temperatura, conforme mostra Figura 4 (QUEIROZ, 2001).

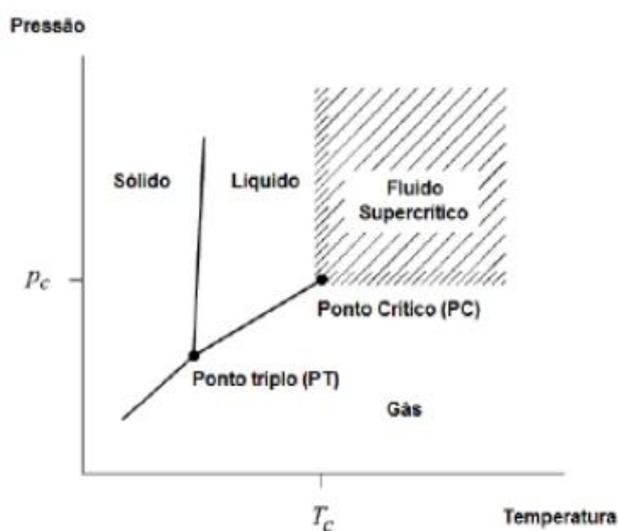


Figura 4. Diagrama de fases típico de uma substância pura.
Fonte: Adaptado de Brunner (1994).

Este método de extração se dá pelo contato entre o fluido em estado supercrítico e o líquido ou o sólido em condições de temperatura e pressão determinadas. Nele, o solvente é fornecido através de cilindros, a pressão de operação é obtida por uma bomba e a temperatura por um trocador de calor. Os compostos presentes na matriz do vegetal são solubilizados pelo solvente no extrator, a mistura solvente-soluto é submetida a uma descompressão por uma válvula de pressão. Assim, em ambos os casos a mistura passa a ser um gás-soluto e o soluto é então recolhido no coletor (PEREIRA, 2009). A Figura 5 apresenta um aparato experimental tradicional de extração com fluido supercrítico.

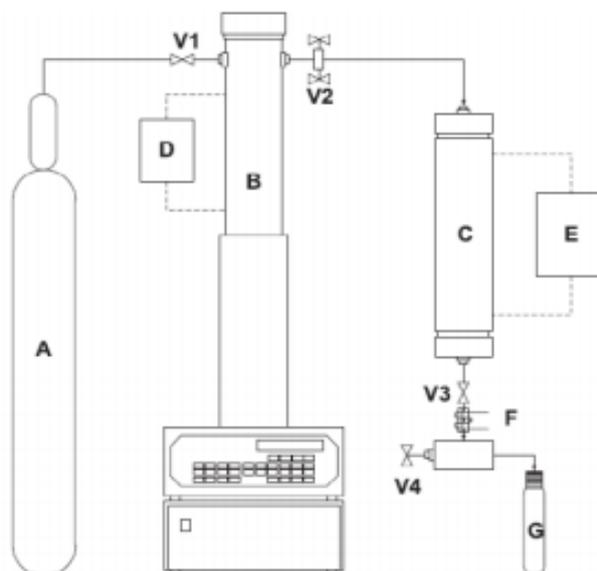


Figura 5. Módulo de extração supercrítico: A: Cilindro de gás. B: Bomba seringa; C: Extrator. D e E: Banhos termostático. F: Controlador de temperatura na válvula micrométrica. G: Coletor de óleo. V1, V2, V3 e V4 válvulas agulha.

Fonte: Silva et al. (2014).

Desse modo, um fluido supercrítico é definido como qualquer substância mantida acima da sua temperatura e pressão críticas, em que apresenta em suas características altas densidades, difusividades intermediárias entre gases e líquidos, além de apresentar baixas viscosidades (SAUCEAU, 2004). Uma vez que permite controlar e alterar a pressão e temperatura para extração, isso possibilita altas taxas de extração devido ao poder de solvatação do solvente e penetração na matriz do sólido (BRUNNER, 2004).

No processo de extração supercrítica existem diversas variáveis que podem influenciar a eficiência da própria extração, como por exemplo a temperatura, vazão do solvente, pressão, tempo de extração, concentração e tipo de cossolvente, densidade, porosidade e tamanho de partícula da amostra (BIMAKR et al., 2012). Dessa forma, é de suma importância o monitoramento e aperfeiçoamento dessas variáveis durante o experimento, para que se tenha uma extração efetiva com boa seletividade.

O emprego do método de extração com fluido supercrítico é uma das alternativas de uso que apresenta muitas vantagens (GAÑAN; BRIGONOLE, 2011). Uma vantagem é a possibilidade de fácil recuperação do solvente supercrítico após a extração, onde o mesmo pode ser continuamente reciclado ajustando a pressão e/ou temperatura do sistema. Logo, elimina a etapa de purificação do óleo, o qual é necessário nos processos de extração convencionais. Além disso, essa técnica de extração permite a modificação na temperatura e da pressão alterando as propriedades físicas do solvente conforme a necessidade de extração (PRONYK & MAZZA, 2009).

A principal desvantagem está no alto custo de investimento, pois, esse método de extração exige equipamentos especiais que suportem altas pressões (MENDES et al., 2005). Todavia, deve-se levar em conta que os produtos finais obtidos pela extração supercrítica apresentam qualidade superior em sua composição, tendo alto valor agregado no mercado (STEFFANI, 2003).

Os óleos essenciais são extraídos com solventes apolares, o mais comum empregado nessa técnica é o dióxido de carbono (CO_2), onde se extraem compostos lipofílicos além do próprio óleo. O CO_2 é muito utilizado nas indústrias alimentícias, é um produto de baixo custo, disponível em alta pureza e sua manipulação é segura. Além disso, pode ser totalmente miscível com hidrocarbonetos de baixo peso molecular e compostos orgânicos oxigenados, possui elevada volatilização quando comparado com compostos orgânicos, facilitando a recuperação do produto (MICIC et al., 2011; REVERCHON & SENATORE, 1992).

Com o emprego de métodos convencionais para extração de óleos essenciais como, por exemplo, hidrodestilação e com solventes orgânicos percebe-se a necessidade de alto tempo de extração e de novos processos para purificação e remoção de resíduos e solventes presentes no óleo. Assim, a extração através

de fluidos supercríticos se torna uma opção atrativa para indústrias e pesquisadores.

3.4.2 Extração supercrítica com adição de cossolvente

A solubilidade de substâncias de baixa volatilidade em gases supercríticos apolares, diminui com aumento da massa molecular e com o aumento da polaridade e número funcionais polares (BRUNNER, 1994). Diante disso, para aumentar o rendimento de óleo extraído é adicionado em baixas concentrações um cossolvente ou modificador, que normalmente é um solvente orgânico líquido. Este, possibilita o aumento da solubilidade do soluto resultando em fortes interações entre soluto e cossolvente, além de alterar a densidade da fase fluida. Dessa maneira, é de suma importância selecionar um cossolvente que seja o mais apropriado possível ao soluto estudado (SOVOVÁ et al., 1999).

Segundo Hollender et al. (1997), os cossolventes apresentam características físico químicas diferentes, logo, permitem a quebra nas interações entre o soluto-sólido, permitindo o transporte do soluto dos poros intersticiais para a superfície da matriz, facilitando a extração. Além de, reduzir o poder de solvatação do CO₂, ainda permitem controlar a seletividade do processo de extração, possibilitando o uso de pressões mais baixas (BRUNNER, 2005).

Dependendo do substrato e compostos de interesse, diferentes solventes podem ser utilizados como modificados, os mais utilizados são: etanol, água, metanol, acetato de etila e diclorometano. Uma vez que estes, fazem ligação de hidrogênio e interações dipolo-dipolo com parte polar da molécula do soluto permitindo uma maior eficiência da extração (AZEVEDO et al., 2008).

As técnicas aplicadas na utilização de cossolvente com extração de CO₂ supercrítico podem ser de modo estático ou dinâmico. No modo estático, o modificador é inserido junto com a amostra antes da pressurização, e após certo tempo de estabilização, abre-se a válvula, para retirada do extrato. Quando realizado em modo dinâmico o cossolvente e o CO₂ passam continuamente pela amostra até o fim da extração. Na literatura encontram-se alguns trabalhos que utilizaram a adição de cossolvente na extração supercrítica pelo modo estático RODRIGUEZ et al. (2018), NAGAVEKAR & SINGHAL (2017) e de modo dinâmico

MONROY et al. (2016), DRABROWSKI et al. (2018), CAMPONE et al. (2018). No entanto, não foram encontrados trabalhos que utilizaram essas técnicas para as folhas de cravo.

3.5 Modelagem Matemática

A técnica de extração supercrítica depende das condições operacionais como pressão, temperatura, tamanho da partícula, vazão de solvente, tratamento da amostra, e também das propriedades físicas do leito fixo dentre elas, porosidade, distribuição de partícula e altura do leito fixo (CORRÊA et al., 2001).

Para otimização destas condições a modelagem matemática é de grande valia para os processos de extração. Onde, ao analisar a curva de extração de um processo, é possível definir o volume do extrator e a vazão necessária de solvente para obter um rendimento em que se almeja. Com isso, é preciso ajustar os parâmetros matemáticos de forma em que esses valores possam relacionar como função das condições experimentais, possibilitando assim, a partir das curvas modeladas planejar um processo de extração supercrítica em escalas maiores e eficientes (MARTÍNEZ et al., 2003).

Os inúmeros modelos de transferências de massa utilizado para modelagem de curvas de extração de óleos essenciais, podem ser classificados em três (3) grupos sendo eles, modelos empíricos, modelos que faz analogia com transferência de massa e calor, e os modelos baseado na integração do balanço de massa (REVERCON & MARCO, 2006). No presente estudo empregou-se apenas o modelo de Sovová (1994), o qual refere-se a transferência de massa do processo.

3.5.1 Modelo de SOVOVÁ (1994)

No modelo de Sovová (1994) a temperatura, pressão e a velocidade do solvente são mantidas constante no decorrer de toda a extração. Além disso, quanto ao soluto e o tamanho de partícula o leito é homogêneo. Nesse modelo, o solvente flui axialmente por uma amostra com partículas pequenas em um extrator de forma cilíndrica (RODRIGUES et al., 2003).

Para Sovová (1994) o soluto fica contido no interior das células do vegetal. Dessa maneira, o pré-tratamento do material a ser utilizado para extração, como a trituração, que possui a finalidade de aumentar a superfície de contato entre o soluto e solvente, acabam por permitir o rompimento das paredes celulares, de modo que parte do soluto fique diretamente exposto ao solvente. Assim sendo, pode-se dizer que a quantidade total de soluto presente (O) é composto pelo soluto que está presente na superfície do sólido (P), considerado de fácil acesso, e o soluto que está no interior do sólido (K), sendo este de difícil acesso.

$$O = P + K \quad (1)$$

Em que:

P: massa de soluto de fácil acesso na superfície do sólido;

K: massa de soluto, de difícil acesso, que se concentra no interior do sólido.

Uma vez que, a massa de inerte (m_s) não se altera no período de extração, a concentração do soluto na fase sólida é relacionada da seguinte forma:

$$\frac{O}{m_s} = \frac{P}{m_s} + \frac{K}{m_s} = X_O = X_P + X_K \quad (2)$$

Neste modelo, nas equações de balanço de massa, os termos que consiste a dispersão na fase fluida, à difusão na fase sólida, e também a variação de Y com o tempo, em uma determinada velocidade, não mostram influência sob o processo, assim, são desprezadas (SOVOVÁ, 1994).

As condições de balanço de massa do sólido e do solvente (fase fluida) são respectivamente:

$$-\rho_s (1 - \varepsilon) \frac{\partial X}{\partial t} = J(X, Y) \quad (3)$$

$$\rho_f \varepsilon \frac{\partial Y}{\partial t} + \rho_f u \frac{\partial Y}{\partial h} = J(X, Y) \quad (4)$$

Em que: x : ($g_{\text{óleo}}/g_{\text{sólido}}$); y : ($g_{\text{óleo}}/g_{\text{solvente}}$), razão mássica de soluto nas fases sólida e fluida, respectivamente; ε : porosidade do leito; t : tempo (s); h coordenada axial; u : velocidade superficial do solvente (m/s); ρ_s ($kg_{\text{sólido}}/m^3$) e ρ_f (kg_{solvente}/m^3)

são as densidade da fase sólida e fluida, respectivamente; $J(X, Y)$: taxa de transferência de massa ($\text{kg}/\text{m}^3 \cdot \text{s}$)

Nas equações 5 e 6, é representada a taxa de transferências de massa $J(X, Y)$ dependendo da localização do soluto no sólido. Considerando-se que quando ocorre a extração do óleo nas superfícies das células, X_P , a resistência a transferência de massa é por difusão no filme externo (Eq. 5). No entanto, durante a extração do soluto no interior das células, X_K a resistência predominante pra a transferência de massa é a difusão do óleo no interior do sólido (Eq. 6).

$$J(X > X_K, Y) = k_F a \rho_F (Y_S - Y) \quad (5)$$

$$J(X \leq X_K, Y) = k_S a \rho_S X \left(1 - \frac{Y}{Y_S}\right) \quad (6)$$

Onde:

Y_S é a solubilidade do soluto no solvente (M M^{-1})

$k_F a$ é o coeficiente de transferência de massa no filme externo (T^{-1})

$k_S a$ é o coeficiente de transferência de massa no sólido (T^{-1})

As condições iniciais e de contorno para a resolução das equações de balanço de massa são, respectivamente:

$$X(h, t = 0) = X_0 \quad (7)$$

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

Dessa maneira, ao considerar-se todas as observações dado pelo modelo, o qual assume que parte do soluto é exposta diretamente à fase fluida, liberada pelo processo de preparação do sólido, e a outra parte de difícil acesso está contida no sólido. Assim, o processo de extração consiste em três etapas, como ilustrado na Figura 6. A primeira consiste no período de taxa constante de extração (CER), o qual o extrato é facilmente acessível e extraído rapidamente a uma taxa constante controlada pela transferência de convecção em massa. Na segunda etapa (FER) ocorre uma diminuição na taxa de extração devido ao esgotamento do soluto

facilmente acessível e ao início da extração da parte de difícil acesso. A terceira e última etapa, apenas o soluto de difícil acesso é extraído e a taxa de extração é controlada pela difusão interpartícula.

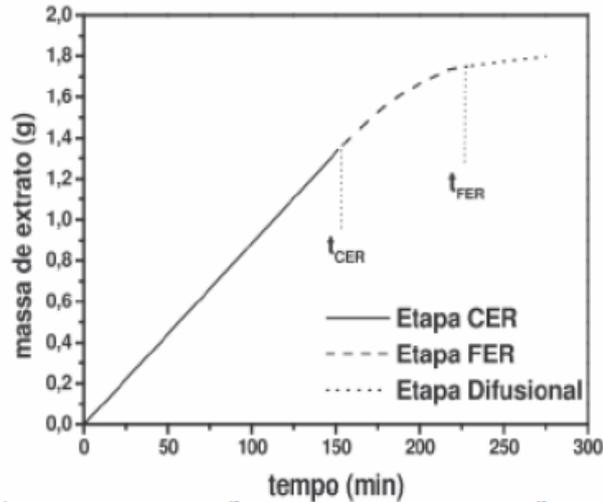


Figura 6. Curva característica de extração com representação das três etapas do processo de extração.

Fonte: Martínez (2005)

As equações do modelo que representam as curvas cinéticas são descritas abaixo:

- 1) O período de taxa constante de extração (CER), onde $t < t_{CER}$

$$m_{ext} = \dot{m}_F Y_S t [1 - \exp(-z)] \quad (9)$$

- 2) O período de taxa decrescente (FER): $t_{CER} \leq t \leq t_{FER}$:

$$m_{ext} = \dot{m}_F Y_S \left(t - t_{CER} \exp \left(\frac{Z Y_S}{W X_0} \ln \left\{ \frac{1}{1-r} \left(\exp \left(\frac{W \dot{m}_F}{m_S} \right) (t_{CER} - t) - r \right) \right\} - Z \right) \right) \quad (10)$$

- 3) Período controlado pela difusão: $t \geq t_{FER}$

$$m_{ext} = m_S \left\langle x_0 - \frac{Y_S}{W} \ln \left\{ 1 + \left[\exp \left(\frac{W X_0}{Y_S} \right) - 1 \right] \exp \left(\frac{W \dot{m}_F}{m_S} \right) (t_{CER} - t) r \right\} \right\rangle \quad (11)$$

Em que:

$$Z = \frac{k_F a m_s \rho_F}{\dot{m}_F \rho_S} \quad (12)$$

$$W = \frac{m_F k_s a}{\dot{m}_F (1 - \varepsilon)} \quad (13)$$

$$t_{CER} = \frac{(1 - r) m_s X_0}{Y_S Z m_F} \quad (14)$$

$$t_{FER} = t_{CER} + \frac{m_s}{\dot{m}_F} \ln \left[r + (1 - r) \exp\left(\frac{W X_0}{Y_S}\right) \right] \quad (15)$$

Onde: \dot{m}_F : vazão mássica de solvente (M T⁻¹); t : tempo de extração (T); X_0 : concentração inicial do óleo matriz sólida (M M⁻¹); m_s : massa de sólido livre de extrato (M); r : fração de óleo facilmente acessível (X_p/X_0); t_{CER} : tempo em que se esgota o soluto presente na superfície das células na parte inicial do leito (T); t_{FER} : tempo em que se esgota o soluto presente na superfície das células na parte final do leito (T); Z e W : são parâmetros adimensionais do modelo proposto.

3.6 Atividade Antioxidante

Os lipídeos possuem um papel importante nas características dos produtos, onde realçam o sabor, a cor, textura e odor dos produtos. A oxidação de lipídios insaturados iniciada por radicais livres é um dos principais fatores que afeta a qualidade dos produtos (ADDIS, 1986) Com isso, a procura por compostos com propriedades antioxidantes vem aumentando, devido a necessidade da preservação dos produtos e redução das perdas nutricionais, afim de aumentar a vida de prateleira dos mesmos (HRAS et al., 2000).

Os radicais livres são moléculas que contém um elétron desemparelhado, e são moléculas instáveis, altamente reativas que reagem com diversos compostos para chegar em uma forma estável, mudando assim suas propriedades (THOMAS, 2000). A formação destes pode ser controlada por adição de um antioxidante (SIES;

STAHL; SUNDQUIST, 1992), onde estes doam um elétron finalizando a reação (ATOUI et al., 2005).

Um antioxidante pode ser definido como qualquer substância em que, quando presente em baixas concentrações em comparação com o substrato oxidável, retarda ou inibe consideravelmente a oxidação desse substrato (SIES; STAHL; SUNDQUIST, 1992). Existe uma grande quantidade de compostos que são utilizados como antioxidantes nas indústrias, sendo estes, de origem sintética ou natural.

São vários os antioxidantes sintéticos utilizados, tais como o hidroxianisil butilato (BHA), hidroxitolueno butilato (BHT), di-*t*-butil- hidroquinona (TBHQ) entre outros. Todavia, existem estudos que indicam que esses antioxidantes sintéticos podem causar algum dano à saúde. Desse modo, o interesse por antioxidantes naturais para utilização principalmente em alimentos teve um aumento significativo, além disso, há maior preferência dos consumidores por alimentos com aditivos naturais (NAMIKI, 1990; MADSEN & BERTELSEN, 1995; WANASUNDARA & SHAHIDI, 1998; HRAS et al., 2000; SALEHI et al., 2005; ABDALLA et al., 2007; BASER & BUCHBAUER, 2010).

As ervas e especiarias são importantes antioxidantes naturais, devido a presença de compostos fenólicos polares e óleos essenciais presentes nos mesmos (HRAS et al., 2000; DEMO et al., 1998; ECONOMOU et al., 1991). Os antioxidantes naturais podem ser isolados de diferentes partes das plantas como, sementes, raízes, folhas, flores e frutos. Os compostos típicos que possuem atividade antioxidante são tocoferóis, flavonoides, ácidos orgânicos, terpenos dentre vários outros (PRATT, 1992).

Dentre as diversas plantas estudadas, as plantas da família *Myrtaceae*, a qual pertence a *Syzygium aromaticum* apresentam um poder antioxidante significativo conforme relatado em estudos (TAKAO; IMATOMI; GUALTIERI, 2015; BARZOTTO et al., 2018). O interesse por antioxidantes naturais, inclusive óleos essenciais e extratos de plantas, para prevenir ou retardar as reações de oxidação é grande pelas indústrias de alimentos não só por ser uma forma de preservar os alimentos, mas também devido aos efeitos benéficos que proporcionam a saúde humana (IBAÑEZ et al., 2003).

3.6.1 Métodos de avaliação da atividade antioxidante

O poder antioxidante presente em extratos vegetais podem ser influenciados por diversos fatores, como por exemplo, o método de extração e/ou método de quantificação utilizado. Para tanto, é importante que sejam avaliados por diferentes métodos, afim de avaliar os diferentes mecanismos do processo que podem ocorrer. Há vários métodos que permitem determinar o poder antioxidante e os compostos fenólicos totais presentes nas substâncias, tais como: métodos por espectrometria de absorção no visível (capacidade de eliminação de radicais livres), métodos por fluorescência (capacidade de absorção de radicais de oxigênio), métodos de quimioluminescência, métodos eletroquímicos e determinação do potencial redox dos antioxidantes (HU & SKIBSTED, 2002; ANTOLOVICH et al., 2001).

O método por DPPH (2,2-diphenil-1-picrilhidrazil) é um dos mais utilizados para avaliar a atividade antioxidante de substâncias naturais, o qual baseia-se na capacidade de redução dos radicais livres. O DPPH é um radical de cor violeta, com absorção máxima em 517 nm, quando este recebe um elétron ou radical hidrogênio a intensidade de absorção diminui. Quanto maior o poder antioxidante da substância analisada maior a diminuição da absorvância e da coloração, a qual muda de violeta para amarelo (BASER & BUCHBAUER, 2010).

Outro método que determina a atividade antioxidante muito utilizado é pelo FRAP (poder antioxidante redutor férrico). Esse método é baseado na redução do Fe^{3+} à Fe^{2+} pela presença de 2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina (TPTZ), em meio ácido, na formação de um complexo. A absorvância pode ser medida (593 nm) afim de quantificar a quantidade de ferro reduzida, correlacionando com a quantidade de substância antioxidante presente na amostra testada (PELLEGRINI et al., 2003; PISOSCHI & NEGULESCU, 2012).

Os métodos que avaliam os compostos fenólicos totais e o poder antioxidante estão relacionados com a capacidade de agirem como agentes redutores de oxidação e fornecedores de hidrogênio ou elétrons. Para determinação de compostos fenólicos o mais empregado para extratos vegetais é pelo método Folin-Ciocalteu. O mecanismo baseia-se na reação em que os compostos fenólicos presente nas amostras em análise são oxidados em meio básico, resultando na formação de um radical superóxido (O_2^-), este então reage

com o molibdato e assim forma o óxido de molibdênio (MoO_4^+) o qual possuem coloração azul (SINGLETON et al., 1999; ROGINSKY et al., 2005; STRATIL et al., 2007).

3.7 Atividade Antimicrobiana

Atualmente, há diversas metodologias empregadas na produção e preservação dos produtos, devido à preocupação com a saúde e qualidade do produto final. Diante disso, a sobrevivência de microrganismos indesejáveis ao processo nos alimentos pode provocar a deterioração dos alimentos e alteração da qualidade dos produtos (LV et al., 2011). Apesar dos conservantes químicos serem utilizados há muitos anos, o uso deste é contestado por causar diversos tipos de problemas de saúde (CELIKTAS et al., 2007).

Assim sendo, é necessário encontrar novos meios de eliminar os microrganismos durante a vida útil dos produtos. Assim, a crescente busca por produtos naturais, requer novas pesquisas sobre novos antimicrobianos a partir de plantas, afim de prevenir ou retardar o surgimento de alterações indesejáveis nos produtos consumidos (GOÑI et al., 2009).

Os óleos essenciais e extratos obtidos de diferentes plantas mostram-se bons agentes antimicrobianos a uma diversidade de microrganismos (TURGIS et al., 2009). Desse modo, ao apresentarem uma eficiência no controle de microrganismos os óleos e extratos de vegetais possuem suma importância na aplicação industrial, devido ao grande potencial como aditivos naturais para conservação dos produtos (LV et al., 2011).

A atividade antimicrobiana dos óleos e extratos obtidos de vegetais, podem ser avaliadas por vários métodos, sendo os principais por difusão de poços, difusão de disco e caldo e o método por diluição em ágar, estes são bem comuns e bastante aplicados. Todavia, não há um método padronizado para expressar os resultados do poder antimicrobiano. Para os métodos aplicados, existem vários fatores que podem influenciar no resultado final de inibição, tais como: composição do meio de cultura, microrganismos testados, método de extração, pH e solubilidade das substâncias testadas (RIOS et al., 1988; BALOURI et al., 2016).

A técnica por difusão foi desenvolvida para monitorar a quantidade de substâncias antibióticas nos extratos (RIOS et al., 1988). Nesta técnica as placas de ágar são inoculadas com inóculo padronizado do microrganismo a ser testado. Em seguida, adiciona sobre a superfície do ágar, um papel filtro em forma de disco contendo o composto de interesse, e com uma concentração desejada. As placas são incubadas sob condições definidas. Desse modo, o agente antimicrobiano se difunde no ágar e inibe o crescimento do microrganismo teste. Após, mede-se os halos de inibição (BALOURI et al., 2016). Esse método oferece muitas vantagens devido a simplicidade de aplicação, baixo custo de operação, capacidade de testar inúmeros microrganismo, além da facilidade em interpretar os resultados (KREGGER et al., 1980).

As técnicas por diluição requerem uma dispersão homogênea da amostra. Esse procedimento é aplicado para determinar a concentração inibitória mínima (MIC) dos extratos e/ou óleos. A MIC, é quantificada como a menor concentração de agente antimicrobiano testado que inibe o crescimento do microrganismo em tubos ou em poços de micro diluição. O procedimento desta técnica, consiste no desenvolvimento de preparação de várias diluições em meio líquido de crescimento microbiano, os quais são distribuídos em tubos ou placas de micro diluição. Os tubos, são inoculados com um padrão de microrganismo, em seguida, são examinados a multiplicação ou inibição dos microrganismos, evidenciados pela turbidez. A vantagem desta técnica é a obtenção de um resultado quantitativo. Porém, por ser um procedimento realizado manualmente, pode ocorrer falta de padronização no preparo das inúmeras diluições dificultando a uniformização das condições das amostras (JORGENSEN & FERRARO, 2009; BALOURI et al., 2016; RIOS et al., 1988).

3.8 Considerações Gerais

Através da revisão realizada na literatura pode-se notar o potencial de extratos e óleos obtidos por plantas aromáticas. Contribuindo com efeitos benéficos para a saúde humana, como por exemplo, a capacidade antioxidante e antimicrobiana. Além disso, dada a importância da substituição de compostos sintéticos em decorrência dos efeitos prejudicial que estes podem estar associados.

Contudo, mostra-se a influência que a metodologia de extração tem sobre a qualidade e composição química dos extratos e óleos, diante disso, a extração supercrítica demonstra ser promissora. As variáveis de pressão e temperatura utilizadas, o efeito apresentado no poder de solvatação do solvente supercrítico, são de grande valia no processo de extração, uma vez que estão relacionadas diretamente com o custo, além de influenciar no rendimento e na qualidade final produto.

Diante do exposto, observa-se o grande potencial na utilização de folhas de cravo da Índia para obtenção de extratos e a investigação de sua capacidade nos efeitos biológicos. Portanto, o presente trabalho visa avaliar o processo de extração e as variáveis de temperatura e pressão sobre o rendimento e a composição dos extratos obtidos pela extração supercrítica e por Soxhlet (*n*-hexano). Além disso, analisar as atividades biológicas que o extrato possui.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção e preparação da amostra

As amostras de folhas de cravo da Índia (*Syzygium aromaticum*) utilizadas foram coletadas de forma *in natura* de produtor rural da cidade de Santa Helena – Paraná, Brasil - 24°52'42" latitude e 54°20'55" longitude, no mês de setembro de 2017, ao anoitecer. As amostras foram submetidas ao processo de secagem em estufa com renovação e circulação de ar (modelo TE-394/3 - TECNAL) a 40 °C (ZHAO & ZHANG, 2013) por 12 horas, afim de obter uma umidade abaixo de 12%, uma vez que o teor de umidade abaixo de 12% se torna insignificante na influência quanto a transferência de massa e a solubilidade do óleo (IVANOVIC et al., 2011).

Com finalidade de aumentar a área de contato do soluto ao solvente, realizou-se a trituração com um liquidificador (MONDIAL) (Figura 7). Posteriormente, foram classificadas com auxílio de um agitador para peneiras (BERTEL) de 16, 20, 28, 32, 48 mesh e fundo. As frações de amostras utilizadas nas extrações supercrítica e convencional (Soxhlet) foram as de mesh 20, 28 e 32 mesh, que permitiram maior massa de amostra retida (64%).



Figura 7. (A) Folhas de cravo. (B) Folhas de cravo após secagem, trituração e peneiramento.

Em seguida, determinou-se a umidade da amostra em estufa de circulação forçada de ar a 105 °C por 24 horas. A umidade da amostra foi calculada segundo a equação 16.

$$\% \text{ Umidade} = \frac{(Pv + Pa) - Pf}{Pa} \times 100 \quad (16)$$

Em que:

Pv = Peso da placa vazia

Pa = Peso de amostra

Pf= Peso final (placa com amostra após secagem) em gramas.

O material foi armazenado sob-refrigeração em sacos plásticos até realização das análises.

4.1.1 Densidade real das folhas

A densidade das folhas de cravo da Índia, já secas e trituradas, foi determinada no Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração – LRAC, da Faculdade de Engenharia Química, Unicamp, utilizando a técnica de picnometria com gás Hélio, pelo equipamento Micromeritics, modelo Accupyc 1330. Na Tabela 1, estão descritas as condições de análise utilizadas.

Tabela 1. Condições utilizadas para a determinação da densidade real das folhas de cravo da Índia por picnometria de gás hélio.

Massa de amostras (g)	2,7893
Temperatura do ensaio (°C)	25,57
Número de purgas	10
Pressão de enchimento na purga (psig)	19,5
Pressão de enchimento na corrida (psig)	19,5
Taxa de equilíbrio (psig/min)	0,0500

4.1.2. Porosidade do leito

A porosidade do leito foi calculada utilizando a Equação 17.

$$\varepsilon = 1 - \frac{\rho_{leito}}{\rho_s} \quad (17)$$

Em que:

ρ_{leito} : densidade do leito (M L⁻³)

ρ_s : densidade real das folhas (M L⁻³)

4.2 Obtenção dos extratos

4.2.1 Extração com CO₂ supercrítico

A obtenção dos extratos das folhas de cravo com CO₂ supercrítico foi realizada em um módulo (conforme ilustrado na Figura 5 na sessão 3.4.1) constituído de um cilindro de CO₂, uma bomba seringa (Isco, 500Dmodel), dois banhos termostáticos, um responsável pelo resfriamento do CO₂ na bomba e outro responsável por aquecer o leito de extração, um leito cilíndrico encamisado de aço inox (diâmetro de 1,91 cm e altura de 16,8 cm) e uma válvula micrométrica do controlador de taxa de fluxo. Realizou-se um planeamento experimental 2² com triplicata no ponto central para avaliar o rendimento de extrato e do composto eugenol.

As condições utilizadas de temperatura e pressão foram: 40, 50 e 60 °C, 150, 185 e 220 bar, respectivamente. A temperatura mínima (40 °C) foi definida a partir da temperatura crítica do CO₂ (31 °C) e a máxima (60 °C) a fim de evitar possível degradação térmica do extrato com o uso de altas temperaturas. Em relação à pressão, o valor máximo (220 bar) foi definido de acordo com o limite do equipamento (250 bar), e de acordo com os limites de temperatura selecionados, a pressão mínima de 150 bar foi escolhida para obter uma alta densidade de CO₂ com todos os níveis, e um alto poder de solvatação.

O extrator foi preenchido com aproximadamente 18 gramas do material triturado. O solvente, resfriado a 5 °C, pressurizado até a pressão desejada, e posteriormente bombeado para o extrator, já estabilizado na temperatura de extração, sendo mantido em contato com a amostra por 30 min antes da abertura da válvula para uma vazão mássica de 1,99 g. min⁻¹. O extrato foi recolhido em

frasco âmbar e sua massa determinada a cada 10 min, com tempo total de extração de 80 min. Considerando que a extração de compostos voláteis é mais rápida que a de ceras, o tempo de 80 minutos foi definido neste trabalho como forma de reduzir a extração desses compostos mais pesados. Os extratos foram mantidos sob refrigeração até realização das análises.

4.2.2 Extração com CO₂ supercrítico e adição de cossolvente

Para a obtenção dos extratos com adição de cossolvente utilizou-se o mesmo módulo de extração descrito na sessão 4.2.1. Selecionou-se a condição de temperatura e pressão de 40 °C e 220 bar, condição esta que proporcionou maior rendimento quando submetido a extração apenas com CO₂ supercrítico.

As extrações foram realizadas utilizando a adição de dois cossolventes etanol (EtOH) e acetato de etila (EtAc). Os cossolventes foram adicionados às folhas trituradas nas proporções de 20 e 25% (m/m). O extrator foi preenchido com aproximadamente 18 gramas do material triturado. O solvente, resfriado a 5 °C, foi pressurizado até a pressão desejada, e posteriormente bombeado para o extrator, já estabilizado na temperatura de extração, sendo mantido em contato com a amostra por 30 min antes da abertura da válvula para uma vazão volumétrica de 2 mL min⁻¹.

O extrato foi recolhido em frasco âmbar e sua massa determinada a cada 10 min, com tempo de extração de 80 min. Os extratos foram mantidos sob refrigeração até a realização das análises.

4.2.3 Extração convencional – Soxhlet

Para a extração do extrato por um método convencional, utilizou-se o método por Soxhlet, com solvente orgânico *n*-hexano, por apresentar caráter apolar semelhante ao CO₂.

Cerca de dez gramas (10 g) de amostra totalmente embrulhada em papel filtro comum são colocadas no aparelho Soxhlet, por 6 horas, o qual consiste em um condensador, um tubo extrator e um balão de fundo redondo. O tubo extrator é conectado ao balão com 300 mL do solvente selecionado, em que o balão é

aquecido através de uma manta de aquecimento, logo, acontece a evaporação do solvente, condensando no condensador e gotejando sobre o cartucho de papel filtro que contém a amostra. O solvente evapora novamente, deixando a substância dissolvida no balão. Esse processo foi mantido por 6 horas até que todo extrato de interesse foi retirado do material vegetal. Em seguida, o extrato foi concentrado em rota evaporador (IKA, RV 10 Control) e então, o solvente residual foi removido em estufa. As extrações foram realizadas em triplicata e o rendimento é descrito com média \pm desvio padrão.

4.3 Caracterização da amostra

4.3.1 Cromatografia gasosa acoplado em espectro de massa (CG- EM)

A análise dos compostos presente nos extratos obtidos, foi realizada no laboratório da Universidade Estadual de Maringá (UEM). As análises foram realizadas em um cromatógrafo a gás acoplado em espectrômetro de massa (CG-EM), QP2010 SE (Shimadzu) com amostrador automático (Shimadzu AOC-20i). As amostras foram diluídas em diclorometano (Anidrol) antes da injeção (1 μ L) em coluna SH-RTx-5MS (30m x 0,25mm id, 0,25 μ m). Utilizou-se hélio como gás de transporte e uma taxa de fluxo de 1,0 mL min⁻¹ com razão de divisão de 2:1 e quantidade de amostra injetada. A temperatura da coluna foi inicialmente programada a 40 °C, aquecimento a 6 °C/min para atingir a temperatura final de 300 °C. As temperaturas da interface do injetor e CG-EM foram mantidas a 250 °C. Os espectros de massa foram registrados a 70 eV com intervalo de massa de m/z 50 a 550 amu. A identificação dos compostos foi realizada a partir da pesquisa no banco de dados da Biblioteca de Espectro NIST (Versão 2014).

4.3.2 Quantificação do Eugenol

A quantificação do composto eugenol foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Saran et al. (2012) com modificações. As amostras foram diluídas em isopropanol para concentração de 0,1 mg.mL⁻¹. Utilizou-se um

cromatógrafo líquido (LC-20AT, acoplado a um SPD-20A UV-VIS, Shimadzu), equipado com uma coluna Phenomenex Kinetex C18 (4,6 mm x 250 mm x 5 µm). A fase móvel metanol:água (60:40, v/v) foi mantida em 1,0 mL min⁻¹, num tempo total de corrida de 15 minutos. Preparou soluções do padrão de eugenol (0,01-0,10 mg mL⁻¹ diluídos em isopropanol) para obter a curva padrão, que apresentou R²>0.99.

4.4 Determinação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante dos extratos das folhas de cravo, obtidos por CO₂ supercrítico e extração por Soxhlet, foi determinada, através do método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), FRAP (Potencial Antioxidante Redutor de Ferro), e também pelo método Folin-Ciocalteu, para determinação dos compostos fenólicos totais

4.4.1 Determinação pelo método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)

Pelo método DPPH, avaliou-se a capacidade de captura dos radicais livres pelo extrato obtido das folhas de cravo da Índia, segundo metodologia descrita por Choi et al., (2002) com modificações.

Soluções dos extratos foram preparadas em concentrações de 150 a 300 µg mL⁻¹ em etanol. Para a reação se adicionou 3,9 mL da solução de DPPH 0,3 mM e 0,1 mL da solução amostra. Após 30 minutos à temperatura ambiente, foram realizadas as leituras das absorvâncias em espectrofotômetro (UV-VIS Shimadzu 1800) a 515 nm. O procedimento foi realizado em triplicata. A porcentagem de inibição foi calculada segundo a Equação 17:

$$\% \text{ de Inibição} = \frac{Abs_{controle} - Abs_{amostra}}{Abs_{controle}} \times 100 \quad (17)$$

Onde:

Abs_{amostra} = a absorvância da amostra

Abs_{controle} = a absorvância da solução de DPPH em etanol

Desse modo, construiu-se um gráfico de porcentagem de inibição versus a concentração de extrato para cada condição de extração, com a finalidade de determinar o índice de IC₅₀ (concentração necessária para inibir 50% do DPPH).

4.4.2 Determinação pela redução de ferro (FRAP)

O FRAP foi determinado segundo metodologia descrita por Benzie & Strain (1996) com modificações. Para a reação, utilizou-se 90 µL da solução de extrato (0,05 mg mL⁻¹), 270 µL de água destilada e 2,7 mL do reagente FRAP (25 mL de tampão acetato 0,3 M, 2,5 de uma solução de TPTZ 10 mM e 2,5 de solução aquosa de cloreto férrico 20 mM). Em seguida, manteve-se as amostras em banho-maria a 37 °C por 5 minutos, e posteriormente realizou a leitura da absorvância em 595 nm. Para a leitura das absorvâncias, utilizou-se o espectrofotômetro (UV-VIS Shimadzu 1800). Como branco usou-se o reagente FRAP. A análise foi realizada em triplicata.

4.4.3 Quantificação dos compostos fenólicos

O teor dos compostos fenólicos total foi determinado utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu, seguindo metodologia descrita por Singleton & Rossi (1965) com modificações.

O procedimento foi feito em triplicata. Os extratos foram dissolvidos em etanol, a fim de obter uma concentração de 1,0 mg mL⁻¹. A quantidade total de fenóis de cada extrato foi quantificada por meio de uma curva padrão preparada com ácido gálico nas concentrações de 10 a 100 µg mL⁻¹, a qual a partir desta, calculou-se um coeficiente de determinação (R²).

Para a reação, uma alíquota de 0,3 mL da solução etanólica de extrato foi adicionada de 2,5 mL de solução aquosa do reagente Folin-Ciocalteu a 10% e 2,0 mL de carbonato de sódio a 7,5%. A mistura foi incubada por 15 minutos em banho-maria (BIOPAR) a 50 °C. Posteriormente, a absorvância foi medida em espectrofotômetro (UV-VIS Shimadzu 1800) em 760 nm. O branco foi obtido substituindo-se o volume de amostra por água, mantendo-se as mesmas quantidades de reagente de Folin-Ciocalteu e solução de carbonato de sódio. Os

resultados foram expressos em μg equivalentes de ácido gálico (EAG) por mg de amostra.

4.5 Modelagem matemática

Para modelagem das curvas de extração do extrato das folhas de cravo da Índia empregou-se o modelo de Sovová (1994), conforme descrito na seção 3.5.1. Para aplicação do modelo utilizou-se algumas variáveis de processo como, a densidade do material triturado de $1,38 \text{ cm}^{-3}$, porosidade do leito de 0,741, concentração inicial do extrato de $1,10 \times 10^{-2} \text{ g}_{\text{extrato}}/\text{g}_{\text{sólido}}$ (dada pela razão entre a massa extraída na condição de maior rendimento e massa de sólido inerte), densidade do leito de $0,358 \text{ g cm}^{-3}$, a densidade do solvente e também a solubilidade do extrato.

As condições experimentais utilizadas para a modelagem das curvas de extração são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Condições experimentais para modelagem da extração supercrítica do extrato das folhas de cravo da Índia.

Pressão (bar)	Temperatura (°C)	P CO ₂ * (kg/cm ³)	Solubilidade (g óleo/ g CO ₂)
150	40	780,87	0,0032
150	60	604,61	0,0040
185	50	761,10	0,0042
220	40	858,11	0,0056
220	60	752,91	0,0043

*NIST

Considerou-se o parâmetro r constante, uma vez que a preparação foi a mesma para todo o material vegetal. Os parâmetros Z e W , foram determinados com o emprego do método de otimização multivariável Simplex Downhill Nelder e Mead (1965).

4.6 Avaliação da atividade antibacteriana

A análise microbiológica foi realizada do padrão comercial de eugenol (C1), do ponto central das amostras obtidas pela extração supercrítica com CO₂ (C2) e também da amostra obtida por Soxhlet com hexano (C3). As análises foram realizadas no Laboratório de Microbiologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), campus Toledo.

Para avaliar os efeitos inibitórios dos extratos de folha de cravo da Índia, empregou-se dois métodos, a técnica por difusão em disco em meio ágar Mueller-Hinton (MH) (Kirby-Bauer), com base na metodologia descrita por Laborclin (2011) e o método de microdiluição em caldo conforme *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012).

Foram testadas quatro bactérias Gram-positivas, *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Staphylococcus aureus* (ATCC 14458), *Staphylococcus aureus* MRSA (ATCC 25923), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) e, três bactérias Gram-negativas, *Salmonella enterica* subs. *enterica* serovar (ATCC 6633), *Escherichia coli* (ATCC 10536), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 7736). Para ativação e utilização das bactérias, do meio disponibilizado, a cultura foi estriada em placas contendo ágar nutriente e incubada por 37 °C por 24 horas. Das colônias formadas na superfície do ágar, foi retirada 5 alçadas e transferidas para um tubo de ensaio contendo caldo MH, o qual foi incubado a 37 °C, até atingir número de células necessárias para a utilização no experimento. Suspendeu-se as colônias em solução salina (NaCl 0,85%) até se obter uma turvação semelhante com o grau 0,5 da escala Mac Farland (1×10^6 UFC.mL⁻¹), em seguida foram semeadas usando swab estéril em placas contendo ágar MH.

Primeiramente, realizou-se o método por difusão de disco. As amostras foram diluídas em DMSO e caldo MH, em uma concentração de 50 mg mL⁻¹. As placas foram previamente divididas em três quadrantes (C1, C2, C3). Adicionou 10 uL de cada óleo, em discos estéril, sobre as placas semeadas com as respectivas bactérias. Após, foi incubada a 37 °C por 24 horas. Por fim, mediu-se os halos inibitórios de cada disco, sendo os resultados expressos em mm. Utilizou-se a ampicilina como controle positivo.

Para o método de microdiluição, na concentração inibitória mínima (CIM) avaliou-se o crescimento microbiando em meio líquido, contendo diferentes

concentrações de óleo. Nesse procedimento, as amostras foram diluídas com 1% de dimetilsulfóxido (DMSO), obtendo-se uma concentração final de 10 mg mL⁻¹. Foram transferidas alíquotas de 100 µL de cada amostra para a microplaca, contendo 100 µL de caldo MH. Em seguida, realizou-se as diluições seriadas que resultaram nas concentrações de 5000 µg mL⁻¹, 2500 µg mL⁻¹, 1250 µg mL⁻¹, 625 µg mL⁻¹, 312,5 µg mL⁻¹, 156,25 µg mL⁻¹, 78,125 µg mL⁻¹ e 39 µg mL⁻¹. Finalizadas as diluições, as placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas.

Por fim, adicionou-se 10 µL de solução 5 mg mL⁻¹ de 2,3,5-Trifeniltetrazólio cloreto em cada poço da placa de microdiluição, e novamente incubadas a 37 °C por 24 horas, afim de observar a multiplicação bacteriana.

4.7 Análise estatística

A diferença entre os dados das amostras obtidos nos parâmetros experimentais, foi avaliado pelo teste de Tukey a 5% de significância, utilizando o StatisticaTM (versão 7), Software (Statsoft).

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Rendimento

As folhas de cravo trituradas e secas em estufa, apresentaram um teor de umidade de $5,85 \pm 0,02\%$. A secagem do material para extração óleo com fluido supercrítico é fundamental, pois esse processo evita a degradação dos princípios ativos os quais as plantas possuem (CORREA et al., 1991; GHASEMI et al., 2013). Segundo a literatura a seletividade de compostos é afetada pela quantidade de umidade presente no material vegetal (LEEKE et al., 2002; HE et al., 2003; YODA et al., 2003). Para tanto, o teor de umidade entre 3 e 12% no momento da extração, se torna insignificante na influência quanto a transferência de massa e a solubilidade do óleo (IVANOVIC et al., 2011).

Os rendimentos das extrações com CO₂ supercrítico, bem como as condições experimentais de temperatura e pressão empregadas e os correspondentes valores de densidade do solvente e a solubilidade aparente são apresentadas na Tabela 3. Também, são apresentados os rendimentos da extração com Soxhlet (*n*-hexano). A solubilidade aparente foi calculada pelo método estático que emprega a parte linear da curva de extração (massa extraída/massa de solvente) (SANTOS et al., 2016; BENSEBIA et al., 2016).

Na extração supercrítica, o rendimento variou de 0,74 a 1,08%, sendo o último obtido na maior densidade de CO₂ (40 °C e 220 bar). A partir dos resultados, pode-se observar que a pressão foi a única variável que teve efeito significativo e positivo no rendimento de extração, a um nível de significância de 5% ($p < 0,05$), com R² de 0,81, onde o p-valor da variável pressão foi igual a 0,037 e 0,707 para a temperatura e 0,871 para a interação entre as variâncias (Figura 8, Tabela 4). Comparando os experimentos 1 e 4 a 40 °C e os experimentos 2 e 5 a 60 °C, o aumento da pressão resulta num aumento do rendimento.

Tabela 3. Condições experimentais e rendimentos obtidos na extração supercrítica com CO₂ e Soxhlet com *n*-hexano.

Supercrítico – CO ₂					
Experimento	Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Densidade CO ₂ (kg/m ³)	Rendimento ^a (%)	Solubilidade g óleo/ g CO ₂
1	150	40	780,87	0,76	0,0032
2	150	60	604,61	0,74	0,0040
3	185	50	765,11	0,97 ± 0,08	0,0042
4	220	40	858,11	1,08	0,0056
5	220	60	752,91	1,03	0,0043

Soxhlet		
Experimento	Solventes	
6	Hexano	1,90 ± 0,02

^a Valor médio ± desvio padrão de três repetições.

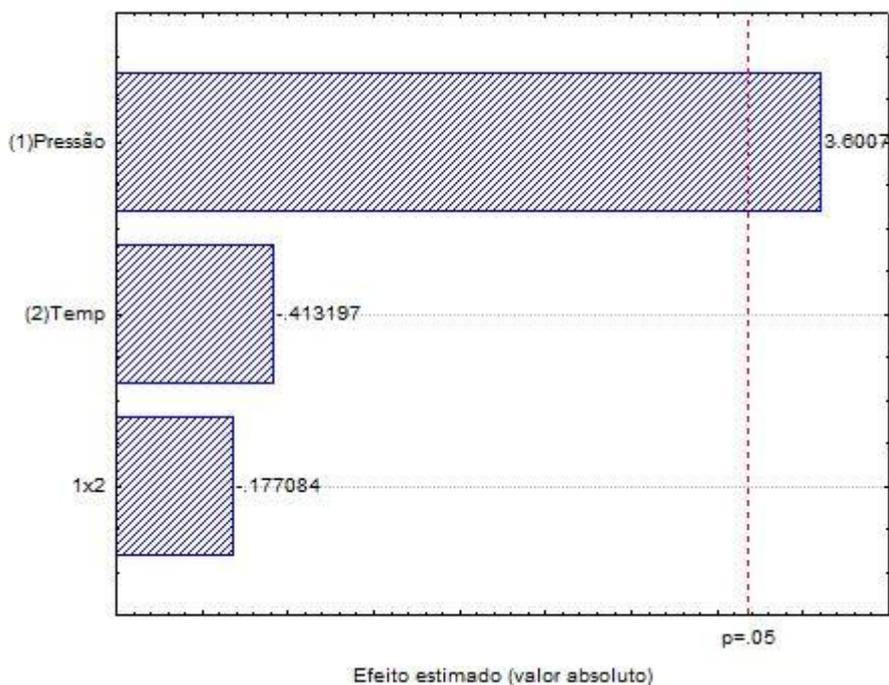


Figura 8. Gráfico de Pareto de efeitos para as variáveis temperatura e pressão na extração do extrato das folhas de cravo utilizando CO₂ supercrítico.

Tabela 4. Tabela de efeitos para variáveis temperatura e pressão na extração do extrato de folhas de cravo utilizando CO₂ supercrítico.

Variável	Média/intercepto	Pressão	Temperatura	P x T
Efeito	0,9300	0,3050	-0,0350	-0,0150
p-valor ^a	0,0001	0,0367	0,7072	0,8707
Coeficiente	0,9300	0,1525	-0,0175	-0,0075
Erro padrão	0,0320	0,0847	0,0847	0,0847

^asignificancia estatística $p < 0,05$

Os valores de solubilidade encontrados para o extrato de folhas de cravo neste estudo variaram de 0,0032 a 0,0056 g de extrato por g de CO₂, valores estes, que se mostraram condizentes com valores relatados para a extração supercrítica de folhas de outras espécies, os quais utilizaram a mesma faixa de temperatura e pressão.

No estudo de Silva et al. (2009), a solubilidade encontrada para o óleo de carqueja (*Baccharis trimera*) obtido pela extração supercrítica (100-250 bar; 30-40 °C), foi de 0,00283 g de óleo por g de CO₂ e os rendimentos obtidos variaram de 0,34 a 0,90%. A solubilidade de 0,003 g de extrato por g de CO₂ foi relatado para a extração de folhas de *Anacardium occidentale* a 200 bar e 45 °C com rendimentos de aproximadamente 1,3% (LEITÃO et al., 2013). Ainda, a solubilidade aparente calculada a partir da parte linear das curvas de extração dos compostos voláteis de flores, folhas, cascas e botões por CO₂ a 40 °C nas pressões de 100 a 250 bar foi de 0,0011 a 0,0058 g g⁻¹ (SOVOVÁ, 2012).

O poder de solvatação do CO₂ supercrítico depende, principalmente, da sua densidade, a qual aumenta com o aumento da pressão em processo isotérmico, e diminui com o aumento da temperatura em sistema isobárico (AZEVEDO et al., 2003). Resultado similar, foi encontrado por Zhao & Zhang (2014) na extração das folhas de eucaliptos, pertencente da família *Myrtaceae*. Para os autores, a pressão e a temperatura foram os principais parâmetros que influenciaram na eficiência de extração supercrítica. Observou-se que a uma dada temperatura (50 °C), o rendimento do óleo aumentou (2,99 para 3,39%) significativamente com pressão crescente (200 a 400 bar), pois o aumento da pressão de extração a uma temperatura constante levou a uma maior densidade do fluido, aumentando assim a solubilidade do óleo. O que pode ser observado também em outros trabalhos (MACKÉLA et al., 2017; SINGH et al., 2016).

Neste trabalho, o efeito da temperatura não influenciou o rendimento, uma vez que a redução do rendimento observado com o aumento da temperatura de 40 para 60 °C a 150 bar não foi significativo. Além disso, tendo em conta a dispersão no ponto central, não houve diferença entre os rendimentos obtidos no intervalo de pressão de 185 a 220 bar, independente da temperatura.

O rendimento obtido na extração por Soxhlet foi de 1,90%. O maior rendimento encontrado para este solvente em relação à extração supercrítica (1,08%), possivelmente está relacionando ao maior tempo de extração. Além de que, a extração por Soxhlet favorece a extração de outros compostos com maior peso molecular, como por exemplos as ceras (GLISIC et al., 2010).

Ciarlini et al. (2017) estudaram a obtenção do extrato das folhas de *Eugenia involucrata*, também da família *Myrtaceae* pelos métodos de extração supercrítica com CO₂ (200 bar, 40 °C, 3 mL min⁻¹ e 180 min) e Soxhlet com *n*-hexano (6 horas). Os autores verificaram comportamento similar ao do presente estudo, onde o rendimento com Soxhlet (4,03%) foi maior quando comparado com a extração supercrítica (1,01%).

A extração supercrítica permite a extração de numerosos compostos fitoquímicos, enquanto que os outros métodos de extração são limitados como, por exemplo, à extração por hidrodestilação é destinada à extração de compostos voláteis e, na extração por Soxhlet, compostos de alto peso molecular, como as ceras são extraídos em maior quantidade (GLISIC et al., 2010).

Na Tabela 5, são apresentadas as condições experimentais e rendimentos das extrações obtido da adição dos cossolventes etanol e acetato de etila às folhas, bem como os valores da solubilidade aparente do extrato no solvente foram calculadas a partir da inclinação da parte linear das curvas de extração.

Tabela 5. Rendimentos das extrações supercríticas com CO₂ a 40°C e 220 bar e a adição dos cossolventes etanol (EtOH) e acetato de etila (EtAc).

Solvente	Cossolvente (%)	Solubilidade (g g ⁻¹) ^a	Rendimento ^b (%)
CO ₂	0	0,0056	1,08
CO ₂ +EtOH	20	0,0105	1,26 ± 0,05
CO ₂ +EtOH	25	0,0102	1,33 ± 0,02
CO ₂ +EtAc	20	0,0090	1,08 ± 0,01
CO ₂ +EtAc	25	0,0105	1,15 ± 0,01

^a Solubilidade do extrato no solvente.

^b g de extrato por 100 gramas de folhas.

Quanto às extrações do extrato das folhas de cravo da Índia com CO₂ supercrítico e adição de cossolvente (etanol e acetato de etila) é possível verificar que, o maior rendimento em termos de extrato foi obtido na condição de extração com a adição de 25% do cossolvente etanol às folhas de cravo (1,33%). O cossolvente etanol, nas proporções de 20 e 25% em relação à massa de matéria-prima, aumentou o rendimento final em 17 e 23% em relação à extração com CO₂ puro (1,08%). Para as extrações com acetato de etila, só houve aumento significativo para a concentração de 25%, sendo o valor final do rendimento aumentado em 6%.

Os solventes modificadores adicionados às folhas tiveram o efeito de aumentar a solubilidade do extrato no CO₂ supercrítico, de 0,0056 g g⁻¹ para a extração com cossolvente até 0,0102 g g⁻¹ para a adição de 25% de etanol e isso é explicável pelo aumento das forças de interação entre soluto e solvente (DÍAZ-REINOSO et al., 2006), além de facilitarem o transporte do soluto pelo inchamento do sólido (HOLLENDER et al., 1997). Os aumentos mais significativos observados para os experimentos com etanol em relação ao acetato de etila se deve, possivelmente, à capacidade deste solvente em realizar ligações de hidrogênio, como também verificado por Bermejo et al. (2016) e Santos et al. (2017).

5.2 Modelagem matemática da extração supercrítica

Para modelagem das curvas de extração do extrato das folhas de cravo empregou-se o modelo de Sovová. Os parâmetros utilizados para a modelagem matemática da cinética de extração foram: concentração inicial do extrato de 0,011 g_{extrato} g_{sólido}⁻¹ (dada pela razão entre a massa de extrato nas folhas e a massa de sólido inerte), densidade do sólido de 1,3833 g cm⁻³ (determinada por picnometria de gás hélio), densidade do leito de 0,358 g cm⁻³, porosidade de 0,741, massa de material inerte de 18,4 g, vazão mássica de solvente de 1,99 g min⁻¹, a densidade do solvente e solubilidade do extrato de cravo de acordo com a Tabela 2.

Na Tabela 6 são apresentados os parâmetros ajustados do modelo de Sovová, Z , W e r . O parâmetro r foi considerado constante devido ao procedimento de preparação ser o mesmo para todo o material (folhas de cravo) e seu valor indica que 53% do extrato é de fácil acesso.

Tabela 6. Parâmetros ajustáveis para o modelo de Sovová para extrações utilizando CO₂.

T (°C)	P (bar)	Z	W	r	t_{CER} (min)	t_{FER} (min)	$k_F a$ (min ⁻¹)	$k_S a$ (min ⁻¹)	R ²
40	150	5,41	0,12	0,53	3,99	27,65	2,10 x 10 ⁻¹	2,61 x 10 ⁻³	0,99
60	150	2,70	0,16	0,53	8,19	32,55	1,05 x 10 ⁻¹	2,72 x 10 ⁻³	0,98
50	185	39,67	0,36	0,53	0,42	20,63	1,54	7,68 x 10 ⁻³	0,99
40	220	1,74	0,77	0,53	6,38	21,02	6,76 x 10 ⁻²	1,86 x 10 ⁻²	0,99
60	220	3,63	0,48	0,53	4,54	25,40	1,41 x 10 ⁻¹	1,01 x 10 ⁻²	0,99

De acordo com as equações 12 e 13 (Seção 3.5.1) os parâmetros Z e W são diretamente proporcionais aos coeficientes volumétricos de transferência de massa nas fases fluida e sólida, $k_F a$ e $k_S a$, respectivamente. Os valores de $k_F a$ (6,76 x 10⁻² a 1,54 min⁻¹) foram elevados em relação aos de $k_S a$ (2,61x 10⁻³ a 1,86 x 10⁻² min⁻¹) e isso se deve ao primeiro coeficiente estar relacionado à extração da fração de fácil acesso, e o segundo, à da fração contida no interior do sólido. Ou seja, há forte limitação da transferência de massa do soluto na fase sólida.

Na Figura 9 estão apresentadas as curvas cinéticas experimentais de extração do extrato das folhas de cravo com CO₂ supercrítico em diferentes condições de temperatura e pressão ajustadas pelo modelo de Sovová. O modelo apresentou um bom ajuste aos dados experimentais, com coeficiente de determinação, R²> 0,98 para todas as condições avaliadas, e desvio médio máximo absoluto de 4%.

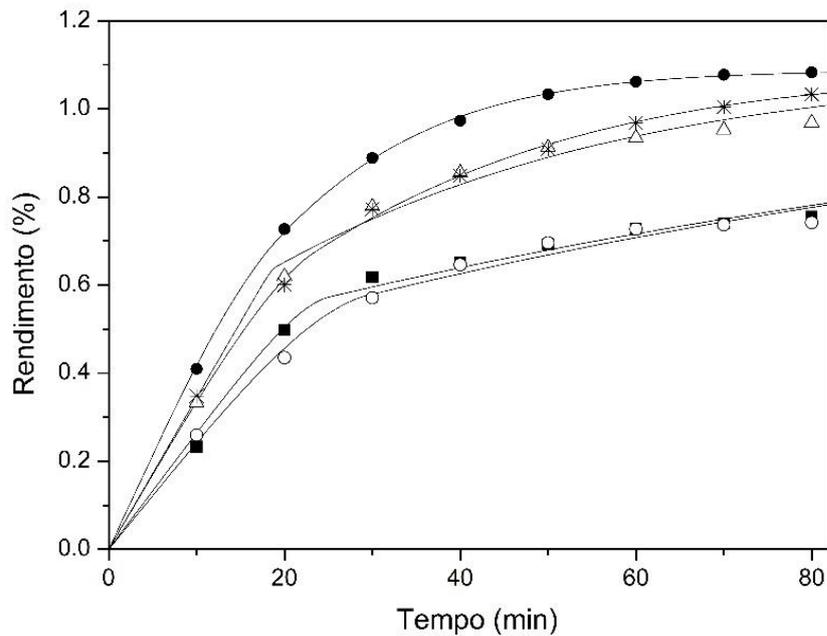


Figura 9. Curvas cinéticas experimentais das extrações dos extratos das folhas de cravo com CO2 supercrítico com ajuste do modelo de Sovová. ■ (150 bar, 40 °C); ○ (150 bar, 60 °C); △ (185 bar, 50 °C) ● (220 bar, 40 °C); ✱ (220 bar, 60 °C).

5.2.1 Modelagem matemática da extração supercrítica (220 bar e 40 °C) com adição de cossolvente

Na Tabela 7 são apresentados os parâmetros ajustados do modelo de Sovová, Z , W e r .

Como apresentado nas Equações 4 e 5, os parâmetros Z e W são diretamente proporcionais aos coeficientes volumétricos de transferência de massa nas fases fluida e sólida, $k_F a$ e $k_S a$, respectivamente. Os valores de $k_F a$ ($2,07 \times 10^{-1}$ a $16,8 \text{ min}^{-1}$) foram elevados em relação aos de $k_S a$ ($1,53 \times 10^{-3}$ a $1,16 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$) e isso se deve devido ao primeiro coeficiente estar relacionado à extração da fração de fácil extração, e segundo, à da fração contida no interior do sólido. O maior valor de $k_S a$ foi obtido na condição de extração com adição de 25 % de etanol às folhas de cravo, condição que também apresentou o maior rendimento da extração (1,33 %).

Tabela 7. Parâmetros ajustados do modelo de Sovová para as extrações com CO₂ supercrítico a 40°C e 220 bar e a adição dos cossolventes etanol e acetato de etila.

Extração	Z	W	r	t_{CER} (min)	t_{FER} (min)	k_{Fa} (min ⁻¹)	k_{Sa} (min ⁻¹)	R^2
CO ₂ (220 bar e 40 °C)	1,74	0,77	0,53	6,38	21,02	$6,76 \times 10^{-2}$	$1,86 \times 10^{-2}$	0,99
EtOH 20%	20,9	0,12	0,15	0,10	2,31	$8,03 \times 10^{-1}$	$2,81 \times 10^{-3}$	0,99
EtOH 25%	438,0	0,49	0,15	0,05	2,82	16,8	$1,16 \times 10^{-2}$	0,98
EtAc 20%	18,15	0,06	0,16	0,12	2,40	$6,96 \times 10^{-1}$	$1,53 \times 10^{-3}$	0,97
EtAc 25%	541,15	0,24	0,16	0,04	2,17	$2,07 \times 10^{-1}$	$5,77 \times 10^{-3}$	0,91

Na Figura 10 são apresentadas as curvas cinéticas de extração das folhas de cravo com CO₂ a 40 °C e 220 bar e adição dos cossolventes etanol e acetato de etila ajustadas pelo modelo de Sovová. °

Os resultados das cinéticas de extração com a adição de cossolventes, observa-se boa concordância entre os dados de modelagem e os dados experimentais, nos estágios inicial e final da extração para ambos os solventes. Além disso, verifica-se que a adição de co-solvente acelerou as taxas de extração quando comparado com as extrações com CO₂ supercrítico, pois a partir do tempo de extração de 30 minutos não houve uma variação significativa da quantidade de extrato, portanto, não foi necessário continuar a extração após 80 minutos. Visto que, na extração com CO₂ puro o rendimento das folhas de cravo permanece constantes apenas após 50 minutos de extração.

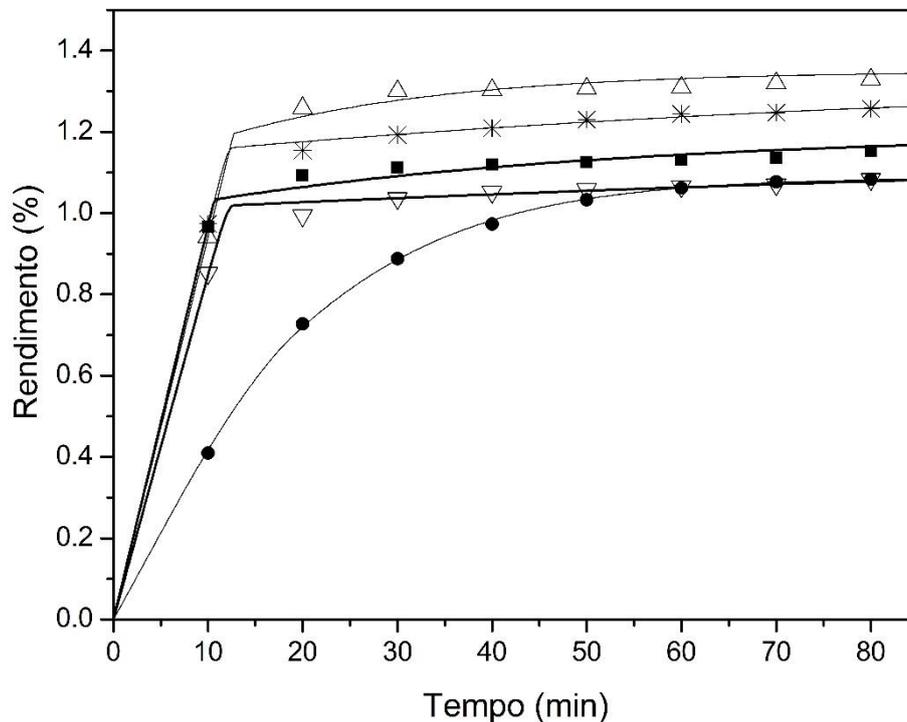


Figura 10. Curva cinéticas experimentais das extrações dos extratos ds folhas de cravo com CO₂ supercrítico puro e adição de cossolvente, na condição de 220 bar e 40 °C. * EtOH 20%; △ EtOH 25%; ▽ EtAc 20%; ■ EtAc 25% ● CO₂ puro.

5.3 Caracterização dos extratos

5.3.1 Cromatografia gasosa com espectrômetro de massa (CG-EM)

A caracterização química do extrato de cravo foi analisada referente ao ponto central das condições de extração realizadas no presente estudo (185 bar e 50 °C). Selecionou-se esta amostra para análise de CG-EM, por ser a condição intermediária do delineamento experimental. Ainda, segundo outros trabalhos com extração supercrítica (SANTOS et al., 2016; CORREA et al., 2016; JOKIĆ et al., 2018), incluindo a extração de cravo (YAZDANI et al., 2005; GUAN et al., 2007) a composição quantitativa dos extratos não se alterou mesmo com o uso de outras condições de pressão e temperatura. A presença de eugenol foi confirmada nesta amostra, então, realizou-se posteriormente a quantificação aos demais extratos

obtidos no presente estudo, pela técnica de HPLC. Os compostos identificados presentes nas folhas do cravo da Índia são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Composição química (%) dos compostos identificados nas folhas de Cravo por CG/EM.

Compostos	Área relativa (%)
Chavicol	13,31
Eugenol	29,73
n-Pentacosane	11,66
Vitamina E	9,30
Gama-Sitosterol	8,62
Hexacosanal	11,37
Lupeol	8,82
Octacosanol	7,18

Os principais componentes identificados no extrato de cravo da Índia foram o eugenol (29,73%), chavicol (13,31%), n-pentacosane (11,66%) e hexacosanal (11,37%). A quantidade de eugenol presente nos extratos de óleo de cravo da Índia, de botões e folhas, podem variar de 20-90% (KHALIL et al., 2017; GAYLOR et al., 2016). A variação de teores apresentados nos extratos pode estar relacionando a diferentes áreas de plantio, clima, parte da planta submetida à extração, e diferentes métodos de extração utilizados (ZHANG et al., 2017).

O composto eugenol pode ser encontrado em várias plantas. Nas folhas de tulsi o eugenol é um dos principais constituintes com atividades terapêuticas (CHATTERJEE et al., 2017). Piras et al., (2018), obtiveram 20,7% do composto eugenol no óleo essencial de *Ocimum basilicum*. Para Garkal et al., (2012) a porcentagem de eugenol variou de 74-80% no óleo de *Ocimum sanctum*.

O Eugenol também pode ser encontrado como composto majoritário no óleo essencial de espécies de pimenta. Na Pimenta *pseudocaryophyllus* com 88,6% de eugenol (SUZUKI et al., 2014). Na Pimenta *dióica*, com variação de 72-82% de eugenol no óleo (OLIVEIRA et al., 2009), e na Pimenta *guatemalensis* com um teor de 72,8% (CHAVERRI et al., 2015), dando aos óleos propriedades benéficas. O eugenol também predomina no óleo essencial extraídos das cascas da canela com um percentual entre 20-50% do composto presente (HAN et al., 2018).

Outro componente encontrado nos óleos foi a vitamina E, formada por 4 tocoferóis (α -, β -, γ - e δ -) e 4 tocotrienóis (α -, β -, γ - e δ -) (KAMAL-ELDIN & APPELQVIST, 1996), que apresentam capacidade antioxidante (SEPPANEN et al., 2010; MUNNÉ-BOSCH & ALEGRE, 2002), anticancerígenas (SAINI & KEUM, 2016), anti-hipertensivo (KIZHAKEKUTTU & WIDLANSKY, 2010), atividade anti-inflamatória (MOCCHIGIANI et al., 2014). No presente estudo, a porcentagem de vitamina E foi de 9,30%.

Inoue et al. (2017), avaliaram a distribuição de tocoferóis e tocotrienóis em 81 plantas e os 4 homólogos de tocoferóis, onde nos extratos de plantas da família *Myrtaceae*, houve predominância do α -tocoferol. O composto vitamina E também foi relatado em outros trabalhos de extração de folhas de espécies da família *Myrtaceae*. No extrato obtido de folhas de *Eugenia involucrata* com CO₂ supercrítico, os autores encontraram 30,49% do composto (BARZOTTO et al., 2018). Rahim et al. (2018) encontraram 6,85% da mistura de 4 tocoferóis no extrato hexânico das folhas de *Syzygium polyanthum*. Chevolleau et al. (1993) também relataram a presença de α -tocoferol (3,3%) no extrato hexânico das folhas de *Myrtus communis*.

O composto chavicol que também está presente no extrato das folhas de cravo, é relatado com atividade antioxidante (JIROVETZ et al., 2007) e também foi encontrado em extratos de botões de cravo (SCOPEL et al., 2014; BHUIYAN, 2010).

5.3.2 Concentração de Eugenol

Na Tabela 9, são apresentados os resultados da quantificação por cromatografia líquida de eugenol, obtido nas diferentes condições de extrações com CO₂ supercrítico e pela técnica Soxhlet sendo, 22,85–29,84% e 5,67%, respectivamente aos métodos de extração. Na Tabela 10, mostra a concentração de eugenol obtidos com adição de cossolventes (EtOH e EtAc).

Tabela 9. Teor de eugenol (%) presente nos extratos de cravo obtidos por diferentes condições de extração.

Experimento	Condições de extração	Eugenol (%) [*]	Eugenol (g /kg folhas)
<i>CO₂ Supercrítico</i>			
1	150 bar 40 °C	25,69 ± 0,10 ^b	1,95 ± 0,006 ^{b,c}
2	150 bar 60 °C	24,62 ± 0,19 ^b	1,81 ± 0,001 ^b
3	185 bar 50 °C	23,41 ± 1,79 ^b	2,27 ± 0,174 ^{c,d}
4	220 bar 40 °C	29,84 ± 0,24 ^c	3,22 ± 0,025 ^e
5	220 bar 60 °C	22,85 ± 0,13 ^b	2,34 ± 0,008 ^d
<i>Soxhlet</i>			
6	Hexano	5,67 ± 0,11 ^a	1,12 ± 0,015 ^a

Letras iguais na mesma coluna e para o mesmo método de extração indicam que não houve diferença significativa ao nível de 5%.

^{*} g de eugenol por 100 g de extrato.

Tabela 10. Concentrações de eugenol no extrato obtido com CO₂ a 40°C e 220 bar e com adição de 20 e 25% dos cossolventes EtOH e EtAc às folhas de cravo.

Solvente	Cossolvente (%)	Eugenol ^a (%)	g _{eugenol} kg _{folhas} ⁻¹
CO ₂	0	29,84 ± 0,24 ^c	3,22 ± 0,02 ^d
CO ₂ +EtOH	20	28,58 ± 0,44 ^c	3,59 ± 0,06 ^e
CO ₂ +EtOH	25	13,12 ± 0,44 ^b	1,74 ± 0,06 ^c
CO ₂ +EtAc	20	7,48 ± 0,41 ^a	0,81 ± 0,04 ^a
CO ₂ +EtAc	25	9,36 ± 0,49 ^a	1,08 ± 0,06 ^b

Letras iguais na mesma coluna e para o mesmo método de extração indicam que não houve diferença significativa ao nível de 5%.

^a g de eugenol por 100 g de extrato.

Para o extrato obtido das folhas de cravo da Índia por CO₂ supercrítico, a maior concentração de eugenol (29,84%) foi obtida na maior pressão e a menor temperatura do planejamento experimental (220 bar e 40 °C), correspondendo a maior densidade de CO₂ (858,11 kg m⁻³), condição esta que também apresentou maior rendimento de óleo (1,08%). O menor teor de eugenol (22,85%) foi obtido na mesma pressão, porém em temperatura maior (220 bar e 60 °C). Avaliando o rendimento de eugenol, verifica-se que a maior quantidade deste composto também pode ser obtida na condição de 220 bar e 40 °C, 3,22 g_{eugenol} kg_{folhas}⁻¹. A

variação das condições experimentais elevou seu rendimento em até aproximadamente 78%. Na extração com aparato Soxhlet obteve-se baixo teor de eugenol (5,67%).

O composto eugenol é um composto majoritário característico dos óleos essenciais de cravo, o qual pode ser obtido dos botões florais, folhas e outras partes. Ao analisar a composição química dos botões de cravo, extraído por hidrodestilação, Ivanovic et al. (2011), encontraram 64,06% de eugenol. Raina et al., (2001), ao estudar a composição química do óleo essencial das folhas de cravo extraídos por hidrodestilação, encontraram 94,41% de eugenol.

Jirovetz et al., (2006) e Zhang et al., (2007) encontram 76,8% e 90,84% de eugenol, respectivamente, nos óleos comercial de folhas de cravo. Nassar et al., (2007) avaliaram a composição química do extrato hexânico dos botões de cravo. Quando analisados por CG/EM os maiores compostos encontrados foram o eugenol (71,06%) e o acetato de eugenol (8,99%). Gaylor et al., (2006) verificaram uma faixa de 25,84-90,48% de eugenol no óleo essencial de folhas de cravo em diferentes fases de desenvolvimento.

Apesar da extração Soxhlet ter apresentado maior rendimento em relação à extração supercrítica com CO₂, deve-se ressaltar que o extrato obtido da tecnologia supercrítica com CO₂ tem a vantagem de maior pureza quanto ao composto majoritário eugenol e de obtenção em menor tempo de extração. Uma vez que, os extratos da extração Soxhlet podem apresentar impurezas e resíduos de solventes indesejados.

Além disso, as extrações por métodos convencionais provocam maior perda de compostos voláteis durante a separação do solvente e também em decorrência do longo tempo de extração (DÍAZ-MAROTO et al., 2002; OZCAN & OZCAN, 2004). Assim sendo, os óleos obtidos através destes métodos convencionais precisam passar por processo posteriores de purificação. Portanto, para a escolha de um método de extração mais eficaz necessita-se que se considere todos os fatores envolvidos, como o processo de extração mais o de purificação (QUISPE-CONDORI et al., 2005).

A adição de 20% de etanol em relação à massa de folhas não alterou a concentração de eugenol nos extratos, ao nível de significância de 5%, no entanto, uma redução considerável do composto foi verificada para a adição da máxima quantidade de etanol (25%) e de 20 e 25% de acetato de etila. Isso se deve,

possivelmente, à baixa seletividade dos cossolventes nestas concentrações, favorecendo a extração de outras classes de compostos, principalmente de caráter polar.

Quando avaliado o rendimento de eugenol (g de eugenol por kg de folhas), a adição de 20% do cossolvente etanol aumentou a quantidade extraída deste composto em relação à extração somente com CO₂, sendo possível obter até 3,59 g_{eugenol} kg_{folhas}⁻¹, ou seja, um aumento de aproximadamente 11%.

5.4 Atividade Antioxidante

Conforme os resultados apresentados na Tabela 11, os melhores resultados dentre as condições realizadas, foram obtidas na menor pressão e temperatura, 150 bar e 40 °C.

Tabela 11. Composto fenólicos total e atividade antioxidante pelo método DPPH e FRAP dos extratos de cravo da Índia extraídos com CO₂ supercrítico e por Soxhlet.

Condições de extração	TCF (µg EAG mg ⁻¹)	IC ₅₀ (ug mL ⁻¹)	FRAP (umol _{Fe2+} mg ⁻¹)
<i>CO₂ Supercrítico</i>			
150 bar 40 °C	324,37 ± 5,46 ^e	435,48 ± 6,47 ^a	12,64 ± 0,35 ^e
150 bar 60 °C	292,26 ± 16,78 ^{d,e}	453,88 ± 31,57 ^a	11,32 ± 0,34 ^d
185 bar 50 °C	241,13 ± 12,86 ^c	535,29 ± 42,95 ^{a,b}	8,43 ± 0,22 ^c
220 bar 40 °C	265,76 ± 12,66 ^{c,d}	513,69 ± 22,43 ^{a,b}	8,51 ± 0,20 ^c
220 bar 60 °C	193,77 ± 13,98 ^b	627,11 ± 21,370 ^b	6,64 ± 0,17 ^b
<i>Soxhlet</i>			
<i>n</i> -Hexano	70,99 ± 9,21 ^a	2349,34 ± 125,85 ^c	2,14 ± 0,10 ^a
Padrão eugenol	645,32 ± 11,41	129,69 ± 3,36	27,18 ± 1,32

IC₅₀: concentração de extrato necessária para reduzir a concentração inicial de DPPH em 50%. Letras iguais na mesma coluna e para o mesmo método de extração indicam que não houve diferença significativa ao nível de 5%.

Para os resultados obtidos do método DPPH, observa-se baixo poder antioxidante para o extrato das folhas de cravo da Índia, uma vez que apresentaram IC_{50} superiores a $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ (CZAIKOSKI et al., 2015). O melhor resultado para o extrato obtido com CO_2 supercrítico foi $435,48 \mu\text{g mL}^{-1}$. Para a extração com Soxhlet verificou-se $2349,34 \mu\text{g mL}^{-1}$. O eugenol puro apresentou um IC_{50} de $129,69 \text{ mg mL}^{-1}$. Mahapatra & Roy (2014) encontraram um valor de IC_{50} $242,47 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o eugenol e Khunkitti et al., (2012) e Politeo et al., (2006) relataram IC_{50} $145,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ e IC_{50} $96,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, para esse fenilpropanoide.

Segundo Fujisawa et al., (2002) a atividade antioxidante do composto eugenol é em decorrência da sua estrutura metoxifenol, considerando que o mecanismo de reação entre o antioxidante e o radical DPPH depende da disposição estrutural do antioxidante.

Em relação ao método FRAP que baseia-se na capacidade para reduzir o complexo Fe^{3+} para Fe^{2+} o melhor resultado obtido nas extrações supercríticas foi de $12.64 \text{ umol}_{\text{Fe}^{2+}} \text{ mg}^{-1}$.

Para tanto, verifica-se que as maiores atividades antioxidante foram obtidas para as amostras com maior concentração de compostos fenólicos. Tai et al. (2002) revelaram que a cadeia lateral além do anel fenólico da molécula de eugenol, também tem um papel importante no poder antioxidante. Visto a elevada atividade do composto eugenol pelo método de Folin-Ciocalteu, conclui-se que atividade antioxidante pelos métodos DPPH e FRAP das amostras extraídas com CO_2 supercrítico está relacionada à sua concentração neste composto ou sinergismo com os outros compostos presentes no extrato. O baixo poder antioxidante obtido pelo método Soxhlet com o solvente hexano, sugere à baixa concentração de eugenol encontrado neste extrato.

5.5 Atividade antimicrobiana

Avaliou-se a atividade antibacteriana do extrato das folhas de cravo da Índia, obtido por extração supercrítica com CO_2 (220 bar e $40 \text{ }^\circ\text{C}$), pela extração Soxhlet com hexano e também do padrão de eugenol com diferentes espécies de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Os métodos aplicados foram de difusão por discos e microdiluição seriada.

As atividades antibacterianas obtidas pelo método por difusão de discos e por microdiluição do extrato em estudo são apresentadas na Tabela 12 e 13, respectivamente. Diante dos resultados, verifica-se que diferentes espécies de bactérias mostram diferentes níveis de sensibilidade diante dos extratos testados.

A presença e tamanho dos halos de inibição indicam a sensibilidade das bactérias aos extratos naturais. A atividade antibacteriana dos extratos pode ser classificada como: halos de inibição menores que 7 mm, não ativo contra bactérias; diâmetro de inibição maior que 12 mm indica efeito satisfatório (ARORA & KAUR, 1999; RADUNZ et al., 2019).

Tabela 12. Atividade antibacteriana dos extratos obtidos das folhas de cravo da Índia e do padrão de eugenol pela técnica de difusão de disco.

Bactérias	Extratos		
	C1	C2	C3
	Diâmetro dos halos em milímetros		
Gram (-)			
<i>Escherichia coli</i>	8,4	6,1	6,4
<i>Salmonella enterica</i>	9,6	6,8	6,6
<i>Klebsiella pneumoneae</i>	10,1	6,7	7,6
Gram (+)			
<i>Staphylococcus aureus</i>	11,3	10,1	7,5
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	9,2	9,8	5,9
<i>Bacillus subtilis</i>	9,4	6,4	5,9
<i>Bacillus cereus</i>	8,2	7,4	6,8

C1: Padrão comercial do eugenol; C2: Ponto central das amostras obtidos pela extração supercrítica com CO₂; C3: Amostra obtida por Soxhlet com hexano.

Tabela 13. Concentração inibitória mínima (MIC) do extrato das folhas de cravo da Índia, extraído com CO₂ à 220 bar e 40 °C, e por Soxhlet (hexano), e do padrão de eugenol.

Bactérias	Extratos		
	C1	C2	C3
	MIC (µg mL ⁻¹)		
Gram (-)			
<i>Escherichia coli</i>	156	2500	1250
<i>Salmonella enterica</i>	625	312	1250
<i>Klebsiella pneumoneae</i>	1250	2500	2500
Gram (+)			
<i>Staphylococcus aureus</i>	1250	2500	1250
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	1250	1250	2500
<i>Bacillus subtilis</i>	625	1250	1250
<i>Bacillus cereus</i>	625	2500	1250

C1: Padrão comercial do eugenol; C2: Ponto central das amostras obtidos pela extração supercrítica com CO₂; C3: Amostra obtida por Soxhlet com hexano.

No presente estudo, verifica-se que a inibição dos extratos das folhas de cravo da Índia, obtidos pela extração supercrítica (220 bar e 40 °C) variou de 6,1 a 10,1 mm sendo a maior inibição para a bactéria gram positiva *Staphylococcus aureus*. Não sendo satisfatória para quatro espécies, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis*. Segundo Vaara (1992) a alta resistência das bactérias gram negativas pode estar relacionado com a estrutura da membrana, uma vez que esta apresenta uma estrutura externa composta por lipopolissacarídeos, acarretando numa menor interação com os extratos.

Em relação a atividade antibacteriana do extrato obtido por Soxhlet com *n*-hexano, pode-se observar uma inibição menor quando comparado com o extrato obtido por CO₂ supercrítico, com uma variação nos halos de 5,9 a 7,5 mm. Sendo as bactérias da espécie de *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* os quais apresentaram um halo de inibição maiores.

Em relação ao método por microdiluição, a atividade antibacteriana dos extratos obtidos de plantas naturais é considerada como um inibidor fraco quando apresenta um MIC acima de 1500 µg mL⁻¹, moderado para MIC entre 600 e 1500 µg mL⁻¹ e um inibidor forte quando apresenta um MIC até 500 µg mL⁻¹ (ALIGIANNIS et al., 2001; DUARTE et al., 2007; WANG et al., 2008; GUINDANI et al., 2016). Diante disso, é possível verificar que o extrato C2 apresentou uma forte inibição para a bactéria *Salmonella enterica* (312 µg mL⁻¹), e fraca inibição diante das outras bactérias testadas, o qual houve uma variação de 1250 a 2500 µg mL⁻¹. Já a amostra C3, apresentou uma sensibilidade moderada a maioria das bactérias com MIC 1250 µg mL⁻¹ e uma fraca inibição apenas para as espécies *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* MRSA, MIC de 2500 µg mL⁻¹.

Em relação ao padrão de eugenol, composto majoritário do extrato das folhas de cravo da Índia, este se mostrou um bom inibidor contra as espécies de bactérias testadas, apresentou uma sensibilidade moderada sob as espécies *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* MRSA, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica*, *Bacillus subtilis* e *Bacillus cereus* com uma variação na MICs de 625 a 1250 µg mL⁻¹. Para Dhara e Tripathi (2013) o MIC do eugenol variou de 249 a 999 µg mL⁻¹ contra *E. coli*, e para *K. pneumoniae* de 0,063 a 0,999 µg mL⁻¹.

Nascimento et al. (2000), afirma que, dentre os fitoquímicos analisados, pelo método de difusão em disco, o eugenol, extraído do cravo apresentou a maior atividade antimicrobiana, o qual foi capaz de inibir 9 (64,2%) tipos de

microrganismos de interesse, dentre os 14 testados. Outros estudos (FREIRES et al., 2015; MARCHESE et al., 2017; SILVA et al., 2018) também confirmam que a atividade antibacteriana presente nos extratos do cravo é decorrente do composto eugenol presente em grande quantidade nos mesmos, assim como também é possível observar no presente estudo, a boa atividade antimicrobiana apresentada pelo padrão de eugenol.

6 CONCLUSÕES

Neste trabalho, os extratos das folhas de cravo foram obtidos pela extração supercrítica com CO₂ puro e com adição de cossolvente (etanol e acetato de etila) e por Soxhlet com *n*-hexane. O melhor resultado encontrado para a SFE foi em 220 bar e 40 °C que proporcionou a maior extração do composto de interesse, o eugenol (29,84%). Com a adição de cossolvente o maior rendimento em relação a matéria foi obtido com adição de 25% de etanol (1,33%). Todavia, a concentração do composto majoritária diminuiu. No entanto, ao adicionar 20% do cossolvente etanol a quantidade de eugenol em relação à extração com CO₂ puro aumentou aproximadamente 11%, condição esta que se mostrou mais favorável para etapa futura de purificação do composto. Na extração Soxhlet obteve-se um rendimento de 1,90%, porém, um extrato com baixo teor de eugenol (5,67%), e baixa atividade antioxidante.

A atividade antioxidante, determinada pelo método DPPH, para todos os extratos pode ser considerada baixa, uma vez que o IC₅₀ foi maior que 250 µg mL⁻¹. O estudo revelou maior potencial antioxidante na condição de 150 bar e 40 °C para ambos os métodos experimentais.

Em relação atividade antimicrobiana, quando testada contra a espécie *Salmonella enterica* o extrato obtido com CO₂ supercrítico puro apresentou uma forte inibição na concentração inibitória de 312 µg mL⁻¹. Frente aos demais microrganismos, de modo geral, os extratos apresentaram atividade antimicrobiana moderada contra as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. O eugenol se evidenciou um forte inibidor diante das espécies analisadas.

O extrato obtido das folhas do cravo devido a concentração de eugenol presente, evidencia um óleo com importantes propriedades bioativas. A SFE se mostrou um método de extração eficiente quando comparada com à extração por Soxhlet, uma vez que trabalha em baixas temperaturas e necessita de menor tempo, e não requer uma etapa a mais para remoção do solvente.

7 REFERENCIAS

ABDALLA, A. E. M.; DARWISH, S. M. AYAD, E. H. E.; EL-HAMAHMY, R. M. **Egyptian mango by-product 2: Antioxidant and antimicrobial activities of extract and oil from mango seed kernel.** *Food Chemistry*, v. 103, n. 4, p.1141-1152, 2007.

ABDULLAH, B.H. HATEM, S. F. JUMAA, W. A. **Comparative Study of the Antibacterial Activity of Clove and Rosemary Essential Oils on Multidrug Resistant Bacteria.** *Journal of Pharmaceutical and Biosciences*, vol. 3(1), p.18-22, 2015.

ADDIS, P.B. **Occurrence of lipid oxidation products in foods.** *Food And Chemical Toxicology*, v. 24, n. 10-11, p.1021-1030,1986.

AFFONSO, R. S.; RENNÓ, M. N.; SLANA, G. B. C. A.; FRANÇA, T. C. C.; **Aspectos Químicos e Biológicos do Óleo Essencial de Cravo da Índia.** *Revista Virtual de Química*, v. 4, n.2, p.146-161, 2012.

AJLAN, A. **Medicinal Plants: A Review.** *Natural Products: An Indian Journal*, v. 12, 2016. Disponível em: <<http://www.tsijournals.com/articles/medicinal-plants-a-review.pdf>>. Acesso em: 10 jul. 2018.

ALIGIANNIS, N. KALPOUTZAKIS, E. MITAKU, S. CHINO, I. B. **Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of TwoOriganumSpecies.** *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, v. 49, n. 9, p.4168-4170, 2001.

ALMA, M. H. MURAT, E. SIEGFRIE, N. HUBERT, K. **Chemical composition and content of essential oil from the bud of cultivated turkish clove (*Syzygium aromaticum* L.).** *Bioresources*, v. 2, n. 2, p.265-269, 2007.

AMARAL, F. M. M. RIBEIRO, M. N. S. BARBOSA, J. M. REIS, A. S. NASCIMENTO, F. R. F. MACEDO, R. O. **Plants and chemical constituents with giardicidal**

activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian: Journal of Pharmacognosy*, v. 16, n. 1, p.696-720, 2006.

ANASS, E.; AMRANI, A. EI; EDDINE, J. J. **Effect of the Parts of Plant Material (Flowers and Leaves) on Essential Oil Chemical Composition of Ormenis mixtafrom Morocco.** *Journal Of Essential Oil Bearing Plants*, v. 18, n. 2, p.398-408, 2015.

ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P. D.; PATSALIDES, E.; McDONALD, S.; ROBARDS, K. **Methods for testing antioxidant activity.** *The Analyst*, v. 127, n. 1, p.183-198, 2001.

ANDOGAN, B. C. BAYDAR, H. KAYA, S. DEMIRCI, M. OZBASAR, D. MUMCU, E. **Antimicrobial activity and chemical composition of some essential oils.** *Arch Pharm Res*, v. 25, n. 6, p.860-864, 2002.

ARORA, D. S; KAUR, J. **Antimicrobial activity of spices.** *International Journal Of Antimicrobial Agents*, v. 12, n. 3, p.257-262, 1999.

ASCENÇÃO, V. L., FILHO, V. E. M. **Extração, Caracterização Química e Atividade antifúngica de Óleo Essencial (*Syzygium Aromaticum*) (CRAVO DA ÍNDIA).** *Cad. Pesq.*, São Luís, v. 20, n. especial, julho 2013. Disponível em: <<http://www.periodicoeletronicos.ufma.br/index.php/cadernosdepesquisa/article/view/1769>>. Acesso em: 16 jul. 2018.

ATOUI, A; MANSOURI, A.; BOSKOU, G.; KEFALAS, P. **Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile.** *Food Chemistry*, v. 89, n. 1, p.27-36, 2005.

AZEVEDO, A B.A. KOPCAK, U. MOHAMED, R. S. **Extraction of fat from fermented Cupuaçu seeds with supercritical solvents.** *The Journal Of Supercritical Fluids*, v. 27, n. 2, p.223-237, 2003.

AZEVEDO, A. B. A. MAZZAFERA, P. MOHAMED, R. S. VIEIRA DE MELO, S. A.B. KIECKBUSCH, T. G. **Extraction of caffeine, chlorogenic acids and lipids from green coffee beans using supercritical carbon dioxide and co-solvents.** *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 25, p.543-552, 2008.

BAGETTA, G. MARRONE, L. A. ROMBOLA, L. AMANTEA, D. RUSSO, R. BERLIOCCI, L. SAKURADA, S. ROTIROTI, D. CORASANITI, M. T. **Neuropharmacology of the essential oil of bergamot.** *Fitoterapia*. v.81,n.6, p.453–461, 2010.

BAKKALI, F. AVERBECK, S. AVERBECK, D. IDAOMAR, M. **Biological effects of essential oils – A review.** *Food And Chemical Toxicology*, v. 46, n. 2, p.446-475, 2008.

BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S. K. **Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review.** *Journal Of Pharmaceutical Analysis*, v. 6, n. 2, p.71-79, 2016.

BARZOTTO, I. L. M.; SANTOS, K. A.; SILVA, E. A.; SENE, A. C; SILVA, N. S.; VIEIRA, L. **Supercritical extraction of *Eugenia involucrata* leaves: Influence of operating conditions on yield and α -tocopherol content.** *The Journal Of Supercritical Fluids*, v. 143, p.55-63, 2019.

BASER, K.H.C.; BUCHBAUER, G. (2010) **Handbook of essential oils: Science, technology and applications.** CRC Press, Boca Raton/London/New York.
Disponível em: <
<https://ttnngmai.files.wordpress.com/2012/09/handbookofessentialoil.pdf>>.
Acesso em: 16 jul 2018.

BENSEBIA, O. BENSEBIA, B.; BARTH, K.H.D. **Supercritical CO₂ extraction of triterpenes from rosemary leaves: Kinetics and modelling.** *Separation Science and Technology*, v. 51, n. 13, p.2174-2182, 2016.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. **The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”**: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, v. 239, n. 1, p.70-76, 1996.

BERMEJO, D.V., IBÁÑEZ, E., REGLERO, G., FORNARI, T. **Effect of cosolvents (ethyl lactate, ethyl acetate and ethanol) on the supercritical CO₂ extraction of caffeine from green tea**. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 107, p. 507-512, 2016.

BHUIYAN, M. N. I. **Constituents of the essential oil from leaves and buds of clove (Syzygium caryophyllatum (L.) Alston)**. *African Journal Of Plant Science*, v. 4, n. 11, p.451-454, 2010.

BIASI, L. A; DESCHAMPS, C. **Plantas aromáticas: do cultivo à produção de óleo essencial**. Curitiba: Layer Studio Gráfico e Editora Ltda, p.7-32, 2009.

BIMAKR, M. RAHMAN, R. A. GANJLOO, A. TAIP, F.S. SALLEH, L. SARKER, Z. I. **Optimization of Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Bioactive Flavonoid Compounds from Spearmint (Mentha spicata L.) Leaves by Using Response Surface Methodology**. *Food And Bioprocess Technology*, v. 5, n. 3, p.912-920, 2011.

BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. **Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas**. *Química Nova*, v. 32, n. 3, p.588-594, 2009.

BRUNNER, G. **Gas extraction: An introduction to Fundamentals of Supercritical Fluids and the Application to Separation Process**. 1 Ed. Darmstadt, Alemanha: Steinkopff, 387p, 1994.

BRUNNER, G. **Supercritical fluids: Technology and application to food processing**. *Journal of Food Engineering*, 67, p.21-33, 2005.

BURT, S. **Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review.** *International J. Food Microbiology* 94, p.223–253. 2004.

CAI, L.N.; WU, C.D. **Compounds from *Syzygium aromaticum* possessing growth inhibitory activity against oral pathogens.** *Journal of Natural Products*, v. 59, p.987-990, 1996.

CAMPONE, L. CELANO, R. PICCINELLI, A. L. PAGANO, I. CARABETTA, S. SANZO, R. D. RUSSO, M. IBANEZ, E. CIFUENTES, A. RASTRELLI, L. **Response surface methodology to optimize supercritical carbon dioxide/cosolvent extraction of brown onion skin by-product as source of nutraceutical compounds.** *Food Chemistry*, .v. 269, p.495–502, 2018.

CASTRO, H. G. OLIVEIRA, L. O. BARBOSA, L. C. A. SILVA, F. A. F. SILVA, D. J> H. MOSQUIM, P. R. NASCIMENTO, E. A. **Teor e Composição do óleo essencial de cinco acessos de mentrasto.** *Química nova*, v.27, n.1, p.55-57, 2004.

CASTRO, M.D. LUQUE de; PRIEGO-CAPOTE, F. **Soxhlet extraction: Past and present panacea.** *Journal Of Chromatography A*, v. 1217, n. 16, p.2383-2389, 2010.

CELIK TAS, O. Y.; KOCABAS, E. E. H.; BEDIR, E.; SUKAN, F. V.; OZEK, T.; BASER, K. H. C. **Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations.** *Food Chemistry*, v. 100, n. 2, p.553-559, 2007.

CHATTERJEE, D.; GHOSH, P. K.; GHOSH, S.; BHATTACHARJEE, P. **Supercritical carbon dioxide extraction of eugenol from tulsi leaves: Process optimization and packed bed characterization.** *Chemical Engineering Research And Design*, v. 118, p.94-102, 2017.

CHAVERRI, C.; CICCIO, J.F. **Leaf and fruit essential oil compositions of *Pimenta guatemalensis* (Myrtaceae) from Costa Rica.** *Rev. Biol. Trop*, v. 63, n. 1, p. 303-311, 2015.

CHEVOLLEAU, S.; MALLET, J. F.; DEBAL, A.; UCCIANI, E. **Antioxidant activity of mediterranean plant leaves: Occurrence and antioxidative importance of α -tocopherol.** *Journal Of The American Oil Chemists' Society*, v. 70, n. 8, p.807-809, ago. 1993.

CHOI, C. W.; KIM, S. C.; HWANG, S. S.; CHOI, B. K.; AHN, H. J.; LEE, M. Y.; PARK, S. H.; KIM, S. K. **Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison.** *Plant Science*, v. 163, n. 6, p.1161-1168, 2002.

CHONG, B. S.; FORD, T. R. Pitt; KARIYAWASAM, S. P. **Short-term tissue response to potential root-end filling materials in infected root canals.** *International Endodontic Journal*, v. 30, n. 4, p.240-249, 2003.

CIARLINI, J. J. S.; MARANGONI, A.; BOLZAN, A. **Selectivity of supercritical CO₂ extraction and atmospheric pressure techniques for the major volatile compounds of *Eugenia involucrata* leaves from Southern Brazil.** *Food And Bioproducts Processing*, v. 106, p.29-34, 2017.

Clinical Laboratory Standards Institute – CLSI. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard**, sixth ed., CLSI document M07-A9, 2012.

CORRÊA, Jr. C. MING, L.C. SCHEFFER, M.C. **Cultivo de plantas medicinais, codimentares e aromáticas.** 1 ed. Curitiba: EMATER- Paraná, 162p, 1991.

CORREA, M.; MESOMO, M. C.; PIANOSKI, K. E.; CORAZZA, M. **Extraction of inflorescences of *Musa paradisiaca* L. using supercritical CO₂ and compressed propane.** *The Journal Of Supercritical Fluids*, v. 113, p.128-135, 2016.

CORRÊA, N. C. F. ARAÚJO, M. E.; MACHADO, N. T.; FRANÇA, L. F. **Mass transfer Modeling Supercritical Extraction from Solid Material**, In: 2nd *International meeting on high pressure chemical engineering*, Hamburg, Germany, 2001.

CORTÉS-ROJAS, D. F. CHAGAS-PAULA, D. A. COSTA, F. B. SOUZA, C. R. F. OLIVEIRA, W. **Bioactive compounds in *Bidens pilosa* L. populations: a key step in the standardization of phytopharmaceutical preparations**. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 23, n. 1, p.28-35, 2013.

CRAVEIRO, A. A.; QUEIROZ, D. C. **Óleos essenciais e química fina**. *Química Nova*, v. 16, n. 3, p.224-228, 1993.

CZAIKOSKI, K.; MESOMO, m. C.; SCHEER, A. P.; CORAZZA, M. L. **Kinetics, composition and biological activity of *Eupatorium intermedium* flower extracts obtained from scCO₂ and compressed propane**. *The Journal Of Supercritical Fluids*, v. 97, p.145-153, 2015.

DANG, J. JIAO, L. J. WANG, W.D. PEI, J. J. Tao, Y. D. SHAO, Y. MEI, L. J. WANG, Q. L. ZHANG, L. C. **Chemotaxonomic importance of diarylheptanoids and phenylpropanoids in *Saxifraga tangutica* (Saxifragaceae)**. *Biochemical Systematics and Ecology*, v.72, p. 29-31, 2017.

DANIYAL, M.; AKRAM, M. **Antifertility activity of medicinal plants**. *Journal Of The Chinese Medical Association*, v. 78, n. 7, p.382-388, 2015.

DE, M.; DE, A. K.; BANERJEE, A. B. **Antimicrobial screening of some indian spices**. *Phytotherapy Research*, v. 13, n. 7, p.616-618, 1999.

DELLA PORTA, G. TADDEO, R. D'URSO, E. REVERCHON, E. **Isolation of Clove Bud and Star Anise Essential Oil by Supercritical CO₂ Extraction**. *Lwt - Food Science And Technology*, v. 31, n. 5, p.454-460, 1998.

DEMO, A.; PETRAKIS, C.; KEFALAS, P.; BOSKOU, D. **Nutrient antioxidants in some herbs and Mediterranean plant leaves.** *Food Research International*, [s.l.], v. 31, n. 5, p.351-354, jun. 1998.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach.** 2. ed. D: John Wiley & Sons Ltd, p. 501, 2002.

DHARA L. TRIPATHI A. **Antimicrobial activity of eugenol and cinnamaldehyde against extended spectrum beta lactamase producing enterobacteriaceae by in vitro and molecular docking analysis.** *Eur J Integr Med.* v.5: p.527–36, 2013.

DIAZ-MAROTO, M. C.; PÉREZ-COELLO, M. S.; CABEZUDO, M. D. **Supercritical carbon dioxide extraction of volatiles from spices.** *Journal Of Chromatography A*, v. 947, n. 1, p.23-29, 2002.

DÍAZ-REINOSO, B. MOURE, A. DOMINGUEZ, H. PARAJO, J. C. **Supercritical CO₂ extraction and Purification of Compounds with Antioxidant Activity.** *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, v. 54, n. 7, p.2441-2469, 2006.

DABROWKI, G. KONOPKA, I. CZAPLICKI, S. **Supercritical CO₂ extraction in chia oils production: impact of process duration and co-solvent addition.** *Food Sci Biotechnol*, v.27, n. 3, p.677–686, 2018.

DUARTE, M. C. T. LEME, E. E. DELARMELINA, C. SOARES, A> A. FIGUEIRA, G. M. SARTORATTO, A. **Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on Escherichia coli.** *Journal Of Ethnopharmacology*, v. 111, n. 2, p.197-201, 2007.

ECONOMOU, K. D.; OREOPOULOU, V.; THOMOPOULOS, C. D. **Antioxidant activity of some plant extracts of the family labiatae.** *Journal Of The American Oil Chemists' Society*, v. 68, n. 2, p.109-113, 1991.

ERKAN, N.; AYRANCI, G.; AYRANCI, E. **Antioxidant activities of rosemary (Rosmarinus Officinalis L.) extract, blackseed (Nigella sativa L.) essential oil,**

carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. *Food Chemistry*, v. 110, n. 1, p.76-82, 2008.

FEHLBERG, I. **Terpenos e Fenilpropanóides de *Myrcia guianensis* (Myrtaceae).** 2011. 121 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Universidade Federal da Bahia, Bahia, 2011.

FREIRES, I.A., DENNY, C., BENSO, B., DE ALENCAR, S.M., ROSALEN, P.L., 2015. **Antibacterial activity of essential oils and their isolated constituents against cariogenic bacteria: a systematic review.** *Molecules* 20, p.7329–7358, 2015.

FUJISAWA, S. **Antioxidant and prooxidant action of eugenol-related compounds and their cytotoxicity.** *Toxicology*, v. 177, n. 1, p.39-54, 2002.

GAÑÁN, N.; BRIGNOLE, E. A. **Fractionation of essential oils with biocidal activity using supercritical CO₂—Experiments and modeling.** *The Journal Of Supercritical Fluids*, v. 58, n. 1, p.58-67, 2011.

GARKAL, D.J.; TARALKAR, S. V.; KULKARNI, P.; JAGTAP, S.; NAGAWADE, A. **Kinetic model for extraction of eugenol from leaves of *Ocimum sanctum* Linn (tulsi).** *Int. J. Pharm. Appl*, v. 3, p. 267–270, 2012.

GAYLOR, R.; RENAUD, B.; MICHEL, J.; PANJA, R.; FANJA, F.; MARC, L.; PASCAL, D. **Variations in yield and composition of leaf essential oil from *Syzygium aromaticum* at various phases of development.** *International Journal Of Basic And Applied Sciences*, v. 5, n. 1, p.90-115, 2016.

GHASEMI, M. JAFARPOUR, M. MORTAZEINEZHAD, F. **Effect of different drying methods on the quality and quantity of the essential oil of lemon balm (*Melissa officinalis* L.).** *Intl J Agri Crop Sci*, v. 6, n.9, p.501-504, 2013.

GIORDANI, R.; HADEF, Y.; KALOUSTIAN, J. **Compositions and antifungal activities of essential oils of some Algerian aromatic plants.** *Fitoterapia*, v. 79, n. 3, p.199-203, 2008.

GLISIC, S.; IVANOVIC, J.; RISTIC, M.; SKALA, D. **Extraction of sage (*Salvia officinalis* L.) by supercritical CO₂: Kinetic data, chemical composition and selectivity of diterpenes.** *The Journal Of Supercritical Fluids*, v. 52, n. 1, p.62-70, 2010.

GONDIM, A. N.S. OLIVEIRA, V. R. SILVA, L. R. SILVA, B. A. CONDE-GARCIA, E. **A. Complete atrioventricular block on isolated guinea pig heart induced by an aqueous fraction obtained from *Psidium guajava* L. leaf.** *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 16, n. 3, p.312-316, 2006.

GOÑI, P.; LOPEZ, P.; SANCHEZ, C.; GOMEZ-LUS, R. BECERRIL, R.; NERIN, C. **Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils.** *Food Chemistry*, v. 116, n. 4, p.982-989, 2009.

GOPALAKRISHNAN, N.; SHANTI, P. P. V; NARAYANAN, C. S. **Composition of clove (*Syzygium aromaticum*) bud oil extracted using carbon dioxide.** *Journal Of The Science Of Food And Agriculture*, v. 50, n. 1, p.111-117, 1990.

GUAN, W.; SHUFEN, L.; RUIXIANG, Y.; SHAOKUN, T.; CAN, Q. **Comparison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and other three traditional extraction methods.** *Food Chemistry*, v. 101, n. 4, p.1558-1564, 2007.

GUINDANI, C. PODESTÀ, R. BLOCK, J. M. ROSSI, M. J. MEZZOMO, N. FERREIRA, S. R. S. **Valorization of chia (*Salvia hispanica*) seed cake by means of supercritical fluid extraction.** *The Journal Of Supercritical Fluids*, v. 112, p.67-75, 2016.

HAN, Y.; YU, M.; WANG, L. **Physical and antimicrobial properties of sodium alginate/carboxymethyl cellulose films incorporated with cinnamon essential**

oil. *Food Packag. Shelf Life*, v.15, p.35–42, 2018.

HAO, Z. CHARLES, D.J. YU, L. SOMIN, J.E. **Purification and characterization of phenylalanine ammonia-lyase from *Ocimum basilicum*.** *Phytochemistry*, v.43, n.4, p. 735-739, 1996.

HE, H.; CORKE, H.; CAI, J. **Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Oil and Squalene from *Amaranthus* Grain.** *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, v. 51, n. 27, p.7921-7925, 2003.

HOLETZ, F. B. PESSINI, G. L. SANCHES, N. R. CORTEZ, D. A. G. NAKAMURA, C. V. FILHO, V. P. D. **Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 97, n. 7, p.1027-1031. 2002.

HOLLENDER, J. SHNEIDE, J. DOTT, W. HEIZEL, M. HAGEMANN, H.W. GOTZ, G.K.E. **Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from polluted soils with binary and ternary supercritical phases.** *Journal of Chromatography A*. p.776, 233-243. 1997.

HRAS, A. R.; HADOLIN, M.; KNEZ, Z.; BAUMAN, D. **Comparison of antioxidative and synergistic effects of rosemary extract with α -tocopherol, ascorbyl palmitate and citric acid in sunflower oil.** *Food Chemistry*, v. 71, n. 2, p.229-233, 2000.

HU, M.; SKIBSTED, L. H. **Antioxidative capacity of rhizome extract and rhizome knot extract of edible lotus (*Nelumbo nuficera*).** *Food Chemistry*, v. 76, n. 3, p.327-333, 2002.

IBAÑEZ, E.; KUBATOVA, A.; SENORANS, F. J.; CAVERO, S.; REGLERO G.; HAWTHORNE, S. B. **Subcritical Water Extraction of Antioxidant Compounds from Rosemary Plants.** *Journal of Agricultural And Food Chemistry*, v. 51, n. 2, p.375-382, 2003.

INOUE, T.; HONMA, S.; OTSUKA, Y.; NAKANE, T.; TAKANO, A.; GAMO, Y.; HASHIDUME, F.; YUASA, H.; NAKANISHI, Y.; HIRAHARA, Y. **Distribution of Eight Vitamin E Homologs Found in 81 Plants Using LC-MS3**, *J. Nutr. Food Sci*, H. v. 7, p. 1-7, 2017.

IVANOVIC, J. ZIZOVIC, I. RISTIC, M. STAMENIC, M. SKALA, D. **The analysis of simultaneous clove/oregano and clove/thyme supercritical extraction**. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 55, n. 3, p.983-991, 2011.

JAGANATHAN, S. K.; SUPRIYANTO, E. **Antiproliferative and Molecular Mechanism of Eugenol-Induced Apoptosis in Cancer Cells**. *Molecules*, v. 17, n. 6, p.6290-6304, 2012.

JIROVETZ, L.; BUCHBAUER, G.; STOILOVA, I.; KRASTANOV, A.; STOYANOVA, A.; SCHMIDT, E. **Spice plants: chemical composition and antioxidant properties of Pimenta Lindl. essential oils, Part 1: Pimenta dioica (L.) Merr leaf oil from Jamaica.**, *Ernährung*, v.31, p.55-62, 2007.

JOKIC, S.; MOLNAR, M.; JAKOVLJEVIC, M.; ALADIC, K.; JERKOVIC, I. **Optimization of supercritical CO₂ extraction of Salvia officinalis L. leaves targeted on Oxygenated monoterpenes, α -humulene, viridiflorol and manool**. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 133, p.253-262, mar. 2018.

JORGENSEN, J. H.; FERRARO, M. J. **Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices**. *Clinical Infectious Diseases*, v. 49, n. 11, p.1749-1755, 2009.

JÚNIOR, C. V. **Terpenos com atividades inseticidas: uma alternativa para o controle químico de insetos**. *Quím. Nova*, v.26, n.3, 2003.

KAMAL-ELDIN, A.; APPELQVIST, L.A. **The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols**. *Lipids*, v. 31, n. 7, p.671-701, 1996.

KAMATOU, G. P.; VERMAAK, I.; VILJOEN, A. M. **Eugenol—From the Remote Maluku Islands to the International Market Place: A Review of a Remarkable and Versatile Molecule.** *Molecules*, v. 17, n. 6, p.6953-6981, 2012.

KHALIL, A. A. RAHMAN, U. KHAN, M. R. SAHAR, A. MEHMOOD, T. KHAN, M. **Essential oil eugenol: sources, extraction techniques and nutraceutical perspectives.** *Rsc Advances*, v. 7, n. 52, p.32669-32681, 2017.

KHAN R, ISLAM B, AKRAM M. **Antimicrobial activity of five herbal extracts against multi drug resistant (MDR) strains of bacteria and fungus of clinical origin.** *Molecules* 14, p.586–97. 2009.

KHUNKITTI, W.;VEERAPAN, P.; HAHNVAJANAWONG, C. **In vitro bioactivities of clove buds oil (*Eugenia caryophyllata*) and its effect on dermal fibroblast,** *Int. J. Pharm. Pharm. Sci*, v.4, n. 1, p.556–560, 2012.

KIM, H M. LEE, E. H. HONG, S. H. SONG, H. J. SHIN, M. K. KIM, S. H. SHIN, T. Y.et al. **Effect of *Syzygium aromaticum* extract on immediate hypersensitivity in rats.** *Journal of Ethnopharmacology*, v. 60, n. 2, p.125-131, 1998.

KIZHAKEKUTTU, T. J.; WIDLANSKY, M. E. **Natural Antioxidants and Hypertension: Promise and Challenges.** *Cardiovascular Therapeutics*, v. 28, n. 4, p.20-32, 29 mar. 2010.

KREGER, B. E.; CRAVEN, D. E.; MCCABE, W. R. **Gram-negative bacteremia.** *The American Journal of Medicine*, v. 68, n. 3, p.344-355, 1980.

LAGOURI, V.; BOSKOU, D. **Screening for antioxidant activity of essential oils obtained from spices.** *Food Flavors: Generation, Analysis and Process Influence*, Proceedings of the 8th International Flavor Conference, p.869-879, 1995.

LEEKE, G.; GASPAR, F.; SANTOS, R. **Influence of Water on the Extraction of Essential Oils from a Model Herb Using Supercritical Carbon Dioxide.** *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 41, n. 8, p.2033-2039, 2002.

LEITÃO, N.C.M.C.S.; PRADO, G. H. C.; VEGGI, P. C.; MEIRELES, M. A. A.; PEREIRA, C. G. **Anacardium occidentale L. leaves extraction via SFE: Global yields, extraction kinetics, mathematical modeling and economic evaluation.** *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 78, p.114-123, jun. 2013.

LEMOS, S. D. C. **Avaliação de eliciadores do metabolismo dos fenilpropanóides em *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae).** 2006. 85f. Dissertação (Programa de pós-graduação em biologia celular e molecular). Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

LOBO, A.M. LOURENÇO, A.M. **Biossíntese de produtos naturais.** Ed.IST press, Lisboa, p. 272, 2007.

LOMBOAN, A. TRISUNUWATI, P. SURJOWARDOJO, P. SOFYAN, O. **The effectiveness of clove leaf oil antibacterial against sub-clinical Mastitis inducing bacteria in dairy cattle,** *Sch. Acad. J. Biosci.* 2. p. 897–900. 2014.

LV, F.; LIANG, H.; YUAN, Q.; LI, C. **In vitro antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms.** *Food Research International*, v. 44, n. 9, p.3057-3064, 2011.

MACKÉLA, I; ANDRIEKUS, T.; VENSKUTONIS, P. R. **Biorefining of buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) hulls by using supercritical fluid, Soxhlet, pressurized liquid and enzyme-assisted extraction methods.** *Journal of Food Engineering*, v. 213, p.38-46, 2017.

MADSEN, H L.; BERTELSEN, G. **Spices as antioxidants.** *Trends In Food Science & Technology*, [s.l.], v. 6, n. 8, p.271-277, 1995.

MAHAPATRA, S. K.; ROY, S. **Phytopharmacological approach of free radical scavenging and anti-oxidative potential of eugenol and *Ocimum gratissimum* Linn.** *Asian Pacific Journal Of Tropical Medicine*, v. 7, p.391-397, 2014.

MARCHESE, A. BARBIERI, R. COPPO, E. ORHAN, I. E. DAGLIA, M. NABAVI, S. F. IZADI, M. ABDOLLAHI, M. NABAVI, S. M. AJAMI, M. **Antimicrobial activity of eugenol and essential oils containing eugenol: A mechanistic viewpoint.** *Critical Reviews in Microbiology*, v.43, n.6, p. 668-689, 2017.

MARÇO, P.H. POPPI, R.J. SCARMINIO, I.S. **Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais.** *Química Nova*, v. 31, n.5, p.1218-1223, 2008.

MARTÍNEZ, J.; MONTEIRO, A. R.; ROSA, P. T. V.; MARQUES, M. O. M.; MEIRELES, M. A. **Multicomponent Model To Describe Extraction of Ginger Oleoresin with Supercritical Carbon Dioxide.** *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 42, n. 5, p.1057-1063, 2003.

MARTINEZ, J.; ROSA, P. T.v.; MEIRELES, M. A. A. **Extraction of Clove and Vetiver Oils with Supercritical Carbon Dioxide: Modeling and Simulation.** *The Open Chemical Engineering Journal*, v. 1, n. 1, p.1-7, 2007.

MARTINÉZ, J. **Extração de Óleos Voláteis e Outros Compostos com CO₂ Supercrítico: Desenvolvimento de uma Metodologia de Aumento de Escala a partir da Modelagem Matemática do Processo e Avaliação dos Extratos Obtidos.** 172 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

MAUL, A. A. **Fluidos Supercríticos – Situação Atual e Futuro da Extração Supercrítica,** *Biotechnology Ciência & Desenvolvimento*, v. 2, n. 11, p. 42-46, 1999.

MAUL, A. A. WASICKY, R.; BACCHI, E. M. **Extração por fluido supercrítico.** *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 5, n. 2, p.185-200, 1996.

MENDES, M. F.; PESSOA, F. L. P.; ULLER, A. M. C. **Optimization of the process of concentration of vitamin and from DDSO using supercritical CO₂.** *Brazilian Journal Of Chemical Engineering*, v. 22, n. 1, p.83-91, 2005.

MICIC, V.; LEPOJEVIC, Z.; NOVAKOVIC, D.; PETROVIC, Z. **Supercritical fluid extraction with carbon dioxide at different pressures.** *Contemporary Materials*, v. 2, n. 1, p.84-87, 2011.

MIKAWLRAWNG, K. RANI, R. KUMAR, S. BHARDWAJ, A. R. PRAKASH, G. **Anti-paralytic medicinal plants – Review.** *Journal of Traditional And Complementary Medicine*, v. 8, n. 1, p.4-10, 2017.

MOCCHIGIANI, E.; COSTARELLI, L.; GIACCONI, R.; MALAVOLTA, M.; BASSO, A.; PIACENZA, F.; OSTAN, R.; CEVENINI, E.; GONOS, E. S.; FRANCESCHI, C.; MONTI, D. **Vitamin E–gene interactions in aging and inflammatory age-related diseases: Implications for treatment. A systematic review.** *Ageing Research Reviews*, v. 14, p.81-101, 2014.

MONROY, Y M. RODRIGUES, R. A. F. SARTORATTO, A. CABRAL, F. A. **Influence of ethanol, water, and their mixtures as co-solvents of the supercritical carbon dioxide in the extraction of phenolics from purple corn cob (*Zea mays L.*).** *Journal of Supercritical Fluids*, v.118, p.11–18, 2016.

MORAIS, L. A. S. **Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais.** *Horticultura Brasileira*, v. 27, n. 2, p.4050-4063, 2009.

MUNNÉ-BOSCH, S.; ALEGRE, L. **The Function of Tocopherols and Tocotrienols in Plants.** *Critical Reviews In Plant Sciences*, v. 21, n. 1, p.31-57, 2002.

NAGAVEKAR, N. SINGHAL, R. S. **Enhanced extraction of oleoresin from *Piper nigrum* by supercritical carbon dioxide using ethanol as a co-solvent and its bioactivity profile.** *Journal Food Process Engineering*. p. 1-12, 2017.

NAMIKI, M. **Antioxidants/antimutagens in food.** *Critical Reviews In Food Science And Nutrition*, v. 29, n. 4, p.273-300, 1990.

NASCIMENTO, G. G. F. LOCATELLI, J. FREITAS, P. C. SILVA, G. L. **Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicalson antibiotic-resistant bactéria.** *Brazilian Journal of Microbiology.* 31: p.247-256, 2000.

NASSAR, M.I.; GAARA, A.H.; EL-GHORAB, A.H.; FARRAG, A.-R.H.; SHEN, H.; HUQ, E.; MABRY, T.J. **Chemical constituents of clove (*Syzygium aromaticum* , Fam . Myrtaceae) and their antioxidant activity,** *Rev. Latinoam. Quim.*, v. 35, p.47-57, 2007.

NELDER, J. A. MEAD, R. **A simplex method for function minimization.** *The Computer Journal*, v. 7, p. 308-313, 1965.

NOGUEIRA, M.A.; DIAZ, G.; SAKUMO, L. **Caracterização química e atividade biológica do óleo essencial de *Lippia alba* cultivada no Paraná.** *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 28, n. 3, p. 273-278, 2007.

OLIVEIRA, M. S. COsTA, W. A. PEREIRA, D. S. BOTELHO, J. R. S. MENEZES, T. O. A. ANDRADE, E. H. A. SILVA, S. H. M. FILHO, A. P. S. S. JUNIOR, R. N. C. **Chemical composition and phytotoxic activity of clove (*Syzygium aromaticum*) essential oil obtained with supercritical CO₂.** *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 118, p.185-193, 2016.

OLIVEIRA, R. A.; OLIVEIRA, F.F.; SACRAMENTO, C.K. **Óleos essenciais: perspectiva para o agronegócio de especiarias na Bahia.** *Bahia Agríc*, v.8, n.1, 2007.

OLIVEIRA, R. A.; REIS, T.; V.; SACRAMENTO, L.; P.; D.; OLIVEIRA, F. F. **Constituintes químicos voláteis de especiarias ricas em eugenol.** *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 19, n. 3, p.771-775, 2009.

OYEDEMI, S. O. OKOH, A. I. MABINYA, L. V. PIROCHENVA, G. **The proposed mechanism of bactericidal action of eugenol, a-terpineol and y-terpinene against *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus vulgaris***

and Escherichia coli. *African Journal Of Biotechnology*, v. 8, n. 7, p.1280-1286, 2009.

ÖZCAN, A.; ÖZCAN, A. S. **Comparison of supercritical fluid and Soxhlet extractions for the quantification of hydrocarbons from Euphorbia macroclada.** *Talanta*, v. 64, n. 2, p.491-495, 2004.

PAVITHRA, B. **Eugenol – A Review.** *J. Pharm. Sci & Res.* v. 6, n. 3, p. 153-154, 2014.

PELLEGRINI, N.; SERAFINI, M. COLOMBI, B.; DEL RIO, D.; SALVATORE, S.; BIANCHI, M.; BRIGHENTI, F. **Total Antioxidant Capacity of Plant Foods, Beverages and Oils Consumed in Italy Assessed by Three Different In Vitro Assays.** *The Journal Of Nutrition*, v. 133, n. 9, p.2812-2819, 2003.

PEREIRA, A. A. **Efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de bactérias e fungos.** 2006. 72 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2006.

PEREIRA, C. S. S. **Avaliação de diferentes tecnologias na extração do Óleo do Pinhão-manso (Jatropha curcas L).**2009. 91 f. Dissertação (Mestrado)- Curso de Engenharia Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2009.

PIRAS, A.; GONÇALVES, M. J.; ALVES, J.; FALCONIERI, D.; PORCEDDA, S.; MAXIA, A.; SALGUEIRO, L. **Ocimum tenuiflorum L. and Ocimum basilicum L., two spices of Lamiaceae family with bioactive essential oils.** *Industrial Crops And Products*, v. 113, p.89-97, mar. 2018.

PISANO, M. PAGNAN, G. LOI, M. MURA, M. E. TILOCCA, M. G. PALMIERI, G. FABBRI, D. DETTORI, M. A. DELOGU, G. PONZONI, M. ROZZO, C. **Antiproliferative and pro-apoptotic activity of eugenol-related biphenyls on malignant melanoma cells.** *Molecular Cancer*, v. 6, n. 1, p.8-26, 2007.

PISOSCHI, A. M.; NEGULESCU, G. P. **Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review.** *Biochemistry & Analytical Biochemistry*, v. 01, n. 01, p.1-10, 2012.

POLITEO, O.; JUKI, M.;MILO, M. **Chemical composition and antioxidant activity of essential oils of twelve spice plants,** *Croat. Chem. Acta*, v. 79, n. 4, p. 545-552, 2006.

POSER, G.L. V; MENTZ, L. A. **Diversidade biológica e sistemas de classificação.** In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 3 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/ Ed. Da UFSC, cap. 4, 2001.

POURMORTAZAVI, S. M.; HAJIMIRSADEGHI, S. S. **Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis.** *Journal Of Chromatography A*, v. 1163, n. 1-2, p.2-24, 2007.

POVH, N.P.; GARCIA, C.A.; MARQUES, M.O.M., MEIRELES, M.A.A. **Extraction of essential oil and oleoresin from chamomile (*Chamomilla recutita* [L.] Rauschert) by steam distillation and extraction with organic solvents a process desing approach.** *Rev. Bras. PL. Med.*,v. 4, n.1, p.1-8, 2001.

PRATT, D. D. **Conceptions of Teaching.** *Adult Education Quarterly*, v. 42, n. 4, p.203-220, 1992.

PRIEFERT, H; STEINBUHEL, A.; RABENHORST, J. **Biotechnological production of vanillin.** *Applied Microbiology And Biotechnology*, v. 56, n. 3, p.296-314, 2001.

PRONYK, C.; MAZZA, G. **Design and scale-up of pressurized fluid extractors for food and bioproducts.** *Journal Of Food Engineering*, v. 95, n. 2, p.215-226, 2009.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. **Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para**

posterior determinação cromatográfica. *Química Nova*, v. 24, n. 1, p. 68-76, 2001.

QUINTANS JÚNIOR, L. J. ALMEIDA, J. R. G. S. LIMA, J. T. NUNES, X. P. SIQUEIRA, J. S. OLIVEIRA, L. E. G. ALMEIDA, R. N. ATHAYDE-FILHO, P. F. BARBOSA-FILHO, J. M. **Plants with anticonvulsant properties - a review.** *Revista Brasileira de Farmacognosia: Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 18, p.798-819, 2008.

QUISPE-CONDORI, S.; SANCHEZ, D.; FOGLIO, M. A.; ROSA, P. T. V.; ZETZL, C.; BRUNNER, G.; MEIRELES, M. A. A. **Global yield isotherms and kinetic of artemisinin extraction from *Artemisia annua* L leaves using supercritical carbon dioxide.** *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 36, n. 1, p.40-48, 2005.

RABELO, W. F. **Caracterização química, toxicidade e avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial do cravo da Índia (*Syzygium Aromaticum*).** 2010. 72 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2010.

RADÜNZ, M. TRINDADE, M. L. M. CAMARGO, T. M. RADUNZ, A. L. BORGES, C. D. GANDRA, E. A. HELBIG, E. **Antimicrobial and antioxidant activity of unencapsulated and encapsulated clove (*Syzygium aromaticum*, L.) essential oil.** *Food Chemistry*, v. 276, p.180-186, 2019.

RAHIM, E.N.A.A.; ISMAIL, A.; OMAR, M.N.; RAHMAT, U.N.; AHMAD, W.A.N.W. **GC-MS Analysis of Phytochemical Compounds in *Syzygium polyanthum* Leaves Extracted using Ultrasound-Assisted Method,** *Pharmacogn. J.* v.10, p. 110-119, 2018.

RAINA, V. K.; SRIVASTAVA, S. K.; AGGARWAL, K. K. SYAMASUNDAR, k. V.; KUMAR, S. **Essential oil composition of *Syzygium aromaticum* leaf from Little Andaman, India.** *Flavour And Fragrance Journal*, v. 16, n. 5, p.334-336, 2001.

RAJA, M. R C. **Versatile and Synergistic Potential of Eugenol: A Review.** *Pharmaceutica Analytica Acta*, v. 6, n. 5, 2015.

RANA, T.; KASHMIRI, M. A.; AHMAD, M. **Studies of antioxidant activity of essential oils of umbelliferae family.** *Pakistan Journal Of Science*, v. 62, n. 2, p.67-70, 2010.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal.** 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

RAZAFINTSALAMA, V. E. RASOARIVELO, S. T. R. RANDRIAMIALINORO, F. RANARIVELO, L. RAKOTONANDRASANA, S. R. PETIT, T. SARTER, S. **Antibacterial activities of fourteen medicinal plants from the endemic plant diversity of Madagascar.** *South African Journal Of Botany*, v. 112, p.303-306, 2017.

Reis, T. V. Sacramento, C.K. Oliveira, F.F. Oliveira, R. **Potencialidade das folhas do craveiro-da-india cultivados no sul da Bahia para extracao de oleos essenciais,** XLVI Congr. Bras. Quimica, ABQ - Associacao Brasileira de Quimica, 2006.

REVERCHON, E.; MARCO, I. de. **Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter.** *The Journal Of Supercritical Fluids*, v. 38, n. 2, p.146-166, 2006.

REVERCHON, E.; MARRONE, C. **Supercritical extraction of clove bud essential oil: isolation and mathematical modeling.** *Chemical Engineering Science*, v. 52, n. 20, p.3421-3428, 1997.

REVERCHON, E.; SENATORE, F. **Isolation of rosemary oil: Comparison between hydrodistillation and supercritical CO2 extraction.** *Flavour And Fragrance Journal*, v. 7, n. 4, p.227-230, 1992.

REZENDE, W. P. BORGES, L. L. ALVES, N. M. FERRI, P. H. PAULA, J. R. **Chemical variability in the essential oils from leaves of *Syzygium jambos*.** *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 23, n. 3, p.433-440, 2013.

RIOS, J. I.; RECIO, M. C.; VILLAR, A. **Screening methods for natural products with antimicrobial activity: A review of the literature.** *Journal Of Ethnopharmacology*, v. 23, n. 2-3, p.127-149, 1988.

RODRIGUES, V. M.; ROSA, P. T. V.; MARQUES, M. O. M.; PETENATE, A. J.; MEIRELES, M. A. A. **Supercritical Extraction of Essential Oil from Aniseed (*Pimpinella anisum*L) Using CO₂: Solubility, Kinetics, and Composition Data.** *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, v. 51, n. 6, p.1518-1523, mar. 2003.

RODRIGUEZ, J. M. F. SOUZA, A. R. C. KRUGER, R. L. BOMBARDELLI, M. C. M. MACHADO, C. S. CORAZZA, M. L. **Kinetics, composition and antioxidant activity of burdock (*Arctium lappa*) root extracts obtained with supercritical CO₂ and co-solvent.** *The Journal of Supercritical Fluids*, v, 135, p. 25–33, 2018.

ROGINSKY, V; LISSI, E. **Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food.** *Food Chemistry*, v. 92, n. 2, p.235-254, 2005.

SAINI, R. K.; KEUM, Y. **Tocopherols and tocotrienols in plants and their products: A review on methods of extraction, chromatographic separation, and detection.** *Food Research International*, v. 82, p.59-70, 2016.

SALEHI, P.; SONBOLLI, A.; EFTEKHAR, F.; NEJAD-EBRAHAMI, S.; YOUSEFZADI, M. **Essential Oil Composition, Antibacterial and Antioxidant Activity of the Oil and Various Extracts of *Ziziphora clinopodioides* subsp. *rigida* (BOISS.) RECH from Iran.** *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, v. 28, n. 10, p.1892-1896, 2005.

SALVAGNINI, L. E. OLIVEIRA, J. R. S. SANTOS, L. E. MOREIRA, R. D. PIETRO, R. C. L. R. **Avaliação da atividade antibacteriana de folhas de *Myrtus***

communis L. (Myrtaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 18, n. 2, p.241-244, jun. 2008.

SANTOS, K. A.; KLEIN, E. J.; GAZIM, Z. C.; GOLÇALVES, J. E. CARDOZO-FILHO, L. CORAZZA< M. L.; SILVA, E. A. **Wood and industrial residue of candeia (Eremanthus erythropappus): Supercritical CO 2 oil extraction, composition, antioxidant activity and mathematical modeling.** *The Journal Of Supercritical Fluids*, v. 114, p.1-8, 2016.

SANTOS, K.A., FROHLICH, P.C., HOSCHIED, J., TIUMAN, T.S., GONÇALVES, J.E., CARDOZO-FILHO, L., SILVA, E.A. **Candeia (Eremanthus erythroppapus) oil extraction using supercritical CO2 with ethanol and ethyl acetate cosolvents.** *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 128, p. 323–330, 2017.

SARAN, S.; MENON, S.; SHAILANJAN, S.; POKHARNA, P. **Validated RP-HPLC method to estimate eugenol from commercial formulations like Caturjata Churna, Lavangadi Vati, Jatiphaladi Churna, Sitopaladi Churna and clove oil.** *Journal Of Pharmacy Research*, v. 6, n. 1, p.53-60, 2013.

SAUCEAU, M. LETOURNEAU, J. J. FREISS, B. RICHON, D. FAGES, J. **Solubility of eflucimibe in supercritical carbon dioxide with or without a co-solvent.** *The Journal Of Supercritical Fluids*, v. 31, n. 2, p.133-140, 2004.

SCHERER, R. WAGNER, R. DUARTE, M. C. T. GODOY, H. T. **Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de Cravo da Índia, Citronela e Palmarose.** *Rev. Bras. Pl. Med.*, Botucatu, v.11, n.4, p.442-449, 2009.

SCOPEL, R.; FALCÃO, M. A.; LUCAS, A. M.; ALMEIDA, R. N.; GANDOLFI, P. H. K.; CASSEL, E.; VARGAS, R. M. F. **Supercritical fluid extraction from Syzygium aromaticum buds: Phase equilibrium, mathematical modeling and antimicrobial activity.** *The Journal Of Supercritical Fluids*, v. 92, p.223-230, 2014.

SENNA, L. M. SOUZA, G. R. BIZZO, H. R. MOREIRA, D. L. **Composição volátil das folhas de *Eugenia racemulosa* O. Berg. (Myrtaceae).** *Rev. Bras. Farm.*, v. 92, n. 2, p.51-54, 2011.

SEPPANEN, C. M.; SONG, Q.; CSALLANY, A. S. **The Antioxidant Functions of Tocopherol and Tocotrienol Homologues in Oils, Fats, and Food Systems.** *Journal Of The American Oil Chemists' Society*, v. 87, n. 5, p.469-481, 2010.

SIES, H.; STAHL, W.; SUNDQUIST, A. R. **Antioxidant Functions of Vitamins.** *Annals Of The New York Academy Of Sciences*, v. 669, n. 1, p.7-20, 1992.

SILVA, D. C. M. N.; BRESCIANI, L. F. V.; DALAGNOL, R. L.; DANIELSKI, L.; YUNES, R. A.; FERREIRA, S. R. S. **Supercritical fluid extraction of carqueja (*Baccharis trimera*) oil: Process parameters and composition profiles.** *Food And Bioproducts Processing*, v. 87, n. 4, p.317-326, 2009.

SILVA, I. C. M. SANTOS, W. L. LEAL, I. C. R. ZOGHBI, M. G. **Extraction of essential oil from *Cyperus articulatus* L. var. *articulatus* (pripioca) with pressurized CO₂.** *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 88, p.134-141, 2014.

SILVA, N.; FERNANDES JÚNIOR, A. **Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity.** *Journal of Venomous Animals And Toxins Including Tropical Diseases*, v. 16, n. 3, p.402-413, 2010.

SILVA, T. C.; OLIVEIRA, J.R.; SOUZA, S.J.O. **Extração de Eugenol a Partir do Cravo da Índia e Produção de Sabonetes Aromatizados.** *Revista Crase.edu. A revista do e-Tec Brasil – IFG/ Campus Inhumas*, v. 01, n. 1, 2011.

SILVA, V. P. ALVES, C. C. F. MIRANDA, M. L. D. BRETANHA, L. C. BALLESTEC, M.P. MICKEC, G. A. SILVEIRAC, E. V. MARTINS, C. H. G. AMBROSIO, M.A.L.V. SILVA, T. S. TAVARES, D. C. MAGALHÃES, L. G. SILVA, F.G. EGEA, M. B. **Chemical composition and in vitro leishmanicidal, antibacterial and cytotoxic activities of essential oils of the Myrtaceae family occurring in the Cerrado biome.** *Industrial Crops & Products*, v. 123, p.638–645, 2018.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. PETROVICK, P. R. **Óleos voláteis**. In: SIMÕES *et al.* Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. UFRGS/UFSC, 2003. p. 467-496.

SINGH, A.; AHMAD, A.; BUSHRA, R. **Supercritical carbon dioxide extraction of essential oils from leaves of Eucalyptus globulus L., their analysis and application**. *Analytical Methods*, v. 8, n. 6, p.1339-1350, 2016.

SINGH, E. SHARMA, S. DWIVEDI, J. SHARMA, S. **Diversified potentials of *Ocimum sanctum* Linn (Tulsi): Na exhaustive survey**. *Scholars Research Library*, v. 2, n. 1, p. 39-48. 2012.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. **Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent**. *Oxidants And Antioxidants Part A*, p.152-178, 1999.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. **Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic**. *Phosphotungstic Acid Reagents, Am. J. Enol. Vitic.*, v. 16, n. 3, p.144-158, 1965.

SONAGLIO, D.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P.R.; BASSANI, V.L. **Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos**. In: Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; de Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. (Org). *Farmacognosia: da Planta ao Medicamento*, 6.ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, p. 289-326, 2007.

SOVOVÁ, H. **Modeling the supercritical fluid extraction of essential oils from plant materials**. *Journal Of Chromatography A*, v. 1250, p.27-33, 2012.

SOVOVÁ, H. **Rate of the vegetable oil extraction with supercritical CO₂—I. Modelling of extraction curves**. *Chemical Engineering Science*, v. 49, n. 3, p.409-414, 1994.

SOVOVA, H.; RAT, V.; KHACHATURYAN, M.; VLCEK, D. **Solubility of squalane and dinonyl phthalate in CO₂ with entrainers.** *The Journal Of Supercritical Fluids*, v. 14, n. 2, p.145-149, 1999.

SRIVASTAVA, K. C.; MALHOTRA, N. **Acetyl eugenol, a component of oil of cloves (*Syzygium aromaticum* L.) inhibits aggregation and alters arachidonic acid metabolism in human blood platelets.** *Prostaglandins, Leukotrienes And Essential Fatty Acids*, v. 42, n. 1, p.73-81, 1991.

STALIKAS, C. D. **Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids.** *Journal Of Separation Science*, v. 30, n. 18, p.3268-3295, 2007.

STEFFANI, E. **Modelagem matemática do Processo de Extração Supercrítica de Óleo essencial de Ho-Sho (*Cinnamomum camphora* Ness & Eber var. *linaloolifera* Fujita) utilizando CO₂.** Tese. Doutorado em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 2003.

STRATIL, P.; KLEJDUS, B.; KUBÁN, V. **Determination of phenolic compounds and their antioxidant activity in fruits and cereals.** *Talanta*, v. 71, n. 4, p.1741-1751, 2007.

SUZUKI, É. Y.; BAPTISTA, E. B.; RESENDE, C. A. M.; MIRANDA, C. M. D.; CHICOUREL, E. L.; BARBOSA, R. N.R. **Potential of the Essential Oil from *Pimenta Pseudocaryophyllus* as an Antimicrobial Agent.** *Acta Pharmaceutica*, v. 64, n. 3, p.379-385, 2014.

TAI, K.W.; HUANG, F.M.; HUANG, M.S.; CHANG, Y.C. **Assessment of the genotoxicity of resin and zinc-oxide eugenol-based root canal sealers using an in vitro mammalian test system,** *J. Biomed. Mater. Res.*, v.59, n. 1, p.73-77, 2002.

TAKAO, L. K.; IMATOMI, M.; GUALTIERI, S. C. J. **Antioxidant activity and phenolic content of leaf infusions of Myrtaceae species from Cerrado (Brazilian Savanna).** *Brazilian Journal Of Biology*, v. 75, n. 4, p.948-952, 2015.

THOMAS, M. J. **The role of free radicals and antioxidants.** *Nutrition*, v. 16, n. 7-8, p.716-718, 2000.

TOLEDO, A. C. O. HIRATA, L. L. BUFFON, M. C. M. MIGUEL, M. D. MIGUEL, O. G. **Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica.** *Revista Lecta, Bragança Paulista*, v. 2, n. 1, p.7-13, 2003.

TURGIS, M.; HAN, J.; CAILLET, S. LACROIX, M. **Antimicrobial activity of mustard essential oil against Escherichia coli O157: H7 and Salmonella typhi.** *Food Control*, v. 20, n. 12, p.1073-1079, 2009.

VAARA, M. **Agents That Increase the Permeability of the Outer Membrane.** *Microbiological Reviews*, v. 56, p. 395-411, 1992.

VITTI, A. M. S. BRITO, J. O. **Óleo essencial de eucalipto.** 2003. Disponível em: <<http://www.ipef.br/publicacoes/docflorestais/df17.pdf>>. Acesso em: 15 jul. 2018.

WANASUNDARA, U. N.; SHAHIDI, F. **Lipase-assisted concentration of n-3 polyunsaturated fatty acids in acylglycerols from marine oils.** *Journal Of The American Oil Chemists' Society*, v. 75, n. 8, p.945-951, 1998.

WANG, Y. HE, H. YANG, J. DI, Y. HAO, X. **New Monoterpenoid Coumarins from Clausena anisum-olens.** *Molecules*, v. 13, n. 4, p.931-937, 2008.

WARGOVICH, M. J. WOODS, C. HOLLIS, D. M. ZANDER, M. E. **Herbals, Cancer Prevention and Health.** *The Journal Of Nutrition*, v. 131, n. 11, p.3034-3036, 2001.

YANG, Y. LEE, S. H. LEE, W. J. CHOI, D. H, ANH, Y. J. **Ovicidal and Adulticidal Effects of Eugenia caryophyllata Bud and Leaf Oil Compounds on Pediculus**

capitis. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, v. 51, n. 17, p.4884-4888, 2003.

YAZDANI, F.; MAFI, M.; FARHADI, F.; HEIDAR, k. T.; AGHAPOOR, K.; MOHSENZADEH, F.; DARABI, H. R. **Supercritical CO₂ Extraction of Essential Oil from Clove Bud: Effect of Operation Conditions on the Selective Isolation of Eugenol and Eugenyl Acetate.** *Zeitschrift Für Naturforschung B*, v. 60, n. 11, p.1197-1201, 2005.

YODA, S. K.; MARQUES, M. O. M.; PETENATE, A. J.; MEIRELES, M. A. **Supercritical fluid extraction from Stevia rebaudiana Bertoni using CO₂ and CO₂+water: extraction kinetics and identification of extracted components.** *Journal Of Food Engineering*, v. 57, n. 2, p.125-134, 2003.

ZABOT, G. L. MOARES, M. N. PETENATE, A. J. MEIRELES, A. A. **Influence of the bed geometry on the kinetics of the extraction of clove bud oil with supercritical CO₂.** *The Journal Of Supercritical Fluids*, v. 93, p.56-66, 2014.

ZHANG, Y.; WANG, Y.; ZHU, X.; CAO, P.; WEI, S.; LU, Y. **Antibacterial and antibiofilm activities of eugenol from essential oil of Syzygium aromaticum (L.) Merr. & L. M. Perry (clove) leaf against periodontal pathogen Porphyromonas gingivalis.** *Microbial Pathogenesis*, v. 113, p.396-402, 2017.

ZHAO, S.; ZHANG, D. **Supercritical fluid extraction and characterisation of Moringa oleifera leaves oil.** *Separation And Purification Technology*, v. 118, p.497-502, 2013.

ZHENG, G.; KENNEY, P. M.; LAM, L. K. T. **Sesquiterpenes from Clove (Eugenia caryophyllata) as Potential Anticarcinogenic Agents.** *Journal Of Natural Products*, v. 55, n. 7, p.999-1003, 1992.

8 ANEXOS

8.1 Anexo I – Artigo Publicado em Periódico que reporta o conteúdo desta dissertação.

FROHLICH, P. C., SANTOS, K. A., PALU, F., CARDOZO-FILHO, L., SILVA, C., SILVA, E. A. **Evaluation of the effects of temperature and pressure on the extraction of eugenol from clove (*Syzygium aromaticum*) leaves using supercritical CO₂.** *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 143, p.313-320, 2019.