

OBTENÇÃO DO EXTRATO DAS FOLHAS DE CRAVO DA ÍNDIA (*Syzygium aromaticum*) COM CO₂ SUPERCRÍTICO E ADIÇÃO DOS COSSOLVENTES ETANOL E ACETATO DE ETILA

OBTAINING EXTRACT OF CRAVO DA ÍNDIA (*Syzygium aromaticum*) LEAVES WITH SUPERCRITICAL CO₂ AND ADDITION OF ETHANOL AND ETHYL ACETATE COSOLVENTS

FROHLICH, Paula Cassiana¹; SANTOS, Kátia Andressa^{1,2}; CARDOZO-FILHO, Lúcio^{2,3}; SILVA, Edson Antônio da¹

¹Universidade Estadual do Oeste do Paraná; ²Universidade Estadual de Maringá; ³Centro Universitário Fundação de Ensino Octávio Bastos

paulinhah-h@hotmail.com

RESUMO. Este trabalho teve como objetivo avaliar a tecnologia supercrítica com dióxido de carbono e adição de cossolventes na obtenção do extrato das folhas de cravo da índia (*Syzygium aromaticum*). Os experimentos foram realizados com CO₂ a 40 °C e 22 MPa, com vazão volumétrica de 2 mL min⁻¹ e tempo total de 80 min. Os cossolventes etanol e acetato de etila foram adicionados às folhas de cravo nas proporções de 15, 20 e 25 % (m/m). Os extratos foram caracterizados quanto à concentração do composto eugenol empregando a cromatografia líquida de alta eficiência. O maior rendimento foi obtido na condição de extração com adição de 25 % do cossolvente etanol, 1,33 %, correspondendo a um aumento de 45 % no rendimento em relação à extração sem cossolvente. No entanto, avaliando o rendimento da extração e a concentração de eugenol, verificou-se que a condição de extração com adição de 20 % de etanol foi a mais favorável para o rendimento deste composto, 3,59 g_{eugenol} kg_{folhas}⁻¹. Em relação às cinéticas das extrações, o modelo matemático de Sovová se ajustou satisfatoriamente aos dados experimentais.

Palavras-chave: *Syzygium aromaticum*, extração supercrítica, cossolventes, eugenol.

ABSTRACT. The aim of this study was to evaluate the supercritical technology by using carbon dioxide and the addition of ethanol and ethyl acetate cosolvents in obtaining the extract of clove (*Syzygium aromaticum*) leaves. The experiments were performed at 40 °C and 22 MPa, with CO₂ volumetric flow rate of 2 mL min⁻¹ and 80 min of extraction. Ethanol and ethyl acetate cosolvents were added to clove leaves at proportions of 15, 20 and 25 % (m/m). The extracts were characterized for eugenol concentration using high performance liquid chromatography. The highest yield was obtained in the condition with addition of 25 % of ethanol, 1.33 wt%, with yield increases of 45 % in relation to the extraction without cosolvent. However, by evaluating the extraction yield and the concentration of eugenol, it was verified that the extraction condition with addition of 20 % of ethanol was the most favorable for the yield of this compound, 3.59g_{eugenol} kg_{leaves}⁻¹. In relation to the kinetics of the extractions, the mathematical model of Sovová was satisfactorily adjusted to the experimental data.

Keywords: *Syzygium aromaticum*, supercritical extraction, cosolvents, eugenol.

INTRODUÇÃO

O cravo da índia (*Syzygium aromaticum*) é uma espécie pertencente à família Myrtaceae, conhecida por possuir elevada quantidade de óleo essencial. Sua árvore pode variar de 8 a 12 m (KAMATOU *et al.*, 2012), possui folhas de formato grandes e ovais e suas flores se apresentam em inúmeros grupos de cachos terminais, de coloração vermelha. Essa planta pode atingir um ciclo de vida de até 100 anos, podendo em alguns casos, atingir 150 anos (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

Os maiores produtores de cravo da índia são Indonésia, Índia e Madagascar (KAMATOU *et al.*, 2012). No Brasil, o destaque no cultivo de cravo da índia encontra-se no estado da Bahia, nas cidades de Valença, Ituberá, e Camamu (OLIVEIRA *et al.*, 2009; CÓRTEZ-ROJAS *et al.*, 2014). O óleo essencial obtido do cravo da índia possui elevado valor comercial devido à grande quantidade de eugenol presente em sua composição química, 45-90% (ZHENG *et al.*, 1992). O composto eugenol (C₁₀H₁₂O₂), fenilpropanoide, é um líquido incolor, volátil, com baixa solubilidade em água e possui cheiro forte e característico do cravo. O eugenol tem sido muito empregado na área odontológica, como anestésico (BARCELOUX, 2008).

Os óleos essenciais são misturas de substâncias voláteis produzidas nas mais diversas partes da planta, tais como nas raízes, caules, cascas, folhas, flores, frutos e sementes (BRUNETON, 1991). Sua produção está relacionada ao metabolismo secundário das plantas, e são responsáveis pelo mecanismo de defesa contra micro-organismos e predadores (SIMÕES *et al.*, 2007).

Existem diversos trabalhos na literatura que demonstraram as propriedades farmacológicas do óleo essencial de cravo, tais como atividade antioxidante, antibacteriana, atividade antifúngica, inseticida (LEE; SHIBAMOTO, 2001; HUANG *et al.*, 2002; KAMATOU *et al.*, 2012; SCHERER *et al.*, 2009), antiviral, antifúngica (IVANOVIC *et al.*, 2013), anticarcinogênica (ZHENG *et al.*, 1992) e antiparasitária (YANG *et al.*, 2003).

Na obtenção de óleos essenciais ou extratos de plantas, geralmente, são empregados os métodos convencionais de extração, tais como destilação por arraste a vapor, hidrodestilação e extração com solvente em aparato Soxhlet, que apresentam algumas inconveniências, como, por exemplo, grande quantidade de solvente orgânico necessário para extração, perda de compostos voláteis devido às altas temperaturas empregadas, contaminação do extrato por resíduos de solvente, necessidade de etapas adicionais de purificação do óleo, além de longo tempo de extração (MAUL, 1999; POURMORTAZAVI *et al.*, 2003).

Assim, a extração pelo método alternativo com CO₂ supercrítico se mostra efetiva para esta finalidade, principalmente em relação à alta qualidade do produto obtido. A tecnologia permite a obtenção de extratos a baixas temperaturas, evitando a degradação dos compostos, os extratos são isentos de solvente (SPARKS *et al.*, 2006) e, após a extração, o solvente pode ser recuperado. Outra importante característica da extração supercrítica é que as propriedades físicas dos solventes como a densidade, difusividade, viscosidade e a constante dielétrica podem ser modificadas pela alteração na pressão e/ou a temperatura do sistema, tornando o processo de extração mais seletivo no composto de interesse (BRUNNER, 1994; PRONYK; MAZZA, 2009).

O dióxido de carbono (CO₂) é o solvente mais empregado nos processos de extração supercrítica, pois possui caráter não tóxico e não inflamável, baixa viscosidade e alto coeficiente de difusão. Além disso, é ambientalmente seguro, facilmente encontrado em alta

pureza, baixo custo e apresenta baixa pressão e temperatura crítica, 7,38 MPa e 31,1 °C, respectivamente (BRUNNER, 1999; DÍAZ-REINOSO *et al.*, 2006).

Em relação às substâncias de baixa volatilidade, a solubilidade diminui em gases supercríticos apolares, tais como o CO₂, em decorrência do aumento da massa molecular e do aumento da polaridade (BRUNNER, 1994). Para melhorar essa desvantagem, a solubilidade destas substâncias pode ser aumentada com a adição de cossolventes ao solvente supercrítico. Geralmente, o cossolvente é um solvente orgânico líquido que é adicionado em pequenas frações ao CO₂ (MURGA *et al.*, 2000) e resulta na melhora das interações químicas entre soluto e solvente.

Neste contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar a tecnologia supercrítica com CO₂ e adição dos cossolventes etanol e acetato de etila na obtenção do extrato das folhas de cravo da Índia, em termos de rendimento e concentração de eugenol. Além disso, avaliou-se o modelo matemático de Sovová (1994) no ajuste das curvas cinéticas de extração.

METODOLOGIA

Preparação da amostra

As folhas de cravo da Índia (*Syzygium aromaticum*) utilizadas nos experimentos foram coletadas em uma propriedade rural na cidade de Santa Helena - Paraná, Brasil. As amostras foram submetidas ao processo de secagem em estufa com circulação de ar (modelo TE-394/3 - TECNAL) à 40°C por 12 horas. Antes de realizar o processo de determinação de umidade, as folhas foram submetidas ao processo de trituração em liquidificador doméstico (MONDIAL) e, posteriormente, ao processo de peneiramento.

A classificação granulométrica da amostra foi realizada com auxílio de um agitador de peneiras (BERTEL), com peneiras de 16, 20, 28, 32 e 48 mesh. Para as extrações utilizou-se o material retido nas peneiras de 20, 28 e 32 mesh.

A umidade (5,85 %) foi determinada após secagem da amostra (2 g) em estufa a 105 °C até massa constante. A análise foi realizada em triplicata. O material foi armazenado sob refrigeração em saco plástico até realização das extrações.

A densidade do material sólido, 1,33 g cm⁻³, foi determinada por picnometria utilizando gás hélio (MICROMERITICS, AccuPyc II 1340).

Extração com CO₂ supercrítico

A obtenção dos extratos das folhas de cravo com CO₂ supercrítico foi realizada em um módulo constituído de um cilindro de CO₂, uma bomba seringa (Isco, modelo 500D), 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 18 cm de altura) e uma válvula micrométrica para controle da vazão volumétrica. A condição utilizada de temperatura e pressão foi de 40 °C e 22 MPa, definida conforme o limite operacional do equipamento e de modo a obter uma elevada densidade do solvente.

As extrações foram realizadas utilizando CO₂ puro e com adição dos cossolventes etanol (EtOH) e acetato de etila (EtAc). Os cossolventes foram adicionados às folhas trituradas nas proporções de 15, 20 e 25 % (m/m). O extrator foi preenchido com aproximadamente 18 g do material triturado. O solvente, resfriado a 5 °C, foi pressurizado até 22 MPa, e posteriormente bombeado para o extrator, já estabilizado na temperatura de extração (40 °C), 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 total de extração de 80 min. Os extratos foram mantidos sob refrigeração até realização das análises.

Análises por cromatografia líquida – HPLC

A quantificação do composto eugenol foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Saran *et al.*, (2012) com modificações. As amostras, 0,1 mg mL⁻¹ diluídas em isopropanol, foram analisadas em 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 a 1,0 mL min⁻¹, com tempo total de corrida de 15 min. Soluções do padrão de eugenol (Sigma-Aldrich), 0,01-0,10 mg mL⁻¹ diluídos em isopropanol, foram empregadas para a obtenção da curva padrão, que apresentou R²>0,99.

Modelagem matemática

As curvas cinéticas de extração foram descritas pelo modelo matemático de Sovová (1994). Neste modelo, o conteúdo de soluto inicial no sólido é dividido entre a fração de fácil acesso, liberada no processo de preparação da matéria-prima, e a fração de difícil acesso. Dessa forma, o processo de extração pode ser dividido em três etapas: no primeiro estágio, a taxa de extração é limitada pela transferência de massa do soluto na fase fluida (etapa de taxa constante de extração - *CER*); no último estágio, a taxa de extração é limitada pela difusão intrapartícula e, no estágio intermediário, estão presentes ambos os mecanismos de transferência de massa (etapa de taxa decrescente de extração – *FER*). A massa extraída em função do tempo, levando em consideração os três períodos, é dado pelas Equações 1 a 3.

Para $t < t_{CER}$:

$$m(t) = \dot{m}_F Y_S t [1 - \exp(-Z)] \quad (1)$$

Para $t_{CER} \leq t \leq t_{FER}$:

$$m(t) = \dot{m}_F Y_S \left[t - t_{CER} \exp\left(\frac{ZY_S}{WX_0} \ln\left\{\frac{1}{1-r} \left(\exp\left(\frac{W\dot{m}_F}{m_s}\right)(t_{CER} - t) - r\right)\right\} - Z\right) \right] \quad (2)$$

Para $t > t_{FER}$:

$$m(t) = m_s \left[X_0 - \frac{Y_S}{W} \ln\left\{1 + \left(\exp\left(\frac{WX_0}{Y_S}\right) - 1\right) \exp\left(\frac{W\dot{m}_F}{m_s}\right)(t_{CER} - t)r\right\} \right] \quad (3)$$

Em que:

$$Z = \frac{k_F a m_s \rho_F}{\dot{m}_F \rho_S} \quad (4)$$

$$W = \frac{m_s k_S a}{\dot{m}_F (1 - \varepsilon)} \quad (5)$$

$$t_{CER} = \frac{(1 - r) m_s X_0}{Y_S Z \dot{m}_F} \quad (6)$$

$$t_{FER} = t_{CER} + \frac{m_s}{W \dot{m}_F} \ln \left[r + (1 - r) \exp \left(\frac{W X_0}{Y_S} \right) \right] \quad (7)$$

Onde: \dot{m}_F é a vazão mássica de solvente (g min^{-1}), Y_S é a solubilidade do extrato no solvente ($\text{g}_{\text{extrato}} \text{g}_{\text{solvente}}^{-1}$), t é o tempo de extração (min), X_0 é a concentração inicial de soluto na matriz sólida ($\text{g}_{\text{extrato}} \text{g}_{\text{sólido}}^{-1}$), m_s é a massa de sólido inerte (g), r é a fração de extrato de fácil acesso, t_{CER} é o tempo em que se esgota o soluto presente na superfície das células na parte inicial do leito (min), t_{FER} é o tempo em que se esgota o soluto presente na superfície das células na parte final do leito (min), $k_F a$ e $k_S a$ são, respectivamente, os coeficientes volumétricos de transferência de massa nas fases fluida e sólida (min^{-1}), ε é a porosidade do leito, ρ_F é a densidade do CO_2 (g cm^{-3}) e ρ_S é a densidade do sólido (g cm^{-3}). Z , W e r são os parâmetros adimensionais do modelo.

No ajuste do parâmetro r utilizou-se o método “golden search”, com a função objetivo dada pela Equação 8.

$$F = \sum_{i=1}^{n_{\text{exp}}} \sum_{j=1}^N (m_{oil,i,j}^{Calc} - m_{oil,i,j}^{Exp}) \quad (8)$$

Os parâmetros adimensionais Z e W foram determinados com o emprego do método de otimização multivariável Simplex Down-Hill (NELDER; MEAD, 1965) a partir da minimização da função objetivo dada pela Equação 9.

$$F = \sum_{j=1}^N (m_{oil,j}^{Calc} - m_{oil,j}^{Exp}) \quad (9)$$

Em que: $m_{oil,j}^{Calc}$ é a massa de extrato obtida pelo modelo matemático; $m_{oil,j}^{Exp}$ é a massa de extrato obtida experimentalmente, n_{exp} é o número experimentos e N o número de pontos da curva cinética experimental.

Análise estatística

As diferenças significativas entre as médias dos resultados experimentais, $p < 0,05$, de rendimento e concentração de eugenol foram analisadas pelo teste Tukey, empregando programa computacional Statistica 8.0 (STATSOFT, USA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Rendimento das extrações

As folhas de cravo da Índia foram submetidas à extração supercrítica com CO_2 a 40°C e 22 MPa. Também foi avaliado o efeito da adição dos cossolventes etanol e acetato de etila às folhas no rendimento ao final de 80 min de extração. Na Tabela 1 são apresentadas as condições experimentais e rendimentos das extrações, bem como os valores da solubilidade aparente do extrato no solvente (Y_s) que foram calculados a partir da inclinação da parte linear das curvas de extração.

Tabela 1 – Rendimentos das extrações supercríticas com CO_2 a 40°C e 22 MPa e adição dos cossolventes etanol (EtOH) e acetato de etila (EtAc).

Solvente	Cossolvente (%)	Y_s^a (g g^{-1})	Rendimento ^b (%)
CO_2	0	$5,09 \times 10^{-3}$	$0,92 \pm 0,02^a$
$\text{CO}_2 + \text{EtOH}$	15	$6,42 \times 10^{-3}$	$1,00 \pm 0,05^{ab}$
$\text{CO}_2 + \text{EtOH}$	20	$9,48 \times 10^{-3}$	$1,26 \pm 0,05^{cd}$
$\text{CO}_2 + \text{EtOH}$	25	$1,02 \times 10^{-2}$	$1,33 \pm 0,02^d$
$\text{CO}_2 + \text{EtAc}$	15	$5,90 \times 10^{-3}$	$0,92 \pm 0,10^a$
$\text{CO}_2 + \text{EtAc}$	20	$9,23 \times 10^{-3}$	$1,08 \pm 0,01^{abc}$
$\text{CO}_2 + \text{EtAc}$	25	$9,30 \times 10^{-3}$	$1,15 \pm 0,01^{bcd}$

Letras iguais na mesma coluna indicam que as médias não diferem entre si ao nível de 5 %.

^a Solubilidade do extrato no solvente.

^b g de extrato por 100 gramas de folhas.

Como apresentado, 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 15, 20 e 25 % em relação à massa de matéria-prima, aumentou o rendimento final em 9, 37 e 45 % em relação à extração com CO_2 puro (0,92 %). Para as extrações com acetato de etila, os rendimentos só tiveram aumentos significativos para as concentrações de 20 e 25 %, sendo os valores finais aumentados em 18 e 26 %.

Os solventes modificadores adicionados às folhas tiveram o efeito de aumentar a solubilidade do extrato no CO_2 supercrítico, de $5,09 \times 10^{-3} \text{ g g}^{-1}$ para a extração sem cossolvente até $1,02 \times 10^{-2} \text{ g g}^{-1}$ 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 do cossolvente facilitar 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).

Modelagem matemática

O modelo matemático de Sovová (1994) foi utilizado para representar as curvas cinéticas de extração. Os parâmetros empregados foram: densidade do material triturado de $1,38 \text{ g cm}^{-3}$, porosidade do leito de 0,743, densidade do solvente de $0,858 \text{ g cm}^{-3}$, concentração inicial de extrato de $1,35 \times 10^{-2} \text{ g}_{\text{extrato}} \text{ g}_{\text{sólido}}$ (dada pela razão entre a massa extraída na condição de maior rendimento, com adição de 25 % de EtOH, e a massa de sólido inerte, densidade do leito de $0,356 \text{ g cm}^{-3}$ e solubilidade do extrato no solvente conforme Tabela 1.

Na Tabela 2 são apresentados os parâmetros ajustados do modelo de Sovová, Z , W e r . O valor do parâmetro r , 0,14, foi considerado constante devido ao procedimento de preparação ser o mesmo para todo o material (folhas de cravo).

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 $k_F a$ ($8,67 \times 10^{-2}$ a $7,57 \text{ min}^{-1}$) foram elevados em relação aos de $k_S a$ ($5,00 \times 10^{-3}$ a $1,10 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$) 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 2 – Parâmetros ajustados do modelo de Sovová para as extrações com CO₂ supercrítico a 40 °C e 22 MPa e 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
1	2,26	0,32	0,14	1,24	4,86	$8,67 \times 10^{-2}$	$7,58 \times 10^{-3}$	0,98
2	6,46	0,30	0,14	0,38	3,38	$2,48 \times 10^{-1}$	$7,23 \times 10^{-3}$	0,99
3	30,62	0,38	0,14	0,06	2,34	1,17	$9,00 \times 10^{-3}$	0,99
4	197,74	0,46	0,14	0,01	2,67	7,57	$1,10 \times 10^{-2}$	0,98
5	8,27	0,22	0,14	0,24	2,48	$3,2 \times 10^{-1}$	$5,28 \times 10^{-3}$	0,97
6	45,12	0,33	0,14	0,04	2,23	1,73	$7,94 \times 10^{-3}$	0,98
7	67,08	0,21	0,14	0,03	1,93	2,57	$5,00 \times 10^{-3}$	0,97

1: Extração sem cossolvente; 2: 15 % de EtOH; 3: 20 % de EtOH; 4: 25 % de EtOH; 5: 15 % de EtAc; 6: 20 % de EtAc; 7: 25% de EtAc

Nas Figuras 1 e 2 são apresentadas as curvas cinéticas de extração das folhas de cravo de índia com CO₂ a 40 °C e 22 MPa e adição dos cossolventes etanol e acetato de etila ajustadas pelo modelo de Sovová.

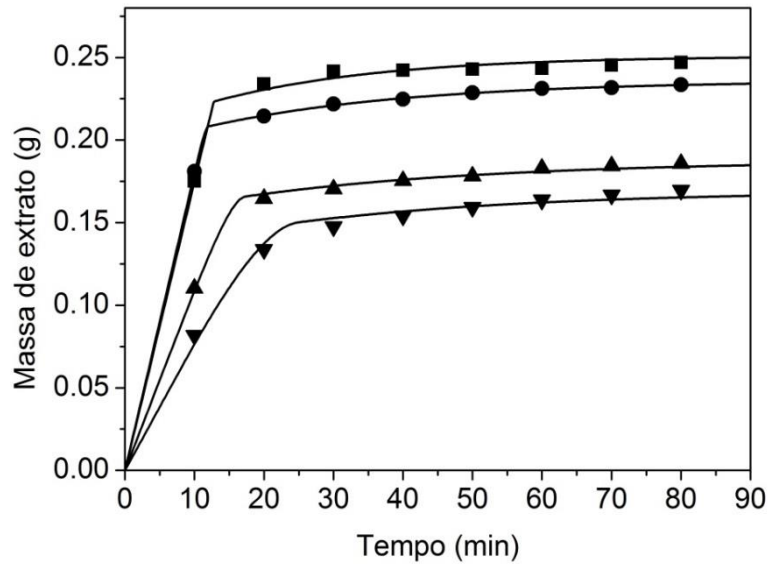


Figura 1 – Curvas cinéticas de extração com CO₂ supercrítico e adição do cossolvente etanol ajustadas pelo modelo de Sovová: ▼ (CO₂ a 40 °C e 22 MPa); ▲ (15 % de EtOH); ● (20 % de EtOH); ■ (25 % de EtOH).

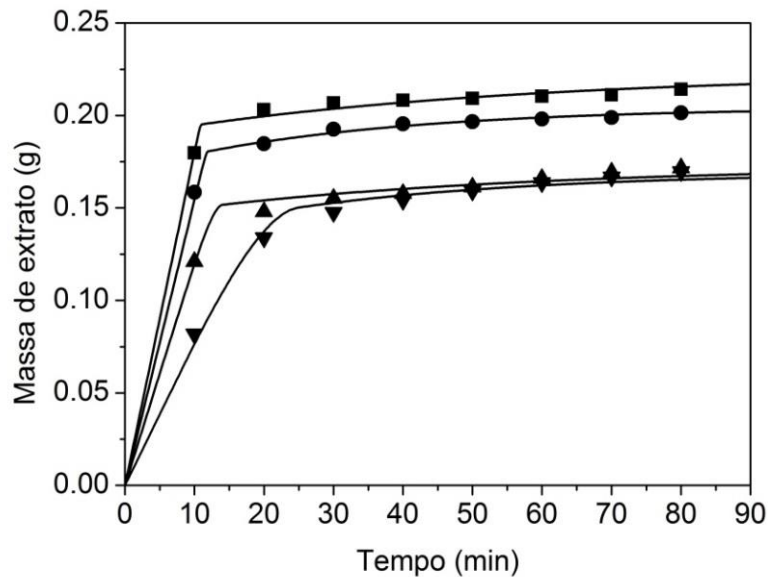


Figura 2 – Curvas cinéticas de extração com CO₂ supercrítico e adição do cossolvente acetato de etila ajustadas pelo modelo de Sovová: ▼ (CO₂ a 40 °C e 22 MPa); ▲ (15 % de EtAc); ● (20 % de EtAc); ■ (25 % de EtAc).

Como apresentado na Tabela 2 e nas Figuras 1 e 2, o modelo apresentou um bom ajuste aos dados experimentais, com coeficiente de determinação, $R^2 > 0,97$ para todas as condições avaliadas.

Concentração de eugenol

A concentração de eugenol nos extratos obtidos das folhas de cravo da Índia foi determinada por cromatografia líquida empregando uma curva padrão do composto puro e os resultados são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Concentração de eugenol nos extratos obtidos com CO₂ a 40 °C e 22 MPa e com adição de 15, 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 ^d	2,73 ± 0,02 ^e
CO ₂ +EtOH	15	27,96 ± 0,92 ^d	2,80 ± 0,09 ^e
CO ₂ +EtOH	20	28,58 ± 0,44 ^d	3,59 ± 0,06 ^f
CO ₂ +EtOH	25	13,12 ± 0,44 ^b	1,74 ± 0,06 ^c
CO ₂ +EtAc	15	25,42 ± 0,92 ^c	2,35 ± 0,90 ^d
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 indicam que as médias não diferem entre si ao nível de 5 %.
^a g de eugenol por 100 g de extrato.

A amostra extraída com CO₂ sem adição de cossolventes às folhas apresentou 29,84 % de eugenol. Como mostrado em outros trabalhos, o óleo essencial das folhas de cravo (*Syzygium aromaticum*) é constituído majoritariamente deste composto, sendo encontrada a concentração de 77 % por Jirovetz *et al.* (2006) e 84 % por Razafimamonjison *et al.* (2014). Deve-se ressaltar que o método empregado nestes trabalhos citados foi o da hidrodestilação, sendo recuperados, principalmente, os hidrocarbonetos monoterpênicos e sesquiterpenos (BAKKALI *et al.*, 2008) - ou no caso do cravo, o fenilpropanóide eugenol - diferentemente do CO₂ que, devido à sua polaridade, tem afinidade pelos compostos lipofílicos presentes na planta (POURMORTAZAVI; HAJIMIRSADEGHI, 2007), o que explica a baixa concentração do eugenol no produto da extração supercrítica.

A adição de 15 e 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 32 %.

CONCLUSÃO

As folhas de cravo da Índia foram submetidas à extração supercrítica com CO₂ e adição dos cossolventes etanol e acetato de etila nas proporções de 15, 20 e 25 % (m/m). Os resultados

mostraram que aumentos significativos no rendimento foram obtidos com a adição destes solventes modificadores. O maior rendimento obtido foi de 1,33 %, referente à extração com adição de 25 % do cossolvente etanol, sendo 45 % maior que o da extração sem cossolvente. A adição de 20 % de etanol foi a condição mais favorável quando se avalia rendimento em extrato e concentração de eugenol no extrato, podendo-se obter 3,59 g_{eugenol} kg_{folhas}⁻¹. O modelo matemático de Sovová (1994) apresentou um bom ajuste aos dados experimentais, com R²>0,97.

REFERÊNCIAS

- BAKKALI, F., AVERBECK, S., AVERBECK, D., IDAOMAR, M.M. **Biological effects of essential oils- a review**. Food and Chemical Toxicology, v. 46, p. 446-475, 2008.
- BARCELOUX, D.G. Medical Toxicology of Natural Substances. Foods, Fungi, Medicinal Herbs, Plants and Venomous Animals; Wiley: Hoboken, NJ, USA, 2008. 1157p.
- 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.
- BRUNETON, J. **Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Médicinales**. 2.ed. Lavoisier. Paris, 1991.993p.
- BRUNNER, G. **Gás extraction: An introduction to Fundamentals of Supercritical Fluids and the Application to Separation Processes**. 1 ed. Darmstadt, Alemanha: Steinkopff, 1994. 387p.
- CÓRTEZ-ROJAS, D.F, SOUZA, C. R. F, OLIVEIRA, W. P. Clove (*Syzygium aromaticum*): a precious spice. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, v. 4, p. 90-96, 2014.
- DÍAZ-REINOSO, B., MOURE, A., DOMÍNGUEZ, H., PARAJÓ, J. C. **Supercritical CO₂ extraction and purification of compounds with antioxidant activity**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 54, p. 2441-2469, 2006.
- HOLLENDER, J., SHNEINE, J., DOTT, W., HEINZEL, 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, v. 776, p. 233-243, 1997.
- HUANG, Y., HO, S. H., LEE, H. C., YAP, Y. L. **Insecticidal properties of eugenol, isoeugenol and methyleugenol and their effects on nutrition of *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera: Curculionidae) and *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae)**. Journal of Stored Products Research, v. 38, p. 403-412, 2002.
- IVANOVIC, J., BRANKVIC, S.D., MISIC, D., RISTIC, M., ZIZOVIC, I. **Evaluation and improvement of antioxidant and antibacterial activities of supercritical extracts from clove buds**. Journal of Functional Foods, v. 5, p. 416-423, 2013.

JIROVETZ, L., BUCHBAUER, G., STOILOVA, I., SCHMIDT, E. **Chemical Composition and Antioxidant Properties of Clove Leaf Essential Oil.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 54, p. 6303–6307, 2006.

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, p. 6933-6981, 2012.

LEE, K. G., SHIBAMOTO, T. **Antioxidant property of aroma extract isolated from clove buds [*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. et Perry].** Food Chemistry, v. 74, p. 443–448, 2001.

LUBBE, A., VERPOORTE, R. **Cultivation of medicinal and aromatic plants for specialty industrial materials.** Industrial Crops and Products, v. 34, p. 785-801, 2011.

MAUL, A.A. **Fluidos supercríticos: situação atual e futuro da extração supercrítica.** Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, v. 2, p. 42-46, 1999.

MURGA, R., RUÍZ, R., BELTRÁN, S., CABEZAS, J.L. **Extraction of natural complex phenols and tannins from grape seeds by using supercritical mixtures of carbon dioxide and alcohol.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 48, p. 3408-3412, 2000.

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

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

POURMORTAZAVI, S.M., HAJMIRSADEGHI, S.S. **Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis.** Journal of Chromatography A, v. 1163, p. 2–24, 2007.

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

RAZAFIMAMONJISON, G., JAHIEL, M., DUCLOS, T., RAMANOELINA, P., FAWBUSH, F., DANTHU, P. **Bud, leaf and stem essential oil composition of *Syzygium aromaticum* from Madagascar, Indonesia and Zanzibar.** International Journal of Basic and Applied Sciences, v. 3, p. 224-233, 2014.

REYES-JURADO, F., FRANCO-VEIGA, A., CORONA, N.R., PALOU, E., LÓPEZ-MALO, A. **Essential Oils: Antimicrobial Activities, Extraction Methods, and their Modeling.** Food Engineering Reviews, v. 7, p. 275-297, 2014.

SANTOS, K.A., FROHLICH, P.C., HOSCHEID, J., TIUMAN, T.S., GONÇALVES, J.E., CARDOZO-FILHO, L., SILVA, E.A. **Candeia (*Eremanthus erythropappus*) 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., SHAILAJAN, 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, p. 53-60, 2013.

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 palmarosa.** Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, v. 11, p. 442-449, 2009.

SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 6. Ed. Porto alegre: Editora da UFRGS, 2007. 1104p.

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

SPARKS, D., HERNANDEZ, R., ZAPPI, M., BLACKWELL, D., FLEMING, T. **Extraction of rice bran oil using supercritical carbon dioxide and propane.** Journal of the American Oil Chemists Society, v. 83, p. 885-891, 2006.

YANG, Y.C., WEI, M.C., HONG, S.J. **Ultrasound-assisted extraction and quantitation of oils from *Syzygium aromaticum* flower bud (clove) with supercritical carbon dioxide.** Journal of Chromatography A, v. 1323, p. 18-27, 2014.

ZHENG, G.Q., KENNEY, P.M., LAM, L.K.T. **Sesquiterpenes from clove (*Eugenia ryophyllata*).** Journal of Natural Products, v. 55, p. 999-1003, 1992.

Aceito em: 14/06/2018

Publicado em: 10/12/2018