

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS LARANJEIRAS DO SUL
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS**

BRUNA DA SILVA GARAI

**AVALIAÇÃO DE PERFIL QUÍMICO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE EXTRATOS DE
CRAVO-DA-ÍNDIA OBTIDOS POR DIFERENTES MÉTODOS**

LARANJEIRAS DO SUL

2021

BRUNA DA SILVA GARAI

**AVALIAÇÃO DE PERFIL QUÍMICO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE EXTRATOS DE
CRAVO-DA-ÍNDIA OBTIDOS POR DIFERENTES MÉTODOS**

Trabalho de Dissertação apresentado ao Programa de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Leda Battestin Quast

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Roberta Letícia Krüger

LARANJEIRAS DO SUL

2021

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Garais, Bruna da Silva

Avaliação de perfil químico e atividade biológica de extratos de cravo-da-índia obtidos por diferentes métodos / Bruna da Silva Garais. -- 2021.

77 f.:il.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Leda Battestin Quast

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Roberta Letícia Krüger

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Fronteira Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Laranjeiras do Sul, PR, 2021.

1. Óleo essencial. 2. Bioaditivo. 3. Atividade antioxidante. 4. Atividade antimicrobiana. I. Quast, Leda Battestin, orient. II. Krüger, Roberta Letícia, co-orient. III. Universidade Federal da Fronteira Sul. IV. Título.

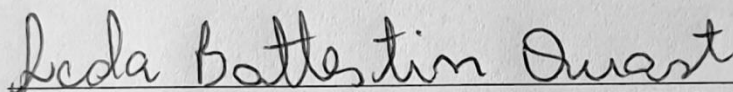
BRUNA DA SILVA GARAIS

**AVALIAÇÃO DE PERFIL QUÍMICO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE EXTRATOS
DE CRAVO-DA-ÍNDIA OBTIDOS POR DIFERENTE MÉTODOS**

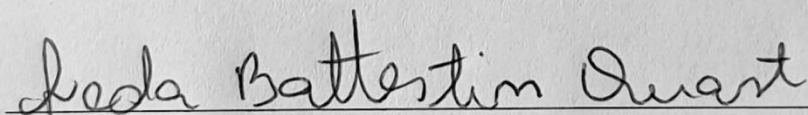
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS) como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Este trabalho foi defendido e aprovado pela banca em 17/12/2021.

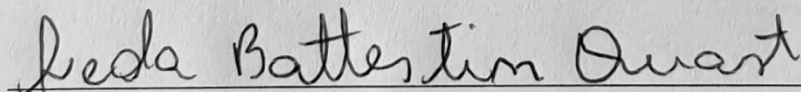
BANCA EXAMINADORA



Prof.^a Dra. Leda Battestin Quast – UFFS
Presidente/Orientadora



Prof. Dr. João Paulo Bender – UFFS
1º Membro



Prof.^a Dra. Michele Cristiane Mesomo Bombardelli – UNICENTRO
2º Membro

Prof.^a Dra. Eduarda Molardi Bainy – UFFS
Suplente

1“Em função da Pandemia do Coronavírus e as medidas de afastamento tomadas pela UFFS, esta Ata foi assinada pelo Presidente da Banca, como representante dos demais membros.”

Dedico este trabalho aos meus pais, Célia e Ildo (*in memoriam*), a minha irmã, Eloisa, e aos meus avós, Antônio e Maria, pois essa é a realização de um sonho nosso.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Célia e Ildo (*in memoriam*), pelo amor incondicional, incentivo e apoio ao longo de toda a minha vida. Por acreditarem em meu potencial, nunca pouparem esforços por mim, sempre estarem presentes, mesmo que em meu coração, e, acima de tudo, pelo exemplo de caráter, dignidade e perseverança. A vocês, todo o meu amor e admiração!

A minha irmã, Eloisa, pelo amor e companheirismo de uma vida inteira, por todo o incentivo e força que me ofereceu durante essa e tantas outras fases que já vivemos. Agradeço por te ter comigo e pelo exemplo de amor e determinação que é para mim! A você, meu amor e admiração!

Aos meus avós, Antônio e Maria, pelo amor incondicional, incentivo, presença e, principalmente, pelo exemplo de fé e resiliência. A vocês, meu amor e admiração!

Aos meus amigos que sempre me incentivaram, apoiaram e que, de tantas formas, contribuíram para a realização deste trabalho, em especial àqueles que vivenciaram comigo essa experiência intensa.

À Prof.^a Dr.^a Leda Battestin Quast, minha Orientadora, e à Prof.^a Dr.^a Roberta Letícia Krüger, minha Coorientadora, pelos ensinamentos, incentivo, confiança e, principalmente, pela compreensão durante os momentos de dificuldade que enfrentamos.

À Prof.^a Dr.^a Cristina Maria Zanette e à Prof.^a Dr.^a Michele Cristiane Mesomo Bombardelli, da Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO), e ao Prof.^o Dr.^o Luciano Tormen, da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), pelo apoio durante a realização da fase experimental deste trabalho.

Aos Professores da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS) que contribuíram para esta etapa da minha formação.

Aos colaboradores dos laboratórios da UFFS e da UNICENTRO pelo apoio durante a realização da fase experimental deste trabalho.

“Pensamentos tornam-se ações, ações tornam-se hábitos tornam-se caráter, e nosso caráter torna-se nosso destino.”

O Monge e o Executivo
James C. Hunter

RESUMO

O uso de determinados aditivos alimentares, pode provocar alterações negativas nas propriedades do alimento e uma alternativa para isso é o uso de bioaditivos, que não causam impactos diretos ao alimento e seu uso pode sugerir benefícios à saúde. Um exemplo de bioaditivos são os óleos essenciais, cujas propriedades antifúngicas e antibacterianas são muito conhecidas. Os extratos de plantas também se destacam como alternativa para o uso de determinados aditivos. O cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) é conhecido por suas atividades antifúngica e antibacteriana. Este trabalho teve como objetivo principal avaliar a atividade biológica do óleo essencial e extratos de cravo-da-índia, obtidos por diferentes métodos de extração. Um único lote de botões secos de cravo-da-índia foi utilizado. A análise de perfil químico dos extratos de cravo-da-índia demonstrou a presença de classes de compostos de ácido gálico, flavonas e seus isômeros. Ácido gálico, teobromina e miricetina foram quantificados com valores entre 413,53 e 798,58 µg/mL, 0,003 e 0,005 µg/mL e 0,031 e 0,040 µg/mL, respectivamente. O óleo essencial de cravo-da-índia foi obtido por método de hidrodestilação e os extratos foram obtidos por maceração, extração assistida por ultrassom a 25 °C e extração assistida por ultrassom a 40 °C. Para a determinação da atividade biológica, foram utilizadas cepas de *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. enteritidis* e *S. aureus*. A atividade antimicrobiana foi verificada pela formação ou não de halos (mm) de inibição ao redor dos orifícios feitos em placas de Petri contendo TSA. A análise de perfil químico foi conduzida em cromatógrafo de fase líquida acoplado a um detector por arranjo de diodos UFLC. A atividade antioxidante foi mensurada pelo método DPPH, conforme descrito por Mensor e colaboradores (2001). O rendimento do processo de extração do óleo essencial foi de 1,05%. Os extratos obtidos com uso de ultrassom e por maceração tiveram rendimentos entre 1,45 e 7,74%. Para a concentração de 100 µL/mL, as amostras de óleo, $U_{(25\text{ }^{\circ}\text{C})30'}$, $U_{(25\text{ }^{\circ}\text{C})30'}$, $U_{(40\text{ }^{\circ}\text{C})15'}$ e $U_{(40\text{ }^{\circ}\text{C})30'}$ apresentaram os maiores halos de inibição para *S. enteritidis*, entre 2,40 e 2,92 mm. Para *S. aureus*, as amostras $U_{(25\text{ }^{\circ}\text{C})30'}$, $U_{(40\text{ }^{\circ}\text{C})15'}$ e $U_{(40\text{ }^{\circ}\text{C})30'}$ apresentaram os maiores valores, entre 2,05 e 2,55 mm. As amostras $U_{(40\text{ }^{\circ}\text{C})15'}$ e $U_{(40\text{ }^{\circ}\text{C})30'}$ apresentaram os maiores halos de inibição para *E. coli*, entre 2,60 e 2,68 mm. Para *L. monocytogenes*, as amostras $U_{(40\text{ }^{\circ}\text{C})15'}$ e $U_{(40\text{ }^{\circ}\text{C})30'}$ apresentaram os maiores valores, entre 1,88 e 2,15 mm. Para a concentração

de 50 $\mu\text{L}/\text{mL}$ a amostra com maior atividade antimicrobiana foi o óleo essencial. O conteúdo de fenólicos totais encontrado ficou entre 0,101 e 0,290 mg GEA/ g_{ext} , com os maiores valores verificados nos extratos obtidos por extração assistida por ultrassom. Os resultados dos percentuais das atividades antioxidantes DPPH (% AA) variaram entre 8,15 e 65,24%. Os maiores valores observados foram das amostras de óleo essencial e de extratos obtidos por extração assistida por ultrassom. A realização deste trabalho demonstrou que o óleo essencial e os extratos de cravo-da-índia, obtidos por diferentes métodos de extração, possuem atividade biológica, que pode despertar interesse nas indústrias de alimentos e farmacêutica.

Palavras-chave: Óleo essencial; Bioaditivo; Atividade antioxidante; Atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

The use of certain food additives might cause negative changes in the properties of food and an alternative for this is the use of bioadditives, which do not cause direct impacts to the food and their use may suggest health benefits. An example of bioadditives are essential oils, whose antifungal and antibacterial properties are well known. Plant extracts also stand out as an alternative to the use of certain additives. Clove (*Syzygium aromaticum*) is known for its antifungal and antibacterial activities. The main objective of this work was to evaluate the biological activity of clove essential oil and extracts, obtained by different extraction methods. A single batch of dried clove buds was used. The clove essential oil was obtained by hydrodistillation and the extracts were obtained by maceration, ultrasound-assisted extraction at 25 °C and ultrasound-assisted extraction at 40 °C. The chemical profile analysis of clove extracts demonstrated the presence of classes of compounds of gallic acid, flavones and their isomers. Gallic acid, theobromine and myricetin were quantified with values between 413,53 and 798,58 µg/mL, 0,0030 and 0,005 µg/mL and 0,031 and 0,040 µg/mL, respectively. In order to determine the biological activity, strains of *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. enteritidis* and *S. aureus* were used. The antimicrobial activity was verified by the formation or absence of inhibition halos (mm) around the holes made in Petri dishes containing TSA. The chemical profile analysis was conducted in a liquid phase chromatograph coupled to a UFLC diode array detector. The antioxidant activity was measured by the DPPH method, as described by Mensor et al. (2001). The yield of the essential oil extraction process was 1,05%. The extracts obtained using ultrasound and by maceration process yielded between 1,45 e 7,74%. For the concentration of 100 µL/mL, the oil samples, U_{(25 °C)30'}, U_{(25 °C)30'}, U_{(40 °C)15'} and U_{(40 °C)30'} presented the largest halos of inhibition for *S. enteritidis*, between 2,40 and 2,92 mm. For *S. aureus*, the samples U_{(25 °C)30'}, U_{(40 °C)15'} and U_{(40 °C)30'} presented the highest values, between 2,05 and 2,55 mm. The samples U_{(40 °C)15'} and U_{(40 °C)30'} showed the largest inhibition halos for *E. coli*, between 2,60 and 2,67 mm. For *L. monocytogenes*, the samples U_{(40 °C)15'} and U_{(40 °C)30'} presented the highest values, between 1,88 and 2,15 mm. For the concentration of 50 µL/mL, the sample with the highest antimicrobial activity was the essential oil. The total phenolic content found was between 0,101 and 0,290 mg GEA/g_{ext}, with the highest values observed in extracts obtained by

ultrasound-assisted extraction. The results of the antioxidant activities DPPH (% AA) ranged between 8,15 and 65,24%. The highest values observed were from essential oil samples and extracts obtained by ultrasound-assisted extraction. This work demonstrated that clove essential oil and extracts, obtained by different extraction methods, have biological activity, which may arouse interest in the food and pharmaceutical industries.

Keywords: Essential oil; Bioadditive; Antioxidant activity; Antimicrobial activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Árvore de cravo-da-índia.....	20
Figura 2 – Frutos da árvore de cravo-da-índia	21
Figura 3 – Botões secos ou cravo-da-índia	22
Figura 4 – Equipamento Clevenger.....	29
Figura 5 – Equipamento Ultrassom	30
Figura 6 – Exemplos de monoterpenos.....	32
Figura 7 – Estruturas moleculares de β -caroteno, o α -caroteno e a β -criptoxantina .	33
Figura 8 – Estrutura molecular do eugenol.....	35
Figura 9 – Estrutura molecular do β -cariofileno	35
Figura 10 – Estrutura molecular do α -humuleno	36
Figura 11 – Estrutura molecular do acetato de eugenila	37
Figura 12 – Mecanismo de ação antimicrobiana dos óleos essenciais.....	40
Figura 13 – Fluxograma de hidrodestilação de óleo essencial de cravo-da-índia.....	45
Figura 14 – Fluxograma de extração por maceração	45
Figura 15 – Fluxograma de extração assistida por ultrassom.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Os principais óleos essenciais do mercado mundial	24
Tabela 2 – Porcentagem dos componentes do óleo essencial de cravo-da-índia	33
Tabela 3 – Dados de inibição do radical DPPH para construção da curva padrão de ácido ascórbico para determinação da atividade de extratos	50
Tabela 4 – Compostos químicos presentes em óleo essencial de cravo-da-índia obtido por hidrodestilação.....	52
Tabela 5 – Compostos químicos presentes em extratos de cravo-da-índia obtidos por maceração e extração assistida por ultrassom.....	53
Tabela 6 – Concentrações de compostos químicos presentes em extratos de cravo-da-índia obtidos por maceração e extração assistida por ultrassom	54
Tabela 7 – Percentual de rendimento de extratos de cravo-da-índia obtidos por maceração e extração assistida por ultrassom a 25 e a 40 °C	55
Tabela 8 – Atividade biológica de extratos de cravo-da-índia (em concentração de 100 µL/mL).....	57
Tabela 9 – Atividade biológica de extratos de cravo-da-índia (em concentração de 50 µL/mL)	59
Tabela 10 – Atividade antioxidante de extratos de cravo-da-índia obtidos por diferentes métodos.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	American Type Culture Collection
bu	Base úmida
CUPRAC	Cupric ion reducing antioxidant capacity
DIPOV	Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Vegetal
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FDA	Food and Drug Administration
FRAP	Ferric reducing antioxidant power
<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
M _{0h}	Maceração no tempo de 0h
M _{6h}	Maceração no tempo de 6h
M _{12h}	Maceração no tempo de 12h
M _{24h}	Maceração no tempo de 24h
M _{48h}	Maceração no tempo de 48h
M _{72h}	Maceração no tempo de 72h
ORAC	Oxygen radical absorbance capacity
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. enteritidis</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>
<i>S. typhimurium</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
TRAP	Total reactive antioxidant potential
U _{(25 °C)0'}	Ultrassom a 25 °C no tempo de 0 min
U _{(25 °C)5'}	Ultrassom a 25 °C no tempo de 5 min
U _{(25 °C)10'}	Ultrassom a 25 °C no tempo de 10 min
U _{(25 °C)15'}	Ultrassom a 25 °C no tempo de 15 min
U _{(25 °C)20'}	Ultrassom a 25 °C no tempo de 20 min
U _{(25 °C)30'}	Ultrassom a 25 °C no tempo de 30 min
U _{(40 °C)0'}	Ultrassom a 40 °C no tempo de 0 min
U _{(40 °C)5'}	Ultrassom a 40 °C no tempo de 5 min
U _{(40 °C)10'}	Ultrassom a 40 °C no tempo de 10 min
U _{(40 °C)15'}	Ultrassom a 40 °C no tempo de 15 min

U _{(40 °C)20'}	Ultrassom a 40 °C no tempo de 20 min
U _{(40 °C)30'}	Ultrassom a 40 °C no tempo de 30 min
UFFS	Universidade Federal da Fronteira Sul
UNICENTRO	Universidade Estadual do Centro-Oeste
% AA	Percentual de atividade antioxidante

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A – Cromatograma de extratos obtidos por maceração	75
APÊNDICE B – Cromatograma de extratos obtidos por ultrassom em 25 °C.....	76
APÊNDICE C – Cromatograma de extratos obtidos por ultrassom em 40 °C.....	77

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	OBJETIVO GERAL	19
1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1	CRAVO-DA-ÍNDIA	20
2.2	ÓLEOS ESSENCIAIS E EXTRATOS DE PLANTAS.....	23
2.3	MÉTODOS DE EXTRAÇÃO	26
2.4	PERFIL QUÍMICO DE EXTRATOS DE CRAVO-DA-ÍNDIA	31
2.5	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	38
2.6	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	41
3	METODOLOGIA.....	44
3.1	MATÉRIA-PRIMA.....	44
3.2	OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL E EXTRATOS	45
3.3	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	47
3.4	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS.....	47
3.5	DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO FENÓLICO TOTAL.....	49
3.6	MÉTODO DPPH.....	49
3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	51
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
4.1	PERFIL QUÍMICO	52
4.2	ÓLEO ESSENCIAL E EXTRATOS	55
4.3	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	57
4.4	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	60
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	62
	REFERÊNCIAS.....	65
	APÊNDICE A – CROMATOGRAMA DE EXTRATOS OBTIDOS EM MACERAÇÃO....	75
	APÊNDICE B – CROMATOGRAMA DE EXTRATOS OBTIDOS EM ULTRASSOM A 25 °C	76
	APÊNDICE C – CROMATOGRAMA DE EXTRATOS OBTIDOS EM ULTRASSOM A 40 °C	77

1 INTRODUÇÃO

O estilo de vida e de consumo da população demanda cada vez mais por aumento do tempo útil dos alimentos com garantia do padrão de qualidade e características nutricionais. O uso de aditivos alimentares, muito comum e amplamente difundido na indústria de alimentos, se opõe a esse crescente interesse por alimentos nutricionalmente saudáveis, pois a utilização de determinados aditivos pode provocar alterações negativas nas propriedades do alimento (FELIPE; BICAS, 2016).

A utilização dos aditivos nos alimentos tem por finalidade conferir características específicas ao produto e/ou prevenir alterações indesejáveis, ou seja, deve-se por razões tecnológicas, sensoriais ou nutricionais, porém, a legislação estabelece quantidade máxima permitida de aditivos nos alimentos, de forma a diminuir ou evitar complicações à saúde humana, em razão dos possíveis efeitos reversos dos aditivos, uma vez que o uso dessas substâncias vem demonstrando controvérsias em relação às vantagens de seu consumo, como manifestações clínicas, complicações metabólicas e efeitos carcinogênicos (SOUZA et al., 2019).

Uma alternativa para a utilização de aditivos é o desenvolvimento de novos e melhores sistemas de conservação de alimentos, sendo comum a utilização de tecnologias como uso de processos térmicos, uso de embalagens ativas e/ou bioaditivos, entre outros (FELIPE; BICAS, 2016).

A utilização de compostos bioativos apresenta grandes vantagens em relação aos aditivos (produtos sintéticos), já que possuem processo de fácil decomposição, não são poluentes e, por isso, não representam risco para o meio ambiente, além de não apresentarem propriedades fitotóxicas ou residuais (PIMENTA NETO et al., 2020).

Os bioaditivos são substâncias que não causam impactos diretos ao alimento, ou ao meio ambiente, e por isso se destacam como opções para a substituição dos aditivos convencionais. Além disso, seu uso pode sugerir benefícios à saúde, pela agregação de suas propriedades ao alimento, desde que sejam respeitados os limites de ingestão diária aceitável (PEREIRA-REIRE et al., 2020). Segundo Pimenta Neto e colaboradores (2020) os compostos bioativos encontrados em óleos essenciais e extratos podem agir de forma concomitante com outras moléculas que já possuem

efeito positivo sobre patógenos, o que endossa seu potencial de uso para a indústria, pois permite a redução da concentração de aditivos utilizados convencionalmente.

Os óleos essenciais são produtos naturais utilizados na produção de alimentos, que não impactam diretamente a característica do produto, e se destacam como matéria-prima para síntese de compostos de alto valor comercial e nutricional para as indústrias de alimentos e farmacêutica (CRAVEIRO; QUEIROZ, 1993). Esses são compostos aromáticos, oriundos de metabolismo secundário das plantas, que podem ser extraídos por diferentes métodos, sendo os mais comuns a hidrodestilação e a destilação por arraste a vapor. Em sua composição são encontrados monoterpenos, sesquiterpenos, e outras substâncias de baixo peso molecular. Suas propriedades antifúngicas e antibacterianas há muito são conhecidas, mas sua utilização se tornou mais popular, em função das mudanças nos hábitos de consumo da população (CRAVEIRO; QUEIROZ, 1993; PANDEY et al., 2017).

Os extratos, assim como os óleos essenciais, são obtidos por esgotamento da planta, com solventes permitidos, e também são muito utilizados como alternativa para o uso de aditivos, sendo compostos por constituintes voláteis e não-voláteis. Esses se destacam como alternativa para o uso de determinados aditivos por oferecerem diversas vantagens, tais como sua baixa toxicidade e amplo modo de ação. Estudos evidenciam que extratos vegetais podem apresentar potencial herbicida e inseticida, com grande eficiência (KOBAYASHI; AMARAL, 2018). Da mesma forma que os óleos essenciais, têm eficácia no controle do crescimento de fungos filamentosos, leveduras, bactérias e outros microrganismos (CUTRIM et al., 2019). A principal vantagem, em relação ao óleo essencial, é o menor custo de produção.

O cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), especiaria comumente utilizada na culinária por sua função flavorizante, é conhecido por suas atividades antifúngicas e antibacterianas. Os principais componentes presentes no cravo-da-índia, no que se refere a sua propriedade antisséptica, são o eugenol e o 3-cariofileno (BARROS GOMES et al., 2020). Além destas, o óleo essencial de cravo-da-índia tem atividades biológicas (contra uma ampla gama de microrganismos patogênicos) antioxidante, analgésica e anti-inflamatória (SCUDELER, 2019).

Diante do contexto exposto, este trabalho teve como objetivo principal avaliar a atividade biológica e determinar o perfil químico do óleo essencial e de extratos de cravo-da-índia, obtidos por diferentes métodos de extração.

1.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do trabalho foi avaliar o perfil químico e os potenciais antimicrobiano e antioxidante de óleo essencial e extratos de cravo-da-índia, obtidos por diferentes métodos de extração.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter óleo essencial de cravo-da-índia por método de hidrodestilação;
- Obter extrato de cravo-da-índia por método de maceração;
- Obter extrato de cravo-da-índia por método de extração assistida por ultrassom, a 25 °C e a 40°C;
- Avaliar atividades antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial e dos extratos;
- Avaliar perfis químicos do óleo essencial e dos extratos por cromatografia;
- Comparar perfis químicos e atividade biológica do óleo essencial e dos extratos, para avaliação de eficácia dos métodos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CRAVO-DA-ÍNDIA

Especiarias como cravo-da-índia, canela, hortelã, entre outros, são amplamente utilizados na indústria como flavorizantes e também como agentes conservantes. Suas propriedades medicinais também são reconhecidas devido à capacidade antimicrobiana, antioxidante e anticarcinogênico. O cravo-da-índia se destaca das demais devido ao seu potencial antioxidante, antimicrobiano, antiséptico e anestésico (BHAVANIRAMYA et al., 2019; TUNÇ; KOCA, 2019).

O cravo-da-índia pertence à família das mirtáceas (*Myrtaceae*) e é conhecido cientificamente pelo nome de *Syzygium aromaticum*. O craveiro-da-índia (Figura 1) é uma árvore de ciclo perene, de grande porte e possui copa alongada, com altura entre 10 e 12 metros, as folhas são ovais e lisas, e as flores hermafroditas, róseas ou avermelhadas, pequenas, aromáticas e dispostas em corimbos terminais.

Figura 1 – Árvore de cravo-da-índia



Fonte: Adaptado de Affonso *et al.* (2012)

Seu cultivo é realizado comumente em áreas costeiras, com altitudes máximas de 200 m acima do nível do mar (CORTÉS-ROJAS; DE SOUZA; OLIVEIRA, 2014). Os maiores produtores desta especiaria são a Indonésia, Índia, Malásia, Sri Lanka, Madagascar e Tanzânia. No Brasil, a região de maior produção é o Nordeste, no estado da Bahia. O cultivo é feito por pequenos produtores, com uso de mudas ou sementes, entre os meses de setembro e fevereiro.

Segundo o Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Vegetal (DIPOV) (2019), o cravo-da-índia é um botão floral, de sabor picante e aroma intenso, colhido antes de desabrochar quando da passagem da coloração verde/amarela clara para róseo/vermelha e que quando desidratado, face a seu preparo, mediante secagem natural e/ou artificial, apresenta a coloração da haste pardo-escura, liso, e as pétalas não desabrochadas de tonalidade mais clara e brilhante.

Os frutos (Figura 2) são drupas secas, que ficam na periferia da copa da árvore e tem formato alongado, ovoide, são coroados pelas divisões do cálice e possuem aroma marcante. O ovário e o cálice das flores compõem o cravo-da-índia (CORTÉS-ROJAS; DE SOUZA; OLIVEIRA, 2014; GOMES et al., 2018).

Figura 2 – Frutos da árvore de cravo-da-índia



Fonte: Ministério da Educação (2021)

O cravo-da-índia é colhido na forma de botão floral maduro e comercializado na forma de botão floral seco. Os botões florais podem ter entre 1,5 e 2 cm de comprimento e são colhidos com pedicelos (estrutura responsável pela sustentação e

condução de seiva para as flores), que são eliminados durante o processo de destalamento (processo de retirada do talo do fruto) (GOMES et al., 2018).

A colheita pode ser manual ou mecânica e ocorre entre o fim do verão e o inverno. O processo de secagem pode durar até dois dias em estufa ou ao sol. Ao botão seco dá-se a denominação de cravo-da-índia (Figura 3).

Esta especiaria, que foi uma das primeiras a ser comercializada no mundo, possui características sensoriais acentuadas devido à presença do eugenol, composto fenólico volátil majoritariamente presente em sua composição. Segundo (YOSTAWONKUL et al., 2019) o óleo extraído das folhas de cravo-da-índia pode conter até 95% desse componente.

O óleo extraído dos botões de cravo-da-índia tem coloração levemente amarelada ou incolor e pode apresentar baixa estabilidade na presença de luz, calor, ar e umidade. Assim como o óleo das folhas, também tem como principal componente o eugenol, e sua composição varia entre 15 e 20% de óleo essencial por massa (TUNÇ; KOCA, 2019).

Figura 3 – Botões secos ou cravo-da-índia



Fonte: Ministério da Educação (2021)

Os principais produtos de cravo-da-índia disponíveis no mercado nacional são o botão floral seco, óleo essencial puro e seus derivados. Para a indústria, o maior interesse está nos derivados do cravo-da-índia, cujas aplicações são variadas. O uso

como bioaditivo se destaca nas indústrias de alimentos e farmacêutica (AFFONSO et al., 2012).

2.2 ÓLEOS ESSENCIAIS E EXTRATOS DE PLANTAS

As plantas produzem metabólitos secundários que possuem atividade biológica, são de grande importância econômica, farmacológica e tecnológica, e são amplamente utilizados nas indústrias de alimentos e farmacêutica, na tentativa de obter efeito mais eficaz e com menor impacto nas características do produto, uma vez que os compostos naturais apresentam efeitos mais leves, porém mais duradouros (CORTÉS-ROJAS et al., 2013).

Muitas plantas apresentam atividade antioxidante que, quando aplicada na fabricação de alimentos, previne ou retarda a sua deterioração oxidativa, aumentando seu tempo útil (CUTRIM et al., 2019). Dentre os produtos que podem ser obtidos a partir do processamento de plantas, estão os extratos e óleos essenciais.

Os óleos essenciais são misturas complexas de substâncias voláteis, geralmente lipofílicas, extraídas de plantas por método de destilação por arraste a vapor, nas quais um composto farmacologicamente ativo é majoritário. Esses compostos são biossintetizados como metabólitos secundários em diferentes partes das plantas aromáticas. Flores, folhas, cascas dos caules, madeira, raízes, frutos ou sementes, entre outras partes das plantas podem conter óleo essencial. Sendo assim, a composição química do óleo essencial poderá variar de acordo com as partes selecionadas para o processo de extração (ANASS; AMRANI; EDDINE, 2015; PANDEY et al., 2013).

Segundo a ANVISA (2007), os óleos essenciais são produtos voláteis de origem vegetal obtidos por processo físico (destilação por arraste com vapor de água, destilação a pressão reduzida ou outro método adequado). Os óleos essenciais podem se apresentar isoladamente ou misturados entre si, retificados (produtos que tenham sido submetidos a um processo de destilação fracionada para concentrar determinados componentes), desterpenados (aqueles dos quais tenha sido retirada a quase totalidade dos terpenos) ou concentrados (os que tenham sido parcialmente desterpenados).

Esses podem ser constituídos por até 60 compostos diferentes, em sua maioria terpenos, sesquiterpenos e compostos fenólicos (DRAWANZ et al., 2020). Entre os compostos de interesse, podem ser listados os fenóis, ésteres, hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos, cetonas, ácidos orgânicos, entre outros (SIMÕES; SPITZER, 1999). Em razão da presença ou ausência desses compostos, o aroma do óleo essencial pode variar de forma qualitativa ou quantitativa.

O uso de óleos essenciais pelas indústrias alimentícia e farmacêutica é crescente devido à ausência de contaminação microbiológica e à uniformidade de suas características sensoriais (aroma e sabor). Suas aplicações são diversas, podendo ser citado o uso em atividades agrícolas para combate de pragas e microrganismos patogênicos, na indústria farmacêutica para fabricação de medicamentos, na indústria de alimentos como substituto para aditivos alimentares (BHAVANIRAMYA et al., 2019; NOBREGA et al., 1997). Os principais óleos essenciais utilizados no mercado mundial são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Os principais óleos essenciais do mercado mundial

Óleo essencial	Espécie
Cânfora	<i>Cinnamomum camphora</i> (L.) J. Presl.
Cedro (China)	<i>Chamaecyparis funebris</i> (Endl.) Franco
Cedro (EUA)	<i>Juniperus virginiana</i> L. e <i>J. ashei</i> Buchholz
Citronela	<i>Cymbopogon winterianus</i> Jowitt e <i>C. nardus</i> (L.) Rendle
Coentro	<i>Coriandrum sativum</i> L.
Cravo-da-índia	<i>Syzygium aromaticum</i> (L.) Merr. e L. M. Perry
Eucalipto (tipo cineol)	<i>Eucalyptus globulus</i> Labill., <i>E. polybractea</i> R.T. Baker e <i>Eucalyptus</i> spp.
Eucalipto (tipo citronela)	<i>Eucalyptus citriodora</i> Hook.
Grapefruit	<i>Citrus paradisi</i> Macfady
Hortelã-pimenta	<i>Mentha piperita</i> L.
Laranja (Brasil)	<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck
Lavanda	<i>Lavandula intermedia</i> Emeric ex Loisel
Lima destilada (Brasil)	<i>Citrus aurantifolia</i> (Christm. & Panz.) Swingle

Tabela 1 – Os principais óleos essenciais do mercado mundial (*continuação*)

Óleo essencial	Espécie
Limão	<i>Citrus limon</i> (L.) N.L. Burm
Menta japonesa (Índia)	<i>Mentha arvensis</i> L. f. <i>piperascens</i> Malinv. ex Holmes
Patchouli	<i>Pogostemon cablin</i> (Blanco) Benth.
Sassafrás (China)	<i>Cinnamomum micranthum</i> (Hayata) Hayata
Spearmint (nativa)	<i>Mentha spicata</i> L.

Fonte: Adaptado de Bizzo, Hovell e Rezende (2009)

As frutas cítricas e as especiarias se destacam como matérias-primas para a obtenção de óleos essenciais e extratos (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009).

Os óleos essenciais de especiarias, em geral, são imiscíveis em água, porém miscíveis em solventes orgânicos, incolores ou de tonalidade amarelada, e possuem diferentes compostos com propriedades antioxidantes e antimicrobianas, sendo os fenólicos os que se destacam por estas características. Estes compostos são hidrofóbicos e atuam diretamente na membrana celular microbiana, desarranjando sua estrutura e impedindo a realização de sua função. Também atuam na célula bacteriana, causando atividade inibitória no citoplasma celular, promovendo lise e liberação de ATP intracelular (SCUDELER, 2019).

A aplicação de óleos essenciais como agentes antimicrobianos, prevenindo a ação de microrganismos deteriorantes de alimentos, e como agente antioxidante, preservando características sensoriais, os classifica como agentes de preservação do alimento. Este tipo de uso ganhou relevância para a indústria de alimentos, em razão da alta demanda do público consumidor por alimentos naturalmente preservados (CUTRIM et al., 2019).

Entre os óleos essenciais, o de cravo-da-índia se destaca por sua forte atividade antimicrobiana contra uma ampla gama de microrganismos patogênicos, o que aumenta seu valor comercial e justifica seu alto consumo em todo o mundo. Além disso, o preço e o alto teor de eugenol tornam esse óleo uma opção econômica de matéria-prima para produtos com maior valor agregado (AGUILAR-GONZÁLEZ; PALOU; LÓPEZ-MALO, 2015; CRAVEIRO; QUEIROZ, 1993; GHOSH; MUKHERJEE; CHANDRASEKARAN, 2012).

Os extratos de plantas também são muito utilizados como alternativa para o uso de determinados aditivos na produção de alimentos. Quando comparados aos compostos sintéticos, oferecem diversas vantagens, tais como sua baixa toxicidade, não representam risco para o ambiente, apresentam amplo modo de ação e são derivados de recursos renováveis. Estudos evidenciam que extratos vegetais podem apresentar potencial herbicida, fungicida e inseticida, com grande eficiência (KOBAYASHI; AMARAL, 2018).

O potencial no controle de fitopatógenos dos extratos vegetais também tem sido evidenciado, em razão tanto da ação fungicida direta, quanto da inibição de micélio e da germinação dos esporos, devido à presença de seus compostos secundários (OLIVEIRA et al., 2009).

Segundo a ANVISA (2007), extratos são produtos obtidos por esgotamento, a frio ou a quente, a partir de produtos de origem animal, vegetal ou microbiana com solventes permitidos. Devem conter os princípios sápidos aromáticos voláteis e fixos correspondentes ao respectivo produto natural. Podem apresentar-se como:

- a. Extratos líquidos: obtidos sem a eliminação do solvente ou eliminando-o de forma parcial; e
- b. Extratos secos: obtidos com a eliminação do solvente.

Os extratos vegetais mais comuns no mercado brasileiro são os da soja e do coco, entretanto, muitos outros tipos de matérias-primas podem ser utilizadas, como amêndoas, castanhas, aveia, semente da abóbora e cravo-da-índia (RIBEIRO; LIMA; OLIVEIRA, 2020).

2.3 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

Os processos de separação para recuperação e purificação de produtos são denominados como operações unitárias. Entre os processos mais comuns estão a destilação, absorção, filtração, centrifugação e extração (DORAN, 1995).

Os métodos para a obtenção dos óleos essenciais e extratos são diversos, e abrangem desde operações unitárias mais simples, como o processo de enfloração (o mais antigo para obtenção do óleo essencial), até os mais complexos como a

extração por dióxido de carbono supercrítico, amplamente utilizada nas indústrias farmacêutica e de alimentos (FREIRE et al., 2011).

As propriedades físico-químicas e a composição dos óleos essenciais são diretamente influenciadas pelo método de extração escolhido. Desta forma, a escolha do método adequado é necessária para que se produza óleos vegetais com alto valor nutricional, sem impactar negativamente seu rendimento e, conseqüentemente, seu valor comercial (SHUAI et al., 2021). Devido a sua volatilidade, os óleos essenciais podem ser obtidos, além dos métodos citados anteriormente, também por hidrodestilação, destilação por arraste a vapor, prensagem a frio e outros.

A prensagem é um método comum para extração de óleo. Suas principais vantagens são a simplicidade do processo e o baixo custo. Além disso, os óleos obtidos possuem cor brilhante e sabor puro (CICERO et al., 2018; SYMONIUK; RATUSZ; KRYGIER, 2017). Nesse método, dois tipos de prensa podem ser utilizados, a prensa hidráulica ou prensa de rosca (mecânica). A eficiência das prensas pode ser influenciada por fatores como pressão, temperatura de prensagem e teor de umidade da matéria-prima (MENDONÇA et al., 2019). O processo gera dois tipos de produto, o óleo bruto, que passa pelo processo de filtração para retirada de impurezas, e a torta, que geralmente retorna para a prensagem pois ainda é composta por óleo.

Devido ao alto rendimento e à volatilidade dos óleos, a extração por solvente é largamente utilizada na produção de óleo industrial e na extração de óleo em laboratório (SHUAI et al., 2021). Esse método consiste na utilização de um solvente orgânico em contato direto com a matriz vegetal. Após o tempo de transferência dos constituintes solúveis presentes na planta, a separação das fases sólida e líquida é realizada. Após a evaporação do solvente presente na fase líquida, obtém-se o óleo. Essa metodologia é indicada para óleos mais instáveis, que não suportam temperaturas elevadas. Os solventes orgânicos mais utilizados são o hexano, benzeno, metanol, etanol, propanol, acetona, pentano e solventes clorados, o que permite a extração não somente do óleo essencial, mas de todos os compostos lipofílicos, como ceras e pigmentos. O solvente pode ser recuperado, por meio de evaporação ou destilação, e reutilizado (DE PINHO; SOUZA, 2018). A maior desvantagem desse processo está relacionada à remoção do solvente, pois substâncias de interesse podem ser eliminadas junto ao solvente, ou pode haver contaminação por resíduos desse.

Dentre as alternativas mais promissoras para a indústria, pode-se citar a extração supercrítica, devido à ausência de resíduos de solvente no produto, atoxicidade, redução do consumo de energia e possibilidade do uso de solventes alternativos. Esse método permite a extração livre de traços de solvente ao final do processo e alto padrão de qualidade do produto obtido (CIVAN; KUMCUOGLU, 2019; LAURENT et al., 1999). Quando as condições de pressão e temperatura são superiores a maior pressão e temperatura em que existe equilíbrio líquido-vapor (ponto crítico), ou seja, a maior pressão na qual um líquido pode ser transformado em vapor caso haja aumento de temperatura, e a maior temperatura na qual um vapor pode ser transformado em líquido caso haja aumento de pressão, diz-se que a substância está em estado supercrítico. Compostos nessas condições apresentam propriedades de interesse para o processo de extração. A densidade se assemelha à dos líquidos, com alto poder de solvatação, e a difusividade se assemelha à dos gases, facilitando a transferência de massa (CABEZA et al., 2016).

Comumente se utiliza como solvente o dióxido de carbono (CO_2), por ser de fácil obtenção, inerte, não explosivo, atóxico, e ter baixa temperatura crítica. As principais desvantagens desse método são o alto custo para os equipamentos industriais, o que inviabiliza o investimento dependendo do produto desejado, e a incapacidade de extração de algumas substâncias polares, o que exige o uso de outro tipo de solvente e, conseqüentemente, a pressão e a temperatura de operação sofrem alterações.

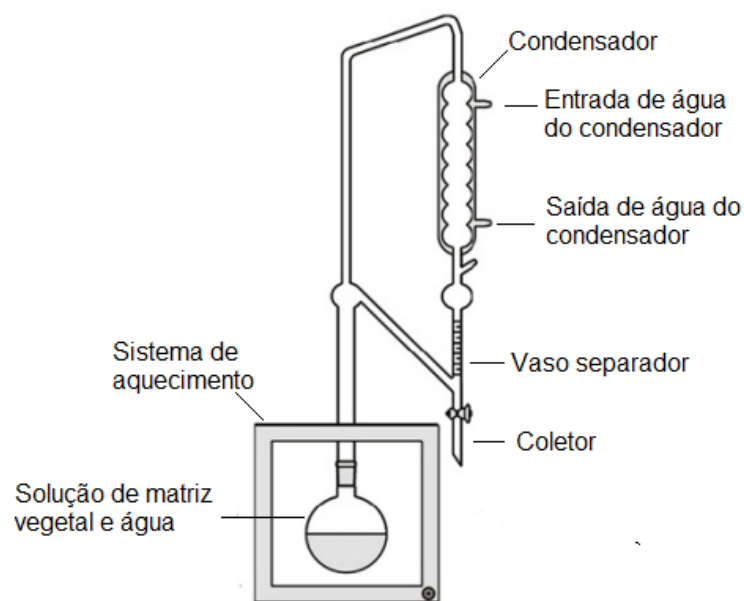
Em escala laboratorial, o óleo essencial de cravo-da-índia é comumente extraído por destilação simples em rotaevaporador. Porém, em escala industrial, a opção mais utilizada é a de destilação por arraste a vapor, ainda que existam outras alternativas, como a extração a frio (CAPAR et al., 2021).

A destilação por arraste a vapor é um processo tradicional na obtenção dos óleos essenciais, que se baseia na diferença da volatilidade dos componentes da planta no vapor d'água. Esse processo é muito usado pela indústria por ter menor custo se comparado com métodos tecnológicos mais complexos, como, por exemplo, a extração com fluido supercrítico. Em escala industrial, esse método é o mais utilizado para extração de óleos essenciais de folhas e ervas, no entanto, para a extração de óleo essencial de sementes, raízes, madeiras e algumas flores, não é indicado (CARVALHO et al., 2020).

Entre as vantagens desse método, pode-se destacar a capacidade de extração de matérias-primas em temperatura menor que a de fervura, o que diminui possíveis alterações indesejadas no produto, e a possibilidade de processamento de grandes volumes de matéria-prima. Na destilação por arraste a vapor, utiliza-se extrator específico, no qual se dispõe a matéria-prima de forma a favorecer o contato superficial com o vapor, sem que haja contato direto com a água. O vapor atravessa os tecidos da planta, volatilizando os óleos essenciais. Nesta fase, os vapores de água e os voláteis do produto são conduzidos ao condensador, onde ocorre troca de calor e condensação dos vapores. Após, pode-se observar as formas líquidas do óleo e da água no separador do extrator. O ciclo é repetido continuamente até que o tempo determinado seja atingido (ROSTAGNO; PRADO, 2015).

Em escala laboratorial, a hidrodestilação é o método mais utilizado, muito similar à extração de arraste a vapor, no entanto, nesse processo a matéria-prima vegetal entra em contato direto com a água durante o processo de extração, e não somente com o vapor. O processo pode ser realizado em equipamento Clevenger (Figura 4), o qual é acoplado a um balão volumétrico que contém uma mistura da matriz vegetal e água (ARAMRUEANG; ASAVASANTI; KHANUNTHONG, 2019).

Figura 4 – Equipamento Clevenger



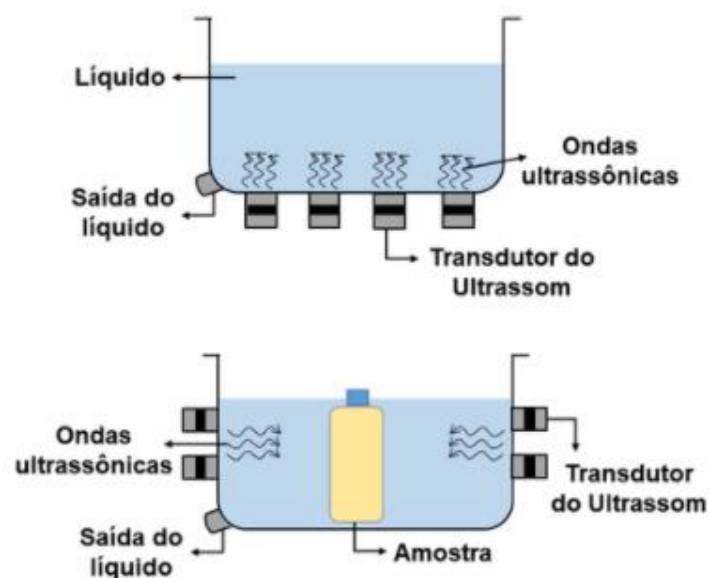
Fonte: Adaptado de Virost *et al.* (2008)

A mistura é aquecida até o ponto de fervura para que os componentes voláteis, como os óleos essenciais, sejam separados e conduzidos ao condensador, antes de serem destinados ao vaso separador, para que sejam coletados (ARAMRUEANG; ASAVASANTI; KHANUNTHONG, 2019).

A maceração é um processo muito utilizado para a preparação de chás e plantas medicinais, ou seja, plantas cujo princípio ativo se degrada facilmente em altas temperaturas. O método, que pode ser estático ou dinâmico, implica a mistura da matéria-prima vegetal e um líquido extrator, em recipiente fechado, durante um longo período de tempo (podendo levar dias). A escolha do líquido extrator deve ser feita com base no princípio ativo da planta, sendo comum o uso de água, álcool, óleo, entre outros. A extração por maceração pode exigir etapas de remaceração, ou seja, de renovação do líquido extrator (SILVA et al., 2017). As principais vantagens são a simplicidade do método, baixo custo de execução, preservação da matriz vegetal, uma vez que não há degradação de compostos por uso de altas temperaturas. A principal desvantagem é o longo tempo de extração.

Entre os métodos de extração que geram menor quantidade de resíduos de solventes orgânicos e permitem maior eficiência na recuperação de compostos bioativos de plantas, destaca-se a extração indireta assistida por ultrassom (Figura 5), na qual a amostra é submetida a um banho de ultrassom (SILVA et al., 2021).

Figura 5 – Equipamento Ultrassom



Fonte: Adaptado de Araújo (2020)

Esse método se baseia na propagação das ondas ultrassônicas e das forças de cavitação resultantes, nas quais as bolhas geradas colapsam intensamente promovendo o rompimento de células do tecido, devido a tensões locais de cisalhamento e formação de zonas de alta pressão e temperatura (KLUCZKOVSKI et al., 2021). Dessa forma, a liberação de substâncias intracelulares das plantas no solvente é favorecida.

Fatores como tempo e temperatura de extração, concentração da amostra e proporção de solvente podem influenciar a extração de metabólitos secundários através desse método (SILVA et al., 2021).

As principais vantagens da extração assistida por ultrassom são a simplicidade do método utilizado, o baixo custo, a quantidade reduzida de reagentes utilizados, a possibilidade de uso de diferentes solventes e um menor tempo necessário para realização do processo, se comparado a outros métodos.

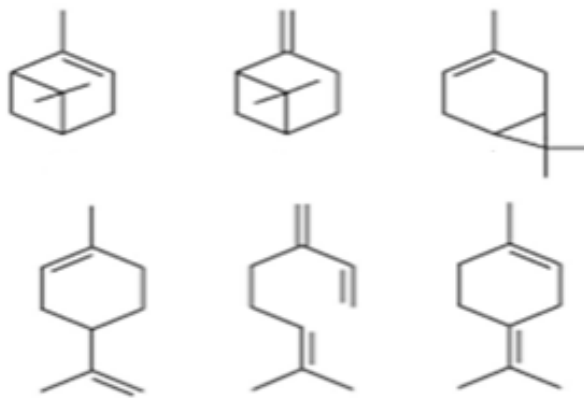
2.4 PERFIL QUÍMICO DE EXTRATOS DE CRAVO-DA-ÍNDIA

A natureza dos óleos essenciais e extratos vegetais é muito complexa, pois mais de 300 componentes, em concentrações distintas, formam sua composição. Os principais compostos estão presentes em concentrações que variam entre 20 e 70%, valores muito superiores se comparados aos demais compostos, que estão presentes em pequenas quantidades. Esses componentes principais são responsáveis pelas várias atividades biológicas dos óleos essenciais e extratos, e frequentemente são classificados como dois grupos de origens biossintéticas distintas, sendo terpenos (terpenóides) e componentes aromáticos (alifáticos). Os compostos de baixo peso molecular, como terpenos, estão presentes na maioria dos óleos essenciais e são responsáveis por, entre outras funções, a preservação de alimentos. Em temperatura ambiente, os óleos essenciais são encontrados, majoritariamente, em estado de vapor parcial. Seus compostos voláteis podem ser categorizados em várias classes químicas, como aldeídos, cetonas, álcoois, fenóis, entre outros (BHAVANIRAMYA et al., 2019).

Os terpenos representam a maior diversidade de compostos naturais encontrados nas plantas e são estrutural e funcionalmente diferentes, sendo alguns

precursores de vitaminas. Suas estruturas básicas são unidades de cinco carbonos, conhecidas como isoprenos, ou unidades isopênicas. Essas são classificadas de acordo com o número presente na estrutura. Assim, as estruturas químicas formadas através dessa junção de duas, três, quatro, cinco unidades isoprênicas são chamadas de monoterpenos (C_{10}) (Figura 6), sendo os principais, junto aos sesquiterpenos (C_{15}). Além desses, outros tipos podem ser citados, como os hemiterpenos (C_5), diterpenos (C_{20}), triterpenos (C_{30}) e tetraterpenos (C_{40}) terpenóide, que contém oxigênio (FEHLBERG, 2011).

Figura 6 – Exemplos de monoterpenos



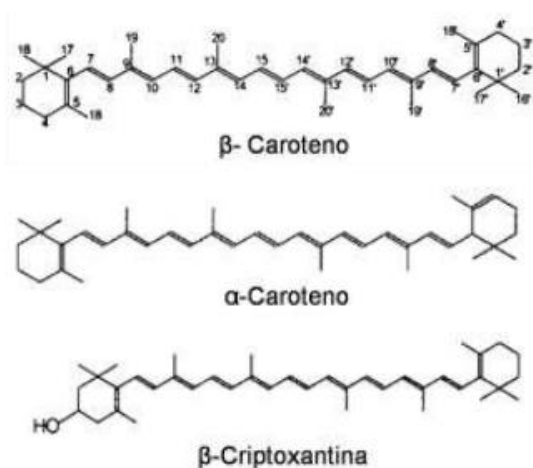
Fonte: Junior (2003)

Os monoterpenos e os sesquiterpenos são mais comumente encontrados nos óleos, e podem apresentar estruturas cíclicas e alifáticas, sendo os segundos compostos importantes característicos de aroma. Os diterpenos são apresentados em minoria (BHAVANIRAMYA et al., 2019; DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

Os terpenos como o β -caroteno, o α -caroteno e a β -criptoxantina (Figura 7) podem apresentar propriedades funcionais fisiológicas no organismo, uma vez que são pró-vitaminas A (PAZZOTI, 2019).

Também podem apresentar ação redutora, reagindo com radicais livres e substâncias genotóxicas e/ou carcinogênicas, o que indica potencial para redução do risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares e degeneração macular (PAZZOTI, 2019).

Figura 7 – Estruturas moleculares de β -caroteno, o α -caroteno e a β -criptoxantina



Fonte: Adaptado de Nascimento *et al.* (2021)

Segundo Oliveira e colaboradores (2009), a composição do óleo essencial e dos extratos pode sofrer alterações dependendo do vegetal utilizado, assim como a parte da planta utilizada, da região onde foi cultivado, tipo de solo, método de extração, solventes utilizados, entre outros fatores.

Oliveira e colaboradores (2009) identificaram e quantificaram a composição química do óleo essencial de cravo-da-índia extraído dos botões florais, talos e folhas. A porção de cada componente está descrita na Tabela 2.

Tabela 2 – Porcentagem dos componentes do óleo essencial de cravo-da-índia

Componentes	%				
	FF*	FSS*	FSE*	Pen*	BFS*
Eugenol	82,47	87,07	82,64	90,41	88,38
β -Cariofileno	10,78	8,29	10,45	3,61	0,64
α -Humuleno	1,44	1,08	1,63	0,60	-
Acetato de eugenila	1,89	-	-	3,76	10,98
Óxido de cariofileno	0,47	-	0,51	-	-
Fenilpropanóides	84,36	87,07	82,64	94,17	99,36
Sesquiterpenos não oxigenados	12,22	9,37	12,08	4,21	0,64
Sesquiterpenos	0,47	-	0,51	-	-

Tabela 2 – Porcentagem dos componentes do óleo essencial de cravo-da-índia (continuação)

Componentes	%				
	FF*	FSS*	FSE*	Pen*	BFS*
Total identificado (%)	97,-5	96,44	95,23	98,38	100,00

*FF: Folhas frescas; FSS: Folhas secas ao sol; FSE: Folhas secas em estufa; Pen: Pedúnculos; e BFS: Botões florais secos de *S. aromaticum*.

Fonte: Oliveira *et al.* (2009)

A composição dos óleos essenciais extraídos das folhas e dos botões de cravo-da-índia são similares, em relação aos principais compostos, o que destaca o potencial das folhas como matéria-prima para a extração, no entanto, há dificuldade na obtenção desse insumo em grandes volumes, o que representa um grande obstáculo para a produção em escala industrial. Dessa forma, se torna mais viável realizar a extração de óleo essencial dos botões de cravo-da-índia.

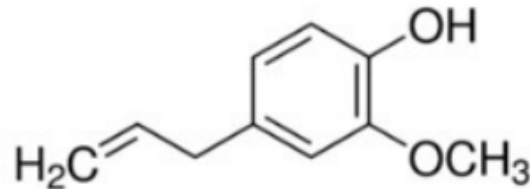
O óleo essencial dos botões de cravo-da-índia possui coloração amarelada, ou transparente, e sabor e odor marcantes e característicos. Em sua composição são encontrados eugenol, β -cariofileno, α -humuleno, acetato de eugenila e óxido de cariofileno. Destes, destaca-se o eugenol (4-alil-2-metoxifenol) por ser o componente majoritário é o principal elemento de aroma e pungência (AFFONSO *et al.*, 2012; DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2009).

O eugenol (Figura 8) é um fenilpropanóide, volátil, solúvel em álcool etílico, éter, clorofórmio e óleo, e de baixa solubilidade em água. Quando em estado líquido, possui coloração amarelada ou incolor, podendo escurecer quando há exposição à luz. Suas principais aplicações são como aromatizante, flavorizante, anti-inflamatório e anestésico (PAVITHRA, 2014). Esse composto é considerado não-mutagênico e não-cancerígeno, e é reconhecido como seguro pelo Food and Drug Administration (FDA).

Na indústria de alimentos, o eugenol é amplamente utilizado em produtos assados, doces e bebidas, com função aromatizante. Como bioaditivo, vem sendo gradualmente introduzido no controle de determinadas bactérias patogênicas de origem alimentar. Estudos evidenciam que o eugenol possui propriedades antifúngicas, anti-inflamatórias, moduladoras de respostas imunes, anticarcinogênicas e antibacterianas, principalmente sobre *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. typhimurium* e

S. aureus, sendo mais eficaz contra cepas Gram-positivas (SANTANA et al., 2021; SEBAALY; HAYDAR; GREIGE-GERGES, 2021). O mecanismo antibacteriano do eugenol ocorre através da indução da lise celular das bactérias, que danifica a parede celular e a membrana e causa vazamento proteico e lipídico (SANTANA et al., 2021).

Figura 8 – Estrutura molecular do eugenol

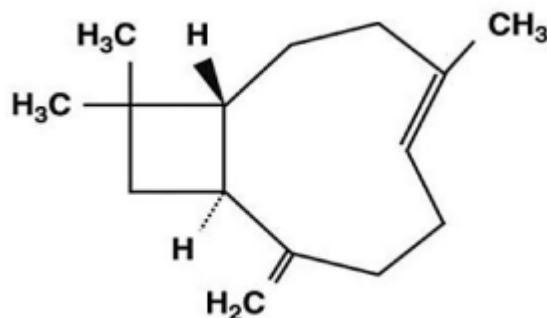


Fonte: Meher e Chakraborty (2018)

Outra característica importante é a atividade antioxidante, que evita a formação de radicais livres, promovendo sua remoção, antes que possam danificar as moléculas, resultando na prevenção de mutações (PAVITHRA, 2014).

O β -Cariofileno (Figura 9) é um sesquiterpeno natural, bi-cíclico, insolúvel em água, presente no cravo-da-índia, canela (*Cinnamomum spp.*), pimenta-do-reino (*Piper nigrum L.*) e orégano (*Origanum vulgare L.*), que apresenta atividades anti-inflamatória, antioxidante, quimiossensibilizante, anticarcinogênica e antibacteriana, o que confere a muitos óleos essenciais eficácia contra as cepas Gram-positivas e Gram-negativas (SANTOS et al., 2021).

Figura 9 – Estrutura molecular do β -cariofileno



Fonte: Adaptado de Santos, Braz-Filho e Castro (2015)

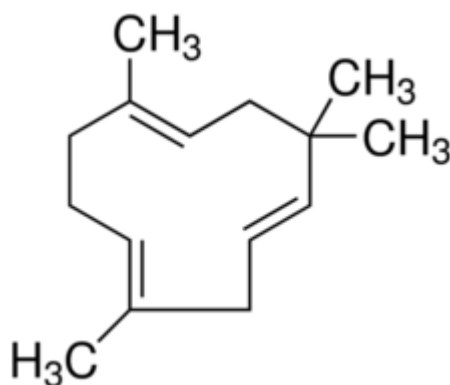
Sua estrutura apresenta um anel de ciclobutano, que pode sofrer oxidação quando exposto ao ar, devido ao hidrocarbono insaturado presente, e formar óxido de cariofileno (BARBOSA et al., 2012).

Esse composto se destaca pelo potencial de inibição das vias de sinalização que promovem a expressão de citocinas pró-inflamatórias, além de promover efeitos de proteção orgânica contra os efeitos nocivos induzidos por drogas e substâncias tóxicas para o fígado, rim, pâncreas, intestinos e cérebro, assim como efeitos anestésicos, anti-inflamatórios e ansiolíticos. O potencial de prevenção de colite e nefrotoxicidade, por meio da ativação de receptores canabinóides CB2, também é evidenciado (LIU; NIU; OU, 2021).

Devido ao seu aroma amadeirado, o β -Cariofileno tem sido muito utilizado na produção de alimentos e bebidas, a fim de conferir sabor cítrico. Em cervejas, seu uso objetiva adição de notas herbais, ou *spicy*. Já nas indústrias química e farmacêutica, seu uso é comum na fabricação de detergentes, sabões, perfumes, loções e cremes (FERREIRA, 2014).

O α -humuleno (Figura 10) é um sesquiterpeno monocíclico, isômero do β -cariofileno, cuja molécula é composta por três unidades de isopreno (C_{15}) e moléculas de hidrogênio (H_{24}) (LEITE et al., 2021), e apresenta atividade anti-inflamatória, com atuação sobre citocinas pró-inflamatórias (GOMES et al., 2019). O mecanismo de ação desse composto é o mesmo de anti-inflamatórios e analgésicos sintéticos, porém, sem a ocorrência de efeitos colaterais relacionados ao uso desses medicamentos.

Figura 10 – Estrutura molecular do α -humuleno



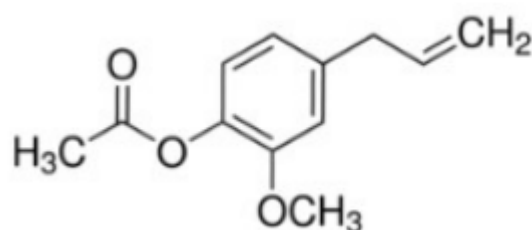
Fonte: Adaptado de Durello, Silva e Bogusz (2019)

Esse composto é biogeneticamente muito próximo ao cariofileno, com o qual ocorre simultaneamente, e é caracteristicamente apresentado como um líquido amarelado ou incolor, insolúvel em água, de aroma amadeirado e levemente apimentado, com ponto de fusão abaixo de 25 °C e ponto de ebulição localizado entre 106 a 127 °C, a 5 mmHg (LEITE et al., 2021). Sua principal função nas plantas, como metabólito secundário, é a ação inseticida.

O α -humuleno teve sua atividade antitumoral evidenciada e foi caracterizado como composto de interesse nessa área. Também foram evidenciadas as atividades antibacteriana, com maior eficácia sobre bactérias Gram-negativas, e antifúngica, ainda que de forma discreta. A estrutura química do α -humuleno atua como um precursor de estruturas mais complexas, e sua eficácia como agente cicatrizante e gastroprotetor também foi evidenciada, o que indica grande potencial farmacológico (HAMMOUD et al., 2018; LEITE et al., 2021). Além do cravo-da-índia, são fontes de α -humuleno o lúpulo, gengibre, erva-baleeira e sálvia.

O acetato de eugenila (Figura 11) é fenilpropanóide, um derivado acetilado obtido através da reação de acetilação do eugenol com anidrido acético via catálise enzimática ou química, classificado como éster aromático, está presente nos óleos essenciais de cravo-da-índia (1 a 10% da composição), louro (*Lourus nobilis*) e canela, e tem seu uso aprovado como um agente aromatizante (MUSTHAFA; VORAVUTHIKUNCHAI, 2016).

Figura 11 – Estrutura molecular do acetato de eugenila



Fonte: Adaptado de Cunha *et al.* (2012)

Diversas propriedades destacam o crescente interesse industrial nesse composto, pois apresenta atividades antioxidante, antimicrobiana e anticancerígena, além de inibir a descalcificação e promover a remineralização resultante de erosão dentária. A ação antifúngica contra várias espécies de *Candida sp* também foi verificada, destacando seu potencial fitoquímico (LAROQUE et al., 2014; MUSTHAFA;

VORAVUTHIKUNCHAI, 2016). Além disso, estudos evidenciam a ação larvicida potencial do acetato de eugenila contra as larvas do mosquito *Aedes aegypti* (PANDEY et al., 2013).

Segundo Tischer (2017), o acetato de eugenila apresenta atividade antimicrobiana em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, sendo a maior inibição encontrada para *L. monocytogenes*.

Na indústria de alimentos, o principal uso desse composto é como agente flavorizante, devido a sua insolubilidade em água. Segundo o comitê Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) e o European Food Safety Authority (EFSA) (2011), o acetato de eugenila foi avaliado e considerado seguro para o uso na fabricação de alimentos, sendo listado no banco de dados da União Europeia de Substância Aromatizante, como composto autorizado para utilização em alimentos (SANTOS et al., 2016).

2.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A estrutura biológica dos alimentos pode ocasionar a perda de qualidade e redução de seu tempo útil. Em todas as fases de processamento, os alimentos estão suscetíveis a possíveis fatores deteriorantes e riscos de contaminação (NESPOLO et al., 2015).

As alterações negativas em características sensoriais e nutricionais dos alimentos podem ser resultado da presença de microrganismos indesejados. A atividade microbiana causa deterioração do produto em casos de contaminação biológica. De acordo com a FAO (2020), aproximadamente um quarto (25%) dos alimentos produzidos anualmente para o consumo humano se perde, também em razão da contaminação microbiológica.

A presença de microrganismos no alimento não necessariamente implica a existência de metabólitos tóxicos e a ausência de características visíveis de contaminação microbiana não garante que o produto está livre destas substâncias, pois mesmo após a eliminação da microbiota, algumas toxinas podem persistir, em razão de sua termoresistência, o que permite que sobrevivam a tratamentos térmicos (CODEX, 1998).

O controle de contaminação microbiana com uso de aditivos pode não apresentar eficácia em casos de microrganismos resistentes a esses agentes. Sendo assim, se faz necessário o estudo e o desenvolvimento de novos produtos com atividade antimicrobiana (NAZZARO et al., 2017). O ideal é eliminar fontes de contaminação antes que haja proliferação de microrganismos, a fim de evitar a deterioração e a presença de metabólitos tóxicos no alimento.

Segundo Siqueira-Batista e Gomes (2010), antimicrobianos são compostos usados no tratamento de condições infecciosas, sendo classificados em antibióticos, metabólitos de microrganismos que inibem a proliferação de outros microrganismos, e quimioterápicos, substâncias sintéticas ou de origem vegetal com alta toxicidade contra patógenos.

Os óleos essenciais e extratos de plantas têm ação antimicrobiana comprovada (OSORIO et al., 2010; PRADO, 2013) e segundo Affonso e colaboradores (2012) e Menezes Filho e Castro (2020), estudos mostram que a velocidade de penetração dos óleos em tecidos microbianos é aproximadamente 100 vezes maior que a da água, o que em membranas confere aos seus compostos fenólicos alta atividade contra microrganismos.

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais ocorre em razão de suas características lipofílicas, o que permite atravessar a parede celular e a membrana citoplasmática das células bacterianas. Essa alteração na permeabilidade celular gera vazamento de componentes intracelulares e perda de elétrons e íons. As alterações na bioquímica celular podem causar uma reação em cadeia, comprometendo a viabilidade e multiplicação da célula (STEVANOVIC et al., 2018; TARIQ et al., 2019).

Os terpenóides e fenilpropanóides presentes nos óleos essenciais se acumulam na bicamada lipídica das bactérias e essa interação faz com que a membrana bacteriana se desintegre, veiculando a morte do microrganismo (FERRO; MOURA; GERON, 2016).

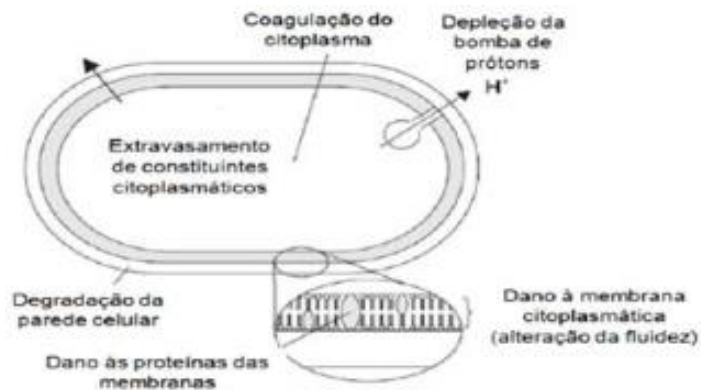
A utilização de extratos vegetais como agentes conservantes, devido a sua atividade antimicrobiana, também os torna bioaditivos de interesse para a fabricação de alimentos e tratamentos terapêuticos. O uso como inibidor de formação de biofilme pode ser destacado, em processos da indústria de alimentos. A eficácia desses compostos se deve ao fato de que bactérias são incapazes de desenvolver facilmente resistência aos diversos fitoquímicos presentes nos extratos vegetais (GUPTA; BIRDI, 2017).

Estudos evidenciam que bactérias, fungos, protozoários e vírus são sensíveis aos extratos vegetais da família *Mirtaceae*, à qual pertence o cravo-da-índia (MESQUITA; PINTO; MOREIRA, 2017).

O mecanismo de ação dos extratos vegetais sobre microrganismos ocorre através da interferência em eventos-chave de seu processo patogênico, e não necessariamente implicando a morte celular direta (GUPTA; BIRDI, 2017).

Além disso, segundo Burt (2004) a efetividade antibacteriana pode ser atribuída a mais de um mecanismo de ação, como demonstrado na Figura 12.

Figura 12 – Mecanismo de ação antimicrobiana dos óleos essenciais



Fonte: Adaptado de Burt (2004)

As bactérias Gram-negativas possuem uma membrana composta por lipopolissacarídeos, que confere uma superfície hidrofílica externa, a qual atua como barreira para a penetração de compostos hidrofóbicos (FERRO; MOURA; GERON, 2016). A membrana, abundante em proteínas porina que fornecem canais transmembranares hidrófilos, também atua como barreira para a penetração de macromoléculas e por esta razão, as bactérias Gram-negativas são relativamente resistentes aos antibióticos hidrofóbicos e drogas tóxicas. No entanto, pequenos solutos hidrofílicos são capazes de passar através dessa membrana (NIKAIDO & VAARA, 1985).

2.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os radicais livres são átomos, ou moléculas, extremamente reativos que têm elétrons desemparelhados na última camada eletrônica. São resultados principalmente de reações de oxidação-redução, ou seja, perdem um elétron, oxidando-se, ou recebem outro, reduzindo-se. Podem danificar células saudáveis e acarretar o desenvolvimento de várias doenças como câncer, doenças cardiovasculares, de Alzheimer, de Parkinson.

Os compostos utilizados para reduzir a atividade oxidativa dos alimentos, aumentando sua estabilidade, possuem três mecanismos básicos de controle, sendo o de radicais livres, de intermediários da oxidação e de pró-oxidantes (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). Rohenkohl, Carniel e Colpo (2011) descrevem esses mecanismos como: prevenção, na qual ocorre a inibição da produção de substâncias nocivas; interceptação, na qual a atividade dos radicais livres é interrompida; e reparo, que acontece quando os demais não foram eficazes. Os antioxidantes que interrompem a cadeia de reação por doação de elétrons ou hidrogênio para os radicais são chamados de primários, e os que retardam a etapa de iniciação de autooxidação, de secundários.

As substâncias antioxidantes podem ser classificadas como sintéticas e naturais, e são caracterizadas por conterem diversos grupos químicos e possuírem estruturas e propriedades diversificadas. As sintéticas podem apresentar potencial tóxico e, apesar de sua eficácia na prevenção da oxidação lipídica, são poucas recomendadas para uso alimentício, o que torna os antioxidantes naturais uma alternativa de grande interesse para minimizar e retardar os processos de deterioração oxidativa (SANTOS et al., 2018).

Entre os antioxidantes naturais, os mais ativos são os compostos fenólicos, tais como os flavonoides. Compostos fenólicos com atividade antioxidante tem grande importância em processos de inibição do risco de doenças cardiovasculares e do estresse oxidativo, que está relacionado a patologias crônico-degenerativas, como diabetes, câncer e processos inflamatórios (HELT; NAVAS; GONÇALVES, 2018; SANTOS et al., 2018).

Os compostos fenólicos fazem parte de uma ampla classe de compostos na natureza, podendo ser encontrados em vegetais, frutas e produtos industrializados.

Sua formação ocorre quando a planta é submetida a situações de estresse, como infecções, exposição à radiação UV, entre outros. Esses têm grande valor medicinal, pois apresentam diversas atividades, como efeitos antioxidantes, devido as suas propriedades redutoras, antienvhecimento, hipoglicemiantes e hipolipemiantes. Estudos recentes também sugerem que esses compostos são de interesse para a indústria de alimentos, farmacêutica ou cosmética devido à sua perspectiva de aplicação pela função biológica (ZHAO; SHI, 2021).

Esses compostos apresentam um grupo hidroxila ligado a um anel aromático, e são subdivididos em antocianinas, flavonas e flavonóis. Entre esses, podem-se destacar os flavonoides, que são responsáveis pela coloração da planta e proteção UV. Outros fenóis de interesse são os taninos e as ligninas (MESQUITA; PINTO; MOREIRA, 2017). Por apresentarem ressonância após atuarem sobre os radicais livres, os compostos fenólicos possuem certa estabilidade, que os permite reter o elétron desemparelhado sem causar danos às estruturas celulares.

Os métodos para avaliação da atividade antioxidante total (AAT) são diversos, porém, dependendo da natureza dos compostos da amostra, deve-se analisar a viabilidade de uso de cada método. Para a determinação de capacidade antioxidante *in vitro*, os métodos mais utilizados são o FRAP, ABTS, DPPH e ORAC. Outro método bastante difundido é o de branqueamento de β -caroteno, que determina o nível de inibição dos radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico (SUCUPIRA et al., 2012). Para análise de alimentos, os métodos mais comumente utilizados são Folin-Denis e Folin-Ciocalteu (SALUNKHE; CHAVAN; KADAM, 1989).

Na quantificação espectrométrica de Folin-Ciocalteu, método mais utilizado para determinação de compostos fenólicos totais em extratos de plantas e sucos, o reagente utilizado é uma mistura dos ácidos fosfomolibídico e fosfotungstístico, em que molibdênio e tungstênio encontram-se no estado de oxidação 6+. No entanto, quando agentes redutores, como os compostos fenólicos, estão presentes, formam-se molibdênio azul e tungstênio azul, nos quais a média do estado de oxidação está entre 5 e 6. Sua coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras, que podem, ou não, ter natureza fenólica (SOUSA et al., 2007), e a reação é monitorada pelo decréscimo do valor da absorvância. O método Folin-Denis utiliza menos reagentes, ocasionando um menor custo de análise e menor geração de resíduo.

Outro método muito utilizado para a determinação de atividade antioxidante de compostos é o método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), que é considerado um dos precisos e facilmente reprodutivos na avaliação da atividade antioxidante de sucos, extratos vegetais e substâncias puras. Nessa metodologia, a molécula de DPPH é caracterizada como um radical livre estável, em razão da deslocalização do elétron desemparelhado, que confere ao DPPH a coloração violeta, caracterizada por uma banda de absorção em etanol em cerca de 520 nm. O ensaio se baseia na medida da capacidade antioxidante da amostra analisada em sequestrar o radical DPPH, reduzindo-o a hidrazina. Caso a amostra atue como agente doador de átomos de hidrogênio, quando adicionada à solução de DPPH, a hidrazina é obtida com mudança simultânea na coloração de violeta a amarelo claro (COTINGUIBA et al., 2013).

A porcentagem de atividade antioxidante (% AA) corresponde à quantidade de DPPH consumida pela amostra. A quantidade de amostra necessária para reduzir a concentração inicial de DPPH em 50% é denominada concentração eficiente (EC_{50}) e essa é inversamente proporcional ao DPPH, ou seja, quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a sua EC_{50} e maior a sua atividade antioxidante (SOUSA et al., 2007).

3 METODOLOGIA

3.1 MATÉRIA-PRIMA

Para a realização do estudo, foram utilizados botões secos de cravo-da-índia de um único lote de botões de cravo-da-índia *in natura*, obtidos no comércio local de Guarapuava/PR.

Uma análise de umidade (a 105 °C) foi realizada e foi utilizada a Equação 1 (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985) para determinação do percentual de umidade da amostra.

Equação 1 – Percentual de umidade

$$\%U = \frac{m_p \times 100}{m_c}$$

Em que m_c é a massa de cravo-da-índia e m_p é a massa perdida durante o aquecimento.

Os rendimentos dos processos de extração assistida por ultrassom e por maceração foram avaliados utilizando a Equação 2 (CHAVES; COSTA, 2012).

Equação 2 – Percentual de extrato obtido

$$\% Extrato = \left(\frac{m_{ext}}{m_t} \right) \times 100$$

Em que m_{ext} corresponde à massa do extrato e m_t , à massa de cravo-da-índia total utilizada.

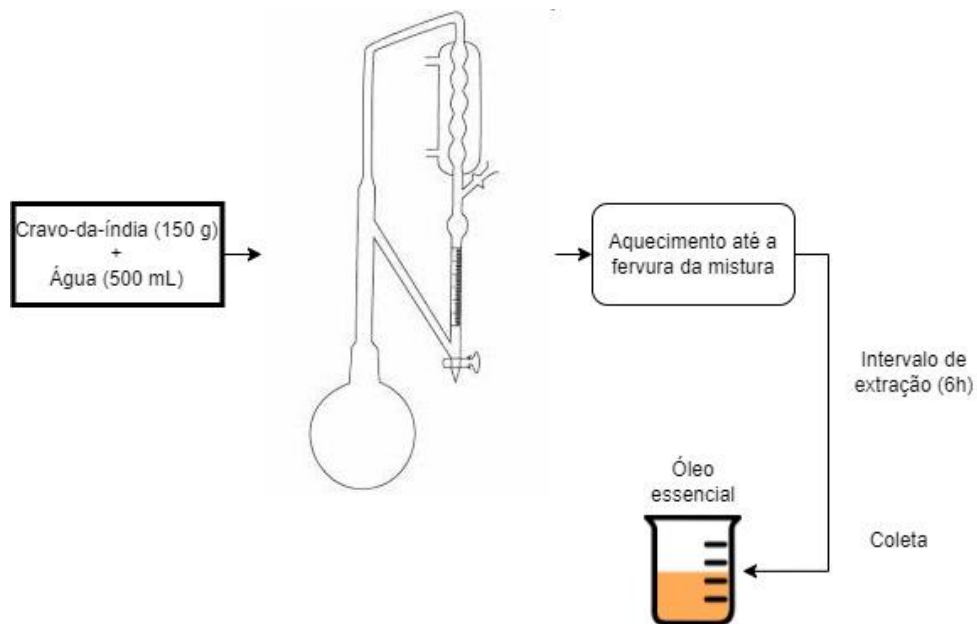
O rendimento do processo de extração do óleo essencial foi calculado, utilizando a razão entre volume (mL) de óleo extraído e massa (g) de matéria-prima utilizada. O rendimento foi calculado em função do volume de óleo, em mL, dividido pela massa, em g de material utilizado.

3.2 OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL E EXTRATOS

O óleo essencial de cravo-da-índia foi obtido por método de hidrodestilação, em aparelho Clevenger. O processo de extração (Figura 13) foi realizado utilizando 150 g de cravo-da-índia *in natura* (previamente moído) e 500 mL de água destilada, em balão de fundo redondo de 1 L.

A mistura foi aquecida a 100 °C por 6h (a contar do momento de ebulição), em triplicata. A proporção amostra:solvente e o tempo de extração foi determinado por estudos preliminares do grupo de pesquisa.

Figura 13 – Fluxograma de hidrodestilação de óleo essencial de cravo-da-índia

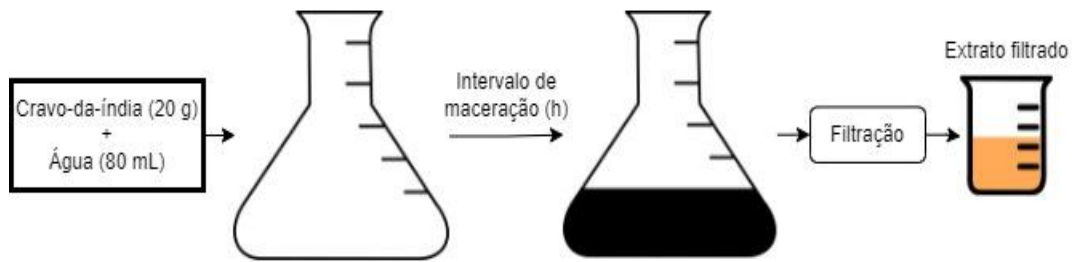


Fonte: O autor

Os extratos foram obtidos por três métodos, sendo maceração, extração assistida por ultrassom a 25 °C e extração assistida por ultrassom a 40 °C.

Para o processo de maceração (Figura 14) foram utilizados 20 g de cravo-da-índia (previamente moído) e 80 mL de água destilada, em balão de Erlenmeyer de 500 mL, em ambiente com temperatura controlada de 25 °C.

Figura 14 – Fluxograma de extração por maceração

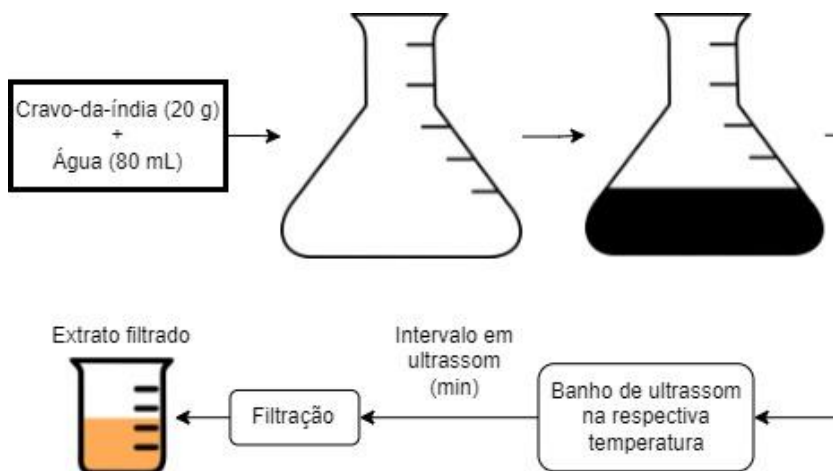


Fonte: O autor

As amostras foram armazenadas ao abrigo de luz até o momento de sua filtração. Os tempos de extração foram 0, 6, 12, 24, 48 e 72h. Após a filtração, os extratos foram armazenados sob refrigeração a 4 °C.

Para o processo de extração assistida por ultrassom (Kondortech CD-4820) (Figura 15) em ambiente com temperatura controlada de 25 °C, foram utilizados 20 g de cravo-da-índia (previamente moído) e 80 mL de água destilada, em balão de Erlenmeyer de 500 mL.

Figura 15 – Fluxograma de extração assistida por ultrassom



Fonte: O autor

As amostras foram dispostas em aparelho de ultrassom, a 25 °C, até o momento de sua filtragem. Os tempos de exposição ao ultrassom foram 0, 5, 10, 15, 20 e 30min. Após, os extratos foram armazenados sob refrigeração, a 4 °C.

O mesmo processo foi realizado para a extração assistida por ultrassom a 40 °C, seguindo-se os mesmos intervalos de tempo citados anteriormente.

3.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Amostras do óleo essencial e dos extratos obtidos por maceração (nos tempos de 0, 6, 24 e 72h), ultrassom em 25 e em 40 °C (nos tempos de 0, 5, 15 e 30 min) foram utilizadas para a determinação de atividade antimicrobiana.

Cepas de *E. coli* (ATCC 35218), *L. monocytogenes* (ATCC 7644), *S. enteritidis* (ATCC 13076) e *S. aureus* (ATCC 25923), microrganismos de importância em alimentos, disponíveis no Banco de Cepas do Laboratório de Microbiologia da UNICENTRO foram cultivadas em tubos com 10 ml de Caldo Trypticase de Soja (TSB) por 24h a 37 °C.

Suspensões desses microrganismos foram preparadas e ajustadas comparando-se com tubo padrão de turbidimetria 0,5 da escala Mc Farland e semeadas com o auxílio de swab estéril em placas de Petri contendo 15 mL de Ágar Trypticase de Soja (TSA). Depois da absorção completa do inóculo pelo meio de cultura, foram feitos poços (orifícios) de 7 mm aos quais foram adicionados 20 µL do extrato filtrado.

O controle negativo foi feito utilizando 20 µL água destilada estéril e o controle positivo com disco de gentamicina. As placas foram mantidas a 4 °C por 3h para permitir a difusão dos extratos de cravo-da-índia no meio de cultura antes do crescimento dos microrganismos inoculados, após, as placas foram incubadas por 24h a 37 °C.

A atividade antimicrobiana foi verificada pela formação ou não de halos (mm) de inibição ao redor dos orifícios. Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados representados pela média aritmética dos halos de inibição (OSTROSKY et al., 2008).

3.4 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS

Os compostos do óleo essencial de cravo-da-índia foram identificados em cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massa (Shimadzu, modelo GCMS-QP2010 Ultra), equipado com coluna capilar de sílica fundida DB 5 ms (5% difenil,

95% dimetipolisiloxano) de 30 m, com diâmetro interno de 0,25 mm e espessura de filme de 0,25 μm . Foi usado hélio como gás de arraste, numa velocidade linear de 43 cm/s, e o óleo foi diluído em n-hexano.

As condições de operação foram: injetor no modo Split (1:5) com temperatura de 210 °C; interface em 210 °C; temperatura programada da coluna: temperatura inicial 50 °C mantida por 1 min, aquecimento numa taxa de 5 °C/min até 130 °C, aquecimento numa taxa de 10 °C/min até 210 °C mantida por 5 min. O espectrômetro de massa foi ajustado para varredura de 35 a 600 m/z. Foram injetados em triplicata 2 μL da solução do óleo essencial diluída em n-hexano. Os compostos foram identificados através da comparação do espectro de massa usando as bibliotecas NIST11 e NIST11s.

Amostras dos extratos obtidos por maceração (nos tempos de 0, 6, 24 e 72h), ultrassom em 25 e em 40 °C (ambos nos tempos de 0, 5, 15 e 30 min) foram utilizadas para a caracterização do perfil físico-químico, por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

Para as diluições foram utilizados 300 μL de extrato em 1 mL de água destilada. Essas foram filtradas em filtro seringa de PTFE com porosidade de 0,22 μm . A análise foi conduzida em cromatógrafo de fase líquida acoplado a um detector por arranjo de diodos UFLC (Shimadzu).

O volume de 20 μL foi injetado, mantendo a coluna NST C18 (250x4,6 mm, 5 μm) em 40 °C, fase móvel (fase A: 99,9% água, 0,1% de ácido metanoico; fase B: 99,9% metanol, 0,1% ácido metanoico), com vazão de 1,2 mL/min, com tempo médio de corrida de 30 min.

Para a identificação foi lida a curva de calibração com soluções padrão de fenóis ((+) catequina, (-) epicatequina, ácido cafeico, ácido vanílico, ácido p-cumárico, ácido trans iso-ferrúlico, (-) resveratrol, miricetina, ácido gálico e quercitina). A quantificação dos componentes foi feita pela normalização simples de áreas.

As análises foram realizadas na Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS) – *Campus* Laranjeiras do Sul, em triplicata.

3.5 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO FENÓLICO TOTAL

O conteúdo fenólico total foi determinado segundo metodologia descrita por Singleton e Rossi Jr (1956). Para os extratos obtidos por hidrodestilação, maceração e extração assistida por ultrassom, foi preparada uma solução aquosa, com concentração de 6 mg/mL, do extrato seco de cravo-da-índia. Para o óleo foi preparada uma solução etanólica, de mesma concentração.

Em balões volumétricos de 10 mL, foram adicionados 100 µL de cada uma das soluções aquosas dos extratos, 2 mL de água destilada, 0,5 mL do reativo de Folin-Ciocalteu e 1,5 mL de solução aquosa de carbonato de sódio a 20 % (m/v). Os balões foram completados com água destilada até a marca de 10 mL, agitados e armazenados ao abrigo da luz, a 25 °C, por 2 horas. A absorbância de cada uma das amostras foi medida a 765 nm em espectrofotômetro (Bel Photonics, 2000 UV) e para o branco, utilizou-se água destilada.

Para a análise dos resultados foi desenvolvida uma curva padrão com ácido gálico em solução, para a qual foram utilizados 100 µL de cada solução das diluições cujas concentrações foram de 0, 20, 30, 40, 50, 70, 90, 100, 200, 400, 600, 800 e 1000 µg/mL. A concentração de fenólicos totais foi calculada e expressa em mg equivalente de ácido gálico (GAE) por g de cravo-da-índia, como média ± desvio padrão.

3.6 MÉTODO DPPH

Amostras do óleo essencial e dos extratos obtidos por maceração (nos tempos de 0, 6, 24 e 72h), ultrassom em 25 e em 40 °C (nos tempos de 0, 5, 15 e 30 min) foram utilizadas para a determinação da atividade antioxidante, pelo método DPPH, em triplicata de acordo com o descrito por Mensor e colaboradores (2001).

Uma solução de DPPH 0,1 mM em metanol P.A. foi preparada diariamente, homogeneizada por 5 min em ambiente com temperatura controlada de 25 °C e armazenada ao abrigo de luz. Soluções estoque do óleo e dos extratos foram preparadas em etanol e em água, respectivamente, na concentração de

100 µL/mL e, após, foram homogeneizadas por 5 min, também em ambiente com temperatura controlada de 25 °C.

Em ambiente livre de incidência de luz, foi transferida uma alíquota de 400 µL das diluições do óleo e dos extratos para tubos de ensaio com 2,6 mL do radical DPPH 0,3 mM. Os tubos foram mantidos em repouso durante 30 min para que a reação ocorresse, também ao abrigo de luz.

A absorbância de cada uma das soluções foi medida a 517 nm em espectrofotômetro (Bel Photonics SP 2000 UV). Foi preparado branco para a diluição do óleo, composto por 400 µL de metanol e 2,6 mL do radical DPPH 0,3 mM. Para as diluições dos extratos foi preparado um branco composto por 400 µL de água destilada e 2,6 mL do radical DPPH 0,3 mM. O percentual de inibição das amostras avaliadas sobre o radical DPPH foi calculado convertendo em porcentagem de atividade antioxidante (AA%) conforme a Equação 3.

Equação 3 – Percentual de inibição das amostras testadas sobre o radical DPPH

$$AA(\%) = \left[1 - \left(\frac{abs_{amostra}}{abs_{branco}} \right) \right] \times 100$$

Em que $abs_{amostra}$ é a absorbância da amostra para uma dada diluição e abs_{branco} é a absorbância do branco da respectiva amostra.

Para a construção da curva analítica foi preparada uma solução de ácido ascórbico com concentração de 200 mg/L e, a partir dessa, foram obtidas as concentrações apresentadas na Tabela 3. Os resultados foram expressos em mg de ácido ascórbico equivalente/L.

Tabela 3 – Dados de inibição do radical DPPH para construção da curva padrão de ácido ascórbico para determinação da atividade de extratos

Concentração AAE (mg/L)	Solução-mãe (mL)	Metanol (mL)
5	0,10	1,90
20	0,40	1,60
35	0,70	1,30
50	1,00	1,00
65	1,30	0,70
80	1,60	0,40

Tabela 3 – Dados de inibição do radical DPPH para construção da curva padrão de ácido ascórbico para determinação da atividade de extratos (continuação)

Concentração AAE (mg/L)	Solução-mãe (mL)	Metanol (mL)
90	1,80	0,20
100	2,00	0,00

Fonte: O autor

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados estatisticamente usando o software BioEstat 5.3® (AYRES et al., 2007), com nível de confiança de 95%.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PERFIL QUÍMICO

Os compostos identificados na análise cromatográfica do óleo essencial são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Compostos químicos presentes em óleo essencial de cravo-da-índia obtido por hidrodestilação

	Composto	Tempo de retenção (min)	Área percentual relativa
1	Acetato de 2-Heptanol	9,80	0,27 (\pm 0,01)
2	beta-cis-Ocimeno	10,01	0,09 (\pm 0,00)
3	2-Nonanona	11,23	0,12 (\pm 0,00)
4	Metil salicilato	14,20	0,28 (\pm 0,03)
5	Eugenol	18,74	86,16 (\pm 0,18)
6	Cariofileno	19,97	7,14 (\pm 0,05)
7	alpha-Humuleno	20,57	0,92 (\pm 0,01)
8	Acetato de Eugenila	21,59	4,84 (\pm 0,10)
9	Óxido de Cariofileno	22,60	0,18 (\pm 0,01)

Os compostos identificados na análise cromatográfica são comumente encontrados em óleos essenciais e estão dentro dos parâmetros da literatura. Amelia e colaboradores (2017) identificaram 44 compostos, entre os quais estavam presentes todos os compostos identificados neste estudo. A quantidade e a composição dos óleos essenciais podem sofrer interferência de inúmeros fatores, como solo, época e método de colheita, estresse hídrico, entre outros. Isso pode explicar a diferença de compostos encontrados no óleo extraído para este estudo.

O eugenol, com área percentual relativa de 86,16%, foi o composto presente mais abundante, seguido de cariofileno (7,14%) e acetato de eugenila (4,84%), todos compostos característicos do óleo essencial de cravo-da-índia (OLIVEIRA et al., 2009). O eugenol antibacterianas, principalmente sobre *E. coli*, *L. monocytogenes* e *S. aureus* (SANTANA et al., 2021; SEBAALY; HAYDAR; GREIGE-GERGES, 2021), o

que foi verificado nas análises de atividade antibacteriana. A atividade antioxidante desse composto também é comprovada, o que endossa o potencial da atividade biológica do óleo de cravo-da-índia (PAVITHRA, 2014).

Os compostos identificados nas análises cromatográficas dos extratos obtidos por maceração e ultrassom são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Compostos químicos presentes em extratos de cravo-da-índia obtidos por maceração e extração assistida por ultrassom

	Composto	Tempo de retenção (min)	[M-H]⁺ m/z	[M-H]⁻ m/z	Classe
1	Ácido gálico	4.11	-	169	Ácido fenólico
2	Isobiflorina	8.9	-	353	Isoflavona
3	Biflorin	10.02	-	353	Flavona
4	Calicosina-glicosídeo	22.0	447	-	Flavona
	Pratensei/ Irilina B/				
5	Metilrobol-glicosídeo	23.63	463	-	Isoflavona
6	Biocanina A-7-O-glicosídeo	25.27	445	-	Isoflavona

Os resultados mostram a presença das classes ácido gálico, flavonas e seus isômeros, dentro dos parâmetros citados pela literatura (FATHONI et al., 2017; SAVIRANTA et al., 2010).

Os compostos ácido gálico, teobromina e miricetina foram identificados na análise cromatográfica realizada. A quantificação de compostos, descrita na Tabela 6, evidencia a diminuição da concentração de ácido gálico com o aumento do tempo de extração, em todos os métodos de extração. As maiores concentrações desse composto foram encontradas nas amostras $U_{(40\text{ }^{\circ}\text{C})5'}$, $U_{(40\text{ }^{\circ}\text{C})15'}$ e $U_{(40\text{ }^{\circ}\text{C})30'}$, sendo que a maior concentração encontrada foi de 798,58 $\mu\text{g/mL}$, em $U_{(40\text{ }^{\circ}\text{C})30'}$.

Tabela 6 – Concentrações de compostos químicos presentes em extratos de cravo-da-índia obtidos por maceração e extração assistida por ultrassom

Amostra	Concentração média ($\mu\text{g/mL}$)		
	Ácido gálico	Teobromina	Miricetina
M _{6h}	651,80 ^d (\pm 6,31)	0,003 ^a (\pm 0,000)	0,031 ^d (\pm 0,001)
M _{24h}	593,13 ^e (\pm 5,91)	0,004 ^a (\pm 0,001)	0,037 ^{abc} (\pm 0,001)
M _{72h}	413,53 ^f (\pm 8,83)	0,004 ^a (\pm 0,000)	0,031 ^d (\pm 0,001)
U _{(25 °C)5'}	754,65 ^b (\pm 9,55)	0,006 ^a (\pm 0,001)	0,033 ^{bcd} (\pm 0,002)
U _{(25 °C)15'}	752,64 ^b (\pm 3,37)	0,004 ^a (\pm 0,001)	0,039 ^{ab} (\pm 0,001)
U _{(25 °C)30'}	654,26 ^d (\pm 3,48)	0,005 ^a (\pm 0,000)	0,032 ^{cd} (\pm 0,003)
U _{(40 °C)5'}	798,58 ^a (\pm 4,48)	0,004 ^a (\pm 0,000)	0,040 ^a (\pm 0,001)
U _{(40 °C)15'}	755,55 ^b (\pm 1,10)	0,005 ^a (\pm 0,000)	0,036 ^{abcd} (\pm 0,002)
U _{(40 °C)30'}	712,71 ^c (\pm 2,42)	0,004 ^a (\pm 0,000)	0,033 ^{bcd} (\pm 0,001)

M: maceração; xh: tempo de extração em horas; Ex.: M_{0h}: maceração em 0h

U: Ultrassom; (x °C): temperatura de extração; x': tempo de extração em minutos;

Ex.: U_{(25 °C)0'}: ultrassom a 25 °C em 0h

Valores com a mesma letra, ao longo da mesma coluna, não são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Dentre os compostos que apresentam atividade antioxidante, os polifenóis atuam sequestrando radicais livres ou como agentes quelantes de metais, sendo o ácido gálico (ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico) um exemplo desses compostos. Relatórios científicos das indústrias farmacêutica e de alimentos evidenciam que o ácido gálico apresenta capacidade antioxidante, antiviral, antibacteriana e antifúngica (NOBRE et al., 2019).

Para o composto teobromina não foi verificada diferença significativa entre as amostras analisadas, em nenhum dos métodos analisados, e os valores encontrados foram relativamente baixos, se comparados aos demais compostos.

A teobromina é um composto da classe dos alcaloides, que são basicamente sólidos brancos em seu estado livre, como óxidos ou como sais, e são de caráter terapêutico, usado em tratamentos naturais para analgésicos, anestésicos, entre outros (PERES; BRANDÃO; REZENDE, 2018).

A miricetina, encontrada em pequenas quantidades em todas as amostras, (3,5,7,3',4',5'-hexa-hidroxi-flavona) é um composto fenólico que apresenta atividade

antioxidante, ou pró-oxidante, efeito fitoestrogênico, anticarcinogênico, entre outros (FU et al., 2021).

4.2 ÓLEO ESSENCIAL E EXTRATOS

O teor de umidade encontrado para a amostra foi de 14,81% ($\pm 0,47$) (bu). Caixeta e colaboradores (2010) encontraram teor de umidade igual a 4%, valor significativamente mais baixo. Apesar do alto teor de umidade, a matéria-prima utilizada atende ao Padrão de Identidade de Qualidade estabelecido pelo DIPOV (2019), que estabelece o valor de 16% com umidade máxima permitida para qualquer tipo de cravo.

A extração do óleo essencial permitiu observar que esse apresentou densidade maior que a água, o que causou a precipitação da fração oleosa na porção inferior do coletor. Isso ocorre em razão da alta concentração de eugenol, que possui densidade de 1,064 g/cm³, a 25 °C, maior que a da água, na mesma temperatura, (0,997 g/cm³) (SILVA; OLIVEIRA; SOUZA, 2011).

O rendimento em percentual encontrado para as extrações assistidas por ultrassom em 25 e em 40 °C, e por maceração são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 – Percentual de rendimento de extratos de cravo-da-índia obtidos por maceração e extração assistida por ultrassom a 25 e a 40 °C

Amostra	Rendimento (%)
Óleo essencial	1,05
M _{0h}	1,45
M _{6h}	6,64
M _{12h}	6,88
M _{24h}	7,26
M _{48h}	7,30
M _{72h}	7,32
U _{(25 °C)0'}	1,45
U _{(25 °C)5'}	3,28
U _{(25 °C)10'}	4,19

Tabela 7 – Percentual de rendimento de extratos de cravo-da-índia obtidos por maceração e extração assistida por ultrassom a 25 e a 40 °C (continuação)

Amostra	Rendimento (%)
U _{(25 °C)15'}	5,97
U _{(25 °C)20'}	7,33
U _{(25 °C)30'}	7,50
U _{(40 °C)0'}	1,45
U _{(40 °C)5'}	3,35
U _{(40 °C)10'}	4,10
U _{(40 °C)15'}	6,01
U _{(40 °C)20'}	7,26
U _{(40 °C)30'}	7,74

M: maceração; xh: tempo de extração em horas; Ex.: M_{0h}: maceração em 0h

U: Ultrassom; (x °C): temperatura de extração; x': tempo de extração em minutos; Ex.: U_{(25 °C)0'}: ultrassom a 25 °C em 0h

O rendimento médio encontrado para esse processo foi de 1,05%. Esse valor pode oscilar em razão de inúmeros fatores que podem exercer influência sobre a eficiência da extração, como o método utilizado, tempo de extração, tipo de matéria-prima e erros experimentais. Caixeta e colaboradores (2010) verificaram rendimento de 3,11%, valor acima do encontrado neste estudo. Já Silvestri e colaboradores (2010) verificaram um rendimento de 1,87%, valor próximo ao encontrado neste estudo.

Segundo Petropoulos e colaboradores (2008), o estresse hídrico em plantas pode impactar seu metabolismo e causar alteração em seus processos fisiológicos, como redução de fotossíntese e transpiração, o que interfere diretamente na produção e composição dos óleos essenciais, o que pode relacionar o alto teor de umidade e o baixo rendimento observado neste estudo.

Os extratos obtidos com uso de ultrassom e por maceração apresentaram aumento do rendimento com o aumento do tempo de extração. Para a maceração, os valores variaram entre 1,45 e 7,32%, nos tempos de 0 e 72h de extração, respectivamente. Para a extração assistida por ultrassom a 25 °C a variação foi de 1,45 a 7,50%, nos tempos de 0 e 30 minutos, respectivamente. No mesmo intervalo de tempo, para ultrassom a 40°C a variação encontrada foi de 1,45 a 7,74%.

Pode-se observar que os valores obtidos são muito superiores ao do óleo essencial, o que demonstra uma vantagem da escolha desse método, pois além de

não expor a amostra a altas temperaturas, evitando degradação de compostos de interesse, requer menor tempo de processamento e tem maior rendimento de produto final.

4.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

O potencial antimicrobiano dos extratos foi avaliado pela formação, ou ausência, de halos (mm) de inibição ao redor dos orifícios, nas placas de Petri. Os resultados das análises antimicrobianas realizadas com concentração de extratos igual a 100 µL/mL estão expressos na Tabela 8.

Tabela 8 – Atividade biológica de extratos de cravo-da-índia (em concentração de 100 µL/mL)

Amostra (100 µL/mL)	Microrganismo			
	<i>S. enteritidis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>L. monocytogenes</i>
Halo de inibição (mm)				
Óleo	2,40 ^{ab} (± 0,14)	1,85 ^{cd} (± 0,07)	2,10 ^{ab} (± 0,14)	1,75 ^b (± 0,07)
M _{24h}	0,25 ^d (± 0,00)	-	0,25 ^c (± 0,00)	-
M _{72h}	1,20 ^c (± 0,14)	1,00 ^e (± 0,14)	1,50 ^b (± 0,14)	1,10 ^c (± 0,00)
U _{(25 °C)15'}	1,95 ^{bc} (± 0,21)	1,52 ^d (± 0,03)	1,78 ^b (± 0,18)	-
U _{(25 °C)30'}	2,40 ^{ab} (± 0,14)	2,05 ^{bc} (± 0,07)	1,80 ^b (± 0,14)	1,25 ^c (± 0,07)
U _{(40 °C)15'}	2,50 ^{ab} (± 0,14)	2,28 ^{ab} (± 0,04)	2,60 ^a (± 0,07)	1,88 ^{ab} (± 0,04)
U _{(40 °C)30'}	2,92 ^a (± 0,11)	2,55 ^a (± 0,21)	2,67 ^a (± 0,03)	2,15 ^a (± 0,21)

M: maceração; xh: tempo de extração em horas; Ex.: M_{0h}: maceração em 0h

U: Ultrassom; (x °C): temperatura de extração; x': tempo de extração em minutos;

Ex.: U_{(25 °C)0'}: ultrassom a 25 °C em 0h

Valores com a mesma letra, ao longo da mesma coluna, não são significativamente diferentes (p<0,05)

Os extratos obtidos por maceração nos tempos 0 e 6h, assim como os obtidos por extração assistida por ultrassom a 25 °C e a 40 °C, nos mesmos tempos, não apresentaram halos de inibição de crescimento bacteriano, indicando que não houve atividade antimicrobiana detectável.

As amostras de óleo, $U_{(25\text{ }^{\circ}\text{C})15'}$, $U_{(25\text{ }^{\circ}\text{C})30'}$, $U_{(40\text{ }^{\circ}\text{C})15'}$ e $U_{(40\text{ }^{\circ}\text{C})30'}$ apresentaram os maiores halos de inibição para *S. enteritidis*, entre 2,40 e 2,92 mm, porém, sem diferença significativa entre si. Os valores encontrados por Chesca e colaboradores (2017) foram de 14 e 15 mm, porém a extração foi realizada com um solvente que contém grau de toxicidade, não sendo indicado para a produção de alimentos, o que inviabiliza seu uso em processos como o analisado neste estudo, apesar do alto potencial de extração de biocompostos.

Para *S. aureus*, observa-se que apenas a amostra M_{24h} não apresentou halo de inibição. O menor halo encontrado foi da amostra M_{72h} e as demais amostras apresentam halos com variação entre 1,52 e 2,55 mm. Guimarães e colaboradores (2017) verificaram formação de halo de inibição de 19 mm, com aplicação de óleo essencial, no entanto, não houve atividade antimicrobiana com a aplicação de extrato de cravo-da-índia. Xu e colaboradores (2016) também verificaram a ação inibitória do óleo essencial de cravo-da-índia sobre *S. aureus*, com halos de inibição de 16,5 e 20,4 mm, em concentrações do composto iguais a 25% e 50%, respectivamente, muito superiores a concentração usada neste estudo, que sugere que maiores concentrações desses extratos resultarão em maior inibição de crescimento microbiano.

As amostras de óleo, $U_{(40\text{ }^{\circ}\text{C})15'}$ e $U_{(40\text{ }^{\circ}\text{C})30'}$ apresentaram os maiores halos de inibição para *E. coli*, entre 2,10 e 2,67 mm. Esses valores são baixos se comparados ao encontrado por Guimarães e colaboradores (2017), que foi de 11 mm com a aplicação de extrato de cravo-da-índia, no entanto, com a aplicação de óleo essencial, não foi verificada inibição de crescimento. Oliveira e colaboradores (2016) verificaram atividade antimicrobiana ainda maior, com halos entre 17 e 22 mm, porém, com aplicação de óleo essencial obtido com CO_2 em fase supercrítica.

Para *L. monocytogenes*, observa-se que as amostras de óleo, $U_{(40\text{ }^{\circ}\text{C})15'}$ e $U_{(40\text{ }^{\circ}\text{C})30'}$ apresentaram os maiores valores, entre 1,75 e 2,15 mm. Silveira (2018) verificou em seu estudo que somente o óleo essencial não apresentou formação de halo de inibição para *L. monocytogenes*, porém, quando aplicado a um filme polissacarídico, apresentou halo de 11,8 mm, o que destaca o potencial do uso do óleo essencial em sistemas de conservação de alimentos.

Conforme evidenciado por Petropoulos e colaboradores (2008), os processos fisiológicos das plantas podem ser impactados por estresse hídrico, o que interfere diretamente na composição dos óleos essenciais. Esse impacto pode afetar a

capacidade antimicrobiana dos óleos essenciais e extratos de plantas, uma vez que as substâncias responsáveis pelos fatores de inibição de crescimento microbiano podem estar alteradas ou não estarem presentes em sua composição. Além disso, El-Maati e colaboradores (2016) evidenciaram que extratos etanólicos são mais eficazes como agentes antimicrobianos que os aquosos.

Os resultados das análises antimicrobianas realizadas com concentração de extratos igual a 50 µL/mL estão expressos na Tabela 9.

Tabela 9 – Atividade biológica de extratos de cravo-da-índia (em concentração de 50 µL/mL)

Amostra (50 µL/mL)	Microrganismo			
	<i>S. enteritidis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>L. monocytogenes</i>
	Halo de inibição (cm)			
Óleo	1,25 ^a (± 0,07)	1,10 ^a (± 0,09)	1,45 ^a (± 0,07)	1,02 ^a (± 0,01)
M _{72h}	0,28 ^c (± 0,01)	-	0,30 ^b (± 0,00)	-
U _{(25 °C)30'}	0,57 ^b (± 0,01)	0,52 ^b (± 0,01)	0,42 ^b (± 0,01)	0,10 ^b (± 0,00)
U _{(40 °C)30'}	0,68 ^b (± 0,01)	0,42 ^b (± 0,01)	0,28 ^b (± 0,01)	0,22 ^b (± 0,01)

Valores com a mesma letra, ao longo da mesma coluna, não são significativamente diferentes (p<0,05).

A análise antimicrobiana com concentração igual a 50 µL/mL foi realizada com os extratos que apresentaram atividade antimicrobiana em concentração igual a 100 µL/mL. Para todos os microrganismos avaliados, a amostra com maior atividade antimicrobiana foi o óleo essencial.

O eugenol, composto mais abundante na amostra de óleo essencial, tem alta atividade antibacteriana, principalmente sobre *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. typhimurium* e *S. aureus* (SANTANA et al., 2021; SEBAALY; HAYDAR; GREIGE-GERGES, 2021), o que indica que mesmo em concentrações mais baixas, o óleo atua como agente de inibição de crescimento bacteriano de forma eficaz. Este resultado evidencia que para o uso de baixas concentrações de bioaditivos, o óleo essencial é a opção mais recomendada, devido ao alto teor de eugenol.

4.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

O conteúdo de fenólicos totais e a atividade antioxidante DPPH (% AA) do óleo essencial e dos extratos de cravo-da-índia são mostrados na Tabela 10. Os resultados indicaram que todos os extratos de cravo-da-índia analisados exibiram atividade antioxidante. Como já verificado, o potencial antioxidante pode ser atribuído ao conteúdo de compostos fenólicos presente no extrato, como o ácido gálico.

Tabela 10 – Atividade antioxidante de extratos de cravo-da-índia obtidos por diferentes métodos

Amostra	Fenólicos totais (mg GEA/g _{ext})	% AA (mg _{tocofero} /mL _{ext})
Óleo	0,226 ^e (± 0,000)	61,93 ^b (± 0,001)
M _{0h}	0,126 ^l (± 0,001)	8,15 ^j (± 0,002)
M _{6h}	0,101 ^p (± 0,000)	15,65 ^h (± 0,003)
M _{12h}	0,119 ^o (± 0,001)	*
M _{24h}	0,126 ^l (± 0,001)	19,95 ^g (± 0,002)
M _{48h}	0,158 ^j (± 0,001)	*
M _{72h}	0,130 ^k (± 0,001)	30,87 ^e (± 0,004)
U _{(25 °C)0'}	0,119 ^{no} (± 0,000)	9,47 ⁱ (± 0,011)
U _{(25 °C)5'}	0,203 ^f (± 0,001)	20,80 ^f (± 0,002)
U _{(25 °C)10'}	0,188 ^h (± 0,001)	*
U _{(25 °C)15'}	0,196 ^g (± 0,001)	32,27 ^e (± 0,004)
U _{(25 °C)20'}	0,264 ^b (± 0,001)	*
U _{(25 °C)30'}	0,290 ^a (± 0,001)	58,43 ^c (± 0,006)
U _{(40 °C)0'}	0,122 ^{mn} (± 0,001)	9,43 ⁱ (± 0,005)
U _{(40 °C)5'}	0,118 ^o (± 0,002)	21,17 ^f (± 0,012)
U _{(40 °C)10'}	0,124 ^{lm} (± 0,0011)	*
U _{(40 °C)15'}	0,162 ⁱ (± 0,001)	40,96 ^d (± 0,005)
U _{(40 °C)20'}	0,234 ^d (± 0,000)	*
U _{(40 °C)30'}	0,248 ^c (± 0,001)	65,24 ^a (± 0,004)

* - volume de amostra insuficiente para análise

Valores com a mesma letra, ao longo da mesma coluna, não são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

O conteúdo de fenólicos totais encontrado, entre 0,101 e 0,290 mg GEA/g_{ext}, foi relativamente baixo, se comparado com outros óleos essenciais e extratos vegetais, como o extrato de bagaço de laranja (*Citrus sinensis*) avaliado por Benelli e colaboradores (2010), o qual apresentou variação entre 9 a 36 mg GEA/g_{ext}. Outros exemplos que podem ser mencionados são do extrato de flores de *Eupatorium intermedium*, avaliado por Czaikoski (2014), variou entre 4,26 e 10,03 mg GEA/g_{ext}. Os maiores conteúdos de fenólicos totais foram verificados nos extratos obtidos por extração assistida por ultrassom. O menor valor encontrado foi para a amostra M_{6h}, o que sugere que a extração assistida por ultrassom é o mais recomendado, entre os métodos testados.

A atividade antioxidante do óleo essencial e dos extratos de cravo-da-índia variaram entre 8,15 e 65,24%, valores corroborados, ainda que ligeiramente inferiores, pelos resultados de El-Maati e colaboradores (2016), para extratos aquosos e etanólicos, iguais a variaram de 25,3% a 91,4%, após 120 min de incubação.

Os maiores valores observados foram das amostras de óleo essencial e de extratos obtidos por extração assistida por ultrassom, com diferença significativa evidenciada.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A realização deste trabalho demonstrou que o óleo essencial e os extratos de cravo-da-índia, obtidos por diferentes métodos de extração, possuem atividades antimicrobiana e antioxidante.

O rendimento observado do processo de extração do óleo essencial foi de 1,05%. Para a maceração, os valores variaram entre 1,45 e 7,32%, nos tempos de 0 e 72h de extração, respectivamente. Para a extração assistida por ultrassom a 25 °C a variação foi de 1,45 a 7,50%, nos tempos de 0 e 30 minutos, respectivamente. No mesmo intervalo de tempo, para ultrassom a 40°C a variação encontrada foi de 1,45 a 7,74%, o que demonstra uma vantagem dos métodos de maceração e ultrassom em relação à hidrodestilação, pois além de não expor a amostra a altas temperaturas, evitando degradação de compostos de interesse, requer menor tempo de processamento e tem maior rendimento de produto final.

O alto teor de umidade encontrado para o cravo-da-índia, de 14,81% ($\pm 0,47$) (bu), pode ter impactado a quantidade e a composição do óleo essencial e dos extratos obtidos.

A análise de perfil químico dos extratos de cravo-da-índia demonstrou a presença de classes de compostos de ácido gálico, flavonas e seus isômeros. Ácido gálico, teobromina e miricetina foram quantificados na análise cromatográfica realizada, sendo que seus valores ficaram entre 413,53 e 798,58 $\mu\text{g/mL}$, 0,0030 e 0,0055 $\mu\text{g/mL}$ e 0,031 e 0,040 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Os extratos obtidos por maceração nos tempos 0 e 6h, assim como os obtidos por extração assistida por ultrassom a 25 °C e a 40 °C, nos mesmos tempos, não apresentaram atividade antimicrobiana detectável. Para a concentração de 100 $\mu\text{L/mL}$, as amostras de óleo, $U_{(25\text{ }^\circ\text{C})30'}$, $U_{(25\text{ }^\circ\text{C})30'}$, $U_{(40\text{ }^\circ\text{C})15'}$ e $U_{(40\text{ }^\circ\text{C})30'}$ apresentaram os maiores halos de inibição para *S. enteritidis*, entre 2,40 e 2,92 mm, sendo. Para *S. aureus*, as amostras $U_{(25\text{ }^\circ\text{C})30'}$, $U_{(40\text{ }^\circ\text{C})15'}$ e $U_{(40\text{ }^\circ\text{C})30'}$ apresentaram os maiores valores, entre 2,05 e 2,55 mm. As amostras $U_{(40\text{ }^\circ\text{C})15'}$ e $U_{(40\text{ }^\circ\text{C})30'}$ apresentaram os maiores halos de inibição para *E. coli*, entre 2,60 e 2,67 mm. Para *L. monocytogenes*, as amostras $U_{(40\text{ }^\circ\text{C})15'}$ e $U_{(40\text{ }^\circ\text{C})30'}$ apresentaram os maiores valores, entre 1,87 e 2,15 mm. Para a concentração de 50 $\mu\text{L/mL}$ a amostra com maior atividade antimicrobiana foi o óleo

essencial. Estes resultados evidenciam a eficácia principalmente dos extratos obtidos por extração assistida por ultrassom.

O conteúdo de fenólicos totais encontrado foi relativamente baixo, com valores entre 0,101 e 0,290 mg GEA/g_{ext.} Ainda assim, os maiores conteúdos de fenólicos totais foram verificados nos extratos obtidos por extração assistida por ultrassom. O menor valor encontrado foi para a amostra M_{6h}.

Os resultados dos percentuais das atividades antioxidantes DPPH (% AA) variaram entre 8,15 e 65,24%. Os maiores valores observados foram das amostras de óleo essencial e de extratos obtidos por extração assistida por ultrassom.

Os resultados deste estudo comprovam as atividades antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial e dos extratos, obtidos por maceração e extração assistida por ultrassom. Pode-se destacar o método de extração assistida por ultrassom como o mais recomendado para a indústria, pois, além de apresentar inúmeras vantagens comerciais, como menor tempo de processamento e menor custo de produção, tem maior rendimento e alta eficácia na extração dos compostos responsáveis pela atividade biológica dos extratos, sem expor o produto a altas temperaturas, o que reduz o risco de degradação de composto e perda de qualidade do extrato.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliar a atividade antioxidante do óleo essencial e dos extratos de cravo-da-índia por diferentes metodologias (FRAP, ABTS etc.);
- Avaliar a toxicidade do óleo essencial e dos extratos de cravo-da-índia;
- Avaliar a atividade antifúngica do óleo essencial e dos extratos de cravo-da-índia;
- Avaliar a aplicação do óleo essencial no tratamento de formação de biofilmes em indústrias de alimentos;
- Avaliar o impacto do uso do óleo essencial e dos extratos, como bioaditivos, no tempo útil de alimentos;
- Avaliar o impacto do uso do óleo essencial e dos extratos, como bioaditivos, nas características sensoriais do alimento escolhido;
- Realizar extração do óleo essencial com uso de fluido supercrítico para comparação de perfil químico e atividade biológica;
- Avaliar perfil químico e atividade biológica das folhas de cravo-da-índia.

REFERÊNCIAS

- AFFONSO, R. S. et al. Aspectos Químicos e Biológicos do Óleo Essencial de Cravo da Índia. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 2, p. 146–161, 2012.
- AGUILAR-GONZÁLEZ, A. E.; PALOU, E.; LÓPEZ-MALO, A. Antifungal activity of essential oils of clove (*Syzygium aromaticum*) and/or mustard (*Brassica nigra*) in vapor phase against gray mold (*Botrytis cinerea*) in strawberries. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 32, p. 181–185, 2015.
- AMELIA, B. et al. **GC-MS analysis of clove (*Syzygium aromaticum*) bud essential oil from Java and Manado**. AIP Conference Proceedings. **Anais**. American Institute of Physics Inc., 10 jul. 2017.
- ANASS, E.; AMRANI, A. E.; EDDINE, J. J. Effect of the parts of plant material (flowers and leaves) on essential oil chemical composition of ormenis mixta from Morocco. **Journal Of Essential Oil Bearing Plants**, v. 18, n. 2, p. 398–408, 2015.
- ARAMRUEANG, N.; ASAVASANTI, S.; KHANUNTHONG, A. Leafy Vegetables. **Integrated Processing Technologies for Food and Agricultural By-Products**, v. 1, n. 3, p. 245–272, 2019.
- ARAÚJO, L. R. S. **Fundamentos e atualidades em tecnologia e inspeção de alimentos**. [s.l.] Editora In Vivo, 2020. v. 1
- AYRES, M. et al. **BioEstat 5.3**. Belém do Pará. Sociedade Civil Mamirauá, 2007. Disponível em: <www.mamiraua.org.br/downloads/programas>. Acesso em: 31 out. 2021
- BARBOSA, P. C. S. et al. Influence of Abiotic Factors on the Chemical Composition of Copaiba Oil (*Copaifera multijuga* Hayne): Soil Composition, Seasonality and Diameter at Breast Height. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 10, p. 1823–1833, 2012.
- BARROS GOMES, P. R. et al. Chemical composition and biological activity of the essential oil of the fruits *Pimenta dioica* against formae speciales of fungus *Fusarium oxysporum*. **Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas**, v. 49, n. 1, p. 89–100, 2020.
- BENELLI, P. et al. Biactive extracts of orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) pomace obtained by SFE and low pressure techniques: Mathematical modeling and extract composition. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 55, p. 132–141, 2010.
- BHAVANIRAMYA, S. et al. Role of essential oils in food safety: Antimicrobial and antioxidant applications. **Grain & Oil Science and Technology**, v. 2, p. 49–55, 2019.

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

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

CABEZA, A. et al. Simulation of the supercritical CO₂ extraction from natural matrices in packed bed columns: User-friendly simulator tool using Excel. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 116, p. 198–208, 2016.

CAIXETA, D. S. et al. **Estudo comparativo do teor de umidade e rendimento dos óleos essenciais de *Syzygium aromaticum* (cravo-da-índia), *Thymus vulgaris* L. (tomilho) e *Lavandula officinalis* (lavanda)**. XIX Congresso de Pós-Graduação da UFLA. **Anais**. 2010. Acesso em: 6 dez. 2021

CAPAR, D. T. et al. Extraction method affects seed oil yield, composition, and antioxidant properties of European cranberrybush (*Viburnum opulus*). **Industrial Crops & Products**, v. 168, 2021.

CARVALHO, L. M. S. et al. Otimização experimental e avaliação do rendimento do processo de extração do óleo essencial da planta *Otacanthus azureus*. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 4, p. 19139–19150, 2020.

CHAVES, F. C. M.; COSTA, J. S. **Teor e rendimento de extrato das folhas de três morfotipos de *Arrabidaea chica* (Bonpl.) B. Verl. em função de adubação orgânica em Manaus, AM**. II Congresso Brasileiro de Recursos Genéticos. **Anais**. Belém do Pará: 2012. Acesso em: 6 dez. 2021

CHESCA, A. C. et al. **Estudo comparativo da atividade antibacteriana do extrato de crav-da-índia (*Eugenia caryophyllata* Thunb.) extraído por via etanólica e metanólica**. I Encontro de Desenvolvimento de Processos Agroindustriais. **Anais**. Uberaba: Uniube, 2017. Acesso em: 6 dez. 2021

CICERO, N. et al. Chemical characterization of a variety of cold-pressed gourmet oils available on the Brazilian market. **Food Research International**, v. 109, p. 517–525, 2018.

CIVAN, M.; KUMCUOGLU, S. Green ultrasound-assisted extraction of carotenoid and capsaicinoid from the pulp of hot pepper paste based on the bio-refinery concept. **LWT - Food Science and Technology**, v. 113, 2019.

CODEX, C. O. F. A. A. C. Position paper on Patulin. **WHO/FAO**, p. 50–55, 1998.

CORTÉS-ROJAS, D. F. et al. 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.

CORTÉS-ROJAS, D. F.; DE SOUZA, C. R. F.; OLIVEIRA, W. P. Clove (*Syzygium aromaticum*): A precious spice. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 4, n. 2, p. 90–96, 2014.

COTINGUIBA, G. G. et al. **Método de Avaliação da Defesa Antioxidante: Uma Revisão de Literatura** UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde. [s.l: s.n.].

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

CUNHA, S. et al. Biomassa em aula prática de química orgânica verde: cravo-da-índia como fonte simultânea de óleo essencial e furfural. **Química Nova**, v. 35, n. 3, p. 638–641, 2012.

CUTRIM, E. S. M. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante dos óleos essenciais e extratos hidroalcoólicos de *Zingiber officinale* (Gengibre) e *Rosmarinus officinalis* (Alecrim). **Revista Virtual de Química**, v. 11, n. 1, p. 60–81, 2019.

CZAIKOSKI, K. **Cinética, composição química e atividade biológica de extratos de flores de *Eupatorium intermedium* obtidos com CO₂ supercrítico e propano comprimido**. Curitiba: [s.n.]

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de alimentos de Fennema**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

DE PINHO, A. P. S.; SOUZA, A. F. Extração e caracterização do óleo de coco (*Cocos nucifera* L.). **Biológicas & Saúde**, v. 8, n. 26, 9 maio 2018.

DIPOV - DEPARTAMENTO DE INSPEÇÃO DE PRODUTOS DE ORIGEM VEGETAL. Anexo da Norma Interna DIPOV nº 02/2019. 2019, p. 1–318.

DORAN, P. M. **Bioprocess Engeneering Principles**. Sidney: [s.n.].

DRAWANZ, B. B. et al. Óleos essenciais e hidrolatos de orégano e cravo-da-índia sobre o desenvolvimento micelial de *Botrytis cinerea* isolado de morangos. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 15, n. 4, p. 341–345, 1 out. 2020.

DURELLO, R. S.; SILVA, L. M.; BOGUSZ, S. Química do lúpulo. **Química Nova**, v. 42, n. 8, p. 900–919, 2019.

EFSA (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY). Scientific Opinion on the safety and efficacy of allylhydroxybenzenes (chemical group 18) when used as flavourings for all animal species. 2011.

EL-MAATI, M. F. et al. Phenolic extracts of clove (*Syzygium aromaticum*) with novel antioxidant and antibacterial activities. **European Journal of Integrative Medicine**, v. 2, p. 494–504, 2016.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Perdas e desperdícios de alimentos na América Latina e no Caribe.**, 2020. Disponível em: <www.fao.org/americas/noticias>. Acesso em: 26 nov. 2021.

FATHONI, A. et al. **Identification of nonvolatile compounds in clove (*Syzygium aromaticum*) from Manado**. AIP Conference Proceedings. **Anais...American Institute of Physics Inc.**, 10 jul. 2017.

FEHLBERG, I. **Terpenos e Fenilpropanóides de *Myrcia guianensis* (Myrtaceae)**. Bahia: [s.n.]

FELIPE, L. O.; BICAS, J. L. O mercado de bioativos para a indústria de alimentos. **Processos Químicos**, v. 19, p. 25–38, 2016.

FERREIRA, D. A. S. **Avaliação do efeito protetor do beta-cariofileno em modelos celulares de doenças neurodegenerativas**. Ribeirão Preto: [s.n.]

FERRO, M. M.; MOURA, D. C.; GERON, L. J. V. Óleos essenciais em dietas para bovinos. **Revista de Ciências Agroambientais**, v. 14, n. 2, p. 47–57, 18 dez. 2016.

FREIRE, J. M. et al. Essential oil of *Origanum majorana* L., *Illicium verum* Hook. f. and *Cinnamomum zeylanicum* Blume: chemical and antimicrobial characterization. **Rev. Bras. Pl. Med**, v. 13, n. 2, p. 209–214, 2011.

FU, M. et al. Essential moieties of myricetins, quercetins and catechins for binding and inhibitory activity against α -Glucosidase. **Bioorganic Chemistry**, v. 115, 2021.

GHOSH, V.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. Mustard oil microemulsion formulation and evaluation of bactericidal activity. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 4, p. 497–500, 2012.

GOMES, M. V. S. et al. Development and validation of a quantification method for humulene and trans-caryophyllene in *Cordia verbenacea* by high performance liquid chromatography. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 29, p. 182–190, 2019.

GOMES, P. R. B. et al. Caracterização química e citotoxicidade do óleo essencial do cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*). **Revista Colombiana de Ciências Químico-Farmacéuticas**, v. 47, n. 1, p. 37–52, 1 jan. 2018.

GUIMARÃES, C. C. et al. Atividade antimicrobiana in vitro do extrato aquoso e do óleo essencial do alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) e do cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus* L.) frente a cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 15, n. 2, p. 83–89, 2017.

GUPTA, P. D.; BIRDI, T. J. **Development of botanicals to combat antibiotic resistance** *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine* Elsevier B.V., 1 out. 2017.

HAMMOUD, L. et al. Humulene derivatives from Saharian *Asteriscus graveolens*. **Tetrahedron Letters**, v. 59, p. 2668–2670, 2018.

HELT, K. M. P.; NAVAS, R.; GONÇALVES, E. M. Características físico-químicas e compostos antioxidantes de frutos de pitanga da região de Capão Bonito – SP. **Revista de Ciências Agroambientais**, v. 16, n. 1, p. 96–102, 23 jul. 2018.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. In: **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. v. 1p. 21–22.

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

KLUCZKOVSKI, A. M. et al. Caracterização e extração do óleo de castanha-do-Brasil: revisão. **Avanços em Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 3, p. 391–402, 2021.

KOBAYASHI, B. F.; AMARAL, D. R. Efeito de extratos vegetais de plantas do Cerrado para controle de pinta-preta em tomateiro. **Summa Phytopathol**, v. 44, n. 2, p. 189–192, 2018.

LAROQUE, D. A. et al. **Seleção de catalisadores e sistema reacional para a síntese de acetato de eugenila via catálise heterogênea em sistema livre de solvente**. Congresso Brasileiro de Engenharia Química. **Anais...** Florianópolis: 22 out. 2014. Disponível em: <www.researchgate.net/publication/300656231>. Acesso em: 1 dez. 2021.

LAURENT, V. et al. MODELAGEM MATEMÁTICA DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS *Schinus terebintifolius* Raddi UTILIZANDO MATHEMATICAL MODELING OF THE ESSENTIAL OIL EXTRACTION PROCESS OF *Schinus terebintifolius* Raddi Using SUPERCRITIC. n. 1994, 1999.

LEITE, GIO. M. L. et al. Pharmacological and toxicological activities of α -humulene and its isomers: A systematic review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 115, p. 255–274, 2021.

LIU, M.; NIU, W.; OU, L. Beta-Caryophyllene ameliorates the Mycoplasmal pneumonia through the inhibition of NF- κ B signal transduction in mice. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, p. 4240–4246, 2021.

MEHER, G.; CHAKRABORTY, H. Influence of eugenol on the organization and dynamics of lipid membranes: a phase-dependet study. **Lagmuir**, v. 34, p. 2344–2351, 2018.

MENDONÇA, A. P. et al. Extração de óleo de andiroba por prensa: rendimento e qualidade de óleo de sementes submetidas a diferentes teores de água e temperaturas de secagem. **Scientia Forestalis**, v. 48, n. 125, 2019.

MENEZES FILHO, A. C. P. et al. Atividade antioxidante e compostos bioativos em espécies de um fragmento de Cerrado goiano tipo cerradão. **Colloquium Agrariae**, v. 15, n. 1, p. 01–08, 1 fev. 2019.

MENEZES FILHO, A. C. P. DE; CASTRO, C. F. DE S. Physicochemical evaluation and antifungal activity of essential oil of *Myrocarpus fastigiatus* and oil-resin of *Copaifera multijuga* Artigo Original Avaliação físico-química e atividade antifúngica do óleo essencial de *Myrocarpus fastigiatus* e óleo-resina d. **Revista Arquivos Científicos (IMMES)**, p. 117–123, 2020.

MENSOR, L. L. et al. Screening of brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytoterapy Research**, v. 15, p. 27–130, 2001.

MESQUITA, M. O. M.; PINTO, T. M. F.; MOREIRA, R. F. Potencial antimicrobiano de extratos e moléculas isolados de plantas da Caatinga: uma revisão. **Revista Fitos**, v. 11, n. 2, p. 119–249, 2017.

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO. **Cravo-da-índia**. Disponível em: <<https://escola.britannica.com.br/artigo/cravo-da-%C3%ADndia/574460>>. Acesso em: 19 nov. 2021.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 2, de 15 de janeiro de 2007. 2007.

MUSTHAFI, K. S.; VORAVUTHIKUNCHAI, S. P. Eugenyl acetate inhibits growth and virulence factors of drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 31, n. 6, p. 448–454, 1 nov. 2016.

NASCIMENTO, F. C. G. et al. Avaliação de carotenoides e atividade antioxidante da polpa madura do abacate (*persea americana mill*). **Research, Society and Development**, v. 10, n. 8, 15 jul. 2021.

NAZZARO, F. et al. **Essential oils and antifungal activity** *Pharmaceuticals* MDPI AG, 1 dez. 2017.

NESPOLO, C. R. et al. **Práticas em tecnologia de alimentos**. 1. ed. Porto Alegre: Artmed, 2015. v. 1.

NOBRE, D. A. C. et al. Aplicación y efecto antioxidante del ácido gálico sobre la calidad de semillas de trigo. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 42, n. 1, p. 22–29, 3 fev. 2019.

NOBREGA, L. P. et al. COMPARISON OF GINGER (*Zingiber officiale* Roscoe) OLEORESIN OBTAINED WITH ETHANOL AND ISOPROPANOL WITH THAT OBTAINED WITH PRESSURIZED CO₂. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 17, n. 4, p. 1–7, 1997.

OLIVEIRA, M. S. et al. **Avaliação da atividade antimicrobiana de óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzyium aromaticum*) obtido com CO₂ em fase super crítica**. XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos. **Anais...** Gramado: FAURGS, 2016. Acesso em: 6 dez. 2021.

OLIVEIRA, R. A. et al. Constituintes químicos voláteis de especiarias ricas em eugenol. **Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 3, p. 771–775, 2009.

OSORIO, E. et al. Biological efficiency of polyphenolic extracts from pecan nuts shell (*Carya Illinoensis*), pomegranate husk (*Punica granatum*) and creosote bush leaves (*Larrea tridentata* Cov.) against plant pathogenic fungi. **Industrial Crops and Products**, v. 31, n. 1, p. 153–157, jan. 2010.

OSTROSKY, E. A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18 (2), p. 301–307, 2008.

PANDEY, A. K. et al. Essential oils: Sources of antimicrobials and food preservatives. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. JAN, 16 jan. 2017.

PANDEY, S. K. et al. Structure-activity relationships of monoterpenes and acetyl derivatives against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. **Pest Management Science**, v. 69, n. 11, p. 1235–1238, nov. 2013.

PAVITHRA, B. Eugenol - A review. **Journal oh Pharmatceutical Sciences and Research**, v. 6, n. 3, p. 153–154, 2014.

PAZZOTI, G. S. O. **Avaliação da estabilidade oxidativa de compostos bioativos em óleos especiais extraídos por prensagem a frio**. São José do Rio Preto: [s.n.].

PEREIRA-REIRE, J. A. et al. Aplicações tecnológicas de bioaditivos alimentares e efeitos sobre fatores de transcrição gênica. In: OLIVEIRA, A. C. (Ed.). **Aspectos translacionais da toxicodinâmica de aditivos alimentares**. Ponta Grossa: Editora Atena, 2020. p. 16–31.

PERES, L. G.; BRANDÃO, V. B.; REZENDE, A. J. Teobromina, substância encontrada no cacau. **Revista JRG de Estudos Acadêmicos**, v. 1, n. 3, p. 48, 2018.

PETROPOULOS, S. A. et al. The effect of water deficit stress on the growth, yield and composition of essential oils of parsley. **Scientia Horticulturae**, v. 115, p. 393–397, 2008.

PIMENTA NETO, A. A. et al. Bioatividade de óleos essenciais e extratos vegetais no controle de doenças causadas por *Phytophthora nicotianae* em solanáceas. **Summa Phytopathol**, v. 46, n. 3, p. 267–272, 2020.

PRADO, A. C. P. **Identificação e avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana de compostos fenólicos da casca de noz-pecã [*Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch]**. Florianópolis: [s.n.].

RIBEIRO, M. V. S.; LIMA, A. R. N.; OLIVEIRA, T. K. B. Avaliação físico-química do extrato vegetal da semente de *Cucurbita moschata*. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 4, 21 mar. 2020.

ROHENKOHL, C. C.; CARNIEL, A. P.; COLPO, E. Consumo de antioxidantes durante tratamento quimioterápico. **Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, v. 24, n. 2, p. 107–112, 2011.

ROSTAGNO, M. A.; PRADO, J. M. **Natural product extraction: principles and applications**. Londres: Royal Society of Chemistry, 2015. v. 21

SALUNKHE, O. K.; CHAVAN, J. K.; KADAM, S. S. Dietary Tannins: Consequences and Remedies. **CRC Press**, 1989.

SANTANA, M. S. et al. Avanços em Ciência e Tecnologia de Alimentos. In: **Avanços em Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 1. ed. Guarujá: Editora Científica, 2021. v. 4p. 59–73.

SANTOS, E. L. et al. Phytochemical characterization and antibiotic potentiating effects of the essential oil of *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) and beta-caryophyllene. **South African Journal of Botany**, v. 143, p. 1–6, 2021.

SANTOS, F. R.; BRAZ-FILHO, R.; CASTRO, R. N. Influência da idade das folhas de *Eugenia uniflora* L. na composição química do óleo essencial. **Química Nova**, v. 38, n. 6, p. 762–768, 1 jul. 2015.

SANTOS, J. A. S. et al. Estudo do potencial antioxidante da *Anacardium occidentale* L. e determinação de seus compostos fenólicos. **Diversitas Journal**, v. 3, n. 2, p. 455, 2 set. 2018.

SANTOS, P. et al. Synthesis of eugenyl acetate by enzymatic reactions in supercritical carbon dioxide. **Biochemical Engineering Journal**, v. 114, p. 1–9, 2016.

SAVIRANTA, N. M. M. et al. Leaf phenolic compounds in red clover (*Trifolium pratense* L.) induced by exposure to moderately elevated ozone. **Environmental Pollution**, v. 158, n. 2, p. 440–446, fev. 2010.

SCUDELER, C. G. DA S. Desenvolvimento e caracterização de filmes biopoliméricos a partir de resíduos de tilápia (*Oreochromis niloticus*) com incorporação de óleos essenciais, nanoargila e gelatina. **Universidade Federal da Grande Dourados**, 2019.

SEBAALY, C.; HAYDAR, S.; GREIGE-GERGES, H. Eugenol encapsulation into conventional liposomes and chitosan-coated liposomes: A comparative study. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, p. 1–7, 2021.

SHUAI, X. et al. Comparative study on the extraction of macadamia (*Macadamia integrifolia*) oil using different processing methods. **LWT - Food Science and Technology**, v. 154, 2021.

SILVA, N. L. et al. Determinação da atividade antioxidante e teor de flavonoides totais equivalentes em quercetina em folhas de *Cymbopogon citratus* (d.c.) stapf e *Melissa officinalis* lam. **Conexão Ciência**, v. 12, n. 1, p. 46–53, 4 maio 2017.

SILVA, R. S. et al. Otimização da extração assistida por ultrassom de compostos bioativos da espécie *Caryocar brasiliense*. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 9, 29 jul. 2021.

SILVA, T. C.; OLIVEIRA, J. R.; SOUZA, S. J. Extração de eugenol a partir do cravo da Índia e produção de sabonetes aromatizados. **Revista Crase**, v. 1, n. 1, 2011.

SILVEIRA, Y. D. O. **Caracterização de filme polissacarídico obtido de casca de mandioca (*Manihot esculenta*) funcionalizado com óleo essencial de cravo-da-Índia (*Syzygium aromaticum*)**. [s.l: s.n.].

SILVESTRI, J. D. F. et al. Perfil da composição química e atividades antibacteriana e antioxidante do óleo essencial do cravo-da-Índia (*Eugenia caryophyllata* Thunb.). **Revista Ceres**, v. 57, p. 589–594, 2010.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: UFRGS, 1999.

SINGLETON, V. L.; ROSSI JR, J. A. Colorimetry of total phenolic with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144–158, 1956.

SIQUEIRA-BATISTA, R.; GOMES, A. P. **Antimicrobianos: guia prático**. 2. ed. Rio de Janeiro: Editora Rubio, 2010.

SOUSA, C. M. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Quim. Nova**, v. 30, n. 2, p. 351–355, 2007.

SOUZA, B. A. et al. Aditivos alimentares: Aspectos tecnológicos e impactos na saúde humana. **Revista Contexto & Saúde**, v. 19, n. 36, p. 5–13, 11 jul. 2019.

STEVANOVIC, Z. D. et al. **Essential oils as feed additives -Future perspectives** *Molecules* MDPI AG, 2018.

SUCUPIRA, N. R. et al. **Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos** *Methods for Measuring Antioxidant Activity of Fruits* 263 UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde. [s.l: s.n.].

SYMONIUK, E.; RATUSZ, K.; KRYGIER, K. Oxidative stability and the chemical composition of market cold-pressed linseed oil. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 119, n. 11, 2017.

TARIQ, S. et al. A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens. **Microbial Pathogenesis**, v. 134, 2019.

TISCHER, S. J. **Emprego de resinas na obtenção de acetato de eugenila em sistema livre de solvente orgânico**. Chapecó: [s.n.].

TUNÇ, M. T.; KOCA, I. Ohmic heating assisted hydrodistillation of clove essential oil. **Industrial Crops and Products**, v. 141, 1 dez. 2019.

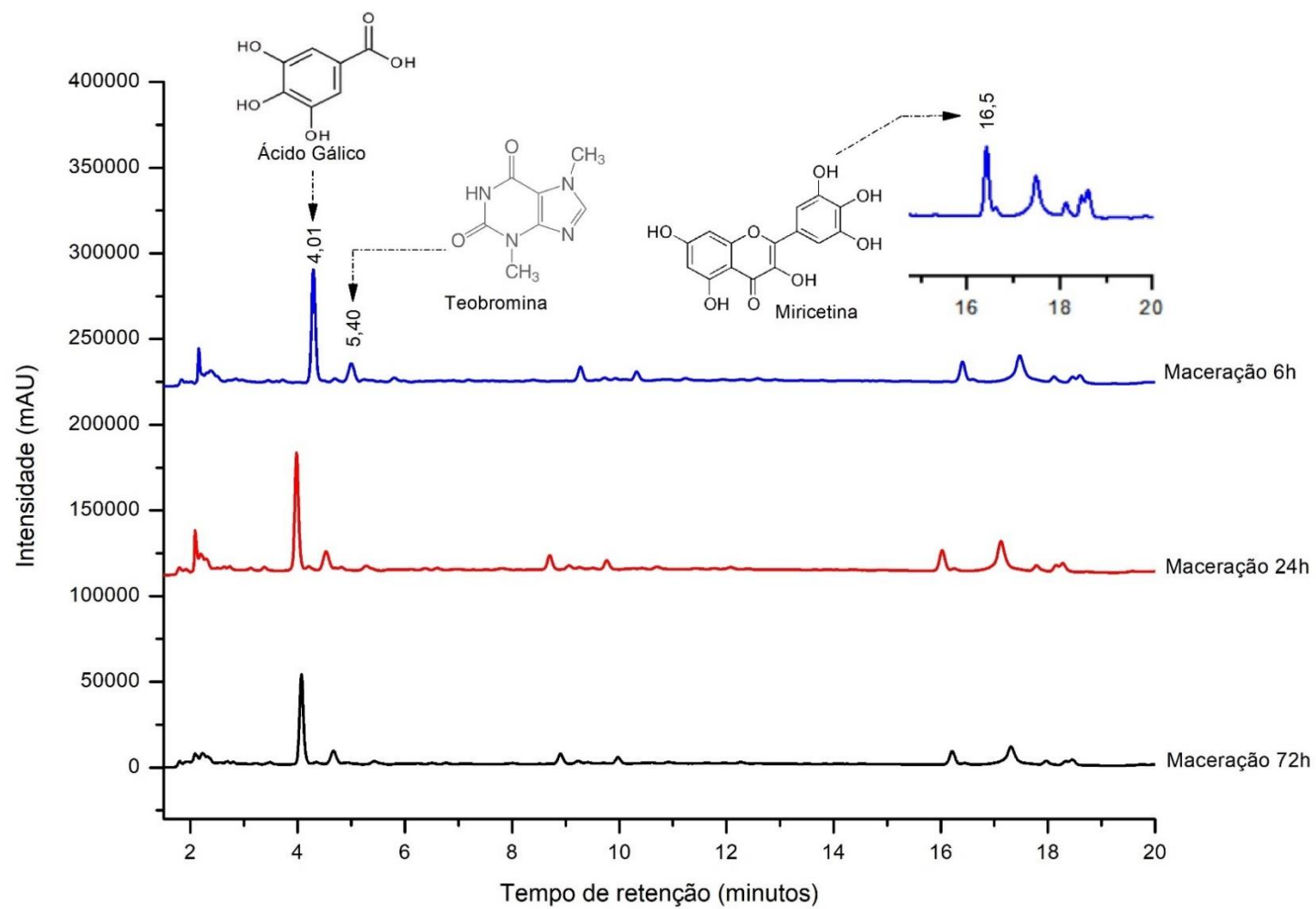
VIROT, M. et al. Green procedure with a green solvent for fats and oils' determination Microwave-integrated Soxhlet using limonene followed by microwave Clevenger distillation. **Journal of Chromatography A**, p. 147–152, 2008.

XU, J. G. et al. Chemical Composition, Antibacterial Properties and Mechanism of Action of Essential Oil from Clove Buds against *Staphylococcus aureus*. **Molecules**, v. 21, n. 9, p. 1194, 2016.

YOSTAWONKUL, J. et al. Bifunctional clove oil nanoparticles for anesthesia and antibacterial activity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v. 503, p. 589–595, 30 mar. 2019.

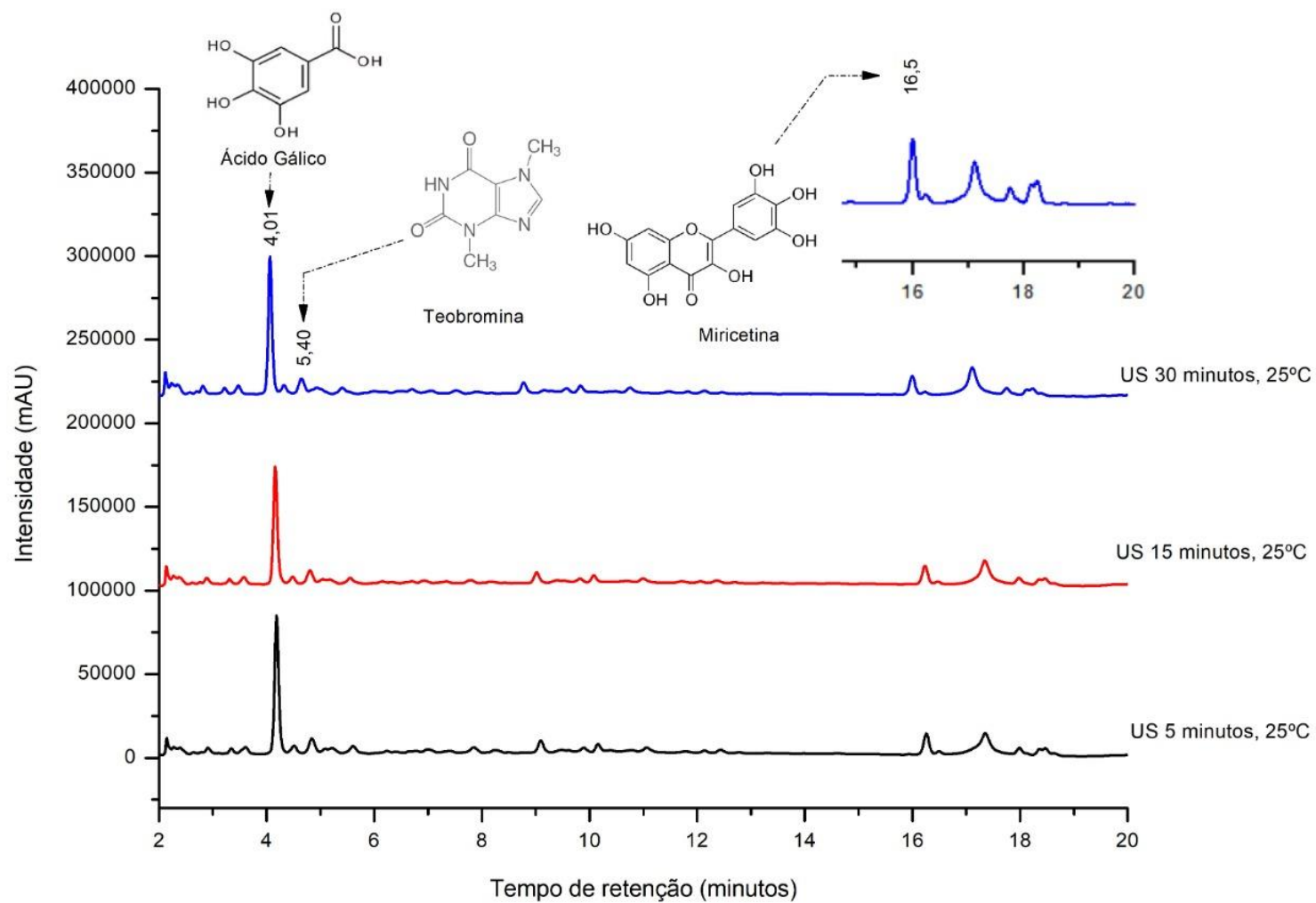
ZHAO, W.; SHI, Y. Comprehensive analysis of phenolic compounds in four varieties of goji berries at different ripening stages by UPLC–MS/MS. **Journal of Food Composition and Analysis**, nov. 2021.

APÊNDICE A – Cromatograma de extratos obtidos em maceração



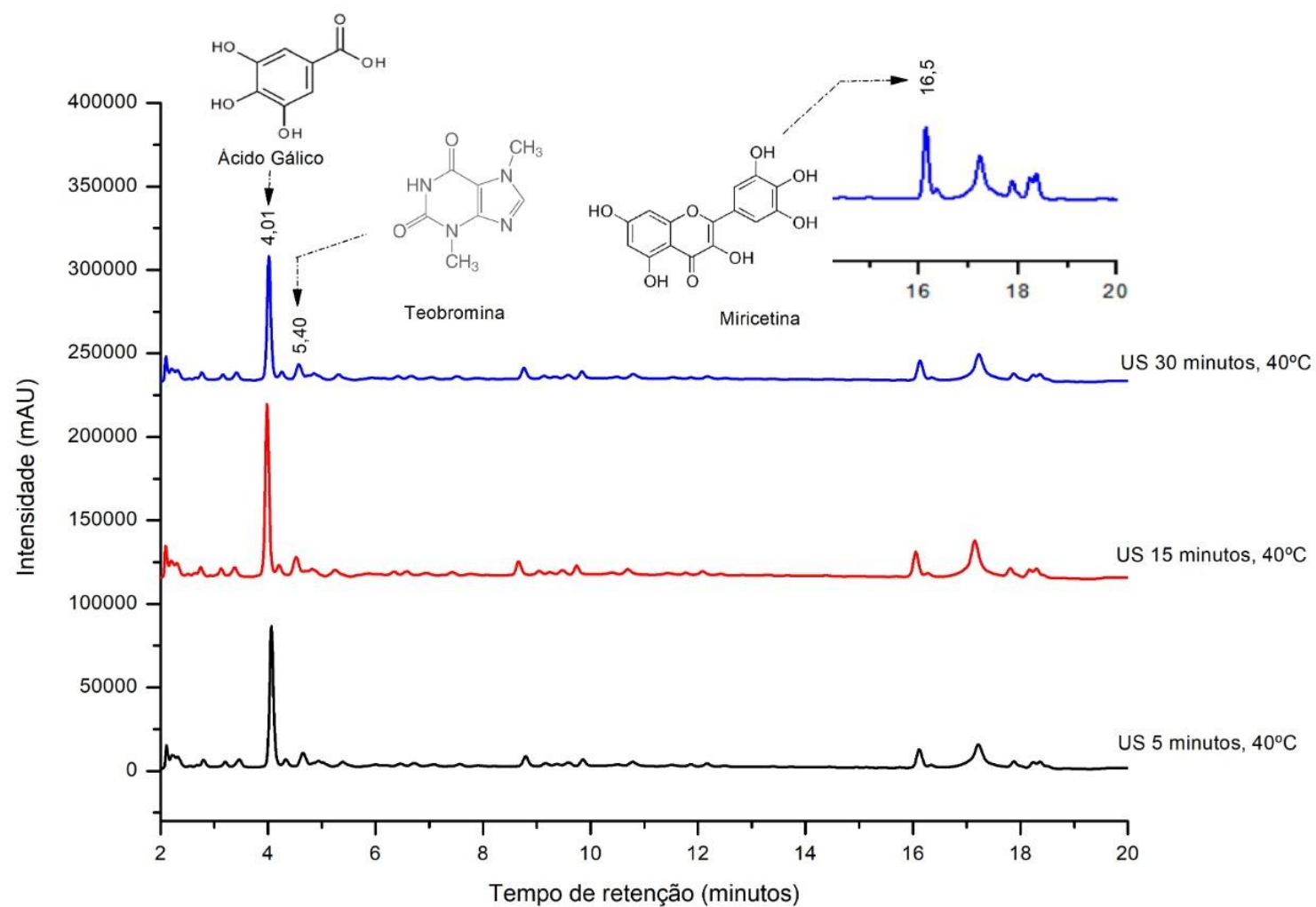
Fonte: O autor

APÊNDICE B – Cromatograma de extratos obtidos em ultrassom a 25 °C



Fonte: O autor

APÊNDICE C – Cromatograma de extratos obtidos em ultrassom a 40 °C



Fonte: O autor