

EXTRAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DO CRAVO-DA-ÍNDIA EM CO₂ SUPÉRCRÍTICO UTILIZANDO ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

Rui Márcio Franco¹, Regina Ferronato², Osmar Tomazeli Junior³, Jacir Dal Magro⁴, Gilza Maria de Souza Franco⁵, Maite Cristina Sordi⁶

RESUMO: Óleos essenciais são encontrados em bolsas secretoras presentes nos vegetais, como: flores e sementes. A extração por CO₂ apresenta características físicas e químicas como: relativamente não-tóxico, não inflamável e menor temperatura. O objetivo foi extrair óleo essencial do cravo-da-Índia (*Eugenia caryophyllata* Thunb) em diferentes pressões de arraste utilizando a análise cromatográfica. Colocou-se 81,58g de pó de cravo-da-Índia no extrator supercrítico a 25°C (fixa), vazão de CO₂ de 2 L/min, calculado e medido utilizando cronômetro para verificação da vazão no experimento e pressão inicial de 80 bar, aumentada em 25 bar a cada 15 minutos, até atingir pressão final de 280 bar. A massa em cada extração foi pesada e calculada o rendimento. Maior rendimento foi 16,85% (balão 3) ocorrido em condições mais propícias de extração do óleo e menor de 3,46% (balão 2), devido a perda de pressão no extrator. A CCD foi positiva para terpenos e negativo para flavonóides. Concluiu-se que, os resultados obtidos a 155 bar e temperatura de 25°C durante 20 minutos, mostrou-se melhor condição de arraste do óleo do cravo-da-Índia, entretanto, são necessários o uso de novos eluentes na extração por CO₂ supercrítico, que visem melhorar o rendimento do óleo essencial do cravo-da-Índia.

PALAVRAS-CHAVE: Óleos essenciais; extração por CO₂ supercrítico; cravo-da-Índia.

INTRODUÇÃO: Óleos essenciais são substâncias odoríferas, voláteis à temperatura ambiente, encontrados em várias partes das plantas (BROWN; MORRA, 1995). Podemos agrupá-los em duas grandes classes, com base em sua origem biossintética: a) derivados dos terpenóides, formados via ácido mevalônico-acetato (FERRACINI *et al.*, 1995); e b) compostos com anéis aromáticos, formados via ácido chiquímico-fenil propanóides.

O gênero *Eugenia* é um dos maiores da família Myrtaceae (ROMAGNOLO; SOUZA, 2006) e assumem destaque especial por serem utilizadas como plantas medicinais (OLIVEIRA, DIAS; CÂMARA, 2005). O cravo cravo-da-índia é uma gema floral seca sendo usado principalmente como condimento na culinária (MAZZAFERA, 2003), devido seu marcante aroma (OLIVEIRA *et al.*, 2006) e sabor (OLIVEIRA; DIAS; CÂMARA, 2005), conferido por um composto fenólico volátil (RAINA *et al.*, 2001), o eugenol (BROWN; MORRA, 1995, BROWN *et al.*, 1991). O principal interesse científico nos metabólitos secundários está na grande capacidade biossintética dos vegetais relacionados (RAVEN *et al.*, 2001), seja quanto ao número de substâncias, ou ainda, a diversidade de metabólitos em uma única espécie (MONTANARI; BOLZANI, 2001). São sintetizados em uma parte da planta (MAZZAFERA, 2003; CARRASCO *et al.*, 2008) e armazenados em outra, e sua concentração pode variar muito durante todo o dia. Entre os principais compostos identificados classificados estão os terpenóides (SANTOS, 2001) e são classificados de acordo com o seu número de unidades de isopreno. Categorias muito conhecidas de terpenóides são os monoterpenóides, que tem duas unidades de isopreno (SIMÕES; SPITZER, 2001); os sesquiterpenóides (três unidades de isopreno) e os diterpenóides

¹ Farmacêutico bioquímico, Mestrando em Ciências Ambientais (Unochapecó). E-mail: francomgj@gmail.com

² Bióloga, Mestranda em Ciências Ambientais (Unochapecó)

³ Oceanógrafo, Mestrando em Ciências Ambientais (Unochapecó)

⁴ Químico. Dr. em química orgânica. Programa de pós graduação em Ciências Ambientais (Unochapecó)

⁵ Bacharel e licenciada em Ciências Biológicas. Dra. em Ecologia, Programa de pós graduação em Ciências Ambientais (Unochapecó)

⁶ Bióloga, Mestranda em Ciências Ambientais (Unochapecó)

(quatro unidades de isopreno) (RAVEN *et al.*, 2001). São importantes por atrair insetos polinizadores e segundo Feresin *et al.* (2001), diversas outras funções biológicas são atribuídas a essas substâncias, como: defesa contra ataque de predadores, proteção contra perda de água (MOYNA *et al.* 2002) e inibidores de germinação (QUEIROZ *et al.*, 2001). Na CCD são utilizadas duas fases sendo uma fase fixa formando uma camada plana (VOGEL *et al.*, 2002) e uma fase móvel líquida do tipo *open-bed* (SALDAÑA *et al.*, 1997). De uso muito vantajoso, devido à sua simplicidade, utilizando equipamentos relativamente simples, onde a fase móvel avança por capilaridade, permitindo ainda a corrida de várias amostras simultaneamente em cada placa, conferindo agilidade ao processo.

METODOLOGIA: Obtenção do óleo de Cravo-da-Índia com CO₂ supercrítico: A atividade de extração de óleo essencial de cravo-da-índia (*E. caryophyllata*) foi realizada no laboratório de análise instrumental da Unochapecó. A obtenção do óleo foi possível através do uso de extração por CO₂ supercrítico. Foram utilizadas 81,58 gramas de pó de cravo como massa inicial, colocada no extrator supercrítico sob condição de 25°C de temperatura constante, vazão de CO₂ de 2 L/min, calculado e medido utilizando um cronômetro para verificação da vazão no experimento, e pressão inicial de 80 bar, aumentada em 25 bar a cada 15 minutos, até atingir a pressão final de 280 bar para o experimento. O óleo essencial do cravo-da-Índia extraído foi armazenado em beakers, que eram trocados a cada mudança de pressão de arraste. As massas obtidas em cada extração foram pesadas e calculado o seu rendimento. Para análise cromatográfica (CCD), as quantidades de óleos extraídos foram dissolvidas em 10 microlitros de acetona para que pudessem ser injetadas no cromatógrafo a gás. No entanto estas análises não puderam ser feitas por motivos de falhas na leitura dos cromatogramas pelo computador. Também foram realizadas análise por cromatografia em massa (camada delgada). Os quatro extratos obtidos foram diluídos em 10 mL de diclorometano (CH₂Cl₂) e aplicados em uma placa cromatográfica em camada delgada. O eluente utilizado foi uma solução de Acetato de etila/Acetona/Água na proporção de 25:5:1. Em seguida, a placa cromatográfica foi revelada em Anisaldeído e Cloreto Férrico para identificação de terpenos e flavonóides, respectivamente.

RESULTADOS E DISCUSSÕES: A extração de óleo essencial a partir do uso de CO₂ supercrítico tendo como matéria prima, o pó de Cravo-da-Índia foi realizado em laboratório estabelecendo as seguintes condições padrão para o experimento (Tabela 1).

Massa reagente do cravo-da-Índia = 81,58 gramas

Temperatura = mantida fixa em 25°C

Pressão inicial de arraste = 105 bar

Pressão final de arraste = 280 bar

Tempo de leitura = 20 minutos após o arraste de óleo essencial

Tabela 1. Pressões (bar), tempo (min) e horário utilizados na extração por CO₂ supercrítico do Cravo-da-Índia em laboratório.

Pressão (bar)	Tempo de leitura (em minutos)	Horário de início de leitura
105	20	14h10min
130	40	14h30min
155	60	14h50min
180	80	15h10min
205	100	15h30min
230	120	15h50min
255	140	16h10min
280	160	16h30min

Calculou-se a massa de óleo essencial, obtendo este valor depois de pesado inicialmente o balão e após a captura de óleo essencial pelo método de CO₂ supercrítico, sendo pesado em balança analítica. Os valores extraídos do óleo são apresentados na tabela 2.

Tabela 2. Valores extraídos de massa do óleo essencial do Cravo-da-Índia.

Número do balão	Massa do balão (em gramas)	Massa do balão + extrato do óleo (em gramas)	Massa obtida do óleo essencial (gramas)
1	0	0	0
2	71,97	74,46	2,49
3	65,12	76,09	10,97
4	70,68	73,19	2,51

Para o cálculo do rendimento utilizou-se a fórmula abaixo:

$$\text{Rendimento} = (\text{massa obtida do óleo essencial} / \text{Massa do balão}) \times 100$$

Onde:

Massa do óleo essencial e massa do balão (em gramas)

Assim, para o balão 1 não se obteve o rendimento, devido ao fato de que não houve massa de óleo essencial obtida para o cálculo, e também não se atingiu o pico de arraste do óleo do cravo-da-Índia. Para o balão 2 obteve-se um rendimento de 3,46% (Tabela 3), um rendimento baixo, que pode ter ocorrido devido a perda de pressão do extrator, resultando num extrato não adequado a pressão de arraste de CO₂ necessária para extração do óleo essencial do cravo-da-Índia.

Tabela 3. Rendimento obtido na extração do óleo essencial do Cravo-da-Índia.

Número do balão	Rendimento obtido (%)
1	0
2	3,46
3	16,85
4	3,55

Para o balão 3 obteve-se o maior rendimento 16,85% (Tabela 3), que pode ser explicado devido às condições mais propícias de extração do óleo essencial, que por conseguinte, acarretou numa melhor extração do óleo essencial para esta pressão, onde se parece verificar que a pressão de CO₂ utilizada esteve mais próxima da ideal (favorável para extração do óleo essencial do cravo-da-Índia).

No balão 4 verificou-se um rendimento de 3,55% (Tabela 3), fato que também pode ser explicado, devido a não ser necessariamente uma pressão ideal de arraste para extração do óleo essencial de cravo-da-Índia, ou também que pode ter ocorrido a fase final ou posterior de arraste do óleo de cravo-da-Índia, onde ainda se verificou ocorrência de impurezas no óleo extraído neste balão.

Na cromatografia em camada delgada o resultado foi positivo para terpenos e negativo para flavonóides. O eluente utilizado nas proporções de 25:5:1 não proporcionou uma boa separação dos terpenos (Figura 1), tornando-se necessário utilizar outras proporções no experimento.

Contudo, novos trabalhos em laboratório devem ser conduzidos com uso de diferentes polaridades a fim de melhorar a extração por CO₂ supercrítico, visando o melhor rendimento do óleo essencial extraído do cravo-da-Índia (*Eugenia caryophyllata*).

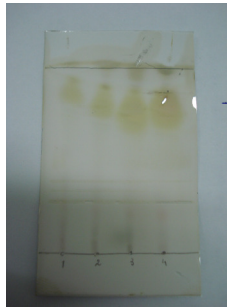


Figura 1. Cromatografia em camada delgada revelada com anisaldeído com aquecimento.

CONCLUSÃO: Os resultados experimentais obtidos a 155 bar e temperatura fixa de 25°C durante 20 minutos, mostrou-se a melhor condição de arraste do óleo do cravo-da-Índia (*Eugenia caryophyllata*) em laboratório. Esta pressão foi obtida a maior eficiência (rendimento) para o experimento quando comparado com as outras pressões de arraste (105, 130, 230, 250 e 280 bar), colaborando com Gil *et al.* (2002) e Mazzafera (2003) que também encontram resultados semelhantes para este tipo de arraste em CO₂ supercrítico nas pressões utilizadas, sendo que, o melhor resultado foi descrito com temperatura um pouco maior que a realizada no experimento (30°C).

O fluido supercrítico apresentou uma alta seletividade através da variação na pressão e mantida a temperatura fixa (25°C) na operação, fato constatado quando na pressão de 155 bar, onde o experimento apresentou melhor resultado na extração por CO₂ supercrítico do óleo essencial do cravo-da-Índia.

No entanto, para purificação de óleos vegetais, principalmente quando estes óleos apresentem na sua composição, os terpenos, devem ser determinadas às condições ótimas de operação e também, o desenvolvimento de um método eficaz de extração, visando aumentar a eficiência do processo de extração por meio de CO₂ supercrítico, que possibilite melhor rendimento do produto (óleo essencial do cravo-da-Índia).

Na cromatografia em camada delgada foi obtido resultado positivo para terpenos e negativo para flavonóides. O fato de se encontrar resultado negativo para flavonóides indica que as condições de extração utilizadas no experimento devem ser aprimorada, pois, na composição química do cravo-da-Índia se tem conhecimento de flavonóides (em pequenas proporções).

Por fim, o eluente utilizado na pesquisa (Acetato de etila/Acetona/Água) na proporção de 25:5:1 não proporcionou uma boa separação dos terpenos e assim, são necessários novos trabalhos com outros eluentes, com intuito de melhorar a extração em CO₂ supercrítico em diferentes polaridades.

FONTE FINANCIADORA: Universidade Comunitária da Região de Chapecó (UNOCHAPECÓ), Centro de Ciências Agro Ambientais e Alimentos (CCAA).

REFERÊNCIAS

BROWN, P.D.; MORRA, M.J. Glucosinolate-containing plant tissues as bioherbicides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 43, p.3070-3074, 1995.

BROWN, P.D.; MORRA, M.J.; MCCAFFREY, J.P.; AULD, D.L.; WILLIAMS III, L. Allelochemicals produced during glucosinolate degradation in soil. *Journal of Chemical Ecology*, v.17, p.2021-2034, 1991.

CARRASCO, A.H. *et al.* Eugenol and its synthetic analogues inhibit cell growth of human cancer cells (Part I). *J. Braz. Chem. Soc.*, São Paulo, v.19, n.3, 2008.

FERESIN, G.E. *et al.* Antimicrobial activity of plants used in traditional medicine of San Juan Province, Argentine. *Journal Ethnopharm*, v.78, n.3, p.103-107, 2001.

FERRACINI, V.L. *et al.* Essential oil of seven brazilian *Baccharis* species. *Journal of Essential Oil Research*, v.7, p.355-367, 1995.

GIL, G.B.; RIBEIRO, M.A.; ESQUÍVEL, M.M. Produção de extractos para indústria alimentar: uso de fluidos supercríticos. *Boletim da Sociedade Portuguesa de Biotecnologia*, n.73, dez. 2002.

MAZZAFERA, P. Efeito alelopático do extrato alcoólico do cravo-da-índia e eugenol. *Revista Brasileira de Botânica*, v.26, n.2, p.231-238, 2003.

MONTANARI, C.A.; BOLZANI, V.S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. *Quím. Nova*, São Paulo, v.24, n.1, 2001.

MOYNA, P.; DELLACASSA, E.; MENÉDEZ, P. Técnicas analíticas aplicadas aos óleos essenciais. In: SERAFINI, L.A.; BARROS, N.; AZEVEDO, J.L. (Org.). *Biotecnologia: avanços na agricultura e na indústria*. Caxias do Sul: EDUCS, p.167-193, 2002.

OLIVEIRA, R.N.; DIAS, I.J.M.; CÂMARA, C.A.G. Estudo comparativo do óleo essencial de *Eugenia puniceifolia* (HBK) DC. De diferentes localidades de Pernambuco. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.15, n.1, p.39-43, jan/mar. 2005.

OLIVEIRA, A.M. de; HUMBERTO, M.M.S.; SILVA, M.J.; ROCHA, R.F.A.; Sant'Ana, A.E.G. Estudo fitoquímico e avaliação das atividades moluscicida e larvicida dos extratos da casca do caule e folha de *Eugenia malaccensis* L. (Myrtaceae). *Rev. Bras. Farmacogn.*, v.16, supl.1, João Pessoa, dez. 2006.

QUEIROZ, S.C.N.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. *Quím. Nova*, v.24, n.1, p.68-76, 2001.

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

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. *Biologia vegetal*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 6.ed. p.31-34, 2002.

ROMAGNOLO, M.B.; SOUZA, M.C. de. O gênero *Eugenia* L. (Myrtaceae) na planície de alagável do Alto Rio Paraná, Estados de Mato Grosso do Sul e Paraná, Brasil. *Acta Botânica Brasileira*, v.20, n.3, p.529-548, 2006.

SALDAÑA, M.D.A.; MAZZAFERA, P.; MOHAMED, R.S. Extração dos alcalóides: cafeína e trigonelina dos grãos de café com CO₂ supercrítico. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, v.17, n.4, 1997.

SANTOS, R.I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Florianópolis: Editora da UFSC, p.333-336, 2001.

SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C.M.O. *et al.* *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Florianópolis: UFSC, p.397-417, 2001.

VOGEL, A.I. *et al.* *Análise química quantitativa*. Rio de Janeiro: LTC, 6.ed. 2002.