

**CENTRO FEDERAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA DE MINAS GERAIS
(CEFET-MG)**

Christianna Maria Vieira de Noronha Gonçalves Lemos

**CARACTERIZAÇÃO CROMATOGRÁFICA E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA
DO ÓLEO DE EUCALIPTO (*Eucalyptus* ssp.)**

Belo Horizonte (MG)

2020

Christianna Maria Vieira de Noronha Gonçalves Lemos

**CARACTERIZAÇÃO CROMATOGRÁFICA E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA
DO ÓLEO DE EUCALIPTO (*Eucalyptus ssp.*)**

Trabalho de conclusão de curso apresentado
como requisito parcial para a obtenção do título
de Bacharel em Química Tecnológica.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Fátima de Cássia
Oliveira Gomes.

Coorientadora: Prof^ª. Dra. Ana Maria de
Resende Machado.

CEFET-MG

Belo Horizonte (MG)

2020

Christianna Maria Vieira de Noronha Gonçalves Lemos

**CARACTERIZAÇÃO CROMATOGRÁFICA E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA
DO ÓLEO DE EUCALIPTO (*Eucalyptus* spp.)**

**Trabalho de conclusão de curso do Bacharelado em
Química Tecnológica
CEFET-MG**

Belo Horizonte, 2020

**Prof^ª. Dra. Fátima de Cássia Oliveira Gomes
(orientador – CEFET-MG)**

**Prof^ª. Dra. Ana Maria de Resende Machado
(coorientadora - CEFET-MG)**

**Prof. Dr. Cleverson Fernando Garcia
(avaliador - CEFET-MG)**

**Prof^ª. Dra. Fabiana da Conceição Pereira Tiago
(avaliadora – CEFET-MG)**

RESUMO

LEMOS, C.M.V.N.G.; GOMES, F. C. O.; MACHADO, A. M. R. Caracterização Cromatográfica e Atividade Antimicrobiana do Óleo de Eucalipto.

A madeira e outras partes da planta de eucalipto têm sido importantes para o provimento de matéria-prima para diversas finalidades. Suas espécies também são conhecidas pelo potencial uso para fornecimento de óleos essenciais, dos quais seu uso é amplamente empregado em cosméticos, alimentos e na indústria farmacêutica. O óleo essencial de eucalipto é um produto natural que apresenta diversas propriedades biológicas como antibacteriana, antifúngica e antioxidante. A resistência de microrganismos a antibióticos é atualmente um problema enfrentado pela indústria farmacêutica, com isso, faz-se necessário a busca de formas alternativas de agentes antimicrobianos. Diante do potencial antimicrobiano do óleo de eucalipto, é importante ampliar os estudos com relação a este assunto. Além disso, existem formas tradicionais de obtenção dos óleos essenciais, incluindo os óleos essenciais de eucalipto. Porém, esses métodos apresentam falhas quando se diz respeito à integridade do óleo e um bom rendimento do mesmo durante o processo de obtenção. Sendo assim, é pertinente pesquisar novas formas de obtenção afim de manter a qualidade do produto, comparando as técnicas clássicas (arraste a vapor e hidrodestilação) com técnicas alternativas (micro-ondas e fluido super crítico de CO₂). Neste trabalho foram abordadas diferentes formas de obtenção do óleo de eucalipto, sendo estas, extração a vapor, hidrodestilação, fluido supercrítico de CO₂ e micro-ondas, seguido das caracterizações do óleo por meio de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS) para identificar os compostos voláteis presentes. A atividade antimicrobiana, fundamental para testar a ação do óleo frente a diferentes microrganismos, também foi um fator de estudo no presente trabalho sendo abordadas as metodologias de difusão em disco e em poço. Desta forma, conclui-se que os métodos de extração alternativos obtêm um maior rendimento de óleo essencial de eucalipto e de maior qualidade, porém os métodos clássicos ainda são os de menor custo, além disso, os óleos essenciais de eucalipto responderam de forma positiva quando testados como agentes antimicrobianos.

Palavras-chave: Eucalipto; Óleo essencial; Atividade Antimicrobiana; Microrganismos; Composição química; GC-MS

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -Folhas, flores e exsicata do Eucalipto.....	11
Figura 2 - Esquema do conjunto destilador para óleos essenciais.....	14
Figura 3 - Esquema da técnica de extração por hidrodestilação usando aparelho do tipo Clevenger: (1) Balão de fundo, (2) Manta de aquecimento, (3) Condensador.....	18
Figura 4 - Diagrama do processo de extração por fluído super crítico	21
Figura 5 - Processo de extração de óleo essencial por de micro-ondas.....	25
Figura 6 - Representação esquemática da configuração experimental da metodologia de extração do óleo essencial de eucalipto por micro-ondas.....	25
Figura 7 - Esquema de um instrumento GC-MS típico capilar. O efluente do GC passa para a entrada do espectrômetro de massas, no qual as moléculas de gás presentes são fragmentadas, ionizadas, analisadas e detectadas	30
Figura 8 - Exemplos de terpenos alifáticos, mono- e bicíclicos, hidrocarbonetos e oxigenados	35
Figura 9 - Teste de sensibilidade pelo método de difusão em disco	39
Figura 10 - Teste de sensibilidade de <i>Staphylococcus epidermidis</i> em gentamicina pelo método de difusão em poço	40
Figura 11 - Potencial antimicrobiano do óleo essencial do <i>Eucalyptus globulus</i> pelo método de difusão em poço.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Rendimento dos óleos essenciais obtidos por hidrodestilação.....	16
Tabela 2 - Rendimento dos óleos essenciais de Eucalipto obtidos por hidrodestilação.....	18
Tabela 3 - Rendimentos obtidos com fluido supercrítico de folhas de eucalipto a partir de diferentes condições de temperatura, pressão e tempo.....	23
Tabela 4 - Rendimento obtido usando micro-ondas em diferentes potências.....	26
Tabela 5 - Efeito da potência do micro-ondas sobre o rendimento da extração do óleo essencial de <i>Eucalyptus microtheca</i>	27
Tabela 6 - Características e comparação entre as principais técnicas de extração de óleos essenciais de Eucalipto.....	27
Tabela 7 - Principais compostos identificados no óleo essencial de eucalipto.....	36
Tabela 8 - Atividade antimicrobiana do óleo de eucalipto do <i>Eucalyptus globulus</i> usando o método de difusão em disco.....	42
Tabela 9 - Resultado das zonas de inibição de crescimento bacteriano (média e desvio padrão em mm) por difusão em ágar de dois volumes diferentes dos óleos de eucalipto.....	43
Tabela 10 - Atividade antimicrobiana do <i>E. globulus</i> e padrões antibióticos contra fungos e bactérias.....	45

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	8
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
2.1	Eucalipto	10
2.2	Óleos essenciais	11
2.2.1	Obtenção do óleo essencial	13
2.2.1.1	Arraste a vapor	13
2.2.1.2	Hidrodestilação.....	17
2.2.1.3	Fluido supercrítico de CO₂.....	20
2.2.1.4	Micro-ondas	23
2.2.2	Caracterização do óleo	28
2.2.3	Composição química do óleo.....	33
2.3	Atividade Antimicrobiana.....	38
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS	46
4	REFERÊNCIAS	47

1 INTRODUÇÃO

Os produtos de origem vegetal e mineral são usados desde tempos remotos em rituais de cura, magia e religião, bem como na culinária e como cosméticos. As plantas aromáticas e seus óleos essenciais têm sido usados não apenas como medicamentos, mas também como aditivos de fragrâncias e para dar sabor nos alimentos, ou ainda como agente inseticida e conservantes naturais (PEREIRA, 2010a). A humanidade usa plantas há milhares de anos para tratar vários tipos de doenças. Em muitos países em desenvolvimento a população conta com médicos tradicionais e suas coleções de plantas medicinais para curá-los (MEHANI, LADJEL, 2012).

Eucalyptus é um gênero que pertence à família Myrtaceae, que inclui cerca de 900 espécies e subespécies. Estudos recentes abordam as propriedades funcionais dos extratos de eucalipto utilizados como óleo essencial. Os extratos de eucalipto apresentam vários efeitos biológicos, como antibacteriano, antifúngico, anti-hiperglicêmico e atividades antioxidantes (TYAGI e MALIK, 2011).

Atualmente, enfrenta-se problemas com relação ao aumento da resistência de microrganismos patógenos a antibióticos, o que coloca em risco a saúde pública, porque compromete a capacidade dos tratamentos de infecções bacterianas. Faz-se necessário, então, buscar formas alternativas para tratar doenças causadas por bactérias, como por exemplo, o uso de plantas medicinais e seus respectivos óleos essenciais, já que estas produzem metabolitos secundários, que apresentam atividade antimicrobiana (CIDRES, 2018).

A análise de plantas normalmente envolve um estágio de preparação da amostra, como extração ou destilação, seguida de análise por cromatografia gasosa ou cromatografia líquida (OZEL, KAYMAZ, 2004). Perdas de alguns voláteis compostos, baixa eficiência de extração, degradação de compostos insaturados por meio de efeitos térmicos ou hidrolíticos e resíduos de solvente tóxico no extrato podem ser encontrados com esses métodos de extração. Recentemente, métodos de extração mais eficientes, como extração com fluido supercrítico (SFE) e extração por micro-ondas têm sido usados para o isolamento de compostos orgânicos de várias plantas (SALIH, ÇELIKBIÇAK, 2010).

Esse trabalho se justifica em estudos anteriores que afirmam que óleos essenciais possuem ação antimicrobiana, dessa forma existe a possibilidade que o mesmo ocorra com o óleo essencial de eucalipto sendo necessário avaliar para quais espécies de microrganismos essa ação é válida. Foi construído por meio de uma revisão de literatura, sendo que as pesquisas partiram de outras monografias, teses, dissertações, artigos científicos e livros. Todos os

materiais de consulta foram publicados entre os anos de 2000 e 2020, com predominância e prevalência para os materiais publicados entre 2010 e 2020, devido a atualidade do tema e dos estudos.

Neste estudo buscou-se conhecer os diferentes métodos de extração do óleo essencial de eucalipto e avaliou a principal técnica analítica utilizada na caracterização da composição química deste óleo, bem como principais compostos já identificados no óleo de eucalipto. A atividade antimicrobiana, fundamental para testar a ação do óleo frente a diferentes microrganismos, também foi um fator de estudo no presente trabalho sendo abordadas as metodologias de difusão em disco e em poço.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Eucalipto

A palavra eucalipto deriva do grego *eu* (bem) e *kalypto* (cobrir) em referência ao opérculo que cobre as sementes até que estejam totalmente desenvolvidas. O eucalipto representa um gênero de plantas com flor da família Myrtaceae que agrupa diversas espécies conhecidas popularmente como eucalipto, mesmo que englobe espécies de outros gêneros. O eucalipto é uma espécie arbórea nativa, especialmente, da Austrália (VALVERDE, 2015).

No Brasil, a espécie *Eucalyptus globulus* Labill é conhecida especialmente como eucalipto, Eucalyptus, eucalipto-comum e eucalipto-limão. O Ministério da Saúde explica que em países da Europa, Estados Unidos, Austrália, África e Ásia, a espécie também é conhecida como eucalipto ou Eucalyptus. Além disso, na China e na Argélia, a espécie é conhecida como goma-azul e árvore-de-febre (MS, 2015).

As plantas do gênero *Eucalyptus* foram inseridas no Brasil em 1865, inicialmente com a espécie *Eucalyptus globulus*. Estas possuem folhas pecioladas e lanceoladas que podem ser usadas para a extração de óleo essencial (AGNOLIN, 2012).

Estudos com eucalipto no Brasil começaram em 1904 por Edmundo Navarro de Andrade (na Companhia Paulista de Estradas de Ferro), que introduziu várias espécies e origens do gênero no Jardim Jundiaí, São Paulo. O interesse por esses estudos surgiu devido às espécies de eucalipto apresentarem uma fácil adaptação a diferentes condições ambientais existentes no Brasil, que possui uma latitude semelhante à da Austrália. Atualmente é considerada uma das mais importantes espécies plantadas no país e em outras regiões tropicais e subtropicais do mundo (CASTRO *et al.* 2016).

O eucalipto trata-se de uma árvore de grande porte, podendo atingir até 90 metros de altura, de tronco liso, folhas perenes, lanceoladas e opostas, cobertas por glândulas oleríferas. A espécie possui flores de até 4 cm de diâmetro, solitárias ou em pequenos grupos, que possuem numerosos estames macios que podem ser branco, creme, amarelo, rosa ou vermelho. Os frutos apresentam-se em forma de cápsula de aproximadamente 3 cm. A casca possui coloração esverdeada, e apresenta fibras e estrias cujo grau varia de acordo com a idade da planta (BRASIL, 2015).

Figura 1 -Folhas, flores e excisata do Eucalipto



Fonte: Brasil (2015)

As características organolépticas das folhas adultas frescas incluem coloração verde escura, com odor característico, forma lanceolada, comprimento entre 10 e 15 cm e largura entre 2 e 4 cm. As flores podem atingir até 4 cm de diâmetro e apresentam estames macios cuja coloração pode variar entre branco, creme, amarelo, rosa e vermelho. Os frutos normalmente se apresentam em forma de cápsulas e a aparência das cascas varia de acordo com a idade da planta, podendo diferir no comprimento das fibras, no grau de estrias, na espessura, na dureza e na cor (BRASIL, 2015).

2.2 Óleos essenciais

Os óleos essenciais são substâncias lipossolúveis (substâncias solúveis em gorduras e óleos). Segundo Tavares (2016), normalmente são produzidos por estruturas secretoras especializadas das plantas, podendo ser encontradas em todas as suas partes, como das folhas, flores, frutos e raiz. Óleos essenciais em geral não são muito estáveis, evaporando-se com facilidade, por isso não é recomendado que se exponha a luz e ao calor, e seu uso deve ser feito após diluição em óleo fixo ou manteiga.

Os óleos essenciais são substâncias naturais, assim Silva (2017) discute que seu uso não agride o meio ambiente e a saúde humana. Portanto, são uma alternativa em substituição aos compostos químicos sintéticos, com casos de sucesso em decorrência da aplicação como no controle da ferrugem em videira e da antracnose do sorgo. Normalmente, os óleos essenciais são constituídos por moléculas de natureza terpênica, complexa de diversas classes de substâncias, dentre elas do fenilpropanóide, mono e sesquiterpeno, pertencentes ao metabolismo secundário das plantas.

Silva (2017) explica que nos vegetais, esses óleos puros apresentam toxicidade elevada, sendo recomendado o uso em pequenas dosagens onde desenvolvem funções que estão ligadas à sua volatilidade, agindo na proteção contra predadores e patógenos. Com isso, eles recebem atenção especial pela atuação como fungicida, herbicida, inseticida e nematicida.

Silva e colaboradores (2014) aponta que o óleo essencial também é conhecido como óleo volátil, óleo etéreo ou essência, sendo uma mistura complexa de substâncias voláteis, lipofílicas, normalmente odoríficas e líquida. O óleo essencial tem como característica principal a volatilidade, que o diferencia dos óleos fixos, sendo líquidos oleosos e aromáticos que são obtidos de material vegetal (flores, brotos, sementes, folhas, galhos, cascas, ervas, madeira, frutos ou raízes).

Óleos essenciais de plantas são conhecidos e usados desde alguns séculos antes de Cristo, especialmente em países como Egito, Pérsia, Japão, China e Índia. Vitti e Brito (2003) explicam que por volta do século XVIII se iniciou os estudos sobre a caracterização química dos óleos essenciais. Contemporaneamente diversas plantas são usadas para a produção de óleos essenciais com relevância econômica, sendo usadas desde plantas rasteiras como a hortelã, até plantas de porte arbóreo, como o eucalipto. A denominação óleos etéreos é referente ao fato de os mesmos serem solúveis em solventes orgânicos apolares, como o éter (VITTI, BRITO, 2003).

Segundo Pereira (2010b) estima-se existir 3000 óleos essenciais conhecidos pelo ser humano. Destes, 300 são de grande relevância comercial, e entre as plantas que contém óleos essenciais é possível citar as espécies de *Eucalyptus*, que pertencente à família *Myrtaceae*. Várias centenas de espécies de *Eucalyptus* contem óleos voláteis, embora provavelmente menos de 20 dessas espécies já tenham sido exploradas comercialmente para a produção de óleo essencial. Entre as espécies de *Eucalyptus* produtoras de óleos destacam-se *E. citriodora* (atualmente *Corymbia citriodora*), *E. globulos*, *E. polybractea* e *E. camaldulensis*.

Alcântara *et al.* (2019) afirmam que o óleo essencial de eucalipto é um líquido com aparência oleosa e de aroma agradável, sendo solúvel em solventes orgânicos apolares, apresentando sabor cítrico e sendo instável na presença de luz e ar, além de ser extremamente volátil. Aproximadamente 200 espécies de eucalipto são potencialmente usadas para a produção de óleos essenciais, dessas em torno de 20 possuem apelo comercial. Vitti e Brito (2003) descrevem que o óleo essencial de eucalipto se divide basicamente em três grupos principais, definidos com base no seu uso final: óleos medicinais, óleos industriais e óleos para perfumaria. O óleo essencial de eucalipto pode ser obtido usando diversas partes da planta, mas quando as folhas ou as cápsulas são usadas, ele apresenta maior qualidade. Alcântara *et al.* (2019)

explicam que diversos fatores impactam na obtenção do óleo, desde a idade da folha até o processo escolhido para a extração.

2.2.1 Obtenção do óleo essencial

Os óleos essenciais são substâncias que pertencem ao metabolismo secundário das plantas, aqueles que não estão relacionados com seu crescimento, desenvolvimento e reprodução. Esses óleos normalmente são produzidos por estruturas secretoras especializadas, como os pelos glandulares, canais oleíferos, as células parenquimáticas diferenciais ou em bolsões, que podem estar em todas as partes da planta. A extração dos óleos essenciais pode ocorrer de diversas maneiras, que se alteram conforme o *design* e a tecnologia das plantas de destilação, bem como a depender da espécie vegetal a ser extraído o óleo (AZAMBUJA, 2020).

Cartaxo (2020) explica que geralmente os óleos essenciais são obtidos por processos de hidrodestilação, destilação por arraste a vapor, destilação a seco ou por prensagem mecânica a frio de plantas. Quanto à hidrodestilação e a destilação por arraste a vapor, estas são técnicas que se diferenciam pelo fato de que durante a hidrodestilação, a amostra está em contato com a água, enquanto a destilação por arraste a vapor, a amostra fica em um recipiente separado do vapor (MAYO, PIKE e TRUMPER, 2000). As técnicas de hidrodestilação e arraste a vapor levam várias horas de aquecimento, que podem causar degradação dos compostos termolábeis presentes no material vegetal inicial e, levando à produção de odores e degradação. Além disso, universidades e indústrias buscam tecnologias inovadoras que podem reduzir o consumo de energia, atender aos requisitos legais sobre emissões de CO₂ e obter redução de custos e maior qualidade (CHEMAT e BOUTEKEDJIRET, 2015). O presente trabalho, apresenta algumas formas tecnológicas de extração de óleos essenciais, sendo estas micro-ondas e fluido super crítico de CO₂, além de abordar sobre as formas convencionais (destilação por arraste a vapor e hidrodestilação).

2.2.1.1 Arraste a vapor

O processo de destilação por arraste a vapor consiste em passar vapor à temperatura aproximada de 100°C por um leito fixo de massa verde da planta, interna a um vaso extrator. Pereira (2010b) explica que sob o efeito da temperatura do vapor em fluxo ascendente, acontece o rompimento das células odoríferas da planta aromática, em decorrência da elevação da pressão interna das células devido à vaporização parcial do óleo em seu interior. O óleo quando entra em contato com o vapor, é arrastado para a parte superior do vaso extrator até o

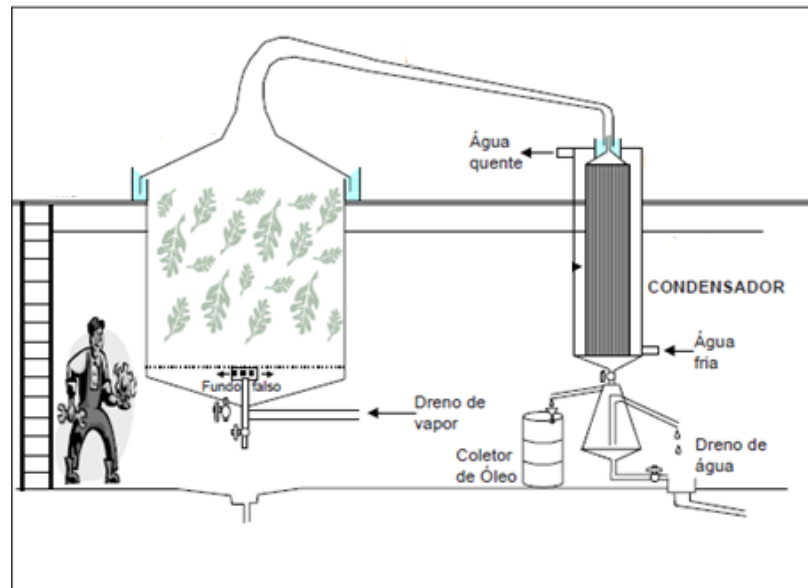
condensador. Isso acontece por causa da diferença de pressão entre a entrada de vapor no vaso extrator e o bocal de saída do produto do condensador. Do bocal de saída do condensador, água e óleo essencial em emulsão (o condensado) são conduzidos pelo efeito da gravidade ao vaso de decantação/separação, denominado de vaso Florentino, onde acontece a separação em fases. A parte do óleo essencial que se mantém emulsionado na água é denominada de hidrolato.

Steffens (2010) afirma que a indústria prefere esse tipo de processo por ser mais simples e econômico, permitindo tratar de uma única vez grandes quantidades de material vegetal. Além disso, ele é um processo tradicional para a obtenção dos óleos essenciais, que emprega as folhas e os caules das plantas aromáticas. Quando comparado com processos mais tecnológicos como a extração com fluido supercrítico, é um processo bem mais econômico.

Apesar das vantagens que apresenta, Steffens (2010) explica que o arraste a vapor possui inconvenientes e limitações. Nele, os constituintes dos óleos essenciais podem sofrer degradação térmica ou hidrólise, o que pode alterar o aroma do extrato e conseqüentemente impactar na reprodução das fragrâncias características das plantas aromáticas.

A extração do óleo essencial do eucalipto feita por destilação por arraste a vapor é formada basicamente por caldeira, condensador, separador e o coletor do óleo, como mostra a Figura 1. Vitti e Brito (2003) explicam que os equipamentos da destilação precisam apresentar proporções métricas entre si, desde a capacidade de produção de vapor da caldeira até o volume do separador de óleo. Assim, é preciso fazer um dimensionamento prévio do conjunto, tendo por base o volume da massa foliar a ser destilada e relacionando-a com o tempo de destilação.

Figura 2 - Esquema do conjunto destilador para óleos essenciais



Fonte: Adaptado de Vitti e Brito (2003).

Gilles *et al.* (2010) obtiveram o óleo essencial de diferentes espécies de eucalipto utilizando a destilação por arraste a vapor e também a hidrodestilação. Para a destilação por arraste a vapor foram medidos a massa de 100 g de amostras de folhas congeladas de *Eucalyptus olida*, *Eucalyptus dives* e *Eucalyptus staigeriana*, as folhas foram cortadas em tiras de 5 mm e submetidas a destilação a vapor indireto por 3 h. Coletou-se o óleo essencial com o auxílio de um funil de separação, transferiu-se para um frasco de cintilação antes de ser seco durante a noite em um dessecador, sendo armazenado a -18°C . O rendimento dos óleos essenciais variou de 2,13% a 3,12% (p/p), com base na massa do material fresco, para as diferentes espécies de eucalipto. O maior rendimento foi obtido a partir de *E. olida* (3,12%), seguido por *E. dives* (2,97%), enquanto *E. staigeriana* apresentou o menor rendimento em 2,13%.

Tolba e colaboradores. (2015) isolaram o óleo essencial de folhas secas de *E. citriodora*, o óleo essencial obtido foi seco sobre sulfato de sódio anidro e, após filtração, armazenado numa temperatura na faixa entre 4 e 8 $^{\circ}\text{C}$. A destilação rendeu um óleo de aspecto amarelo claro com rendimento de 2,26% p/p (base de peso seco). Identificou-se um total de 22 compostos a partir do método por GC-MS Cromatografia Gasosa–Espectrometria de Massas (GC-MS).

Bonora (2016) extraiu folhas de diversas espécies de eucalipto separadamente. Usou-se 100g de amostra, obteve-se uma mistura heterogênea de água e óleo essencial no coletor, e adicionou-se ainda 8 mL de diclorometano para recolher o óleo retido nas paredes do “*dean stark*”. A mistura de óleo essencial, água e diclorometano foi recolhida e realizou-se a separação adicionando 0,1 g de NaCl para aumentar a eficiência da migração do óleo para o diclorometano e então separar as duas fases distintas de água e diclorometano. Com o auxílio de um funil de

separação, o óleo essencial e o diclorometano foram isolados, resíduos de água foram retirados da fase orgânica, usando sulfato de anidro. O filtrado foi conduzido em um rotavapor para destilação à vácuo e, conseqüente separação do solvente e do óleo. Em seguida calculou-se o rendimento do óleo essencial por meio da razão entre a massa inicial (100 g de folhas) e a massa final do óleo extraído (g).

As espécies *Corymbia ptychocarpa*, *Eucalyptus saligna*, *Eucalyptus robusta*, *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus camaldulensis* apresentaram menor valor de rendimento. Observou-se rendimentos mais elevados para *Eucalyptus tereticornis*, *Eucalyptus resinífera*, *Eucalyptus exserta*, *Corymbia citriodora* e *Eucalyptus staigeriana* (Tabela 1).

Tabela 1 - Rendimento dos óleos essenciais obtidos por hidrodestilação

Espécie	Rendimento médio (%)
<i>Corymbia ptychocarpa</i>	0,021 ± 0,003
<i>Eucalyptus saligna</i>	0,109 ± 0,021
<i>Eucalyptus robusta</i>	0,118 ± 0,032
<i>Eucalyptus grandis</i>	0,181 ± 0,023
<i>Eucalyptus camaldulensis</i>	0,268 ± 0,057
<i>Eucalyptus tereticornis</i>	0,515 ± 0,144
<i>Eucalyptus resinífera</i>	0,587 ± 0,05
<i>Eucalyptus exserta</i>	0,613 ± 0,094
<i>Corymbia citriodora</i>	1,262 ± 0,173
<i>Eucalyptus staigeriana</i>	1,599 ± 0,243

Fonte: Adaptado de Bonora (2016)

Bonora (2016) explica que as espécies *E. staigeriana* e *C. citriodora* se destacaram, sendo os resultados coerentes com a literatura especializada, onde ambas se destacam por seus elevados rendimentos na extração de óleo essencial. Das espécies que apresentaram maior rendimento, somente *E. resinífera* e *E. exserta* não são empregadas normalmente na extração de óleos essenciais, e dentre os menores rendimentos, *E. camaldulensis* é a única espécie referenciada como fonte de óleo essencial.

Observando os rendimentos dos óleos para uma mesma espécie de eucalipto, Gilles e colaboradores (2010) obtiveram um maior rendimento para *Eucalyptus staigeriana* (2,13%) comparado ao menor rendimento (1,599%) obtido por Bonora (2016) utilizando o mesmo processo de obtenção do óleo.

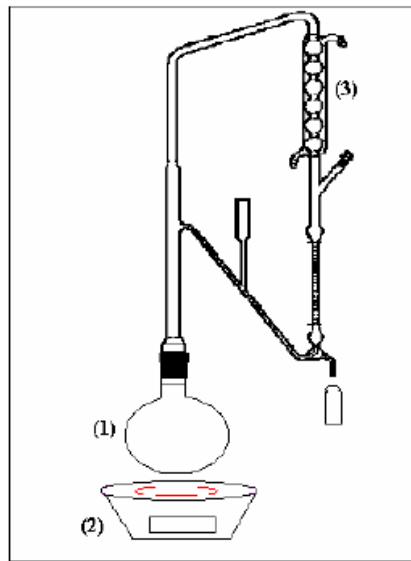
Diferenças, também foram observadas no rendimento dos óleos para as espécies *Eucalyptus citriodora* também denominada de *Corymbia citriodora* nos trabalhos de Tolba e colaboradores (2015) com rendimento de 2,26%. Enquanto que Bonora (2016) obteve um menor rendimento (1,262%). As diferenças nos rendimentos dos óleos se devem a diversos fatores, como o horário da coleta, a idade da planta e as condições edafoclimáticas, dentre outros.

2.2.1.2 Hidrodestilação

No método de hidrodestilação usa-se um aparelho do tipo Clevenger, Figura 2, no qual segundo Ministério da Saúde (2015), o material a ser destilado fica em contato direto com a água e, quando esta entra em ebulição, arrasta os compostos voláteis, inclusive o óleo que, ao condensar, forma uma mistura heterogênea, com duas fases, devido a diferença de polaridade e densidade entre a água e o óleo (BRASIL, 2015).

Dorsaf e colaboradores (2010) extraíram o óleo essencial de quinze espécies diferentes de Eucalipto: *Eucalyptus torquata*, *Eucalyptus leucoxyleba*, *Eucalyptus incressata*, *Eucalyptus intertexta*, *Eucalyptus transcontinentalis*, *Eucalyptus leucoxylon*, *Eucalyptus stricklandy*, *Eucalyptus dumosa*, *Eucalyptus striaticalyx*, *Eucalyptus oleosa*, *Eucalyptus gilii*, *Eucalyptus salubris*, *Eucalyptus cladocalyx*, *Eucalyptus bicolor* e *Eucalyptus brevifolia*. A extração foi realizada por hidrodestilação com o auxílio de um aparelho tipo Clevenger, durante 3 horas. Os óleos essenciais obtidos foram desidratados usando sulfato de sódio anidro e mantidos em um refrigerador para sua posterior análise da composição química por GC-MS. Os resultados mostraram que o rendimento médio varia de acordo com cada espécie, sendo 3,63% para *Eucalyptus dumosa*, a espécie que apresentou maior rendimento, e *Eucalyptus bicolor* 1,16%, espécie da qual apresentou menor rendimento. A Tabela 2 apresenta o rendimento das demais espécies.

Figura 3 - Esquema da técnica de extração por hidrodestilação usando aparelho do tipo Clevenger: (1) Balão de fundo, (2) Manta de aquecimento, (3) Condensador.



Fonte: Gomes (2003)

Apesar de os óleos essenciais apresentados na Tabela 1 serem procedentes de espécies diferentes daqueles apresentados na tabela 2, observou-se um maior rendimento quando se utilizou a hidrodestilação em comparação com a destilação por arraste a vapor.

Tabela 2 - Rendimento dos óleos essenciais de Eucalipto obtidos por hidrodestilação

Espécie	Rendimento g óleo essencial / 100 g folhas secas	Espécie	Rendimento g óleo essencial / 100 g folhas secas
<i>E. dumosa</i>	3,637	<i>E. intertexta</i>	1,880
<i>E. salubris</i>	3,363	<i>E. torquata</i>	1,867
<i>E. cladocalyx</i>	3,060	<i>E. oleosa</i>	1,750
<i>E. leucoxylon</i>	3,005	<i>E. inressata</i>	1,740
<i>E. gilii</i>	2,970	<i>E.transcontinentalis</i>	1,720
<i>E. striaticalyx</i>	2,787	<i>E. brevifolia</i>	1,605
<i>E. leuxophleba</i>	2,387	<i>E. bicolor</i>	1,163
<i>E. stricklandy</i>	1,990		

Fonte: Adaptado de Dorsaf *et al.* (2010)

Ghnaya e colaboradores (2013) realizaram extração por hidrodestilação de folhas de cinco árvores diferentes de *Eucalyptus erythrocorys* L., que foram misturadas para obter uma

amostra homogênea e secas ao ar livre durante 10 dias a 25°C. Usou-se 100 g da amostra em 500 mL de água destilada, e a extração foi realizada com um aparelho do tipo Clevenger durante 3 h. Os óleos extraídos foram secos usando sulfato de sódio anidro e armazenado em frascos de vidro selados a 4 °C. O óleo essencial obtido tinha uma cor amarelo claro, um odor forte e uma densidade de 0,9700 g/mL à temperatura ambiente. O rendimento do óleo foi de 0,9% (v/p; volume/peso seco).

Concomitantemente foi desenvolvido outro trabalho de extração de óleo de eucalipto, usando folhas de *Eucalyptus camaldulensis* e *Eucalyptus cineria* secas ao ar livre e protegidas da luz solar, moídas para obter um tamanho médio de 0,8 mm. A umidade do material vegetal foi quantificada pelo método de Karl Fischer, 10% p/p. Após a moagem, 100 g de matéria seca foram submetidas a hidrodestilação com 1 litro de água por 3 h, usando um aparelho tipo Clevenger. O destilado volátil foi coletado e seco por sulfato de sódio anidro e armazenado a 4 °C. Realizou-se triplicata. O rendimento global do óleo essencial extraído das folhas de *Eucalyptus cinerea* e *Eucalyptus camaldulensis* foram 23 e 6,2 g /kg, respectivamente (HERZI et al., 2013).

Costa e colaboradores (2015) usaram aproximadamente 100 g de folhas frescas de *Eucalyptus citriodora*, para obter o óleo essencial. A amostra foi submetida a hidrodestilação durante 3 horas, usando aparelho do tipo Clevenger, depois de obter cerca de 500 mL da mistura de óleo e água, o óleo essencial foi extraído usando pentano como solvente. Cinco extrações foram feitas com 30 mL de pentano, recuperando a fase orgânica. Nesta fase, adicionou-se sulfato de sódio anidro em excesso afim de remover a água da amostra, filtrando em seguida. O solvente foi separado do filtrado por um evaporador rotativo. O óleo essencial apresentou coloração verde clara e o rendimento foi de 2,9% (p/p), calculado em relação à massa seca.

Gakuubi (2016) realizou a extração do óleo essencial de *E. camaldulensis*. As folhas foram cortadas em pequenos pedaços de 10 a 15 cm, mediu-se a massa de 4 kg do material vegetal e transferiu-se para um destilador de um tanque de destilação de fundo plano acoplado a um aparelho do tipo cClevenger modificado. O material vegetal foi submetido a destilação a vapor, que perdurou de 5 a 8 horas. Os óleos foram coletados e secos com sulfato de anidro (Na₂SO₄). Quatro lotes rederam 0,2414% p/p. Identificou-se 54 compostos no óleo essencial extraído, com o auxílio de um equipamento GC-MS

Ribeiro et al. (2018) obtiveram o óleo essencial de folhas frescas de três espécies de Corymbia (*Corymbia citriodora*, *Corymbia henryi* e *Corymbia maculata*) e oito de Eucalipto (*Eucalyptus andrewsii*, *Eucalyptus resinifera*, *Eucalyptus sphaerocarpa*, *Eucalyptus*

phaeotricha, *Eucalyptus cinérea*, *Eucalyptus pyrocarpa*, *Eucalyptus punctata* e *Eucalyptus siderophloia*) e um híbrido (*Eucalyptus alba* x *Eucalyptus tereticornis*). Os óleos essenciais foram extraídos por hidrodestilação durante 3 h, em triplicata, usando um aparelho de Clevenger modificado. Cada repetição foi de 100 g de folhas (cortadas em pequenos pedaços) misturadas em 1 L de água destilada. O material vegetal foi armazenado em um freezer a $15 \pm 4^\circ\text{C}$ até a conclusão do procedimento de extração. Os óleos essenciais foram armazenados em frascos de vidro âmbar e mantidos a 5°C .

Os rendimentos dos óleos da espécie de *E. citriodora* obtidos por meio da destilação por arraste a vapor e por hidrodestilação foram melhores quando se utilizou o segundo processo, com rendimento de 2,9% (Costa et al., 2015) em relação aos rendimentos obtidos por Tolba e colaboradores (2015) (2,26%) e Bonora (2016) que obteve um menor rendimento (1,262%).

2.2.1.3 Fluido supercrítico de CO₂

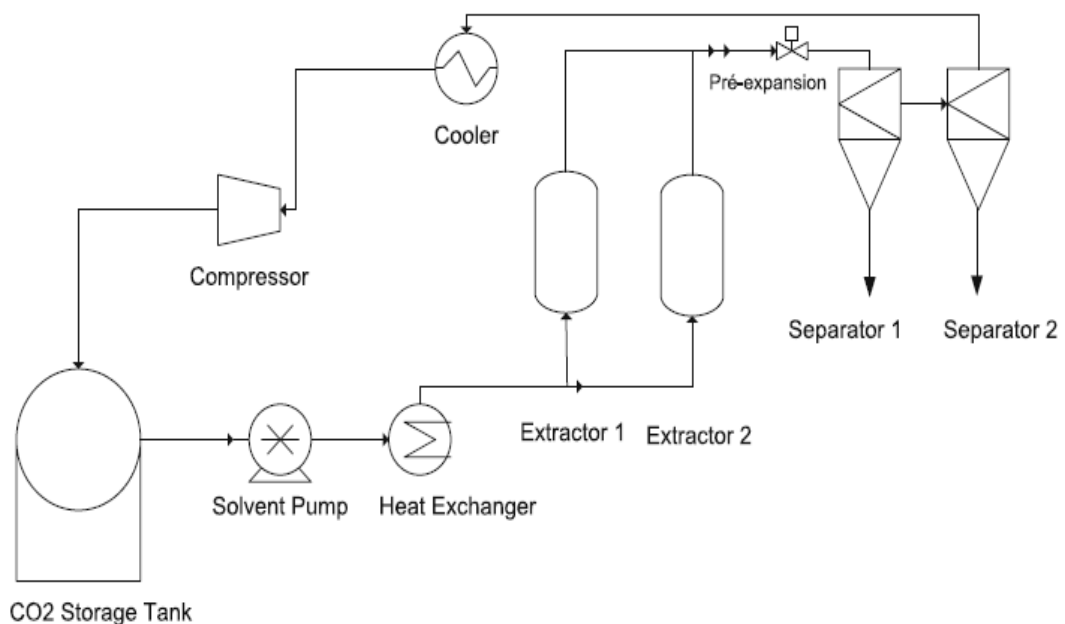
No método de extração por fluido supercrítico, Santos (2016) explica que os gases acima de uma determinada temperatura e pressão passam para um estado intermediário entre o líquido e o gasoso, ou seja, se tornam supercríticos, podendo então agir como solventes. Diversas substâncias podem ser usadas como solventes supercríticos como o metano, o etano e o etileno. Entretanto, o CO₂ normalmente é o escolhido, pois apresenta facilidade de separação de soluto, é extremamente volátil, não tóxico, não é inflamável, relativamente barato e não possui odor.

Conde-Hernández *et al.* (2017) afirmam que a extração com CO₂ supercrítico, como método alternativo para extração de solventes, pode reter os componentes do óleo essencial sem qualquer mudança ou degradação. Além disso, este solvente pode também remover compostos indesejáveis. As condições de extração podem se diferenciar de acordo com uma série de variáveis que podem mudar, dependem, por exemplo, do material biológico e do tipo de equipamento. Em relação aos materiais biológicos, as plantas podem diferir na composição dependendo da estação, condições de cultivo, variedade de espécies. No caso, o tipo de equipamento pode influenciar dependendo se for de uma marca comercial ou construído em bancada, sendo assim podem ter instrumentação diferente para controlar variáveis como pressão (medidores de pressão), temperatura (medidores de temperatura), fluxo de gases, entre outros. De qualquer forma, as condições de trabalho devem ser adaptadas para cada biomaterial e fluidos usados para a extração.

Um sistema de extração por fluido supercrítico simples consiste basicamente em duas etapas principais: (1) extração das substâncias solúveis do substrato pelo solvente e (2)

separação destes compostos do solvente supercrítico após a expansão. O processo de extração é ilustrado na Figura 3. Primeiro, o solvente é alimentado em (bomba de solvente e troca de calor) o extrator (extrator 1 ou 2) é uniformemente distribuído ao longo do leito fixo formado pelo substrato sólido. Durante a extração, o solvente flui através do leito e dissolve os compostos solúveis. A mistura solvente-soluto é separada nos tanques “flash” (separadores 1 e 2) por uma rápida redução da pressão e aumento de temperatura, ou ambos. O solvente é resfriado, comprimido e retorna ao extrator. A extração pode ser descrita da seguinte forma: (1) o substrato sólido absorve o solvente supercrítico promovendo a dilatação das estruturas celulares. Esta etapa facilita o fluxo do solvente diminuindo a resistência à transferência de massa; (2) ao mesmo tempo, os compostos solúveis são dissolvidos pelo solvente; (3) os compostos dissolvidos são transferidos por difusão para a superfície do sólido; e (4) os compostos são transportados pelo solvente e, em seguida, removidos do extrator (PEREIRA, MEIRELES, 2009).

Figura 4 - Diagrama do processo de extração por fluido super crítico



Fonte: Pereira e Meireles (2009)

Herzi *et al.* (2013) realizaram uma extração piloto com fluido supercrítico, que é composto de um extrator de aço inoxidável de 200 mL, que foi carregado com 50 g de folhas secas de *Eucalyptus camaldulensis* e *Eucalyptus cineria*. O sistema foi operado em uma temperatura constante de 40°C e pressão de 90 bar. Durante as análises, as oscilações de temperatura e pressão foram de ± 2 unidades (°C e bar). O CO₂ puro foi passado para a célula

durante 30 min com o fluxo e a taxa mantidos constante em 20 g min⁻¹ em todas as execuções. Cada experimento foi triplicado usando um novo material biológico de eucalipto. A recuperação do extrato foi feita por meio de três separadores ciclônicos colocados em série em pressões decrescentes. O primeiro e o segundo separadores foram fixados em 50 bar e o terceiro em 2 bar. As pequenas quantidades dos extratos obtidos foram recuperadas lavando o piloto com etanol. Os extratos foram concentrados em um evaporador rotativo sob pressão reduzida a 35°C. Os rendimentos globais de cada espécie obtida foram 27,5 e 8,8 g/kg para *Eucalyptus cinerea* e *Eucalyptus camaldulensis*, respectivamente.

Zhao e Zhang (2014) realizaram a extração de folhas secas de *Eucalyptus loxophleba* ssp. *lissophloia*. Mediu-se a massa de 5 g de eucalipto, transferiu-se para um recipiente de extração SC-CO₂ com capacidade para 50 mL. Ambas as extremidades do extrator foram envolvidas por cerca de 1 g de lã de vidro para impedir o arrastamento do substrato. A extração começou assim que a pressão e a temperatura desejadas foram atingidas, a taxa de fluxo do gás expandido CO₂ (sob pressão atmosférica e temperatura ambiente de 20°C) foi fixada em 2 L/min em todas as execuções. Tais condições de extração foram determinadas com base em um conjunto de testes experimentais preliminares, onde a taxa de fluxo de solvente variou de 1,0 a 4,0 L/min, e considerou-se a taxa de 2 L/min mais adequada para esse ensaio. O extrato foi coletado em etanol e transferido para um frasco âmbar. Para melhorar a eficiência da coleta, o frasco foi colocado em banho de gelo durante a etapa de extração dinâmica, que também atuou para minimizar a perda de compostos voláteis, pois a sublimação do CO₂ diminui a temperatura do solvente de coleta. Os tubos de conexão foram lavados com etanol para a remoção dos precipitados e, em seguida, misturou-se ao extrato coletado no frasco âmbar. A mistura foi feita até atingir 10 mL e 1 mL foi retirado para análise de GC-MS, o restante foi colocado em um evaporador rotativo para remover o solvente de etanol, e então mediu-se a massa dos extratos. O rendimento de extração estimado está representado na equação 1:

Cálculo de rendimento do extrato obtido por extração de fluido super crítico

$$\text{Rendimento do extrato (\%)} = \frac{\text{massa total do extrato}}{\text{massa das folhas secas}} \times 100\%$$

Equação 1

Aplicou-se um projeto para determinar a melhor combinação de variáveis de processo para a extração de fluido supercrítico do óleo de folhas de eucalipto. As variáveis independentes estudadas foram pressão (10–50 MPa), temperatura (40–80°C) e tempo de extração (30-150

min), enquanto a variável de resposta era o rendimento do óleo. Os dados dos rendimentos dos óleos e as variações das condições do processo de extração em fluido supercrítico estão apresentados na Tabela 3. Os rendimentos representam a média de pelo menos três medições sob as mesmas condições. Observou-se que o melhor rendimento se deu com as condições de pressão, temperatura e tempo de extração de 40 Mpa, 70 °C e 120 min, respectivamente, enquanto o menor rendimento foi com 10 Mpa, 60 °C e 90 min, respectivamente.

Os óleos obtidos pelo processo de fluido supercrítico apresentaram um maior rendimento em relação às técnicas clássicas de obtenção do óleo, além de elevada pureza, e sem necessidade de purificação, uma vez que não se utiliza solventes no processo. O principal inconveniente desta técnica é que além das substâncias voláteis outros constituintes da planta de massa molar mais elevada, também podem ser extraídos, além disso o elevado custo de operação torna a técnica pouco utilizada.

Tabela 3 - Rendimentos obtidos com fluido supercrítico de folhas de eucalipto a partir de diferentes condições de temperatura, pressão e tempo

Ensaio	Fatores			Rendimento (%)
	Pressão (Mpa)	Temperatura (°C)	Tempo (min)	
1	40	70	60	4,66
2	50	60	90	4,62
3	20	50	120	3,50
4	30	60	90	4,04
5	30	60	30	2,73
6	30	60	150	4,39
7	10	60	90	0,99
8	20	50	60	2,99
9	40	50	60	3,39
10	30	60	90	3,96
11	20	70	120	3,06
12	30	80	90	4,44
13	30	60	90	4,29
14	20	70	60	2,51
15	30	60	90	4,18
16	30	60	90	4,26
17	40	50	120	4,45
18	40	70	120	4,78
19	30	60	90	3,91
20	30	40	90	3,31

Fonte: Adaptado de Zhao e Zhang (2014)

2.2.1.4 Micro-ondas

As micro-ondas são radiações eletromagnéticas cuja frequência situa-se entre 300 MHz e 300 GHz, o que corresponde a comprimento de onda de 1 mm a 1 m. A radiação

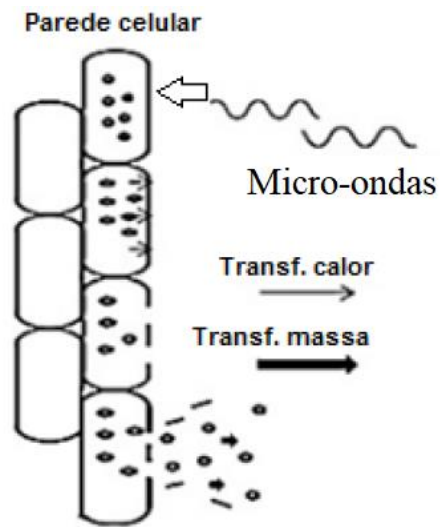
eletromagnética é uma energia não ionizante, ou seja, aquelas que não afetam as ligações químicas e nem causam alterações moleculares devido à remoção de elétrons (RIBEIRO, 2018).

Ribeiro (2018) ainda explica que as radiações eletromagnéticas da energia de micro-ondas são um resultado da ação de dois campos perpendiculares: um campo elétrico e um campo magnético. As micro-ondas de modo, particularmente, tem a capacidade de atuar nas moléculas do material exposto a elas por meio de dois mecanismos: a rotação dipolar e a condução iônica. Esses mecanismos são responsáveis pelo aquecimento do material por meio da conversão da energia eletromagnética em calor. A rotação dipolar acontece devido a aplicação de um campo elétrico que promove o alinhamento das moléculas com momento dipolo e, quando essas moléculas voltam ao seu estado desordenado, a energia que foi absorvida durante seu alinhamento é dissipada sob a forma de calor. Esse processo de alternância entre o alinhamento e o relaxamento das moléculas acontece milhares de vezes por segundo, gerando calor por atrito molecular. Já o mecanismo de condução iônica, é gerado por meio do campo eletromagnético que promove a migração de íons que são atraídos pelos polos de sinais opostos. A alternância entre os polos que acontece milhares de vezes por segundo, resultando na colisão dos íons entre si e com moléculas não ionizadas, gera calor por fricção. Assim, com o aquecimento por micro-ondas, ou aquecimento dielétrico como também pode ser denominado, o calor é gerado uniformemente no interior da matriz, direcionando-se para a sua superfície.

Com a energia que é convertida em calor aumentando a temperatura interna das células da matriz e elevando a pressão interna, existe o rompimento de membranas e liberação do óleo essencial. A Figura 4 esquematiza todo esse processo.

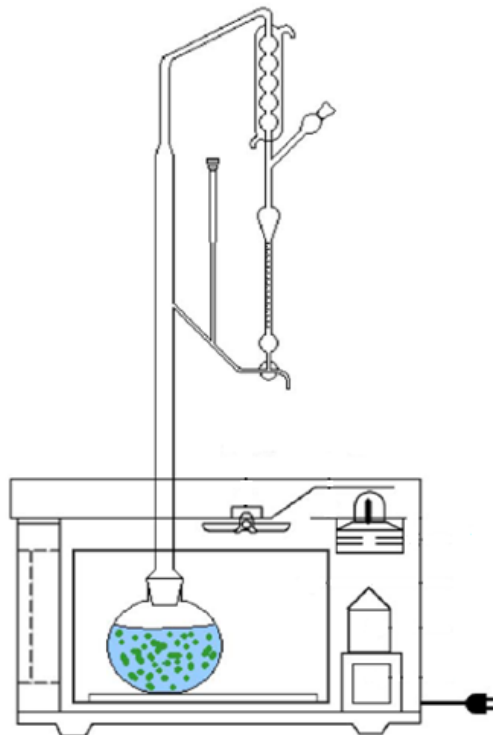
Gunes e Alma (2010) obtiveram o óleo essencial de *Eucalyptus camaldulensis* a partir da metodologia de extração por micro-ondas. A Figura 5 mostra de forma esquemática a configuração experimental usada para obter o óleo por meio de aquecimento por micro-ondas. Extraíu-se o óleo essencial a partir de 50 g de folhas misturadas a 100 mL de água. Um magnetron de 2.455 MHz foi usado para fornecer energia de micro-ondas em três níveis diferentes para a mistura folha-água. Conectou-se um aparelho do tipo Clevenger a um copo de fundo redondo colocado no forno de micro-ondas. O excesso da água foi refluxado para o vaso de extração para restaurar a água para o material vegetal.

Figura 5 - Processo de extração de óleo essencial por de micro-ondas



Fonte: Ribeiro (2018)

Figura 6 - Representação esquemática da configuração experimental da metodologia de extração do óleo essencial de eucalipto por micro-ondas



Fonte: Adaptado de Gunes e Alma (2010)

O óleo essencial de *Eucalyptus camaldulensis* foi coletado às três potências diferentes, 300, 600 e 900 W, durante 20 min, e desidratado sob sulfato de sódio anidro e armazenado a -8°C até o uso. Os resultados estão representados na Tabela 4.

Tabela 4 - Rendimento obtido usando micro-ondas em diferentes potências

	Potência (W)		
	300	600	900
Rendimento (%)	0,21	0,30	0,48

Fonte: Adaptado de Gunes e Alma (2010)

Os resultados mostraram que rendimento do óleo aumentou com o aumento da potência utilizada no processo, assim o maior rendimento foi obtido na potência de 900 W.

Hashemi-Moghaddam e colaboradores (2013) realizaram a extração das folhas secas de *Eucalyptus microtheca*. O forno de micro-ondas usado foi fornecido pela marca Samsung (Coréia do Sul) operando a 2450 MHz. A potência máxima do forno foi regulada em 1000W. Para examinar o efeito da potência de micro-ondas, quatro níveis foram estudados: 90% (900 W), 70% (700 W), 50% (500 W) e 30% (300 W). As dimensões da cavidade interna do forno foram de 29×37×40 cm. Modificou-se um forno de micro-ondas fazendo um furo no topo, um frasco de fundo plano com capacidade de 1000 mL foi colocado no forno e conectado a um aparelho do tipo Clevenger através do orifício. Após o aparelho de Clevenger ser colocado no forno, o orifício ao redor do gargalo do frasco foi coberto com politetrafluoretileno (Teflon) para evitar vazamento de micro-ondas. Mediu-se a massa de 50 g de folhas secas de *Eucalyptus microtheca* que foram embebidas em 500 mL de água destilada à temperatura ambiente (25 °C) por 1 hora para hidratar as camadas externas do material vegetal e o excesso de água foi drenado. O tempo de imersão, durante o qual a quantidade máxima de absorção é alcançável, foi determinado a partir de um experimento preliminar. O material vegetal umedecido foi colocado no frasco de fundo plano. Durante o processo, o vapor passou continuamente pelo condensador localizado na parte externa da cavidade do micro-ondas onde foi condensado. O processo foi realizado por diferentes condições de tempo, e realizou-se diversas repetições até que nenhum óleo fosse extraído, os testes foram feitos em duplicata. O óleo essencial foi coletado em frascos âmbar, desidratado com sulfato de sódio anidro, tampado sob nitrogênio e mantido a 4 °C até a análise. O rendimento do óleo essencial foi expresso em termos do volume do óleo coletado em mL/g de material vegetal original. Observou-se que o rendimento do óleo

essencial diminuiu com o aumento da potência de micro-ondas, e também com o maior tempo de processamento. Os rendimentos foram expressados na Tabela 5.

Tabela 5 - Efeito da potência do micro-ondas sobre o rendimento da extração do óleo essencial de *Eucalyptus microtheca*

Potência (W)	Rendimento (%)		
	Tempo (min)		
	10	20	180
300	1,72	1,44	-
500	1,10	1,10	-
700	0,66	0,20	-
900	0,20	-	-

Fonte: Adaptado de Hashemi-Moghaddam *et al.* (2013)

Os resultados apresentados para o rendimento dos óleos de espécies de eucalipto diferentes, *Eucalyptus camaldulensis* e *Eucalyptus microtheca* utilizando o processo de extração por micro-ondas mostraram resultados contraditórios referentes ao rendimento e a potência utilizada.

Comparando os rendimentos dos óleos obtidos na extração por micro-ondas com as técnicas clássicas de obtenção do óleo, observou-se que os rendimentos são semelhantes, mas um pouco melhores do que aqueles apresentados nos processos de hidrodestilação e destilação por arraste a vapor. E comparando os diferentes métodos de extração do óleo da espécie de *Eucalyptus camaldulensis*, observou-se que o maior rendimento (0,88%) foi quando o óleo foi extraído por fluido supercrítico (Herzi et al. 2013) em seguida por extração em micro-ondas (Gunes e Alma, 2010) com rendimento de 0,48% e por último 0,268% por arraste a vapor.

Tabela 6 - Características e comparação entre as principais técnicas de extração de óleos essenciais de Eucalipto

Principais técnicas de extração e suas características				
Técnica	Características			
Arraste a vapor	Amostra separada do vapor	Técnicas comumente utilizadas (clássicas)	Várias horas de aquecimento	
Hidrodestilação	Amostra em contato com a água			
Fluido Super Crítico CO₂	CO ₂ possui melhor custo benefício	Remoção dos compostos indesejáveis	Sem mudança ou degradação da amostra	Extração de componentes de massa molar mais elevada

Micro-ondas	Rendimentos um pouco melhores do que as técnicas clássicas			

Fonte: Autoria própria

A Tabela 6 apresenta um compilado das principais informações coletadas no presente trabalho quanto às características das principais técnicas de extração dos óleos essenciais de Eucalipto bem como suas vantagens e desvantagens afim de comparação entre as técnicas com o objetivo de facilitar a conclusão quanto à técnica mais adequada e de melhor custo benefício.

2.2.2 Caracterização do óleo

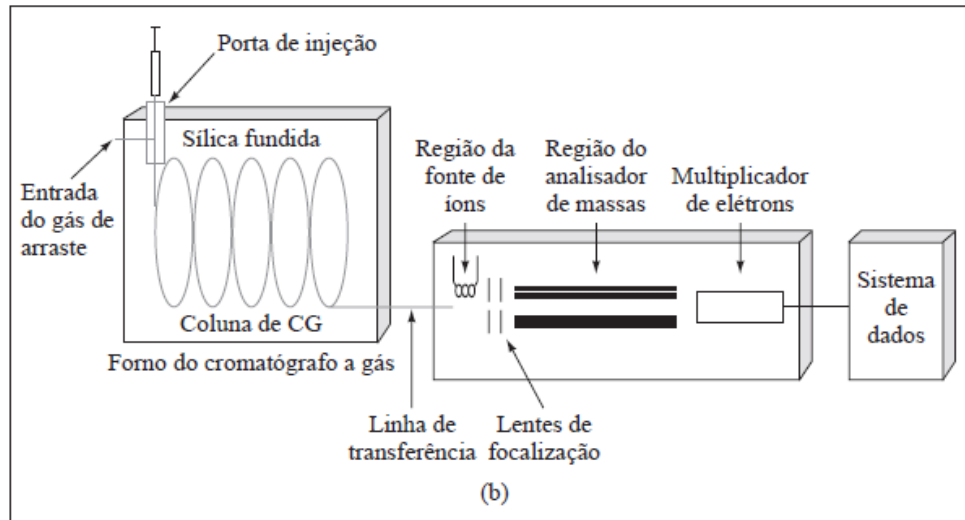
A cromatografia gasosa (CG) acoplada à espectrometria de massas (ES) é recomendada para analisar óleos essenciais por permitir maior segurança na identificação dos picos individuais e controlar a pureza de um pico cromatográfico. Segundo Santos (2016) um importante método na análise de substâncias orgânicas. Enquanto a cromatografia gasosa separa os componentes de uma mistura, a espectroscopia de massas caracteriza cada um dos componentes de forma individualizada. A combinação das duas técnicas permite tanto uma análise qualitativa como quantitativa e avalia uma solução contendo uma série de compostos químicos. Santos (2016) ainda explica que essa técnica permite a separação dos componentes fornecendo um espectro de massas para cada pico, que normalmente indica a massa molar e o padrão de fragmentação. Sendo que esse último pode ser comparado com aqueles constantes em uma biblioteca de espectros de massas que normalmente é instalada em um computador.

Na análise da CG-EM uma quantidade pequena da amostra a ser analisada é injetada no cromatógrafo a gás. A amostra é vaporizada e introduzida em um fluxo de um gás adequado denominado de fase móvel (FM) ou gás de arraste – específico para cada detector. Este fluxo de gás com a amostra vaporizada passa por um tubo contendo a fase estacionária FE (coluna cromatográfica), onde ocorre a separação da mistura. A FE pode ser um sólido adsorvente (Cromatografia Gás-Sólido) ou, mais comumente, um filme de um líquido pouco volátil, suportado sobre um sólido inerte (Cromatografia Gás-Líquido com Coluna Empacotada ou Recheada) ou sobre a própria parede do tubo (Cromatografia Gasosa de Alta Resolução). As substâncias são separadas da coluna dissolvida no gás de arraste e passam por um detector; dispositivo que gera um sinal elétrico proporcional à quantidade de material diluído. O registro deste sinal em função do tempo é o cromatograma, sendo que as substâncias aparecem nele como picos com área proporcional à sua massa, o que possibilita a análise quantitativa. A CG é aplicável para separação e análise de misturas cujos constituintes tenham pontos de ebulição de até 300°C e que sejam termicamente estáveis (SANTOS, 2016, p.33).

A vantagem da junção de um equipamento cromatográfico a um espectrômetro de massas é que misturas complexas podem ser analisadas detalhadamente por interpretação espectral dos compostos separados. O acoplamento de um cromatógrafo a gás com um espectrômetro de massas é a técnica mais utilizada e bem estabelecida para a análise de óleos essenciais, devido ao desenvolvimento de ferramentas fáceis de manusear, sistemas poderosos de sensibilidade, aquisição e processamento de dados e um custo relativamente baixo. A grande maioria das aplicações da cromatografia gasosa hifenada à espectrometria de massas do inglês *gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS)* de hoje utiliza GC capilar unidimensional com detecção de MS quadrupolo e ionização de elétrons. A Figura 6 apresenta o esquema completo de GC-MS, onde a amostra é injetada no capilar do GC e o efluente penetra em uma entrada de um espectrômetro de massas tipo quadrupolo. As moléculas são fragmentadas e ionizadas pela fonte e analisadas e detectadas pelo multiplicador de elétrons (SKOOG, HOLLER e CROUCH, 2006).

Para a realização do seu trabalho de determinação do potencial de rendimento de diferentes espécies de eucalipto, Pereira (2010b) usou um cromatógrafo a gás equipado com detector de ionização em chama (DIC) e coluna capilar de sílica fundida (30m x 0,25mm, espessura do filme de 0,25 μ m) com as seguintes condições cromatográficas: gás de arraste N₂ sob fluxo de 1,8 mL min⁻¹; temperatura do injetor de 220°C; temperatura do detector de 240°C; temperatura inicial da coluna de 40°C, isotérmica por 4 minutos, seguido de aquecimento a 3°C min⁻¹ até 240°C, permanecendo isotérmica por 15 minutos; volume de injeção da amostra: 1,0 μ L (10 mg mL⁻¹ em CH₂Cl₂); razão de “Split”, 1:10; pressão da coluna, 115 kPa.

Figura 7 - Esquema de um instrumento GC-MS típico capilar. O efluente do GC passa para a entrada do espectrômetro de massas, no qual as moléculas de gás presentes são fragmentadas, ionizadas, analisadas e detectadas



A amostra é injetada no capilar da CG e o efluente penetra em uma entrada de um espectrômetro de massas tipo quadrupolo. As moléculas são fragmentadas e ionizadas pela fonte e analisadas e detectadas pelo multiplicador de elétrons.

Fonte: Skoog, Holler e Crouch, 2006

As análises foram realizadas em triplicata e a concentração de cada constituinte foi calculada usando a porcentagem da área do pico correspondente em relação a área total de todos os picos observados no cromatograma. Para a identificação dos componentes dos óleos essenciais, Pereira (2010b) usou um aparelho equipado com coluna de sílica fundida (30m x 0,25mm, espessura de filme de 0,25 μ m) e acoplado a espectrômetro de massas. As condições cromatográficas foram idênticas àquelas usadas no CG-DIC, exceto o gás de arraste, que foi o He, e a pressão da coluna, que foi 100kPa. Com relação ao espectrômetro de massas, o processo de ionização foi por impacto de elétrons (70 eV) e a amplitude de varredura que foi de 30 a 700 Da. A identificação dos compostos foi feita pela comparação dos espectros de massas obtidos experimentalmente com os disponíveis na base de dados do equipamento (Wiley sétima geração) e também pela comparação do índice de retenção relativo calculado a partir da injeção de uma mistura de alcanos lineares (C₉ – C₂₆) com os encontrados na literatura.

Ghnaya e colaboradores (2013) investigaram a composição do óleo de *Eucalyptus erythcorys* por GC e GC/MS. A análise cromatográfica foi realizada em um cromatógrafo gasoso equipado com detectores de ionização de chama do inglês *flame ionization detector* (FID) e uma coluna capilar de sílica fundida, apolar e polar (30 m, 0,25 mm, e espessura do

filme de 0,25 mm). A temperatura do forno foi mantida a 50 °C por 1 min e depois programada a uma taxa de 5 °C/min a 240 °C e mantida isotérmica por 4 min. O gás transportador foi o nitrogênio a uma taxa de fluxo de 1,2 mL/min; a temperatura do injetor era de 250 °C e do detector de 280 °C; o volume injetado foi de 0,1 mL de solução a 1% (diluída em hexano). As porcentagens dos constituintes foram calculadas por integração eletrônica das áreas do pico do FID sem o uso de correção do fator de resposta. Uma coluna capilar HP-5 MS (30 m, 0,25 mm i.d., espessura de filme de 0,25 mm) foi acoplada diretamente ao MS. O gás de arraste foi o hélio, com vazão de 1,2 mL/min. A temperatura do forno foi programada para: 50 °C por 1 min, então 50–240 °C a 5 °C/min e manteve-se isotérmico por 4 min. A porta do injetor estava em 250 °C, detector 280 °C e a razão de divisão 1:50. O volume injetado foi de 0,1 mL de solução a 1% (diluída em hexano); o espectrômetro de massas registrando a 70 eV; tempo de varredura 1,5 s; faixa de massa 40–300 amu. O *software* adotado para lidar com espectros de massas e os cromatogramas foi o ChemStation. A identificação dos compostos foi baseada em espectros de massas (em comparação com Wiley 6ª edição). A confirmação adicional foi feita a partir de dados do índice de retenção gerados a partir de uma série de índices de retenção de alcanos (relativos a C₉-C₂₈).

Hashemi-Moghaddam e colaboradores (2013) estudaram a composição do óleo de *Eucalyptus microtheca*, por meio de análises de GC que foram realizadas em um cromatógrafo de gás Varian (CP 3800) equipado com um injetor *split/splitless* (20:1) (250 °C) e um detector de ionização de chama (250°C). O nitrogênio foi usado como gás de arraste (1 mL/min). A coluna capilar usada foi CP-Sil 5 CB (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm de espessura de filme). A temperatura do forno foi mantida a 60°C por 3 min, depois aquecida a 220°C com uma taxa de 7 °C/min e mantida constante a 220°C por 5 min. Os dados quantitativos foram obtidos a partir da porcentagem da área do GC-FID. As determinações de GC-MS foram realizadas em um sistema GC acoplado a um detector seletivo de massa de rede e equipado com uma coluna de sílica fundida capilar HP5-MS (30 m × 0,25 mm i.d. × 0,32 µm de espessura de filme). As condições operacionais foram as mesmas descritas acima, mas o gás transportador era hélio com taxa de fluxo de 1 mL/min. Os espectros de massas foram obtidos a 70 eV e foram registrados na faixa de m/z 20-500 amu. Todas as medidas cromatográficas foram realizadas em triplicata e levou-se em consideração a média dos tempos de retenção e a composição percentual de cada componente. Os tempos duplicados eram descartados se diferissem por mais de 1 segundo e os experimentos foram repetidos novamente em duplicata.

Zhao e Zhang (2014) analisaram a composição do óleo de *Eucalyptus loxophleba* ssp. *Lissophloia* usando um cromatógrafo de gás equipado com um detector seletivo de massas e

uma coluna HP-5MS (coluna 30 x 0,25 mm (5% -Fenil) -metilpolisiloxano, espessura de filme 0,25 μm). As configurações de GC foram as seguintes: A temperatura do forno foi mantida a 40 °C por 5 minutos e então aumentada para 250°C a 2 °C/min e mantida a 250°C por 30 minutos. Cada amostra (1 μL) foi injetada na coluna em uma proporção de divisão de 20:1. O hélio foi usado como gás de arraste a uma taxa de fluxo de 1,0 mL/min. As temperaturas da fonte de íons e da linha de transferência foram de 230°C e 250°C, respectivamente. O espectrômetro de massas foi operado no modo de ionização por impacto de elétrons a um nível de energia de 70 eV. O intervalo de varredura foi de 40-650 amu e a taxa de varredura foi de 0,2 s/varredura. As composições percentuais dos compostos identificados foram calculadas a partir da área do pico do GC sem considerar fatores de resposta. Os índices de retenção foram determinados em relação a uma série homóloga de n-alcenos ($\text{C}_8\text{-C}_{40}$) nas mesmas condições operacionais. Os componentes do óleo foram identificados comparando seus espectros de massas com a biblioteca de espectros MS do NIST (Instituto Nacional de Padrões e Tecnologias). Os compostos também foram confirmados pela comparação de seus índices de retenção com os dados publicados na literatura.

Tolda e colaboradores (2015) analisaram os compostos voláteis presentes no óleo essencial de *Eucalyptus citriodora*. O óleo essencial foi analisado por GC-MS equipado com uma coluna capilar de sílica fundida (30 m, 0,25 mm i.d., 0,25 mm de espessura de filme). Os espectros no GC-MS foram obtidos usando as seguintes condições: gás transportador, hélio; taxa de fluxo, 0,5 mL/min; modo, divisão (50:1); volume de injeção, 1 mL; temperatura de injeção, 250°C; programa de temperatura do forno, 60°C por 8 min, e então aumentada a 2°C /min até atingir 250°C e mantida a 250°C por 15 min; modo de ionização, impacto eletrônico a 70 eV. O índice de retenção (IR) de todos os constituintes foi determinado pelo método de Kovats por co-injeção das amostras com uma solução contendo a série homóloga de n-alcenos ($\text{C}_8\text{-C}_{24}$) na coluna. A identificação dos componentes foi feita por interpretação visual, comparando seus índices de retenção e espectros de massas com dados publicados na literatura e combinando seus espectros de massas registrados com espectros de referência na biblioteca de computador (Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia [NIST] e bibliotecas Wiley). A quantificação equivale ao cálculo da contribuição percentual de cada composto sobre o valor total presente.

Azadbakht e colaboradores (2018) analisaram a composição química do óleo de *Eucalyptus globulus*. O óleo essencial foi analisado por cromatografia gasosa. O cromatógrafo foi equipado com coluna capilar (30 \times 0,25 mm i.d. \times 0,25 mm de espessura do filme) e os dados foram adquiridos nas seguintes condições: temperatura inicial 50°C; taxa do programa

2°C, temperatura final 265°C e temperatura do injetor 250°C. O usou-se o hélio como gás de arraste e a razão de divisão foi de 120. O óleo essencial também foi analisado por GC-MS e a mesma coluna capilar e condições analíticas indicadas acima. O MS foi executado no modo de ionização de elétrons, utilizando energia de ionização de 70 eV. Os componentes foram identificados com base na comparação de seu tempo de retenção relativo (RI) e fragmentação de espectro de massa com aqueles armazenados na biblioteca de computadores de massa Wiley e no NIST (National Institute of Standards and Technology) e quantificados como o valor médio de duas injeções de óleo essencial.

Cidres (2018) realizou a análise da composição química do óleo de *Eucalyptus globulus* usando um cromatógrafo a gás GC-MS, que possui uma coluna de sílica fundida (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm;), e acoplada a um espectrômetro de massas. A temperatura do forno foi programada, entre 45-175°C, a 3 °C/min, e posteriormente a 15 °C/min até 300°C, essa temperatura foi conservada por 10 min; a temperatura do injetor e detector foi de 280°C e o injetou-se um volume de 1 µL de amostra. O gás hélio foi empregado como gás de arraste regulado a uma velocidade constante de 30 cm/s nas seguintes condições: a temperatura da linha de transferência foi de 280°C e a temperatura da fonte iônica foi 220°C; com uma razão de split 1:40; energia de ionização 70 eV; faixa de varrimento, 40-300 u; tempo de varrimento 1 segundo. Os compostos foram identificados com base nos espectros contidos na biblioteca espectral de massas NIST e confirmou-se usando índices de retenção lineares definidos a partir dos tempo de retenção de uma mistura de n-alcenos (C₇-C₄₀) examinados a condições iguais comparados aos dados publicados e, quando possível, com compostos padrão comerciais.

Nestes estudos observou-se grande semelhança nas condições da coluna cromatográfica, sendo utilizada uma coluna de média polaridade (HP5 -MS) e com temperatura programada iniciando a 40°C até 230°C. Em quase todos os estudos, os compostos voláteis do óleo de eucalipto tiveram sua identificação confirmada pelo índice de Kovats.

2.2.3 Composição química do óleo

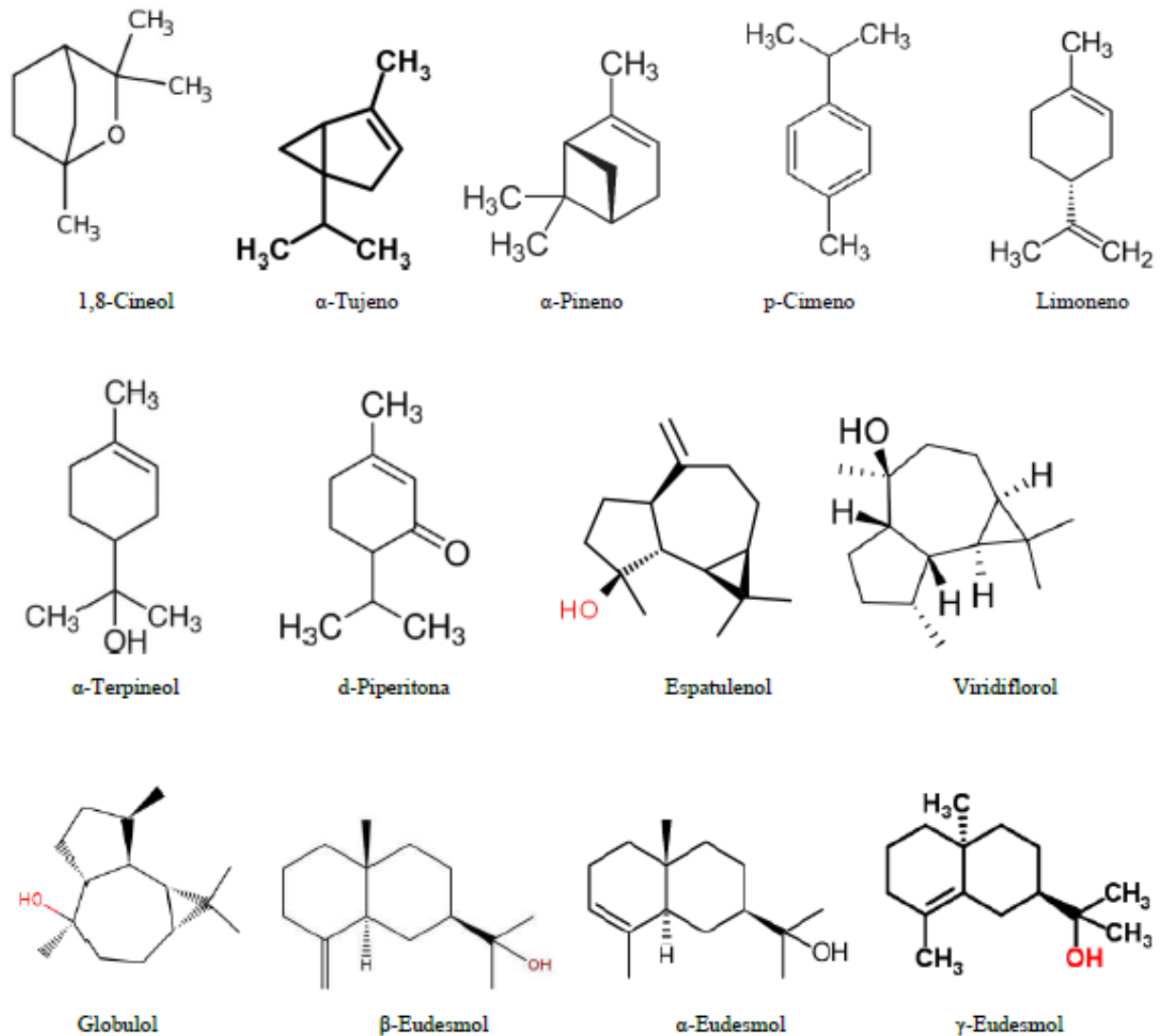
Os óleos essenciais têm os compostos terpênicos como composição majoritária. Os terpenos são substâncias que fazem parte de um pequeno grupo de moléculas orgânicas produzidas como metabólitos secundários na maioria de plantas, para evitar lesões por motivos externos. Sua estrutura molecular contém dupla ligação carbono-carbono, ou seja, hidrocarbonetos insaturados. Todos os terpenos ou os terpenos oxigenados, denominados de terpenóides são estruturados em blocos de cinco carbonos (C₅H₈), apesar de apresentarem diferenças estruturais entre si. A classificação dos terpenos pode ser realizada de acordo com a

quantidade de unidades de isoprenos que constitui sua cadeia, e sub-classificados em termos do grau de ciclização da molécula: acíclicos (cadeias abertas), monocíclicos ou bicíclicos. Os monoterpenos e sesquiterpenos são compostos de maior volatilidade, isso se dá por possuírem cadeias terpênicas de menor massa molar. Esta característica pode ser associada ao aroma acentuado de produtos naturais como de frutas cítricas, ervas aromáticas, especiarias e condimentos (FELIPE, BICAS, 2016).

Os óleos essenciais formados por derivados de terpenos são geralmente constituídos por mono- e sesquiterpenos, que podem ser hidrocarbonetos ou oxigenados, Figuras 7 e 8. No entanto, eles também podem ser derivados de alifáticos ou alicíclicos e alguns podem ter estruturas aromáticas. Exemplos de óleos essenciais deste extenso grupo incluem turpento (*Pinus* spp.) Com α e β -pineno, geraniol da rosa damascena (*Rosa damascena*), óleo da árvore-do-chá (*Melaleuca alternifolia*) com terpinen-4-ol, coentro (*Coriandrum sativum*) com linalol, hortelã-pimenta (*Mentha piperita*) com mentol, limão (*Citrus limon*) com limoneno, cominho (*Carum carvi*) com carvona, absinto (*Artemisia absinthium*) com tujona, eucalipto (*Eucalyptus globulus*) com cineol e chenopodium (*Chenopodium ambrosioides*) com o ascaridol como exemplos de monoterpenos (RÍOS, 2016).

A composição química do óleo essencial é afetada por vários fatores como, espécies, localização geográfica, época de colheita, tipo de material vegetal usado e método de extração (DORSAF *et al.* 2010). É possível observar que na composição química dos óleos de eucalipto, os mais abundantes compostos são monoterpenos oxigenados, e entre estes, 1,8 – cineol é o principal. A maioria das estruturas é formada por hidrocarbonetos monoterpenóides do óleo essencial de folhas de *Eucalyptus camaldulensis* e também por óleos de *Eucalyptus robusta* e *Eucalyptus saligna*. Hidrocarbonetos monoterpenos também estiveram presentes, como α -tujeno, α -pineno e p-cimeno (HASHEMI-MOGHADDAM *et al.* 2013; DORSAF *et al.* 2010). Tolba e colaboradores (2015), explicam que o óleo de *E. citriodora* é geralmente monoterpenóide por natureza. Seus estudos relatam que o óleo essencial de *E. citriodora* continha principalmente monoterpenóides (91,8%).

Figura 8 - Exemplos de terpenos alifáticos, mono- e bicíclicos, hidrocarbonetos e oxigenados



Fonte: Autoria própria

Elaissi e colaboradores (2010) observaram que dentre os óleos essenciais das diferentes espécies de eucalipto estudadas em seu trabalho, a maior classe foi constituída pelos monoterpenos oxigenados com 1,8-cineol, tendo o maior conteúdo na maioria das espécies, seguido por α -terpineol e d-piperitona. A segunda classe com o segundo maior número de substâncias foi composta pelos sesquiterpenos oxigenados representados por espatulenol, viridiflorol, globulol, β -eudesmol, α -eudesmol e γ -eudesmol. Os hidrocarbonetos monoterpênicos eram compostos essencialmente de p-cimeno, limoneno e α -pineno. A Tabela 6 reúne diversos autores que realizaram as análises dos constituintes voláteis dos óleos essenciais extraídos de diversas espécies de eucalipto por GC-MS.

Tabela 7 - Principais compostos identificados no óleo essencial de eucalipto

Compostos	Referências	Compostos	Referências
Triciclono	Dorsaf et al. 2010	β -Cubebeno	Dorsaf et al. 2010
α -Tujeno	Dorsaf et al. 2010; Chinnarasu <i>et al.</i> (2015); Elaissi et al. (2010)	β -Cariofileno	Dorsaf et al. 2010
α -Pineno	Dorsaf et al. 2010; Hashemi-Moghaddam <i>et al.</i> (2013); Ghnaya <i>et al.</i> (2013); Harkat-Madouri <i>et al.</i> (2015); Chinnarasu <i>et al.</i> (2015); Elaissi et al. (2010)	α -Gurjuneno	Dorsaf et al. 2010; Hashemi-Moghaddam <i>et al.</i> (2013)
p-Cimeno	Dorsaf et al. 2010; Chinnarasu <i>et al.</i> (2015); Elaissi et al. (2010)	α -Cedreno	Dorsaf et al. 2010
1,8-Cineol	Dorsaf et al. 2010; Hashemi-Moghaddam <i>et al.</i> (2013); Ghnaya <i>et al.</i> (2013); Harkat-Madouri <i>et al.</i> (2015); Chinnarasu <i>et al.</i> (2015); Elaissi et al. (2010)	Aromadendreno	Dorsaf et al. 2010; Elaissi et al. (2010)
z- β -ocimeno	Dorsaf et al. 2010	α -Himacaleno	Dorsaf et al. 2010
γ -Terpineno	Dorsaf et al. 2010; Chinnarasu <i>et al.</i> (2015)	α -Humuleno	Dorsaf et al. 2010
α -Canfolenol	Dorsaf et al. 2010	Alo-Aromadendreno	Dorsaf et al. 2010; Hashemi-Moghaddam <i>et al.</i> (2013); Harkat-Madouri <i>et al.</i> (2015);
Trans-pinocarveol	Dorsaf et al. 2010	γ -Muroleno	Dorsaf et al. 2010
Câmfora	Dorsaf et al. 2010	Elemol	Dorsaf et al. 2010
Borneol	Dorsaf et al. 2010; Ghnaya <i>et al.</i> (2013)	α -Calacoreno	Dorsaf et al. 2010
Trans-sabinol	Dorsaf et al. 2010	Óxido de β -cariofileno	Dorsaf et al. 2010; Harkat-Madouri <i>et al.</i> (2015)
Pinocarvacrono	Dorsaf et al. 2010	Cedrol	Dorsaf et al. 2010
Mirtenol	Dorsaf et al. 2010; Chinnarasu <i>et al.</i> (2015)	Hexadicano	Dorsaf et al. 2010
p-Cimeno-8-ol	Dorsaf et al. 2010	Trans-cardanol	Dorsaf et al. 2010
Trans-carveol	Dorsaf et al. 2010	α -Cardanol	Dorsaf et al. 2010
Carvona	Dorsaf et al. 2010	Isoamilisoverato	Hashemi-Moghaddam <i>et al.</i> (2013)
Piperitona	Dorsaf et al. 2010	α -Terpineol	Hashemi-Moghaddam <i>et al.</i> (2013); Harkat-Madouri <i>et</i>

			<i>al.</i> (2015); Chinnarasu <i>et al.</i> (2015); Elaissi <i>et al.</i> (2010)
Geraniol	Dorsaf <i>et al.</i> 2010	Bicicloelemeno	Hashemi-Moghaddam <i>et al.</i> (2013)
Acetato de linalila	Dorsaf <i>et al.</i> 2010	α -Copaeno	Hashemi-Moghaddam <i>et al.</i> (2013)
Acetato de bornila	Dorsaf <i>et al.</i> 2010	Calareno	Hashemi-Moghaddam <i>et al.</i> (2013)
Carvacrol	Dorsaf <i>et al.</i> 2010	γ -Eudesmol	Elaissi <i>et al.</i> (2010)
Timol	Dorsaf <i>et al.</i> 2010	β -selineno	Hashemi-Moghaddam <i>et al.</i> (2013)
Acetato de terpenila	Dorsaf <i>et al.</i> 2010	Viridiflorol	Hashemi-Moghaddam <i>et al.</i> (2013); Ghnaya <i>et al.</i> (2013)
Acetato de α -terpenila	Dorsaf <i>et al.</i> 2010	Espatulenol	Hashemi-Moghaddam <i>et al.</i> (2013); Ghnaya <i>et al.</i> (2013); Harkat-Madouri <i>et al.</i> (2015)
α -Copaeno	Dorsaf <i>et al.</i> 2010	Canfeno	Ghnaya <i>et al.</i> (2013); Elaissi <i>et al.</i> (2010)
β -Elemeno	Dorsaf <i>et al.</i> 2010; Hashemi-Moghaddam <i>et al.</i> (2013)	β -ocimeno	Ghnaya <i>et al.</i> (2013)
Tumbergol	Dorsaf <i>et al.</i> 2010	z-pinocarveol	Ghnaya <i>et al.</i> (2013)
Longifoleno	Dorsaf <i>et al.</i> 2010	β -meta-1-em-8-ol	Ghnaya <i>et al.</i> (2013)
z-Cariofileno	Ghnaya <i>et al.</i> (2013)	Epiglobulol	Ghnaya <i>et al.</i> (2013); Harkat-Madouri <i>et al.</i> (2015)
δ -Gurguneno	Ghnaya <i>et al.</i> (2013)	Ledol	Ghnaya <i>et al.</i> (2013)
Bicicliogemacreno	Ghnaya <i>et al.</i> (2013)	Ácido octadecanoico	Ghnaya <i>et al.</i> (2013)
β -Pinenol	Harkat-Madouri <i>et al.</i> (2015); Chinnarasu <i>et al.</i> (2015); Elaissi <i>et al.</i> (2010)	4-Terpineol	Harkat-Madouri <i>et al.</i> (2015); Chinnarasu <i>et al.</i> (2015)
o-Ocimeno	Harkat-Madouri <i>et al.</i> (2015)	L-Pinocarvona	Harkat-Madouri <i>et al.</i> (2015)
Isovaleraldeído	Harkat-Madouri <i>et al.</i> (2015)	Felandral	Harkat-Madouri <i>et al.</i> (2015); Chinnarasu <i>et al.</i> (2015); Elaissi <i>et al.</i> (2010)
2-pentanona-4-hidroxi-4-metila	Harkat-Madouri <i>et al.</i> (2015)	Piperitona	Harkat-Madouri <i>et al.</i> (2015); Chinnarasu <i>et al.</i> (2015)
Linalol	Harkat-Madouri <i>et al.</i> (2015); Chinnarasu <i>et al.</i> (2015)	p-Cimenol	Harkat-Madouri <i>et al.</i> (2015)
2-Pinen-4-ol	Harkat-Madouri <i>et al.</i> (2015)	Ledeno	Harkat-Madouri <i>et al.</i> (2015); Chinnarasu <i>et al.</i> (2015)
Oxido de cariofileno	Harkat-Madouri <i>et al.</i> (2015)	Pinocarvona	Chinnarasu <i>et al.</i> (2015)
Eudesmol	Harkat-Madouri <i>et al.</i> (2015)	1-Terpineol	Chinnarasu <i>et al.</i> (2015)
Sabineno	Chinnarasu <i>et al.</i> (2015); Elaissi <i>et al.</i> (2010)	Criptona	Chinnarasu <i>et al.</i> (2015); Elaissi <i>et al.</i> (2010)
Felandreno	Chinnarasu <i>et al.</i> (2015)	α -Terpineno	Chinnarasu <i>et al.</i> (2015); Elaissi <i>et al.</i> (2010)
Terpineno	Chinnarasu <i>et al.</i> (2015)	(+) Espatulenol	Elaissi <i>et al.</i> (2010)
β -Felandreno	Chinnarasu <i>et al.</i> (2015); Elaissi <i>et al.</i> (2010)	α -Gurjeno	Chinnarasu <i>et al.</i> (2015)

Palmitato de isopropila	Chinnarasu <i>et al.</i> (2015)	α -Cadinol	Chinnarasu <i>et al.</i> (2015)
Palmitato de etila	Chinnarasu <i>et al.</i> (2015)	γ -Gurjeno	Chinnarasu <i>et al.</i> (2015)
α -Fencheno	Elaissi <i>et al.</i> (2010)	Mirceno	Elaissi <i>et al.</i> (2010)
Tuj-2,4(10)-dieno	Elaissi <i>et al.</i> (2010)	α -Felandreno	Elaissi <i>et al.</i> (2010)
Limoneno	Elaissi <i>et al.</i> (2010)	β -cis-ocimeno	Elaissi <i>et al.</i> (2010)
Terpinoleno	Elaissi <i>et al.</i> (2010)	β -trans-ocimeno	Elaissi <i>et al.</i> (2010)
α -p-dimetilestireno	Elaissi <i>et al.</i> (2010)	Óxido de cis-linalol	Elaissi <i>et al.</i> (2010)
Cuminal	Elaissi <i>et al.</i> (2010)	Óxido de β -Cariofileno	Elaissi <i>et al.</i> (2010)
d-Piperitona	Elaissi <i>et al.</i> (2010)	Viridiflorol	Elaissi <i>et al.</i> (2010)
Globulol	Elaissi <i>et al.</i> (2010)	α -Eudesmol	Elaissi <i>et al.</i> (2010)
β -Eudesmol	Elaissi <i>et al.</i> (2010)		

Fonte: Autoria Própria

Segundo Ghnaya e colaboradores (2013) as diferenças na composição química dos óleos de eucalipto de espécies distintas podem ser devido a nutrientes de diferentes solos e seu acúmulo nas folhas que podem resultar em diversos metabolismos e produção de diferentes bioprodutos e óleos voláteis, mudanças genéticas através de gerações e hibridizações, naturais e induzidas, que levam à produção de uma variedade de óleos voláteis em comparação com néctares ou aqueles de diferentes habitats, aclimatação das espécies ao ambiente em que foram cultivadas no passado.

2.3 Atividade Antimicrobiana

O interesse pelo uso de medicamentos fitoterápicos vem aumentando nos últimos anos, particularmente contra agentes microbianos devido ao problema de resistência de bactérias a antibióticos, que vem se tornando cada vez maior (GHAFAR *et al.*, 2015). As espécies de eucalipto são bem conhecidas como plantas medicinais por conta de suas propriedades biológicas e farmacológicas. O *Eucalyptus globulus* é a espécie mais importante entre outras de eucalipto quando se diz respeito a óleos essenciais. Esses óleos essenciais têm grande demanda desde que estudos comprovaram suas propriedades anestésicas, antissépticas, desinfetantes, entre outras, com isso faz-se necessário aprofundar estudos sobre a atividade antimicrobiana destes (BACHIR e BENALI, 2012).

Segundo Cidres (2018) existem diversas metodologias para avaliar a possível atividade antimicrobiana dos óleos essenciais. Dentre estes métodos, os métodos de difusão em ágar por poço e disco estão entre os mais comuns, apesar de não serem apropriados para medir a

concentração mínima inibitória (MIC), devido ao fato de não ser possível calcular o nível da quantidade de agente antimicrobiano difundido no ágar. Cidres (2018) também explica que, apesar desse método não fornecer o MIC, ele tem a vantagem de ser um método de baixo custo, de fácil execução, bem como ser facilmente adaptado para diversos tipos de microrganismos e agentes antimicrobianos.

Essa metodologia estuda a capacidade inibitória de um agente antimicrobiano contra um microrganismo. Geralmente, os agentes antimicrobianos testados são solúveis em água, mas ao se adaptar as amostras de natureza hidrofóbica, sendo o caso dos óleos essenciais, adiciona-se solventes orgânicos e agentes emulsificadores às amostras (Pereira, 2010b). Sobre o método de difusão em ágar para óleos essenciais:

O óleo essencial solubilizado é aplicado sobre a superfície deste meio, em uma área restrita. A forma de aplicação é que caracteriza o tipo da variante. Se disco, ou ainda, construção de cavidade (poço). Após o tempo adequado de incubação, sendo o microrganismo sensível ao produto testado, não ocorre o crescimento nas áreas onde tenha ocorrido a difusão do óleo testado, formando halos de inibição. Isso contrasta com as áreas onde não houve difusão e o ocorreu o crescimento do microrganismo. O óleo se difunde no ágar em concentrações decrescentes e os microrganismos inoculados no meio de cultura crescem até encontrar a concentração inibitória mínima e, a partir deste ponto, se forma o halo de inibição (Pereira, 2010b, p.23).

As Figuras 9 e 10 ilustram o método de difusão em ágar por disco e poço, respectivamente. Na figura 9, a região de A até X ilustra o halo formado devido ao reagente antimicrobiano, indicando sua concentração inibitória. Na região entre X e B, é representada uma concentração subinibitória, que permite o crescimento do microrganismo.

Figura 9 - Teste de sensibilidade pelo método de difusão em disco

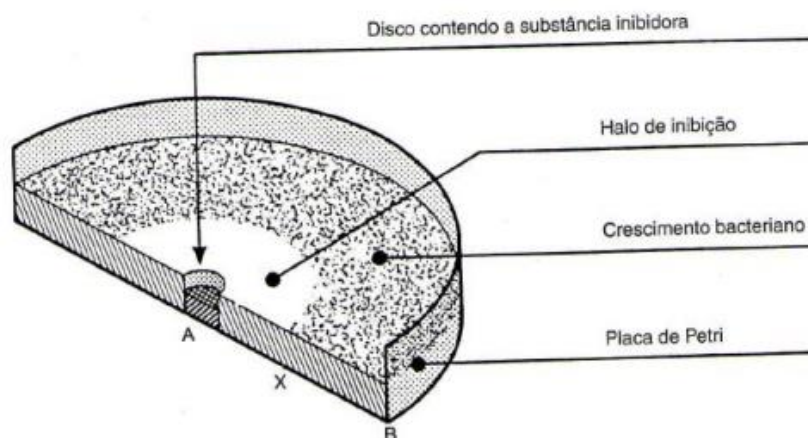
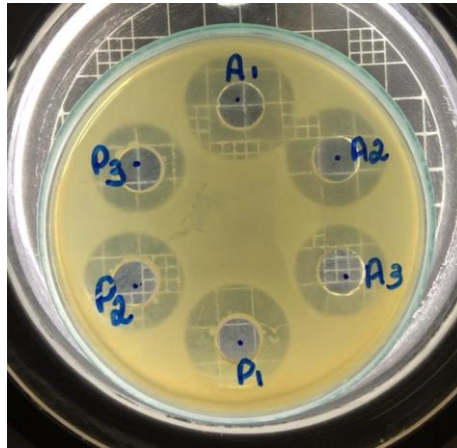


Figura 10 - Teste de sensibilidade de *Staphylococcus epidermidis* em gentamicina pelo método de difusão em poço



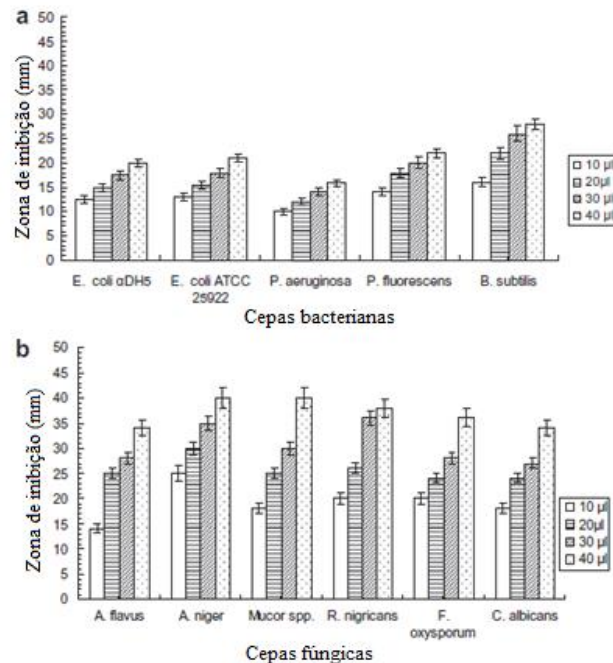
Fonte: Autoria própria

Segundo ANVISA (2020), esse método de avaliação possui muitas variáveis que devem ser consideradas como a forma os meios de cultura serão preparados; um rigoroso controle do pH do meio; o tempo; a temperatura e a atmosfera da incubação; a concentração no inóculo; uma forma adequada para se fazer o estoque dos discos de sensibilidade; e um rigor científico na forma de executar todos os passos da técnica.

Tyagi e Malik (2011) utilizaram a técnica de difusão em poço e disco para determinar a atividade antimicrobiana do óleo de *Eucalyptus globulus*, as cepas de bactérias e fungos usadas cresceram em ágar Mueller Hinton (MHA), e ágar batata, incubadas em 30 °C durante 24h, em uma incubadora com agitação orbital a 180 rpm. As células foram colhidas por centrifugação, e suspensas em água destilada esterilizada, sendo usadas imediatamente. Para o método de difusão em poço, dissolveu-se o óleo de eucalipto em 0,5% de dimetilsulfóxido (DMSO), seguido de esterilização por filtração em membrana de 0,45 µm. Cada cepa de teste foi suspensa em água bidestilada estéril e diluída em série para 10⁶ UFC/mL. 100 µL de cada suspensão foi espalhada sobre a superfície da placa de MHA e ágar batata, em seguida deixando secar. Poços de 8 mm de diâmetro foram cortados no ágar, e adicionou-se a estas diferentes doses do óleo essencial (10, 20, 30 e 40 µL). Após incubação de 24h, em 30°C, as zonas de inibição de crescimento foram examinadas e o diâmetro medido. Os testes foram realizados em duplicata. Os resultados indicaram que o potencial antimicrobiano do óleo essencial foi observado, houve

crescimento dos halos de inibição gerados, o diâmetro aumentou com o aumento da concentração, ou seja, 10, 20, 30 e 40 μL , como indica a Figura 11.

Figura 11 - Potencial antimicrobiano do óleo essencial do *Eucalyptus globulus* pelo método de difusão em poço



(a) Zona de inibição (mm) devido a diferentes concentrações (10, 20, 30 e 40 μL /poço), contra diferentes cepas de bactérias (*E. coli* aDH5, *E. coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*). (b) Zona de inibição (mm) devido a diferentes concentrações (10, 20, 30 e 40 μL /poço), contra diferentes cepas de fungos (*A. flavus*, *A. niger*, *Mucor spp.*, *R. nigricans*, *F. oxysporum* and *C. albicans*).

Fonte: Tyagi e Malik (2011)

O óleo de *Eucalyptus globulus* teve halos de 16, 20, 21, 22 e 28 mm no caso de *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* aDH5, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas fluorescens* e *Bacillus subtilis*, respectivamente (Figura 11a), e 34, 34, 36, 38, 40 e 40 mm no caso de *Candida albicans*, *Aspergillus flavus*, *Fusarium oxysporum*, *Rizhopus nigricans*, *Aspergillus niger* e *Mucor spp.*, respectivamente.

Djenane e colaboradores (2011) estudaram a atividade antimicrobiana também do *Eucalyptus globulus*, usando a metodologia de difusão em disco. Usou-se cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, estas foram padronizadas por meio de dois ciclos de crescimentos sucessivos de 24 horas a 37°C, em 9 mL de ágar BD Brain Heart Infusion (BHI). Depois de 48 h, 100 mL da suspensão foi inoculada em uma nova placa de BHI, e inoculada a 37°C por 12 h para obter uma cultura nova de 5×10^5 UFC/mL, em seguida mediu-se a transmitância em 600 nm em um espectrofotômetro. Placas Petri foram preparadas vertendo 20

mL de ágar MHA, em seguida foram secas por 30 minutos em um fluxo de segurança biológica, 0,1 mL da suspensão foi adicionada e espalhada uniformemente sobre a placa, deixou-se secar por 5 min. As soluções das amostras de óleo essencial foram preparadas dissolvendo-as em Tween 80 5% (v/v), os discos de papel esterilizados de 6 mm de diâmetro foram embebidos em 5 mL de óleo essencial, usando uma micropipeta capilar. As placas foram deixadas por 15 minutos em temperatura ambiente, para permitir a difusão do óleo essencial, e então foram incubadas a 37°C por 24 h. Ao final do período de incubação, mediu-se o diâmetro do halo de inibição formado. A sensibilidade do óleo essencial foi classificada como: não sensível (-) para diâmetros menores que 8 mm; sensível (+) para diâmetros entre 9 e 14 mm; muito sensível (+ +) para diâmetros entre 15 e 19 mm e extremamente sensível para diâmetros maiores que 20 mm. Preparou-se controles negativos usando o mesmo solvente empregado para dissolver a amostra. Cloranfenicol (10mg/disco) foi usado como referência padrão de antibiótico como controle positivo para testar a sensibilidade dos microrganismos testados (Tabela 7). O teste foi realizado em triplicata. Tanto *Escherichia coli* quanto *Staphylococcus aureus* foram significativamente inibidos, o óleo essencial de *Eucalyptus globulus* deu origem a um halo de inibição de 29 mm contra *Staphylococcus aureus*, sendo classificado então como extremamente sensível, e 12,80 mm contra *Escherichia coli* (muito sensível).

Tabela 8 - Atividade antimicrobiana do óleo de eucalipto do *Eucalyptus globulus* usando o método de difusão em disco

Microrganismo	Ø (mm)	Ø (mm)
	<i>E. globulus</i>	Cloranfenicol
<i>E. coli</i>	12,84 ± 1,2	17,25 ± 1,4
<i>S. aureus</i>	29,10 ± 2,3	22,50 ± 1,3

Expresso em diâmetro (Ø) da zona de inibição (DP médio), incluindo o diâmetro do disco (mm)

Fonte: Adaptado de Djenane *et al.* (2011)

Aldoghaim, Flematti e Hammer (2018) analisaram a capacidade antimicrobiana de diversas espécies de eucalipto além do composto isolado 1,8-cineol presente nestes óleos. Os óleos do eucalipto e o 1,8 – cineol foram testados contra *Staphylococcus aureus* (Gram positivo) e *Escherichia coli* (Gram negativa) (tabela 8). O inóculo dos microrganismos foi preparado em ágar Sangue e incubados a 35°C. As colônias foram suspensas em solução salina 0,85%, e a suspensão foi ajustada para uma turbidez de 0,5 McFarland (10^8 ufc/mL) com o auxílio de um nefelômetro. Em seguida, a solução foi transferida para ágar Mueller Hinton usando um swab,

e posteriormente poços de 8 mm foram abertos no ágar. Alíquotas de 25 µL e 50 µL de cada óleo de eucalipto e de 1,8-cineol foram adicionadas aos poços. Discos de Trimetoprim (5µg / disco) foram usados como controle positivo. As placas foram incubadas a 35°C por 24 h e os halos de inibição foram medidos e expressos em milímetros. Cada óleo foi testado pelo menos três vezes em momentos diferentes, e a média foi calculada. Todos os óleos testados apresentaram halos de inibição contra as duas bactérias testadas. A maior zona de inibição foi observada para 50 µL do óleo de *Eucalyptus polybractea* contra *Staphylococcus aureus*. Para os demais óleos, os tamanhos dos halos foram modestos, entre 11 a 16,7 mm.

Tabela 9 - Resultado das zonas de inibição de crescimento bacteriano (média e desvio padrão em mm) por difusão em ágar de dois volumes diferentes dos óleos de eucalipto

Óleos de Eucalipto	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Escherichia coli</i>	
	25 µL	50 µL	25 µL	50 µL
<i>E. globulus</i>	13,0 ± 1,0	15,3 ± 0,6	11,3 ± 0,6	15,0 ± 0,0
<i>E. loxophleba</i> 1	15,3 ± 0,6	16,7 ± 0,6	14,7 ± 0,6	16,7 ± 0,6
<i>E. loxophleba</i> 2	13,0 ± 0,6	15,0 ± 0,0	12,3 ± 0,6	15,3 ± 0,6
<i>E. polybractea</i>	28,0 ± 0,0	29,5 ± 0,7	14,0 ± 0,6	16,7 ± 0,6
<i>E. kochii</i> subsp. <i>Plenissima</i>	13,0 ± 0,0	15,7 ± 0,6	13,0 ± 0,0	13,0 ± 0,0
<i>E. kochii</i> subsp. <i>Borealis</i>	12,7 ± 0,0	14,7 ± 0,6	11,3 ± 0,6	13,0 ± 0,0
1,8 cineol	11,0 ± 0,0	12,7 ± 0,6	13,3 ± 0,6	14,3 ± 0,6
Trimetoprim 5µg	27,7 ± 0,6		26,3 ± 0,6	

Fonte: Aldoghaim, Flematti e Hammer (2018)

Azadbakht e colaboradores (2018) testaram o óleo de *Eucalyptus globulus* contra cepas de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* e *Listeria monocytogenes*. Para o preparo das cepas, uma alça de cada bactéria foi transferida para 10 mL de caldo Casoy, e incubadas a 37°C por 18 h. Em seguida, as culturas foram diluídas em caldo Casoy e incubadas a 37 °C até a fase de turvação de 0,2 a 600 nm (106 cfu/mL). A atividade antimicrobiana do *Eucalyptus globulus* foi realizada usando difusão em disco, semeou-se 100

μL de cada cultura em ágar triptona de soja (TSA), discos de papel estéril de 25 mm embebidos em diferentes quantidades de óleo de *Eucalyptus globulus* (10, 25, 50, 75 e 100 μL) foram colocados no ágar. Em seguida as placas foram seladas em *parafilm* e incubadas a 37°C durante 24 horas. A maior atividade de inibição foi obtida com 100 μL óleo. Bactérias Gram negativas, especialmente *Salmonella enteritidis* apresentaram mais resistência ao óleo do que Bactérias Gram positivas.

Mekonnen e colaboradores(2016) investigaram a possível capacidade antimicrobiana do *Eucalyptus globulus* contra os seguintes microrganismos: *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* bem como quatro fungos (dois *Trichophyton* spp. e dois *Aspergillus* spp.). Os inóculos das bactérias foram preparados inoculando em ágar, sendo incubados a 37 °C durante 24 horas. As cepas de fungos usadas nesse estudo foram preparadas inoculando em ágar Ssabouraud dextrose (SDA)/Ágar Batata e incubadas a 30°C. Empregou-se o método de difusão em poço para determinar as zonas de inibição, sendo ágar Mueller Hinton para bactérias, ágar sabouraud dextrose (SDA) para *Trichophyton* spp. e ágar batata para para *Aspergillus* spp. Depois de 16 a 24 h de crescimento das culturas de bactérias, 48 horas das culturas de *Aspergillus* spp. e 7 dias de culturas de *Trichophyton* spp, estas foram espalhadas em com o auxílio de swab por toda a superfície da placa de ágar afim de obter um crescimento uniforme. Foram cortados de 3 a 4 poços de 6 mm de diâmetro e 5 mm de profundidade (para obter a profundidade, verteu-se de 20 a 25 mL de ágar em cada placa). Cerca de 50 μL do óleo essencial não diluído foi dispensado nos poços, e 10 μg de gentamicina foi usado como controle positivo e dimetilsulfóxido foi usado como controle negativo. As placas foram deixadas em temperatura ambiente por 30 min e depois incubadas a 30 °C por 7 dias para *Trichophyton* spp, 48 h para *Aspergillus* e as incubou-se as placas de bactérias por 24 horas a 37°C. As zonas de inibição foram medidas apresentadas em mm. Os testes foram executados em triplicata, e calculando o valor médio (tabela 9). O óleo de *Eucalyptus globulus* exibiu uma atividade antimicrobiana significativa, apresentou uma zona de inibição de 10 a 32 mm. Quanto aos medicamentos padrão, a gentamicina apresentou um halo de 18 a 21 mm, mas não inibiu o *Shigella* spp., o dimetilsulfóxido não mostrou inibição no crescimento das bactérias testadas, como mostra a Tabela 9.

Tabela 10 - Atividade antimicrobiana do *E. globulus* e padrões antibióticos contra fungos e bactérias

Média da zona de inibição em (mm)			
(média ± desvio padrão)			
Bactérias	<i>E. globulus</i>	Gentamicina	Dimetilsulfóxido
<i>S. aureus</i>	32 ± 1,34	18 ± 1,21	NI
<i>S. pyogenes</i>	16 ± 0,9	20 ± 0,91	NI
<i>S. epidermidis</i>	20 ± 1	21 ± 0,99	NI
<i>S. typhi</i>	18 ± 0,9	18 ± 0,88	NI
<i>E. coli</i>	10 ± 0,52	21 ± 1,10	NI
<i>Shigella</i> spp.	18 ± 0,89	NI	NI
<i>P. aeruginosa</i>	28 ± 1,1	19 ± 0,90	NI
Fungos	<i>E. globulus</i>	Gentamicina	Dimetilsulfóxido
<i>Trichophyton</i> spp.1	27,3 ± 1,10	NA	NI
<i>Trichophyton</i> spp.2	NI	NA	NI
<i>Aspergillus</i> spp..1	11 ± 1,3	NA	NI
<i>Aspergillus</i> spp2	NI	NA	NI

NI: Não inibição; NA: Não aplicável.

Fonte: Adaptado de Mekonnen, Yitayew, Tesema e Taddese (2016)

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A técnica de extração por fluido supercrítico de CO₂ apresentou um rendimento maior de óleo essencial com relação à pressão e ao tempo de extração em comparação com a técnica de hidrodestilação. Foi possível constatar também que a extração por fluido supercrítico de CO₂ é uma técnica de extração mais rápida e de melhor rendimento. Quanto à destilação por micro-ondas, esta pode oferecer também significativamente maiores rendimentos de óleo essencial do que a hidrodestilação e arraste a vapor, -além de reduzir também o tempo de processo. A destilação acelerada por micro-ondas, que é um método simples e que economiza tempo, é uma alternativa superior para a extração do óleo essencial quando comparada às técnicas tradicionais (hidrodestilação e arraste a vapor).

Os solventes utilizados no método de fluido supercrítico são gasosos em condições normais de temperatura e pressão, o que torna mais fácil a eliminação destes nos produtos de extração, obtendo-se um produto de maior pureza. O CO₂ é um material inerte, não inflamável e como solvente, depois da água é o de menor custo. O tempo necessário para extração nas técnicas de fluido super-crítico e micro-ondas mostrou-se menor do que nas técnicas convencionais. Na técnica de micro-ondas esse tempo inferior deve-se ao fato da eficiência de aquecimento do método de micro-ondas, o que permite também um rendimento um pouco maior e em menor tempo. As técnicas alternativas de extração estudadas neste trabalho (fluido supercrítico de CO₂ e micro-ondas) são mais vantajosas em relação às técnicas tradicionais (hidrodestilação e arraste a vapor), contribuindo de forma satisfatória ao serem empregadas.

A cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas se mostrou uma técnica eficiente para a análise do óleo essencial, é um método rápido e capaz de identificar uma ampla lista de compostos presentes na amostra.

O êxito da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais depende dos compostos nele presentes e, no caso dos óleos essenciais de eucalipto. Os estudos sugerem que são potencialmente uma boa fonte de agentes antimicrobianos, sendo os compostos oxigenados, com destaque para os hidrocarbonetos monoterpênicos os mais abundantes e responsáveis pela maior atividade antimicrobiana. Os óleos essenciais de eucalipto são constituídos em sua maioria por compostos terpênicos como o 1,8-cineol, sendo este o composto encontrado com mais frequência entre as espécies estudadas, e o principal responsável pelas atividades antimicrobianas. De um modo geral, o óleo de eucalipto independente da espécie, é um agente antimicrobiano em potencial contra dentre outros microrganismos, *Escherichia Coli*, *Pseudomonas* spp. *Staphylococcus Aureus* e *Aspergillus* spp., sendo então 36 pertinente a ampliação dos estudos a respeito.

4 REFERÊNCIAS

- ALCÂNTARA, A. L.; CARDOSO, R. C.; SOUZA, F. M.; ESPINHEIRA, M. J. C.. Avaliação da Atividade Antimicrobiana do Óleo Extraído da Cápsula do *Eucalyptus urograndis*: Uma Contribuição Significativa para o ramo Farmacêutico. **Revista Multidisciplinar e de Psicologia**, v. 13, n. 43, p. 455-468, jan. 2019.
- ALDOGHAIM, F.; FLEMATTI, G.; HAMMER, K.. Antimicrobial Activity of Several Cineole-Rich Western Australian *Eucalyptus* Essential Oils. **Microorganisms**, [S.L.], v. 6, n. 4, p. 122-133, 3 dez. 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms6040122>.
- AGNOLIN, C. A.. **Avaliação de óleos essenciais de capim limão, citronela e eucalipto no controle do carrapato**. Santa Maria – RS. 2012. 83 f. Tese (Doutorado) – Curso de Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Teste de sensibilidade dos antimicrobianos**. 2020. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede_rm/cursos/boas_praticas/modulo5/interpretacao2.htm>. Acesso em 13 ago. 2020.
- AULTON, M. E. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. 2ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2005.
- AZADBAKHT, E.; MAGHSOUDLOU, Y.; KHOMIRI, M.; KASHIRI, M.. Development and structural characterization of chitosan films containing *Eucalyptus globulus* essential oil: potential as an antimicrobial carrier for packaging of sliced sausage. **Food Packaging And Shelf Life**, [S.L.], v. 17, p. 65-72, set. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fpsl.2018.03.007>.
- AZAMBUJA, W.. **Métodos de extração de óleos essenciais**. 2020. Disponível em: <<https://www.oleosessenciais.org/metodos-de-extracao-de-oleos-essenciais/>>. Acesso em 28 jul. 2020.
- BACHIR, R. G; BENALI, M. Antibacterial activity of the essential oils from the leaves of *Eucalyptus globulus* against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Asian Pacific Journal Of Tropical Biomedicine**, [S.L.], v. 2, n. 9, p. 739-742, set. 2012. Medknow. [http://dx.doi.org/10.1016/s2221-1691\(12\)60220-2](http://dx.doi.org/10.1016/s2221-1691(12)60220-2).
- BONORA, F. S.. **Prospecção de compostos químicos presentes nos óleos essenciais das folhas e flores de eucalipto**. 2016. 84 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Recursos Florestais, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2016.
- CARTAXO, P. H. A.. **Óleos essenciais no controle de *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae)**. 2020. 35 f. TCC (Graduação) – Curso de Engenharia Agrônômica, Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2020.
- CASTRO, C. A. O.; RESENDE, R. T.; BHERING, L. L.; CRUZ, C. D.. Brief history of *Eucalyptus* breeding in Brazil under perspective of biometric advances. **Ciência Rural**, [S.L.], v. 46, n. 9, p. 1585-1593, 16 jun. 2016. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20150645>.

CHEMAT, F.; BOUTEKEDJIRET, C.. Extraction // Steam Distillation☆. **Reference Module In Chemistry, Molecular Sciences And Chemical Engineering**, [S.L.], 2015. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-409547-2.11557-4>.

CHINNARASU, C.; MONTES, A.; FERNANDEZ-PONCE, M.T.; CASAS, L.; MANTELL, C.; PEREYRA, C.; LAOSSA, E.J. M. de; PATTABHI, S.. Natural antioxidant fine particles recovery from Eucalyptus globulus leaves using supercritical carbon dioxide assisted processes. **The Journal Of Supercritical Fluids**, [S.L.], v. 101, p. 161-169, jun. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2015.03.013>.

CIDRES, E. S. S. A.. **Óleo essencial das folhas e fruto do eucalipto: avaliação da atividade antimicrobiana e da atividade antioxidante**. 2018. 71 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Escola Superior de Tecnologia e Gestão, Bragança, 2018.

CONDE-HERNÁNDEZ, L. A.; ESPINOSA-VICTORIA, J. R.; TREJO, A.; GUERRERO-BELTRÁN, J. Á.. CO₂ -supercritical extraction, hydrodistillation and steam distillation of essential oil of rosemary (*Rosmarinus officinalis*). **Journal Of Food Engineering**, [S.L.], v. 200, p. 81-86, maio 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.12.022>.

COSTA, A. V.; PINHEIRO, P. F.; QUEIROZ, V. T.; RONDELLI, V. M.; MARINS, A. K.; VALBON, W. R.; PRATISSOLI, D.. Chemical Composition of Essential Oil from *Eucalyptus citriodora* Leaves and Insecticidal Activity Against *Myzus persicae* and *Frankliniella schultzei*. **Journal Of Essential Oil Bearing Plants**, [S.L.], v. 18, n. 2, p. 374-381, 4 mar. 2015. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/0972060x.2014.1001200>.

DJENANE, D.; YANGÜELA, J.; AMROUCHE, T.; BOUBRIT, S.; BOUSSAD, N.; RONCALÉS, P.. Chemical composition and antimicrobial effects of essential oils of *Eucalyptus globulus*, *Myrtus communis* and *Satureja hortensis* against *Escherichia coli* O157:h7 and *Staphylococcus aureus* in minced beef. **Food Science And Technology International**, [S.L.], v. 17, n. 6, p. 505-515, 2 nov. 2011. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/1082013211398803>.

DORSAF, B. H.; HANEN, B. I.; CHOKRI, J.; LARBI, K. M.; MANEF, Abderrabba.. Chemical composition of some Tunisian *Eucalyptus* essential oils as obtained by hydrodistillation using Clevenger type apparatus. **Biosciences, Biotechnology Research Asia**, Tunisie, v. 7, n. 2, p. 647-656, maio 2010.

ELAISSI, A.; MARZOUKIA, H.; MEDINI, H.; KHOUJA, M. L.; FARHAT, F.; LYNENE, F.; HARZALLAH-SKHIRI, F.; CHEMLI, R.. Variation in Volatile Leaf Oils of 13 *Eucalyptus* Species Harvested from Souinet Arboreta (Tunisia). **Chemistry & Biodiversity**, Tunisia, n. 2, p. 909-921, 2010.

FELIPE, L. O.; BICAS, J. L. Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais. **Química e Sociedade**, São Paulo, v. 39, n. 2, p. 120-130, maio 2016.

GAKUUBI, M. M.. Steam distillation extraction and chemical composition of essential oils of *Toddalia asiatica* L. and *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. **Journal Of Pharmacognosy And Phytochemistry**, Mwenge, v. 2, n. 5, p. 99-104, fev. 2016.

GHAFFAR, A.; YAMEEN, M.; KIRAN, S.; KAMAL, S.; JALAL, F.; MUNIR, B.; SALEEM, S.; RAFIQ, N.; AHMAD, A.; SABA, I. Chemical Composition and in-Vitro Evaluation of the Antimicrobial and Antioxidant Activities of Essential Oils Extracted from Seven Eucalyptus Species. **Molecules**, [S.L.], v. 20, n. 11, p. 20487-20498, 18 nov. 2015. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules201119706>.

GHNAYA, A. B.; HANANA, M.; AMRI, I.; BALTI, H.; GARGOURI, S.; JAMOSSI, B.; HAMROUNI, L.. Chemical composition of Eucalyptus erythrocorys essential oils and evaluation of their herbicidal and antifungal activities. **Journal Of Pest Science**, [S.L.], v. 86, n. 3, p. 571-577, 11 maio 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10340-013-0501-2>.

GILLES, M.; ZHAO, J.; AN, M.; AGBOOLA, S.. Chemical composition and antimicrobial properties of essential oils of three Australian Eucalyptus species. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 119, n. 2, p. 731-737, 15 mar. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.07.021>.

GOMES, F.. **Estudo dos compostos voláteis do alecrim utilizando técnicas de microextração em fase sólida (SPME), hidrodestilação e extração com fluido super crítico (SFE)**. 2003. 68 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

GUNES, M; ALMA, M H. Distillation of Essential Oil From Leaves of Eucalyptus camaldulensis by Using Microwave Power Source. **Ieee Transactions on Instrumentation and Measurement**, [S.L.], v. 59, n. 8, p. 2243-2245, ago. 2010. Institute of Electrical and Electronics Engineers (IEEE). <http://dx.doi.org/10.1109/tim.2010.2047988>.

HARKAT-MADOURI, L.; ASMA, B.; MADANI, K.; SAID, Z. B.; RIGOU, P.; GRENIER, D.; ALLALOU, H.; REMINI, H.; ADJAOU, A.; BOULEKBACHE-MAKHLLOUF, L.. Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of essential oil of Eucalyptus globulus from Algeria. **Industrial Crops And Products**, [S.L.], v. 78, p. 148-153, dez. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.10.015>

HASHEMI-MOGHADDAM, H.; KALATEJARI, A.; AFSHARI, H.; EBADI, A. G.. Microwave Accelerated Distillation of Essential Oils from the Leaves of Eucalyptus microtheca: Optimization and Comparison with Conventional Hydrodistillation. **Asian Journal of Chemistry**, Damghan Branch, v. 25, n. 10, p. 5423-5427, abr. 2013.

HERZI, N.; BOUAJILA, J.; CAMY, S.; CAZAUX, S.; ROMDHANE, M.; CONDORET, J. S.. Comparison between Supercritical CO₂ Extraction and Hydrodistillation for Two Species of Eucalyptus: yield, chemical composition, and antioxidant activity. **Journal Of Food Science**, [S.L.], v. 78, n. 5, p. 667-672, 2 abr. 2013. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/1750-3841.12113>.

MAYO, D. W.; PIKE, R. M.; TRUMPER, P. K.. **Microscale Organic Laboratory**. 4. ed. Nova Iorque: John Wiley & Sons, 2000.

MEHANI, M.; LADJEL, S.. Antimicrobial Effect of Essential Oils of the Plant Eucalyptus Camaldulensis on Some Pathogenic Bacteria. **International Journal Of Environmental Science And Development**, Algeria, p. 86-88, abr. 2012.

MEKONNEN, A.; YITAYEW, B.; TESEMA, A.; TADDESE, S.. In Vitro Antimicrobial Activity of Essential Oil of *Thymus schimperi*, *Matricaria chamomilla*, *Eucalyptus globulus*, and *Rosmarinus officinalis*. **International Journal of Microbiology**, [S.L.], v. 2016, p. 1-8, 2016. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/9545693>.

Ministério da Saúde (MS). **Monografia da espécie *Eucalyptus globulus* Labill (*Eucalipto*)**. Brasília, 2015.

OZEL, M.; KAYMAZ, H.. Superheated water extraction, steam distillation and Soxhlet extraction of essential oils of *Origanum onites*. **Analytical And Bioanalytical Chemistry**, [S.L.], v. 379, n. 7-8, p. 128-133, 4 jun. 2004. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-004-2671-5>.

PEREIRA, C. G.; MEIRELES, M. Angela A.. Supercritical Fluid Extraction of Bioactive Compounds: fundamentals, applications and economic perspectives. **Food and Bioprocess Technology**, [S.L.], v. 3, n. 3, p. 340-372, 3 out. 2009. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11947-009-0263-2>.

PEREIRA, J. L.. **Composição química dos óleos essenciais de espécies de *Eucalyptus L'herit* (*Myrtaceae*)**. 2010. 72 f. Dissertação (Mestrado). – Curso de Agroquímica, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2010a.

PEREIRA, M. A. A.. **Estudo da atividade antimicrobiana de óleos essenciais extraídos por destilação por arraste a vapor e por extração supercrítica**. 2010. 60 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia e Tecnologia de Materiais, Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010b.

RIBEIRO, A. V.; FARIAS, E. S.; SANTOS, A. A.; FILOMENO, C. A.; SANTOS, I. B.; BARBOSA, L. C. A.; PICANÇO, M. C.. Selection of an essential oil from *Corymbia* and *Eucalyptus* plants against *Ascia monuste* and its selectivity to two non-target organisms. **Crop Protection**, [S.L.], v. 110, p. 207-213, ago. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2017.08.014>.

RIBEIRO, L. G.. **Extração assistida por micro-ondas de óleo essencial de folhas de eucalipto (*Eucalyptus urophylla* x *globulus*)**. 2018. 118 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2018.

RÍOS, J. L.. Essential Oils. **Essential Oils In Food Preservation, Flavor and Safety**, [S.L.], p. 3-10, 2016. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-416641-7.00001-8>.

SANTOS, A. D.. **Extração do óleo essencial da espécie *Corymbia citriodora* e sua caracterização por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa**. 2016. 56 f. TCC (Graduação) – Curso de Licenciatura em Química, Universidade Federal de Campina Grande, Cuité, 2016.

SALIH, B.; ÇELIKBĐÇAK, O.. **Gas Chromatography in Plant Science, Wine Technology, Toxicology and Some Specific Applications**. Intech, 2010.

SILVA, F. de L.; SUGAUARA, E. Y. Y.; MAGALHÃES, H. M.; PASCOTTO, C. R.; COLAUTO, N. B.; LINDE, G. A.; GAZIM, Z. C. Atividade antimicrobiana do óleo essencial

de *Cymbopogon citratus*. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia UNIPAR**, Umuarama, v. 17, n. 3, p. 181-184, jul./set. 2014.

SILVA, H. A. O.. **Óleos essenciais no controle da antracnose em feijão caupi**. 2017. 46 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenheiro Agrônomo, Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2017.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Principles of instrumental analysis**. 8 ed. Boston: Cengage Learning, 2006. 999 p.

STEFFENS, A. H.. **Estudo da composição química dos óleos essenciais por destilação por arraste a vapor em escala laboratorial e industrial**. 2010. 68 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia e Tecnologia de Materiais, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

TAVARES, C.. **Trabalho de conclusão de curso em projeto de produto BNSN: baseado na sua necessidade**. Brasília. 2016. 60 f. TCC (Graduação) – Curso de Artes, Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

TOLBA, H.; MOGHRANI, H.; BENELMOUFFOK, A.; KELLOU, D.; MAACHI, R.. Essential oil of Algerian *Eucalyptus citriodora*: chemical composition, antifungal activity. **Journal de Mycologie Médicale**, [S.L.], v. 25, n. 4, p. 128-133, dez. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mycmed.2015.10.009>

TYAGI, A. K.; MALIK, A.. Antimicrobial potential and chemical composition of *Eucalyptus globulus* oil in liquid and vapour phase against food spoilage microorganisms. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 126, n. 1, p. 228-235, maio 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.002>.

VALVERDE, S. R.. **As plantações de eucalipto no Brasil**. Texto técnico, Universidade Federal de Viçosa. 7 f. 2015.

VITTI, A. M. S.; BRITO, J. O.. **Óleo essencial de eucalipto**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2003.

ZHAO, S.; ZHANG, D.. Supercritical CO₂ extraction of *Eucalyptus* leaves oil and comparison with Soxhlet extraction and hydro-distillation methods. **Separation and Purification Technology**, [S.L.], v. 133, p. 443-451, set. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.seppur.2014.07.018>.