

Artigo

Quantificação e Caracterização dos Principais Componentes do Extrato Etanólico de Cravo-da-Índia *Syzygium aromaticum* [L] Merr. et Perry.

Affonso, R. S.; Lessa, B.; Slana, G. B. C. A.; Barboza, L. L.; de Almeida, F. V.; Lima, A. L. S.; de Souza, F. R.; França, T. C. C.*

Rev. Virtual Quim., 2014, 6 (5), 1316-1331. Data de publicação na Web: 27 de setembro de 2014

<http://www.uff.br/rvq>

Quantification and Characterization of the Main Components of the Ethanolic Extract of Indian Cloves, *Syzygium aromaticum* [L] Merr. et Perry.

Abstract: The Indian clove, *Syzygium aromaticum* [L] Merr. et Perry, has been popularly used in the treatment of several diseases. A more recent use of this spice in Brazil is a homemade formulation, based on the ethanolic extraction of the dried flower buds of *S. aromaticum*, which has shown to be efficient as mosquitoes repellent. Here we evaluated, through the development of a GC analytical technique, the concentrations of the main components of the ethanolic extract of Indian cloves (eugenol and eugenyl acetate), and possible responsible for the repellent activity, in this homemade formulation. Our results corroborated the efficiency of this protocol to extract eugenol and eugenyl acetate and established the ideal conditions for extraction.

Keywords: Eugenol; quantification; eugenyl acetate; repellent; indian cloves.

Resumo

O cravo-da-índia, *Syzygium aromaticum* [L] Merr. Perry et, é popularmente usado no tratamento de várias doenças. Uma utilização mais recente dessa especiaria no Brasil é uma formulação caseira, com base na extração de etanol dos botões florais secos de *S. aromaticum*, que se mostrou eficiente como repelente contra mosquitos. Aqui nós avaliamos por meio do desenvolvimento de uma técnica analítica utilizando CG, as concentrações dos principais componentes do extrato etanólico do cravo (eugenol e acetato de eugenila), possíveis responsáveis pela atividade repelente, nesta formulação caseira. Nossos resultados corroboram a eficiência deste protocolo para extrair eugenol e acetato de eugenila, e estabeleceu as condições ideais para extração, além da caracterização dos compostos.

Palavras-chave: Eugenol; quantificação; acetato de eugenila; repelentes; cravo da Índia.

* Instituto Militar de Engenharia, Seção de Engenharia Química, Divisão de Ensino e Pesquisa, Praça General Tibúrcio, 80, CEP 22290-270, Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

✉ tanos@ime.eb.br

DOI: [10.5935/1984-6835.20140086](https://doi.org/10.5935/1984-6835.20140086)

Quantificação e Caracterização dos Principais Componentes do Extrato Etanólico de Cravo-da-Índia *Syzygium aromaticum* [I] Merr. et Perry.

Raphael S. Affonso,^a Bruno Lessa,^b Glaucia B. C. A. Slana,^c Larissa L. Barboza,^d Fernanda V. de Almeida,^e Antônio Luiz S. Lima,^f Felipe R. de Souza,^a Tanos C. C. França^{a,*}

^a Instituto Militar de Engenharia, Seção de Engenharia Química, Divisão de Ensino e Pesquisa, Praça General Tibúrcio, 80, CEP 22290-270, Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

^b Plataforma de Metodologia Analítica (PMA), Farmanguinhos, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Avenida Brasil 4.365 - Manginhos, Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

^c Instituto Nacional de Propriedade Industrial, Praça Mauá 7, CEP 20081-240, Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

^d Laboratório de Produtos Florestais (LPF), IBAMA-DF, Trecho 2 - Edifício Sede - UNB SCEN - Asa Norte, Brasília-DF, Brasil.

^e Laboratório de Química Analítica e Ambiental, Instituto de Química (Universidade de Brasília-UnB), Asa Norte 70910-900 – Brasília-DF, Brasil.

* tanos@ime.eb.br

Recebido em 31 de março de 2014. Aceito para publicação em 27 de setembro de 2014

1. Introdução

2. Materiais e Métodos

2.1. CG-DIC

2.2. CG-EM

2.3. IV

2.4. RMN

2.5. Padrões

3. Resultados e Discussão

3.1. Caracterização dos padrões

3.2. Otimização da metodologia de análise

3.3. Quantificação

4. Considerações Finais

1. Introdução

O craveiro da Índia pertence à família das mirtáceas (*Myrtaceae*) e é atualmente conhecido cientificamente pelo nome de *Syzygium aromaticum* [L] Merr. et Perry.¹ É uma planta de porte arbóreo com copa alongada característica e que pode atingir em média 8-10 metros de altura. Suas folhas possuem características ovais, aromáticas e tem de 7-11 centímetros de comprimento.^{1,2}

Por muitos anos o cravo tem sido usado principalmente como um tempero culinário, mas há vários estudos científicos que demonstram outras atividades para esta especiaria.^{1,3-36} Há relatos do uso do cravo entre os egípcios como um tônico para fortalecer os trabalhadores das pirâmides e entre os chineses, que o usavam para mascarar o hálito na presença do imperador.^{1,3} Várias atividades farmacológicas são relatadas para o *S. aromaticum*, tais como antiviral,^{1,3-5} anti-ulcera,^{1,3,7} antidiabética,^{1,3,8} antitumoral,^{1,3,4,9,10} anestésica e anti-inflamatória,^{1,3,4,11-14,18} antimicrobiana,^{1,3,4,15-17,19-23} inseticida e repelente.^{1,3,4,22,24-36}

O uso do extrato de *S. aromaticum* como repelente para o mosquito *Aedes aegypti*, está se tornando popular no Brasil, como medida preventiva de combate à Dengue. Secretarias municipais de saúde têm incentivado, através da mídia, a produção de um repelente caseiro a partir do extrato etanólico de *S. aromaticum*.^{1,36,37,38}

Após a malária, a dengue é a doença transmitida por mosquitos de maior relevância no Brasil. De acordo com o Ministério da Saúde (MS), em 2011 os casos de dengue no país atingiram o número de 764.032 indivíduos, com 291 óbitos registrados, sendo, apenas o estado do Rio de Janeiro, responsável por 21% dos casos e 28% das mortes.³⁹

Oliveira *et al.* (2009) relataram a composição química dos compostos voláteis extraídos de *S. aromaticum* (folhas, caules e botões florais).³⁴ Os resultados (Tabela 1) mostram que o eugenol (4-alil-2-metóxi-fenol) e o acetato de eugenila (Figura 1) são os principais componentes do extrato, obtidos por hidrodestilação, corroborando os resultados de outros autores.^{1,3,16,17,34-36,40}

Tabela 1. Porcentagem dos componentes do óleo essencial do *S. aromaticum*³⁵

Componentes	% área				
	FF*	FSS*	FSE*	Pen*	BFS*
Eugenol	82,47	87,07	82,64	90,41	88,38
β-Cariofileno	10,78	8,29	10,45	3,61	0,64
α-Humuleno	1,44	1,08	1,63	0,60	-
Acetato de eugenila	1,89	-	-	3,76	10,98
Óxido de cariofileno	0,47	-	0,51	-	-

*FF: Folhas frescas; FSS: Folhas secas ao sol; FSE: Folhas secas em estufa, Pen: Pedúnculos e BFS: Botões florais secos de *S. aromaticum*³⁵

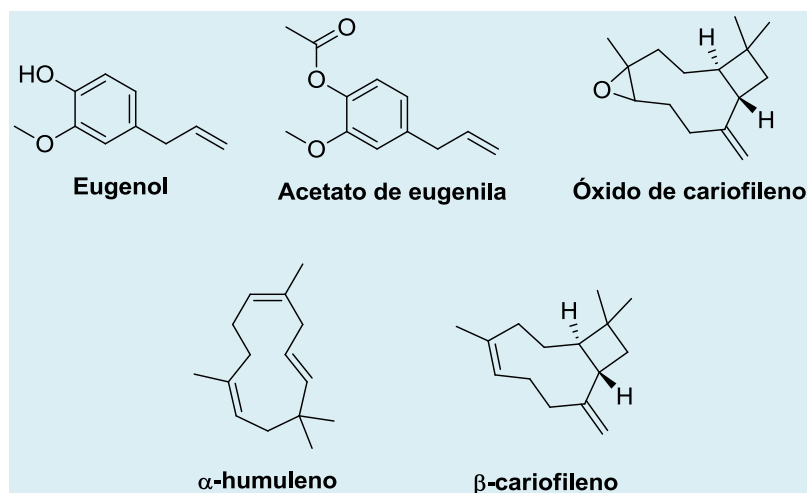


Figura 1. Estruturas do Eugenol, Acetato de eugenila, Óxido de cariofileno, α-humuleno e β-cariofileno

Affonso *et al.* (2013) em seus estudos de modelagem molecular, mostraram que o eugenol e o acetato eugenila tem uma forte interação molecular com uma importante proteína (Agam OBP1) presente nas fêmeas do gênero *Anopheles* e responsável por desencadear o processo de alimentação desses artrópodes hematófagos vetores da malária.³⁶

Os resultados de modelagem revelaram que os derivados do *S. aromaticum* possuem energia de interação com a Agam OBP1 superior a moléculas atrativas como ácido láctico e 1-octen-3-ol e comparáveis ao principal repelente sintético usado comercialmente (N,N-dimetil-meta-toluamida ou DEET). Esses resultados são fortes indicativos para elucidação da atividade repelente dos componentes do *S. aromaticum* e mesmo do DEET.³⁶

Incentivado pela eficácia do extrato etanólico caseiro de *S. aromaticum* como repelente e pelo trabalho de Affonso *et al.* (2013)³⁶ otimizamos aqui um método analítico por cromatografia gasosa (CG) para quantificar o eugenol e o acetato de eugenila das amostras de *S. aromaticum* adquiridas em diferentes pontos da cidade do Rio de Janeiro.

2. Materiais e Métodos

As amostras foram adquiridas aleatoriamente em lojas nos três principais centros de comércio popular de especiarias da cidade do Rio de Janeiro: Mercado de Madureira (localizada no bairro de Madureira), Centro de Abastecimento do Estado da Guanabara - CADEG (localizado no bairro de Benfica) e o Centro de Abastecimento do Estado do Rio de Janeiro S/A - CEASA - RJ (localizado no bairro de Irajá). Além destes locais de comércio popular, foram adquiridas em uma rede de supermercados, amostras de cravo das marcas Kitano® e Chinezinho®. Todas as amostras foram armazenadas durante todo o período de análise, sob a temperatura de 8,0 °C.

As extrações do eugenol e do acetato eugenila foram feitas de acordo com a metodologia caseira proposta pela mídia.³⁷ Foram colocados 1,000 g dos botões florais de *S. aromaticum* em 5,0 mL de etanol, deixando a solução macerando por quatro dias (96 horas), com duas agitações diárias. Ao fim do tempo de extração proposto o líquido obtido foi separado do sólido através de filtração e analisado. A fim de verificar a capacidade de extração desta metodologia,

variações do tempo de extração de 12 a 240 horas, usando a mesma proporção cravo-etanol, foram analisadas de acordo com a tabela 2. As amostras foram diluídas na

proporção 1:10 em etanol para análise por CG-DIC (Cromatografia Gasosa - Detector de Ionização por Chamas).

Tabela 2. Extração do óleo de cravo (*S. aromaticum*) por maceração em etanol em função do tempo

Tempo de extração (horas)	Ponto
12	1
24	2
96	3
240	4

2.1. CG-DIC

As amostras extraídas de acordo com a metodologia caseira foram quantificadas por CG-DIC, utilizando o equipamento da Agilent (6890N *Network GC System*). Foi utilizada uma coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm) com fase estacionária HP-5 (5% Fenil metil siloxano e 95% de Dimetilpolisiloxano) e espessura do filme de 0,25 μm . O hidrogênio (H_2) foi utilizado como gás de arraste em um fluxo de 1,2 mL/min. As temperaturas do injetor e do detector foram de 260 °C e 280 °C, respectivamente. Foram injetados 1,0 μL de solução em etanol no modo divisão de fluxo ou do inglês *split* (1:5). A programação de temperatura da coluna para as análises teve início em 120 °C, seguida de aquecimento na taxa de 12 °C/min até atingir 280 °C. As concentrações relativas dos compostos foram determinadas através das áreas integradas dos seus respectivos picos, relacionadas com a área total de todos os compostos constituintes da amostra.

2.2. CG-EM

As análises qualitativas das preparações caseiras, bem como a caracterização dos padrões de eugenol e acetato de eugenila, foram feitas em equipamento CG da Agilent

(6890N *Network GC System*) acoplado a um espectrômetro de massas (EM) da Agilent (5973N *Network Mass Selective Detector*), utilizando o *software* Willey 7.1. Foi utilizada a mesma coluna da quantificação por DIC e na metodologia só foi alterado o gás de arraste (neste caso o hélio foi utilizado). O modo de operação do EM utilizado foi a impacto de elétrons (IE) a 70 eV. Os constituintes químicos do extrato caseiro foram identificados através da comparação com a biblioteca de substâncias do *software* e com dados da literatura.

2.3. IV

Foi montado um filme de nujol a partir do padrão de eugenol e outro com o padrão do acetato de eugenila para posterior análise. Os espectros foram registrados em um espectrofotômetro da Shimadzu® FT-IR (*Fourier transform infrared spectroscopy*), Prestige 21, usando uma janela espectral de 400 a 4000 cm^{-1} com 32 varreduras.

2.4. RMN

Os espectros de RMN ^1H , ^{13}C e DEPT (Distortion-less Enhancement by Polarization Transfer) foram obtidos em um espectrômetro BRUKER® Digital NMR 400 MHz. As análises de ^1H tiveram 16 varreduras

em uma janela de 8.272,146 Hz. As análises de ^{13}C foram feitas em uma janela de 23.980,814Hz com 256 varreduras para o eugenol e 512 para o acetato de eugenila. Aproximadamente 10 mg de padrão de eugenol e acetato de eugenila foram solubilizados em 0,7 mL de CDCl_3 . A solução foi colocada em tubos de 5 mm de diâmetro para a análise à 298 K. Como referência foi usado tetrametilsilano (TMS da Aldrich).

2.5. Padrões

Os padrões utilizados foram Acetato de eugenila – Lote: STBE4523 da Sigma Aldrich® (Alemanha), Eugenol – Lote: STBC3761 da Sigma Aldrich® (Alemanha). Ambos com purezas superiores a 98%.

3. Resultados e Discussão

3.1. Caracterização dos padrões

Presentes também nos botões florais de *S. aromaticum*, o eugenol e o acetato de eugenila foram tratados como principais compostos responsáveis pela possível atividade repelente do *S. aromaticum*. Por isso, com auxílio dos padrões adquiridos comercialmente, suas estruturas químicas foram confirmadas através de análises de RMN, IV e EM. Esse estudo é importante não só para a validação como também para servir de consulta para futuros trabalhos que visem caracterizar possíveis extrações desses compostos.

3.1.1. Estudo por RMN

Para confirmação das estruturas, os padrões obtidos foram analisados por RMN através dos espectros de ^1H , ^{13}C e DEPT.

No espectro de RMN ^{13}C as amostras de eugenol e acetato de eugenila puderam ser caracterizadas e discriminadas tendo em vista a presença do grupo funcional éster encontrado apenas na amostra de acetato de eugenila (Tabela 3).

Acetato de eugenila		Eugenol	
Carbono	Deslocamento (δ ppm)	Carbono	Deslocamento (δ ppm)
1	138,23	1	144,13
2	151,08	2	146,66
3	112,95	3	114,47
4	139,21	4	132,12
5	120,88	5	121,39
6	122,72	6	115,70
7	40,29	7	40,09
8	137,24	8	138,02
9	116,34	9	111,34
11	56,01	11	56,06
13	169,39	-	-
14	20,85	-	-

O DEPT 90 mostra os sinais que representam os grupamentos CH. Já no DEPT 135 são representados os carbonos CH₂ para baixo e os carbonos CH e CH₃ para cima. Desta maneira, observando os dois espectros é possível identificar cada espécie de carbono hidrogenado. Na Tabela 4 é possível observar

que a amostra de acetato de eugenila possui justamente um pico de metila a mais do que a amostra de eugenol. Essa metila do acetato de eugenila está relacionada ao éster presente apenas na estrutura dessa molécula.

Tabela 4. Deslocamentos químicos (δ ppm) das amostras de eugenol e acetato de eugenila nas análises por DEPT 90 e 135

	Acetato de eugenila	Eugenol
CH	137,24;	138,03;
	122,72;	121,40;
	120,88;	114,47;
	112,96	111,34
CH ₂	116,35;	115,70;
	40,29	40,09
CH ₃	56,02;	56,07
	20,87	

3.1.2. Estudo por CG-EM

O espectro de massa do eugenol tem o mesmo íon molecular (m/z 164 e abundância de 100%), como descrito por Santin *et al.* (2011),⁶ fragmentos de m/z 91 e m/z 77 (abundância de 25%), uma característica dos compostos aromáticos e m/z 149 (abundância de 33%), e m/z 137 (abundância de 24%), também foram observados. O acetato de eugenila apresentou seu íon molecular em 206 m/z (abundância de 12%), tal como descrito por Santin *et al.* (2011)⁶ os íons dos fragmentos característicos de anéis aromáticos (m/z 91 e m/z 77 com abundância de 12%) e o pico de base de m/z 164 (abundância de 100%).

3.1.3. Estudo por IV

O espectro de absorção infravermelho (IV) dos padrões de acetato de eugenila e eugenol estão representados nas Figuras 2 e 3.

Na molécula de eugenol podem-se destacar as bandas de estiramento axial de OH em 3.520 cm^{-1} , as de éter aromático em 1.033 cm^{-1} (de baixa intensidade) e 1.277 cm^{-1} (de maior intensidade) e a banda do anel aromático em 1.514 cm^{-1} (figura 2).

A molécula de acetato de eugenila, com a presença da função éster ligada ao anel aromático, possui uma banda característica da carbonila éster em 1764 cm^{-1} , além de duas bandas de estiramento axial de éster em 1.198 cm^{-1} (alta intensidade) e 1.269 cm^{-1} (média intensidade) (figura 3).

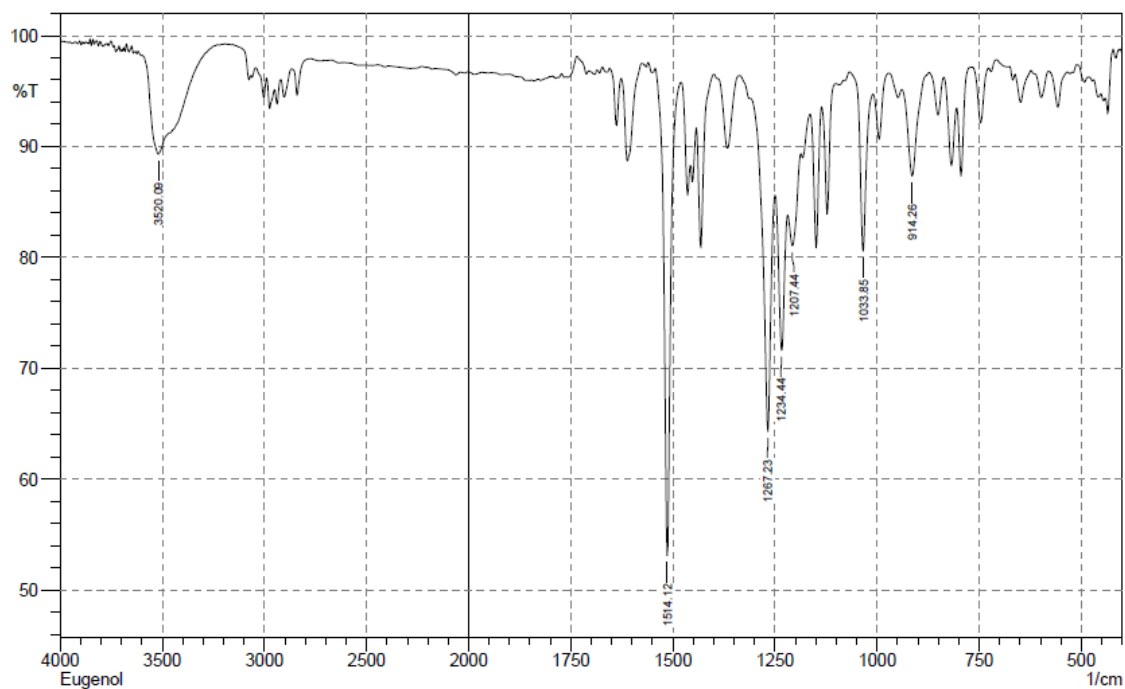


Figura 2. Espectro de FTIR da molécula de eugenol

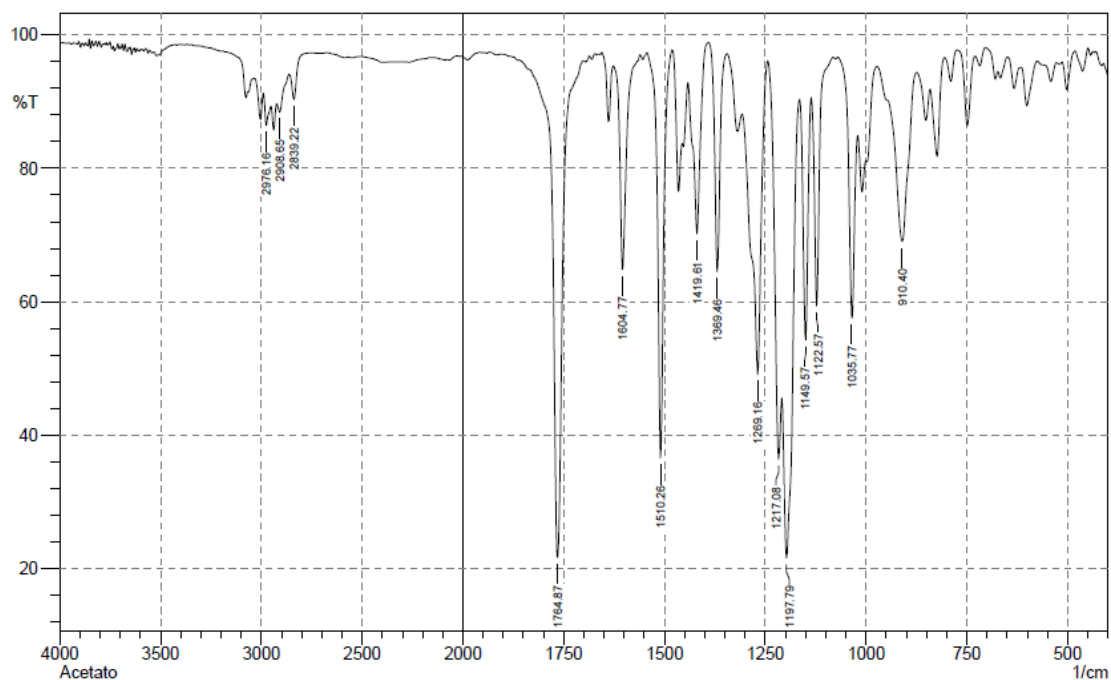


Figura 3. Espectro de FTIR da molécula de acetato de eugenila

3.2. Otimização da metodologia de análise

Com base nas metodologias analíticas já descritas na literatura,^{1,3,6,16,17,21,22,34-36} nas características voláteis dos compostos presentes no extrato etanólico de *S. aromaticum* e no fato de haver uma maior

concentração de eugenol e acetato de eugenila nos botões florais de dessa especiaria, a técnica de CG-DIC foi escolhida para a quantificação dos analitos nas amostras selecionadas.

O cromatograma da Figura 4 mostrou uma boa resolução para a análise simultânea dos dois analitos a partir da injeção dos padrões.

O tempo total de análise ficou em 16 minutos com tempos de retenção (t_R) de aproximadamente 8,8 minutos para o eugenol e 10,3 minutos para o acetato de eugenila. O solvente utilizado para a diluição foi o etanol, o qual teve seu t_R observado em 4,7 minutos.

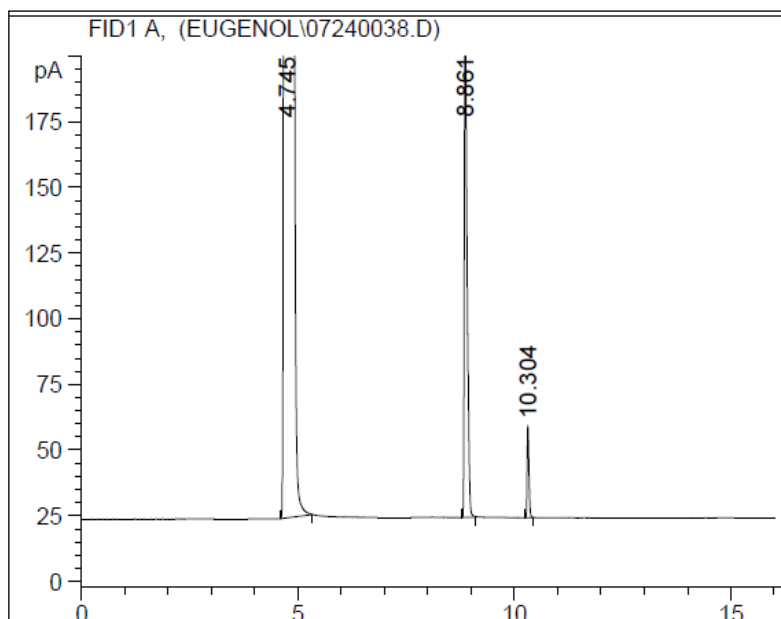


Figura 4. Cromatograma contendo os padrões de eugenol com t_R de 8,86 min e o acetato de eugenila com um t_R de 10,30 min.

3.3. Quantificação

Amostras de *S. aromaticum* foram coletadas a partir de quatro fontes distintas na cidade do Rio de Janeiro, para mimetizar os possíveis comportamentos da população na busca por esta especiaria. De modo a reproduzir a metodologia e avaliar o processo de extração potencial em diversas amostras selecionadas, foi desenvolvido um protocolo para a análise das amostras de acordo com a

resolução 899 da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária).⁴¹ As amostras foram pesadas e separadas em frascos, à cada frasco foi adicionado 5,0 mL de etanol. Os frascos foram deixados à temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C) de acordo com o tempo de maceração proposto pelo protocolo. As amostras não foram expostas ao sol e nem moídas. A Tabela 5 apresenta a quantidade de material extraído de acordo com o protocolo proposto na nossa metodologia (Tabela 2).

Tabela 5. Massa de cravo para 5,0 mL de etanol com variação na quantidade de dias de extração e na origem das amostras

Amostra	Tempo de extração			
	12 horas	1 Dia	4 Dias	10 Dias
Kitano	1,02 g	1,03 g	1,02 g	1,06 g
Chineizinho	1,07 g	1,08 g	1,06 g	1,07 g
Mercadão	1,00 g	1,05 g	1,01 g	1,05 g
CADEG	1,01 g	1,04 g	1,07 g	1,08 g
CEASA	1,06 g	1,03 g	1,01 g	1,02 g

No final do processo de extração, a fase líquida foi separada do sólido por filtração. O líquido amarelado obtido apresentou um odor característico de *S. aromaticum*, especialmente nas amostras submetidas a tempo de maceração mais longo.

A análise das amostras confirmou o eugenol como principal composto presente nos extratos, corroborando os resultados de vários autores que identificaram esta substância como o principal componente em extratos de *S. aromaticum*.^{1,3,6,16,42,43}

A alta concentração de eugenol nas amostras é um fator determinante para o odor característico apresentado por todas elas (Figura 5). Os resultados quantitativos de eugenol variaram de 96,34% a 69,52%. A diminuição no percentual do eugenol na área total das amostras não representa uma diminuição na área do pico e sim um aumento na contribuição por parte de outros picos como o acetato de eugenila e um pico com t_R em 9,8 (min.) que, segundo a espectrometria de massas, corresponde à coeluição do α -humuleno e do β -cariofileno.

Estes compostos já tinham sido observados em outros trabalhos,^{1,3,6,16,34,42,43} mas por apresentarem-se como componentes minoritários do produto da extração (valor máximo observado foi de 3,2 %) e segundo Affonso *et al.* (2013)³⁶ por não demonstrarem interações com a proteína AgamOBP1, sua caracterização e quantificação não foi priorizada. O pico

correspondente ao t_R 9,7 (min.) foi observado em todas as amostras a partir do quarto dia de sua extração (Figura 6).

A intensidade das áreas dos picos do acetato de eugenila e dos compostos α -humuleno e β -cariofileno não apresentaram aumento significativo com a extração em tempo maior (10 dias). Entretanto, a área do pico do eugenol cresceu consideravelmente, tendo quase dobrado em todas as amostras analisadas nos tempos de 4 e 10 dias. Diante da possível capacidade repelente da molécula de eugenol, é possível sugerir que haja um tempo maior de extração a fim de aperfeiçoar o processo. Isso em se tratando da preparação artesanal (caseira) do produto (Figura 7).

A origem do produto também pode influenciar nos teores obtidos a partir do extrato. Foi possível observar que o produto da marca Chineizinho® apresentou níveis maiores de eugenol em todos os tempos de extração. Nas amostras desta marca também foram observadas a presença de α -humuleno e β -cariofileno em todos os níveis de extração (Figura 6).

Outros fatores como sazonalidade ou região produtora também influenciam o teor de eugenol nas amostras de cravo, entretanto esses parâmetros não foram avaliados neste trabalho tendo em vista que seu objetivo foi mimetizar o procedimento artesanal usado pela população em geral na produção "caseira".^{1,3}

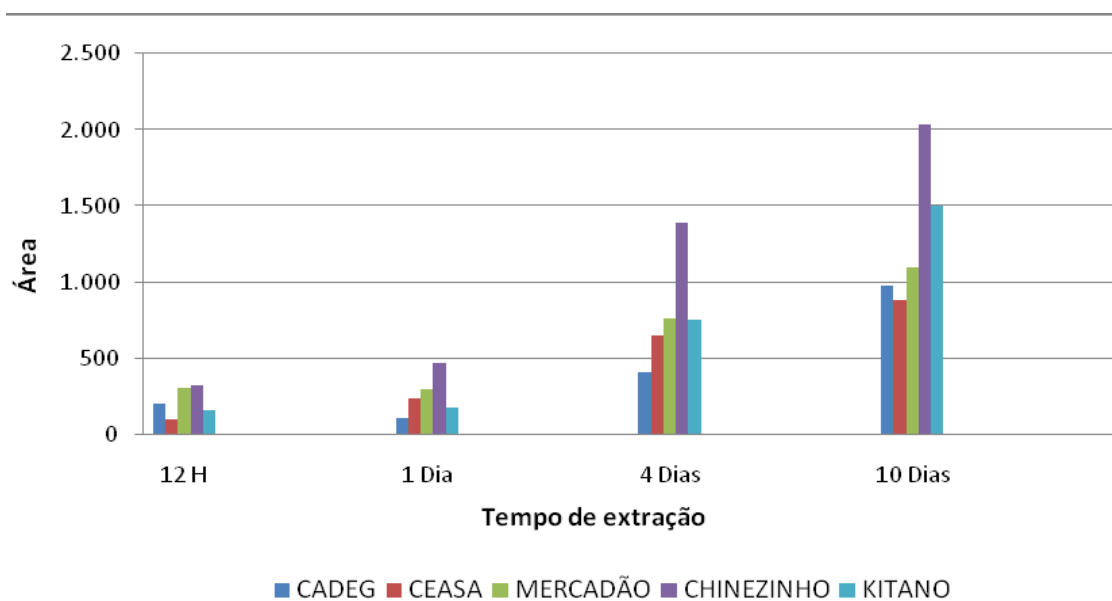


Figura 5. Representação das áreas referentes ao eugenol de acordo com a origem da amostra e o tempo de extração

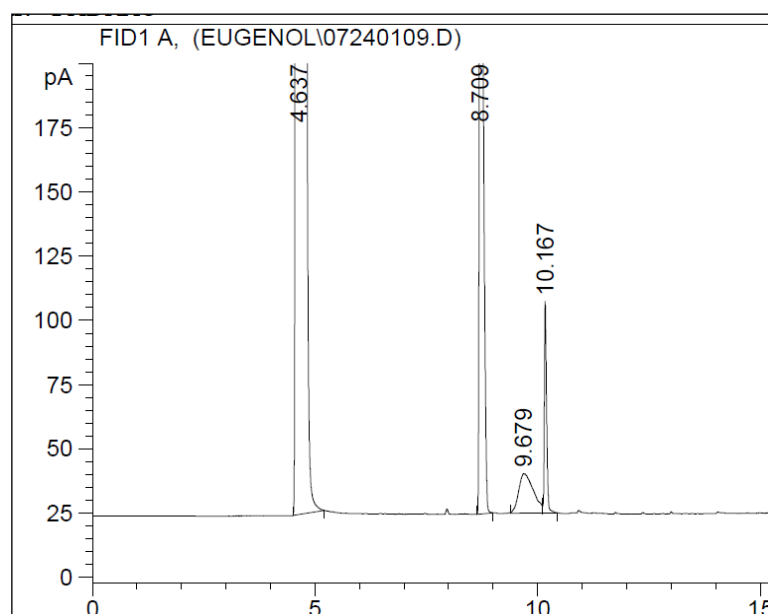


Figura 6. Cromatograma da amostra da marca Chinezinho® macerada em etanol por 10 dias apresenta o pico em 9.679 min correspondente a coeluição, confirmada por CG-EM do α -humuleno e β -cariofileno

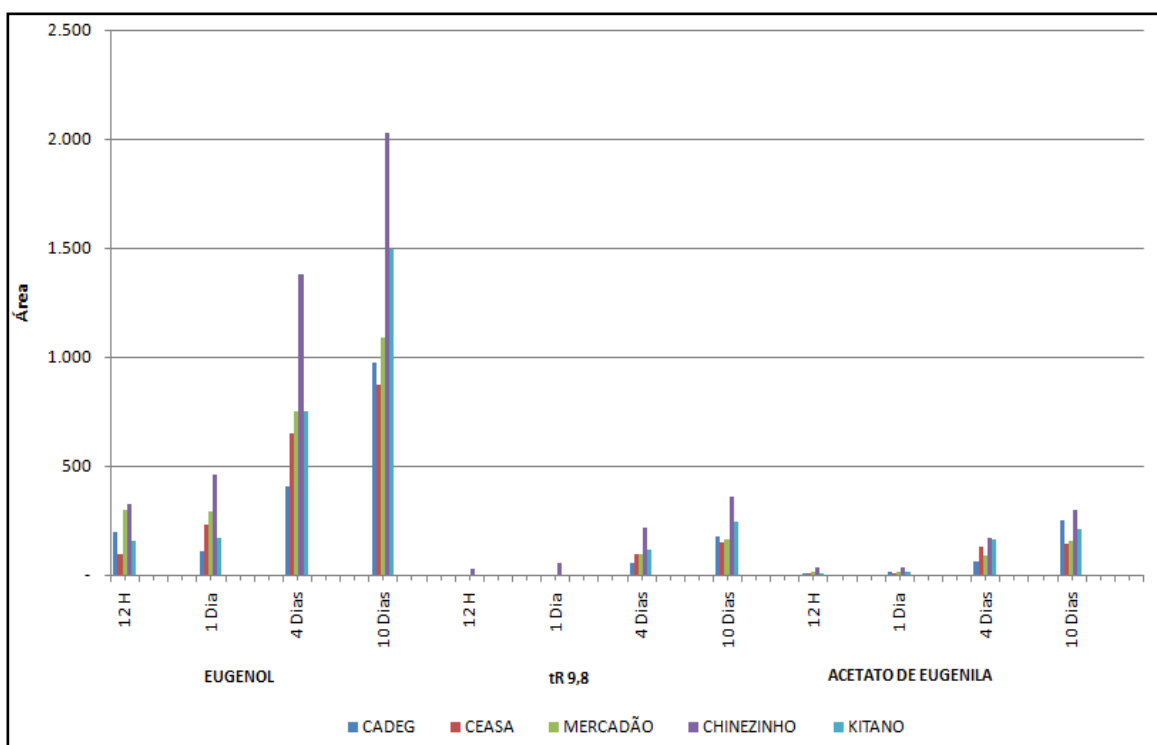


Figura 7. Representação das áreas dos três picos encontrados nas amostras de acordo com o tempo de extração

Dentro da teoria matemática os coeficientes de uma curva são feitos usando regressão linear (a e b) e o coeficiente de correlação (r).⁴⁴ A ANVISA recomenda um "r" maior que 0,99 a fim de se obter evidência de um ajuste ideal dos dados estatísticos e que esses dados possuam uma baixa dispersão do

conjunto de pontos experimentais.^{41,44}

As curvas de calibração (Figura 8) apresentaram um "r" dentro daquele estipulado pela a resolução 899 da ANVISA (2003).⁴¹ Com isso, o método mostrou-se linear para as faixas de trabalhos propostas para as duas moléculas.

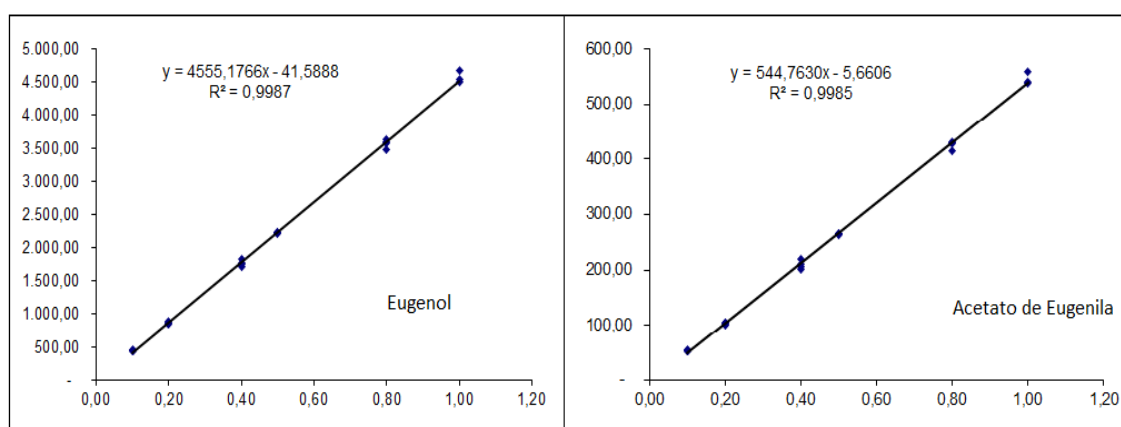


Figura 8. Curvas de calibração dos padrões de Eugenol e Acetato de Eugenila

A repetibilidade é também chamada de precisão intracorrída e junto com os testes de precisão-intemediária (intercorrída) e reprodutibilidade (interlaboratorial) determinam a precisão do método analítico.⁴¹

A análise estatística para observação da repetibilidade se dá através da análise do desvio padrão relativo (DRP) que segundo RIBANI *et. al.*, (2004)⁴⁴ para quantificação de compostos macro deve ser de até 2%.

As concentrações das amostras foram selecionadas em três níveis (baixo, médio e alto) para as duas amostras, com injeções em triplicatas. Os dados estão descritos com o DRP calculado na Tabela 6.

As amostras de eugenol apresentaram DRP máximo de 1,82 %. Valor ainda alto, porém dentro dos parâmetros aceitáveis, assim como a molécula de acetato de eugenila que também apresentou elevado DRP (1,97%).

Tabela 6. Cálculos do desvio padrão das amostras de eugenol e acetato de eugenila em três níveis de concentrações (baixo, médio e alto)

Eugenol				
Concentração (mg/mL)	Medida	Média	Desvio Padrão	DRP (%)
0,79	438,60	439,10	6,86	1,56
	446,20			
	432,50			
3,97	2.178,80	2.178,70	0,56	0,03
	2.179,20			
	2.178,10			
7,93	4.170,80	4.108,97	74,96	1,82
	4.130,50			
	4.025,60			
Acetato de eugenila				
Concentração (mg/mL)	Medida	Média	Desvio Padrão	DRP (%)
0,11	54,60	54,60	0,50	0,92
	55,10			
	54,10			
0,53	274,40	273,73	0,61	0,22
	273,60			
	273,20			
1,06	525,10	514,00	10,12	1,97
	511,60			
	505,30			

4. Considerações Finais

Os nossos resultados mostraram que o protocolo utilizado para a preparação do repelente caseiro a base de cravo é eficiente para a extração do eugenol, o principal

composto presente nos botões de flores de *S. aromaticum*. O acetato de eugenila, que é estruturalmente semelhante ao eugenol, também é extraído no processo, mesmo em tempos de extração inferiores.

A avaliação dos extratos a partir de diferentes fontes mostrou que amostras de

origem controlada, apresentou uma concentração mais elevada de eugenol. Em relação ao tempo de extração foi observado que 4 dias de extração é suficiente para extrair de maneira artesanal uma boa porção do eugenol e, por conseguinte, produzir um repelente caseiro eficiente.

Referências Bibliográficas

- ¹ Affonso, R. S.; Rennó, M. N.; Slana, G. B. C. A.; França, T. C. C. Aspectos químicos e biológicos do óleo essencial de Cravo da Índia. *Revista Virtual de Química* **2012**, *4*, 146. [CrossRef]
- ² Lorenzi, H.; Matos, F. J.; *Plantas medicinais no Brasil nativas e exóticas*, Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA: São Paulo, 2002.
- ³ Chaieb, K.; Hajlaoui, H.; Zmantar, T.; Kahla-Nakbi, A. B.; Rouabhia, M.; Mahdouani, K.; Bakhrouf, A. The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* l. myrtaceae): a short review. *Phytotherapy Research* **2007**, *21*, 501. [CrossRef] [PubMed]
- ⁴ Pramod, K.; Ansari, S. H.; Ali, J. Eugenol: A natural compound with versatile pharmacological actions. *Natural Product Communications* **2010**, *5*, 1999. [PubMed]
- ⁵ Tragoolpua Y.; Jatisatienr A. Anti-herpes simplex virus activities of *Eugenia caryophyllus* (Spreng.) Bullock & S. G. Harrison and essential oil, eugenol. *Phytotherapy Research* **2007**, *21*, 1153. [CrossRef] [PubMed]
- ⁶ Santin, J. R.; Lemos, M.; Klein-Júnior, L. C.; Machado, I. D.; Costa, P.; De Oliveira, A. P.; Tilia, C.; De Souza, J. P.; De Souza, J. P. B.; Bastos, J. K.; De Andrade, S. F. Gastroprotective activity of essential oil of the *Syzygium aromaticum* and its major component eugenol in different animal models. *Naunyn-Schmiedeberg Archives of Pharmacology* **2011**, *383*, 149. [CrossRef] [PubMed]
- ⁷ Magaji, R. A.; Okasha, M. A. M.; Abubakar, M. S.; Fatihu M. Y. Anti-ulcerogenic and anti-secretory activity of the n-butanol portion of *Syzygium aromaticum* in rat. *Nigerian Journal of Pharmaceutical Sciences* **2007**, *6*, 119. [Link]
- ⁸ Shukri, R.; Mohamed, S.; Mustapha, N. M. Cloves protect the heart, liver and lens of diabetic rats. *Food Chemistry* **2010**, *122*, 1116. [CrossRef]
- ⁹ Arung, E. T.; Matsubara, E.; Kusuma, I. W.; Sukaton, E.; Shimizu, K.; Kondo, R. Inhibitory components from the buds of clove (*Syzygium aromaticum*) on melanin formation in B16 melanoma cells. *Fitoterapia* **2011**, *82*, 198. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁰ Pal, D.; Banerjee, S.; Mukherjee, S.; Roy, A.; Panda, C. K.; Das, S. Eugenol restricts DMBA croton oil induced skin carcinogenesis in mice: Downregulation of c-Myc and H-ras, and activation of p53 dependent apoptotic pathway. *Journal of Dermatological Science* **2010**, *59*, 31. [CrossRef] [PubMed]
- ¹¹ Michielin, E. M.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil, 2009.
- ¹² Velisek, J.; Stara, A.; Li, Z.-H.; Silovska, S.; Turek, J. Comparison of the effects of four anaesthetics on blood biochemical profiles and oxidative stress biomarkers in rainbow trout. *Aquaculture* **2011**, *310*, 369. [CrossRef]
- ¹³ Bilbao, A.; De Vicose, G. C.; Vieira, M. P.; Sosa, B.; Fernández-Palacios, H.; Hernández, M. C. Efficiency of clove oil as anesthetic for abalone (*Haliotis tuberculata coccinea*, reeve). *Journal of Shellfish Research* **2010**, *29*, 679. [CrossRef]
- ¹⁴ Daniel, A. N.; Sartoretto, S. M.; Schmidt, G.; Caparroz-Assef, S. M.; Bersani-Amado, C. A.; Cuman, R. K. N. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of eugenol essential oil in experimental animal models. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2009**, *19*, 212. [CrossRef]
- ¹⁵ Pawar, V. C.; Thaker, V. S. In vitro efficacy of 75 essential oils against *Aspergillus niger*. *Mycoses* **2006**, *49*, 316. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁶ Santoro, G. F.; Cardoso, M. G.; Guimarães, L. G. L.; Mendonça, L. Z.; Soares, M. J. *Trypanosoma cruzi*: Activity of essential oils from *Achillea millefolium* L., *Syzygium aromaticum* L. and *Ocimum basilicum* L. on

- epimastigotes and trypomastigotes. *Experimental Parasitology* **2007**, *116*, 283. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁷ Pereira, A. A.; Cardoso, M. G.; De Abreu, L. R.; De Moraes, A. R.; Guimarães, L. G. L.; Salgado, A. P. S. P. Caracterização química e efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. *Ciência e Agrotecnologia* **2008**, *32*, 887. [[CrossRef](#)]
- ¹⁸ de Paoli, S.; Giani, T. S.; Presta, G. A.; Pereira, M. O.; Da Fonseca, A. S.; Brandão-Neto, J.; Medeiros, A. C.; Santos-Filho, S. D.; Bernardo-Filho, M. Effects of clove (*Caryophyllus aromaticus* L.) on the labeling of blood constituents with technetium-99m and on the morphology of red blood cells. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **2007**, *50*, 175 [[CrossRef](#)]
- ¹⁹ Scherer, R.; Wagner, R.; Duarte, M. C. T.; Godoy, H. T. Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* **2009**, *11*, 442. [[CrossRef](#)]
- ²⁰ Veiga Junior, V. F.; Pinto, A. C. O GÊNERO *Copaifera* L. *Química Nova* **2002**, *25*, 273. [[CrossRef](#)]
- ²¹ Rabêlo, W. F.; *Dissertação de mestrado*, Universidade Federal do Maranhão, Brasil, **2010**. [[Link](#)]
- ²² Affonso, R. S.; *Dissertação de mestrado*, Instituto Militar de Engenharia, Brasil, 2013.
- ²³ Moon, S.-E.; Kim, H.-Y.; Cha, J.-D. Synergistic effect between clove oil and its major compounds and antibiotics against oral bacteria. *Archives of oral biology* **2011**, *56*, 907. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁴ Katz T. M.; Miller, J. H.; Hebert, A. A. Insect repellents: Historical perspectives and new developments. *Journal of the American Academy of Dermatology* **2008**, *58*, 865. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁵ Ribas, J.; Carreño, A. M. Avaliação do uso de repelentes contra picada de mosquitos em militares na Bacia Amazônica. *Anais Brasileiros de Dermatologia* **2010**, *85*, 33. [[CrossRef](#)]
- ²⁶ Ives A. R.; Paskewitz, S. M.; Testing vitamin B as a home remedy against mosquitoes. *Journal of the American Mosquito Control Association* **2005**; *21*, 213. [[CrossRef](#)]
- ²⁷ Sritabutra, D.; Soonwera, M.; Waltanachanobon, S.; Pongjai, S. Evaluation of herbal essential oil as repellents against *Aedes aegypti* (L.) and *Anopheles dirus* Peyton & Harrion. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* **2011**, *1*, S124. [[CrossRef](#)]
- ²⁸ Shapiro, R. Prevention of vector transmitted diseases with clove oil insect repellent. *Journal of Pediatric Nursing* **2011**, *27*, 346. [[CrossRef](#)]
- ²⁹ Choi, H.-Y.; Yang, Y.-C.; Lee, S. H.; Clark, J. M.; Ahn, Y.-J. Efficacy of spray formulations containing binary mixtures of clove and eucalyptus oils against susceptible and pyrethroid/ malathion-resistant head lice (anoplura: pediculidae). *Journal of Medical Entomology* **2010**, *47*, 387. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁰ Trongtokit, Y.; Rongsriyam, Y.; Komalamisra, N.; Krisadaphong, P.; Apiwathnasorn, C. Laboratory and field trial of developing medicinal local thai plant products against four species of mosquito vectors. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* **2004**, *35*, 325. [[Link](#)] [[PubMed](#)]
- ³¹ Trongtokit, Y.; Rongsriyam, Y.; Komalamisra, N.; Apiwathnasorn, C. Comparative repellency of 38 essential oils against mosquito bites. *Phytotherapy Research* **2005**, *19*, 303. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³² Plarre, R.; Pöschko, M.; Prozell, S.; Frank, A.; Wohlgemuth, R.; Phillips, J. K. Effects of oil of cloves and citronellol, two commercially available repellents, against the webbing clothes moth *Tineola bisselliella* Hum. (Lepidoptera: Tineidae). *Anzeiger für Schädlingkunde* **1997**, *70*, 45. [[Link](#)]
- ³³ Pasay, C.; Mounsey, K.; Stevenson, G.; Davis, R.; Arlian, L.; Morgan, M.; Vyszenski-Moher, D.; Andrews, K.; McCarthy, J. Acaricidal activity of eugenol based compounds against scabies mites. *PLoS One* **2010**, *5*, e12079. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁴ Lucca, P. S.; *Dissertação de Mestrado*, UNIOESTE, Cascavel, Brasil, 2009. [[Link](#)]
- ³⁵ De Oliveira, R. A.; Reis, T. V.; Do Sacramento, C. K.; Duarte, L. P.; De Oliveira, F. F. Constituintes químicos voláteis de

- especiarias ricas em eugenol. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2009**, *19*, 771. [CrossRef]
- ³⁶ Affonso, R. S.; Guimarães, A. P.; Oliveira, A. A.; Slana, G. B. C.; França, T. C. C. Applications of molecular modeling in the design of new insect repellents targeting the odorant binding protein of *Anopheles gambiae*. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2013**, *24*, 473. [CrossRef]
- ³⁷ Portal de Boa Vista da Aparecida – Paraná. Disponível em <http://www.portalbva.com.br/index.php?option=com_content&view=article&id=476:secretaria-de-saude-de-boa-vista-na-luta-contra-a-dengue&catid=34:conteudo&Itemid=56>. Acesso em maio 2012.
- ³⁸ Garcez, W. S.; Garcez, F. R.; Silva, L. M. G. E.; Sarmiento, U. C. Substâncias de Origem Vegetal com Atividade Larvívica Contra *Aedes aegypti*. *Revista Virtual de Química* **2013**, *5*, 363. [Link]
- ³⁹ Sítio do Ministério da Saúde. Disponível em <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/dcc_obito_2001_2011_10_02_12.pdf>. Acesso em maio 2012.
- ⁴⁰ Oussalah, M.; Caillet, S.; Saucier, L.; Lacroix, M.; Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control* **2006**, *18*, 414. [CrossRef]
- ⁴¹ RE 899 da ANVISA Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/4983b0004745975da005f43fbc4c6735/RE_899_2003_Determina+a+publica%C3%A7%C3%A3o+do+Guia+para+valida%C3%A7%C3%A3o+de+m%C3%A9todos+anal%C3%ADticos+e+bioanal%C3%ADticos.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em julho 2014.
- ⁴² Politeo, O.; Jukic, M.; Milos, M. Comparison of chemical composition and antioxidant activity of glycosidically bound and free volatiles from clove (*Eugenia caryophyllata* thunb.). *Journal of Food Biochemistry* **2010**, *34*, 129. [CrossRef]
- ⁴³ Mazzafera, P. Estudo toxicológico pré-clínico (agudo) do extrato do *Syzygium aromaticum* (L) em roedores. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2003**, *26*, 231. [CrossRef]
- ⁴⁴ Ribani, M.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F.; Melo, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova* **2004**, *27*, 771. [CrossRef]