

Caracterização química e citotoxicidade do óleo essencial do cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*)

Paulo Roberto Barros Gomes^{1*}, Victor Elias Mouchrek Filho¹, Waléria Ferreira Rabêlo¹, Alexandre Albuquerque do Nascimento¹, Hilton Costa Louzeiro¹, Wellington da Silva Lyra², Maria Alves Fontenele³

¹ Laboratório de Pesquisa e Aplicação de Óleo Essenciais, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, Maranhão, Brasil.

² Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brasil.

³ Laboratório de Cereais, Coordenação de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Maranhão – Campus Avançado, Imperatriz, Maranhão, Brasil.

* Correios eletrônicos: prbgomes@yahoo.com.br; prb.gomes@ufma.br

Recebido em: 08 de Junho de 2017

Aceito em: 14 de Dezembro de 2017

RESUMO

Este trabalho avalia as propriedades-físico químicas do óleo essencial dos botões florais seco do cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) que são encontradas no Município de São Luís, Maranhão. Extraíu-se quantitativamente o óleo essencial por hidrodestilação. Determinaram-se as propriedades físico-químicas do óleo essencial (densidade, índice de refração, solubilidade, cor e aparência) e atividade citotóxica frente às larvas da *Artemia salina*. Caracterizou-se analiticamente o óleo por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM). Os resultados mostram que o melhor tempo e o rendimento do óleo foram correspondentemente 4 horas e 4,33 % de massa por volume. A partir disso foi possível identificar 5 componentes, sendo a presença majoritária do eugenol que logo foi confirmada pelas técnicas espectroscópica. Na identificação do componente majoritário e dos demais

componentes, bem como suas quantificações, as técnicas foram precisas e os métodos eficientes, proporcionando um bom desempenho analítico nas determinações.

Palavras chave: avaliação físico-química, *Syzygium aromaticum*, botões florais, Eugenol, hidrodestilação.

Summary

Chemical characterization and cytotoxicity of clove essential oil (*Syzygium aromaticum*)

This work evaluates the physical-chemical properties of the essential oil of the dry floral buds of clove (*Syzygium aromaticum*) that are found in the Municipality of Saint Louis, Maranhão. The essential oil was quantitatively extracted by hydrodistillation. The physicochemical properties of the essential oil (density, refractive index, solubility, color and appearance) and cytotoxic activity against larvae of *Artemia salina* were determined. The oil was analytically characterized by gas chromatography coupled to mass spectrometer (GC-MS). The results show that the best time and yield of the oil were correspondingly 4 hours and 4.33% mass per volume. From this, it was possible to identify five components, being the major presence of eugenol that soon was confirmed by the spectroscopic techniques. In the identification of the major component and the other components, as well as their quantifications, the techniques were precise and the methods efficient, providing a good analytical performance in the determinations.

Key words: Physical-chemical evaluation, *Syzygium aromaticum*, floral buds, Eugenol, hydrodistillation

INTRODUÇÃO

O craveiro-da-índia é uma árvore de ciclo perene, que cresce a uma altura que varia de 10 a 12 metros, possui folhas ovais grandes e flores de cor vermelha que se apresentam em numerosos grupos de cachos terminais [1]. Essa planta vive por cerca de 100 anos e há alguns recordes de árvores atingindo 150 anos [2].

O cravo-da-índia é colhido na forma de botão floral maduro e comercializado na forma de botão floral seco, sendo a qualidade do produto (cravo com cabeça proveniente de

botão colhido antes da antese) primordial para a obtenção de melhores preços no mercado nacional e internacional. Os botões florais do craveiro-da-índia são colhidos com pedicelo, e estes são eliminados durante o processo de destalamento. Além disso, grande quantidade de folhas é derrubada durante o processo de colheita, seja ele manual ou químico. Tais resíduos provenientes da colheita também constituem fonte de óleos essenciais [3]. Os botões florais adquirem primeiro uma cor pálida e, gradualmente tornam-se verdes, então eles se tornam vermelho brilhante quando prontos para a coleta. Os botões são colhidos quando chegam a ter 1,5 - 2 cm de comprimento [1]. Das sementes de aroma ativo, extrai-se o ácido eugênico, incolor e de sabor picante. Sua composição química é constituída principalmente por eugenol, acetato de eugenol, β -cariofileno, ácido oleânico, e substâncias das classes: triterpeno, ceras vegetais, cetonas, resinas, taninos e esteróis [4].

O óleo essencial do botão do cravo é pouco produzido, embora sua procura seja grande. O botão contém 17% de óleo essencial e o talo que o acompanha contém 4,5 – 6,0% [5]. O principal componente do óleo de cravo é geralmente considerado como eugenol seguido pelo β -cariofileno e menores quantidades de outros componentes, tais como álcool benzílico, mas as proporções variam amplamente [6].

Com a finalidade de manter os pesquisadores ou mesmo leitores leigos informados, Affonso e colaboradores [7] descrevem em seu trabalho informações úteis sobre o *Syzygium aromaticum*, tais como: os aspectos históricos, a composição química, aplicações e as principais atividades que foram obtidas a partir do óleo essencial dessa espécie.

Nesse contexto, este trabalho avalia analiticamente as propriedades físico-químicas e a citotoxicidade do óleo essencial dos botões do cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) que são comercializadas em supermercados da rede varejista do Município de São Luís.

METODOLOGIA

Obtenção dos botões florais

Os botões florais foram obtidos em supermercado da rede varejista de São Luís, identificados como (*Syzygium aromaticum*) e levados ao laboratório de Físico-Química de Alimentos do Pavilhão Tecnológico da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), para extração do óleo essencial.

Extração do óleo essencial

Para a extração do óleo essencial do *Syzygium aromaticum*, 68,79 g desses botões florais foram triturados em um moinho elétrico de facas da marca Tecnal-modelo TE340.

Após esse procedimento, o material foi transferido para um balão de fundo redondo com capacidade de 1000 mL, onde efetuou-se a adição de 200 mL de água destilada e o acoplamento ao extrator de Clevenger.

Em seguida ligava-se a manta elétrica e mantinha-se a temperatura em 100 °C. Após 4 horas, encerrava-se a destilação recolhendo-se o óleo essencial. O óleo foi seco por meio de percolação em sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄). Essas operações foram realizadas em triplicatas e as amostras armazenadas em ampolas de vidro âmbar sob refrigeração para evitar possíveis perdas de constituintes voláteis. Posteriormente esses óleos foram submetidos às análises.

O rendimento do óleo essencial foi expresso em porcentagem na relação massa/volume pela medida da densidade, observando o volume (mL) de óleo essencial obtido após a extração do óleo por massa (g) de material vegetal, conforme descrito pela Farmacopeia Brasileira [8] e Fabrowski [9].

Análise físico-química do óleo essencial

As propriedades físico-químicas do óleo essencial determinadas foram: densidade, solubilidade em etanol a 70% v/v, índice de refração, cor e aparência.

Análise química do óleo essencial

Para as análises químicas, utilizou-se a técnica cromatografia em fase gasosa acoplada ao espectrômetro de massas por impacto de elétrons e analisador íon trap (CG-EM-IE-Ion trap). O equipamento utilizado foi da marca Varian 2100, utilizando hélio como gás de arraste com fluxo na coluna de 1 mL min⁻¹; temperatura do injetor de 280 °C, split 1:10; coluna capilar (15 m x 0,25 mm) com fase estacionária VF-1ms (100 % metilsiloxano 0,25 µm) e programação de temperatura do forno de 40 °C a 240 °C com taxa de aquecimento de 8° C min⁻¹. No Espectrômetro de Massas, as temperaturas do mainfold, ion trap e da linha de transferência foi de 280 °C. Foram injetadas alíquotas de 0,3 µL (injetor automático CP-8410) das amostras diluídas na proporção de 1mg da amostra em 1000 µL de diclorometano.

A determinação da concentração do eugenol e dos demais componentes do óleo essencial por esse método foi obtida através da integração eletrônica das áreas dos picos cromatográficos, utilizando o programa AMDIS (*Automated Mass Spectral Deconvolution Mass & Identification System*): Programa utilizado para a interpretação dos espectros de massas quando havia diferenças significativas entre o espectro de massas obtido e o encontrado na biblioteca do CG/EM.

Bioensaio do óleo essencial frente a *Artemia salina*

A metodologia utilizada para os ensaios de citotoxicidade utilizando *Artemia salina* foi baseada em Meyer *et al.* [10] e em Nascimento *et al.* [11].

Em um recipiente retangular, com uma divisória contendo furos de aproximadamente 0,02 cm de espessura espaçada por 0,5 cm e distribuídos uniformemente, foram adicionados (60 g de sal marinho/ 1 L de água destilada) de solução salina artificial. O recipiente foi colocado dentro de uma incubadora iluminada por uma lâmpada fluorescente, com aeração (figura 1). Em um dos lados desse recipiente, adicionou-se cerca e 64 mg de cistos de *Artemia salina*, tomando-se o cuidado para que os mesmos não ultrapassassem a divisória. A parte do sistema contendo os cistos de *Artemia salina* foi coberta com papel alumínio, para que os organismos ao nascerem, fossem atraídos pela luz do outro lado do sistema, forçando-os a atravessar à divisória. Tal procedimento visa uma homogeneização das condições físicas dos organismos-teste. A incubação foi feita por um período de 48 horas. Durante todo o ensaio a temperatura foi monitorada.

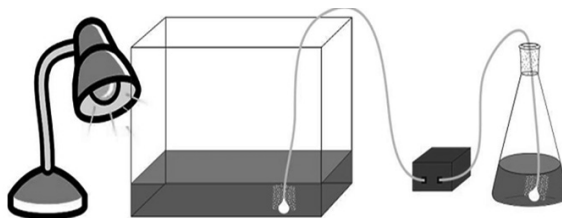


Figura 1. Esquema do bioensaio de citotoxicidade em *Artemia salina*.

Após o período de incubação, os organismos-testes (náuplios de *Artemia salina*) foram expostos ao óleo essencial do cravo-da-índia por 24 horas, utilizando-se tubos de ensaio graduados, cada um contendo 10 náuplios de *Artemia salina*, previamente selecionados. Os testes foram feitos em triplicata para cada concentração de cada composto. Além disso, o óleo foi testado, no mínimo, três vezes, totalizando um mínimo de 9 ensaios por concentração do composto. Determinou-se a faixa de concentração a ser testada (correspondente à concentração de 1000, 100, 10 $\mu\text{g/mL}$), buscando sempre a maior concentração em que se observasse 0% de mortalidade e a menor concentração em que se deflagraisse 100 % de mortalidade, de modo a obter a DL_{50} ; 24 h (dosagem letal para 50 % da população em 24 h) do composto testado. As soluções dos compostos a serem testadas foram preparadas em 1 a 3 % de DMSO (dimetilsulfóxido) e avolumadas com solução salina. Os testes para o controle também foram realizados

em triplicata, utilizando-se uma solução de DMSO 1 a 3 % diluído em solução salina. Os controles foram utilizados também para se ter certeza de que a mortalidade observada nos náuplios de *Artemia salina* fosse resultante da toxicidade aos compostos e não devido à falta de alimentação [12].

Após 24 horas de exposição, foi feita a contagem de náuplios vivos e mortos, sendo considerados vivos todos aqueles que apresentassem qualquer tipo de movimento quando observados próximos a uma fonte luminosa por 10 segundos. Só foram considerados válidos os testes nos quais o controle apresentou uma mortalidade igual ou inferior a 10 % da população. Os resultados foram submetidos a tratamento estatístico utilizando a regressão linear, o qual forneceu os valores de DL_{50} ; 24 h.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Características físico-químicas

A qualidade dos óleos essenciais depende de vários parâmetros tais como índice de refração, solubilidade em diferentes solventes orgânicos, densidade, dentre outros, os quais são utilizados para a avaliação da qualidade da matéria prima vegetal, além do controle da identidade e da pureza do óleo. Segundo Mouchrek Filho [13] o tempo de extração do óleo essencial é um dos principais parâmetros físico-químicos da indústria de essências, no que se refere à qualidade e à natureza econômica. Por isso, uma destilação rápida pode conduzir a um produto contendo predominantemente constituintes mais voláteis, porém destituído das melhores características; ao contrário, uma extração prolongada encarece o produto e também pode sobrecarregá-lo de compostos de aromas indesejáveis [14].

Os resultados referentes aos parâmetros físico-químicos do óleo essencial do cravo-da-índia estão representados na tabela 1.

Os resultados mostraram valores de 1,526 e 0,973 g mL⁻¹ para o índice de refração e densidade do óleo essencial do cravo-da-índia respectivamente. No que se refere à solubilidade em etanol 90 %, o resultado demonstrou que o óleo essencial foi solúvel na proporção 1:2. A cor e aparência apresentada pelo óleo analisado foram consideradas sendo típica, ou seja, transparente e límpido como foi mostrado na tabela 1, afirmando que o óleo essencial estudado possui uma cinética de extração e qualidade muito eficaz, quando comparado a outros óleos, principalmente em relação à quantidade de óleo extraído (volume) e tempo de extração.

Tabela 1. Parâmetros físico-químicos do óleo essencial do *Syzygium aromaticum* (cravo-da-índia).

Parâmetros Físico-químicos	<i>Syzygium aromaticum</i>
Densidade (g mL ⁻¹)	0,973
Solubilidade em etanol a (90 %)	1:2
Índice de refração (N _D 25°)	1,526
Cor	Transparente
Aparência	Límpido
Odor	Característico
Rendimento (%)	3,54

Reis [15] investigando os óleos essenciais extraídos dos talos e frutos secos do cravo-da-índia, relatou um índice de refração 1,5230 e 1,5252 respectivamente, valores semelhante ao encontrado nesta pesquisa. Valores esses, próximos ao índice de refração descrito para o eugenol, que é de 1,5410 [16]. A proximidade entre os valores do índice de refração descrito para o eugenol com os valores encontrados para os óleos essenciais dos talos e dos frutos evidenciam que o óleo em estudo é realmente rico em eugenol.

O rendimento da extração pode ser calculado a partir da quantidade de óleo que se obteve com uma determinada massa vegetal. Como nesse experimento, partiu-se de uma massa de 68,79 g dos botões florais secos e moídos do cravo-da-índia e obtiveram-se em média 2,5 mL de óleo essencial em cada extração o rendimento m/v foi de 3,63 %, um bom rendimento. Como a densidade do óleo foi determinada em 0,973 g.mL⁻¹, rendimento m/m foi calculado em 3,54 %.

Segundo Ozcan e Chalchat [17] o rendimento do óleo essencial de diferentes variedades de plantas é dependente da variação sazonal e da localidade. Sendo assim, de acordo com Reis [15] que apresenta rendimentos de massa/volume do óleo essencial dos talos e frutos secos do cravo-da-índia em torno de 15 %, o baixo rendimento quando comparado ao estudo acima do óleo essencial dos botões do cravo pode ser atribuído ao fato do período da coleta das amostras e estocagem, ou seja, do clima com altas temperaturas que podem ter favorecido a evaporação parcial de alguns constituintes do óleo.

Caracterização química (análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas)

Por meio da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas foi possível separar e identificar cinco constituintes do óleo essencial, os quais são apresentados na figura 2, seguindo a ordem de eluição.

A tabela 2 mostra a identificação de cada pico apresentados na figura 2, assim como o seu tempo de retenção (T_r) na coluna e o respectivo teor na mistura de óleos essenciais, sendo que a quantificação dos cinco picos cromatográficos foi determinada pelo método de normalização (integração da área do pico correspondente). Nota-se que o eugenol apareceu com 52,53 %, e o cariofileno com 37,25 %, o que caracteriza serem estes os principais componentes majoritários.

Tabela 2. Composição química do óleo essencial.

Pico	Tr (min)	Substância identificada	Teor (%)
1	27,40	Eugenol	52,53
2	27,99	Copaeno	2,05
3	29,47	Cariofileno	37,25
4	30,57	Humuleno	4,11
5	32,94	Acetato de eugenila	4,05

Tr: tempo de retenção.

Bioensaio da citotoxicidade frente à *Artemia salina*

Os ensaios de letalidade permitem a avaliação da toxicidade geral e é considerado como um bioensaio preliminar no estudo do potencial biológico de um composto ou produto [10]. Atualmente, um dos ensaios mais empregado é o teste com larvas de *Artemia salina* e vem sendo reportado na literatura, não só para avaliar a toxicidade de substâncias, óleos, produtos e extratos vegetais, como também para determinar grau de contaminações ambientais [18].

O critério de classificação do óleo do *Syzygium aromaticum* (cravo-da-índia) frente *Artemia salina* com base nos valores das DL_{50} foi estabelecido por Dolabella [19] como $DL_{50} \leq 80 \mu\text{g/mL}$, o produto é altamente tóxico; DL_{50} entre 80 a 250 $\mu\text{g/mL}$, o produto é moderadamente tóxico e $DL_{50} \geq 250 \mu\text{g/mL}$, o produto é levemente tóxico ou atóxico. [10] utilizam o critério de avaliação em que considera a amostra tóxica ou ativa

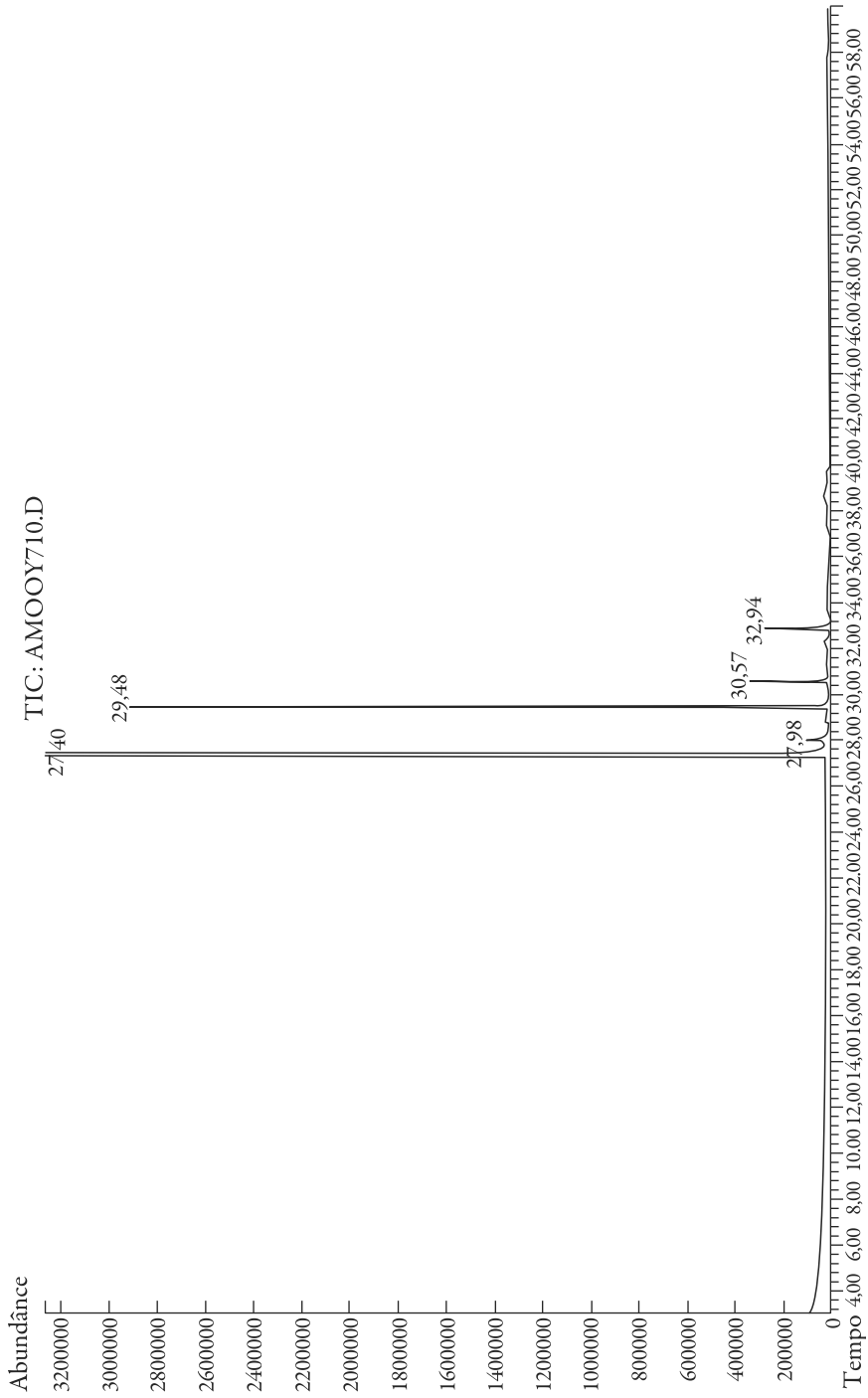


Figura 2. Cromatograma do óleo essencial do cravo-da-índia.

as que apresentarem $DL_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$ e amostras atóxicas ou inativas as que apresentarem $DL_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$. (Cálculos de DL_{50}).

A importância deste ensaio de toxicidade deve-se ao fato de que vários autores buscam correlacionar a toxicidade sobre *Artemia salina* com atividades anticancerígena, antifúngica, inseticida e tripanossomicida [3, 10, 20, 21, 22].

Na tabela 3 e na figura 3 estão expostos os resultados obtidos para o bioensaio frente à *Artemia salina* para o óleo essencial do cravo-da-índia.

Tabela 3. Porcentagem de mortalidade por doses analisadas e valores de DL_{50} obtidos no bioensaio com *Artemia salina* para o óleo essencial do cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*).

Concentração do óleo essencial	Nº de indivíduos vivos após 24 horas			CNm*
10 mg/L	3	0	0	10
100 mg/L	0	0	0	10
1000 mg/L	0	0	0	10

*CNm: média do controle negativo.

A dose letal a 50 % (DL_{50}) do óleo essencial do cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) a partir do teste de toxicidade (a atividade larvicida frente à *Artemia salina*, avaliando o grau de letalidade pelo produto) foi igual a $1 \mu\text{g/mL}$, considerado altamente tóxico de acordo com [19].

Na tabela 4 estão expostos os valores encontrados para o bioensaio frente à *Artemia salina* com o componente majoritário do óleo, o eugenol.

A dose letal a 50 % (DL_{50}) do padrão de eugenol a partir do teste de toxicidade (a atividade larvicida frente à *Artemia salina*, avaliando o grau de letalidade pelo produto) foi igual a $18,53 \mu\text{g/mL}$, considerado altamente tóxico, ou seja ativo, de acordo com [19].

Comparando os resultados tanto do óleo quanto somente do seu componente majoritário, o eugenol, observa-se que ambos são ativos, ou seja, tóxicos frente aos testes com *Artemia salina*, mostrando eficiência na sua citotoxicidade. Pode-se observar também que o óleo é bem mais tóxico quando comparado ao padrão de eugenol, mostrado nos gráficos de regressão linear para mortalidade do microcrustáceo frente ao óleo testado.

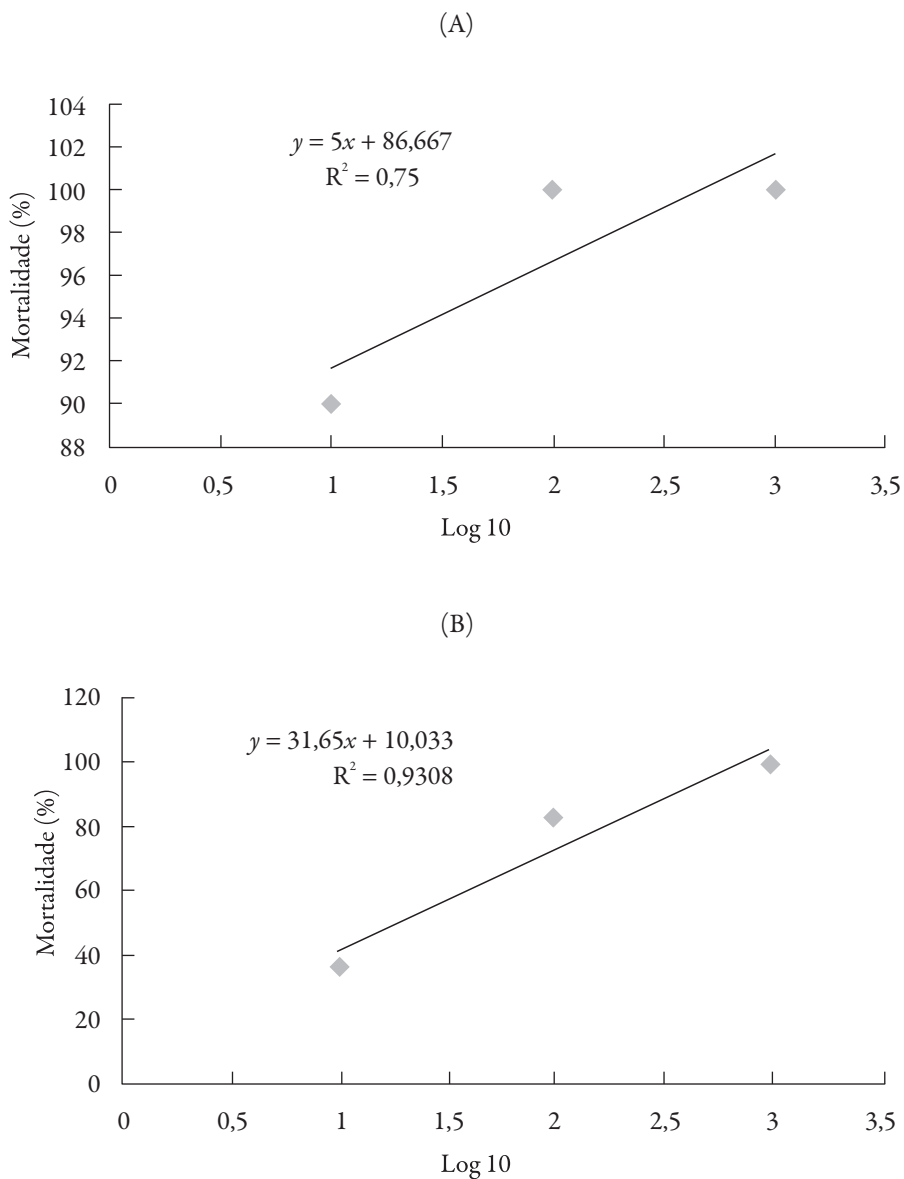


Figura 3. (A) Regressão linear do percentual de animais mortos do óleo essencial do cravo-da-índia (DL_{50}); (B) Regressão linear do percentual de animais mortos do padrão de eugenol (DL_{50}).

Tabela 4. Porcentagem de mortalidade por doses analisadas e valores de DL₅₀ obtidos no bioensaio com *Artemia salina* para o padrão de eugenol.

Concentração do óleo essencial	Nº de indivíduos vivos após 24 horas			CNm*
10 mg/L	6	9	4	10
100 mg/L	3	1	1	10
1000 mg/L	0	0	0	10

*CNm: média do controle negativo.

A alta toxicidade do óleo do Cravo-da-índia frente à *Artemia salina* pode ser apontada pela presença do eugenol que é um forte agente bactericida, fungicida, antimicrobiano, anti-séptico e antialérgico, mas também pela mistura de outros componentes presentes nesse óleo, como por exemplo, o cariofileno e o copaeno que possuem um ótimo poder cicatrizante, diurético, antiinflamatório, aumentando assim o poder de toxicidade do óleo essencial.

Alguns estudos reafirmam o poder do sesquiterpeno cariofileno. Quando isolado do óleo essencial de *Cordia verbenacea*, este componente mostrou atividade antiinflamatória em diferentes modelos experimentais, utilizando-se nesse caso ratos [23]. Esta atividade do cariofileno também foi demonstrada no estudo da espécie *Bupleurum fruticosens*, cujo óleo essencial mostrou forte ação antiinflamatória atribuída aos seus dois principais constituintes, α -pineno e cariofileno. A ação farmacológica desses compostos quando administrados juntos tornou-se similar à do óleo essencial completo de *B. fruticosens* [24]. A administração oral de cariofileno em ratos inibiu significativamente a colite ulcerativa experimental induzida por dextran sulfato de sódio, abrindo caminho para a prevenção e o tratamento da colite [25].

Também [26] relatou que a administração oral do cariofileno em ratos inibiu significativamente a irritação da mucosa gástrica. Além disto, o composto mostrou atividade antiinflamatória sem nenhuma indicação de causar danos à mucosa gástrica, típicos de agentes antiinflamatórios não esteroidais. O composto óxido de cariofileno, também encontrado em alta proporção no óleo essencial de *P. neochilus* (15,54 %), é um reconhecido conservante de alimentos e cosméticos. Este sesquiterpeno mostrou atividade antifúngica em modelo experimental “in vitro” contra três espécies *Trichophyton* que causam infestações micóticas nos pés [27]. Vários constituintes de *Eugenia caryophyllata* foram isolados, identificados e tiveram sua bioatividade analisada. Dentre estes, óxido de cariofileno, cariofileno e α -humuleno mostraram-se potentes agentes anticarcinogênicos [28].

Logo, como teste de triagem, os ensaios com *Artemia salina* estão se destacando na “indicação de atividade antitumoral”. A literatura vem trazendo correlações entre a toxicidade geral com esse microcrustáceo e a citotoxicidade diante de linhagens de células humanas de tumores sólidos [29].

Segundo Mclaughlin [29], o fato de se trabalhar com organismos relativamente simples torna mais fácil a indução de um retardo ou paralisação do ciclo celular normal por provocar alteração do processo mitótico, observou uma ótima correlação entre o teste de toxicidade frente *Artemia salina* e o teste de citotoxicidade, usando células 9 K (carcinoma humano de nasofaringe) e a partir desses resultados, utilizam o teste de *Artemia salina* como pré-clínico para testes de citotoxicidade com seis linhagens de células tumorais sólidas humanas. Estes autores observaram que a ED₅₀ (dose eficiente 50 %) nos testes de citotoxicidade é geralmente em torno de um décimo da DL₅₀ encontrada no teste com esse microcrustáceo.

CONCLUSÃO

No presente estudo, conclui-se que os parâmetros físico-químicos do óleo essencial do Cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) apresentaram resultados satisfatório no que se diz respeito a avaliação da qualidade do óleo extraído. Além disso, houve a identificação segura e positiva do componente majoritário pela técnica de Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas, CG-EM (baseando-se nos seus tempos de retenção) no qual os botões florais do *Syzygium aromaticum*, forneceram um óleo essencial cujo rendimento foi de 3,63%, m/v, um valor considerável bom para extração por hidrodestilação. No teste do bioensaio, os resultados mostraram a alta toxicidade do óleo essencial frente às larvas de *Artemia salina*.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem as bolsas concedidas pela FAPEMA e ao CNPQ.

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram que não há conflito de interesses.

REFERÊNCIAS

1. M.H. Alma, M. Ertas, S. Nitz, H. Kollmannsberger, Chemical composition and content of essential oil from the bud of cultivated Turkish clove (*Syzygium aromaticum* L.), *BioResources*, **2**, 265-269 (2007).
2. M.L. Oliveira, G.L. Melo, A.R.R. Niella, V.R. Silva, Black root rot caused by *Rosellinia pepo*, a new disease of the clove tree in Brazil, *Trop. Plant.*, **33**, 90-95 (2008).
3. R.A. Oliveira, F.F. Oliveira, C.K. Sacramento, Óleos essenciais: perspectivas para o agronegócio de especiarias na Bahia, *Bahia Agricol.*, **8**, 46-48 (2007).
4. J.D.F. Silvestri, N. Paroul, E. Czyewski, L. Lerin, I. Rotava, R.L. Cansian, A. Mossi, G. Toniazzo, D. Oliveira, H. Treichel, Perfil da composição química e atividades antibacteriana e antioxidante do óleo essencial do cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata* Thunb.), *Rev. Ceres*, **57**, 589-594 (2010).
5. A.A. Craveiro, D.C. Queiroz, Óleos essenciais e química fina, *Quim. Nova*, **16**, 224-228 (1993).
6. K. Chaieb, H. Hajlaoui, T. Zmantar, A.B. Kahla-Nakbi, M. Rouabhia, K. Mahdouani, A. Bakhrouf, The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): A short review, *Phytother. Res.*, **21**, 501-506 (2007).
7. R.S. Affonso, M.N. Rennó, G.B.C.A. Slana, T.C.C. França, Aspectos químicos e biológicos do óleo essencial de cravo da Índia, *Rev. Virtual. Quim.*, **4**, 146-161 (2012).
8. Farmacopeia Brasileira IV, Parte 1, 4.^{ed.}, Editora Atheneu, São Paulo, 1996, p. 1. 320.
9. F.J. Fabrowski, "Eucaliptus smithii R.T. Baker (*Myrtaceae*) como espécie produtora de óleo essencial no sul do Brasil", tese de doutorado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba (PR), 2002.
10. B.N. Meyer, N.R. Ferrigni, J.E. Putnam, L.B. Jacobsen, D.E. Nichols, J.L. McLaughlin, A convenient general bioassay for active plant constituents, *Planta Med.*, **45**, 31-34 (1982).

11. G.G.F. Nascimento, J. Locatelli, P.C. Freitas, G.L. Silva, Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria, *Braz. J. Microbiology*, **31**, 247-256 (2000).
12. J.L. Carballo, Z.L. Hernández-Inda, P. Pérez, M.D. García-Grávelalos, A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products, *BMC Biotechnology*, **2**, 17 (2002).
13. V.E. Mouchrek Filho, “Estudos analíticos e modificações químicas por metilação e acetilação do eugenol contido no óleo essencial extraído das folhas da espécie *Pimenta dioica* Lindl.”, tese de doutorado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos (SP), 2000.
14. J.S. Chaar, “Estudos analíticos e modificação química por acetilação do linalol contido no óleo essencial da espécie *Aniba duckei* Kostermans.”, tese de doutorado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos(SP), 2000.
15. T.V. Reis, “Potencialidade das folhas do Craveiro-da-Índia cultivados no Sul da Bahia para extração de óleos essenciais”, En: XLVI Congresso Brasileiro de Química, Associação Brasileira de Química, Salvador, 25 a 29 de setembro de 2006.
16. Aldrich, “Handbook of fine chemicals and laboratory equipment”, Brasil, 2001, 804 p.
17. M. Özcan, J.C. Chalchat, Essential oil composition of *Ocimum basilicum* L. and *Ocimum minimum* L. in Turkey, *Czech. J. Food. Sci.*, **20**, 223-228 (2002).
18. J. Barosa, “Teste de toxicidade do cobre para *Artemia salina*. Disciplina: Poluição e Ecotoxicologia Marinha”, Faculdade de Ciências do Mar e do Ambiente, Universidade de Algarves. 2003. URL: <https://siweb.ualg.pt>, consultado em: 30 janeiro 2016.
19. M.F. Dolabella, “Triagem in vitro para a atividade antitumoral e anti-*T. cruzi* de extratos vegetais, produtos naturais e sintéticos”, tese de mestrado, Belo Horizonte Universidade Federal de Minas Gerais, 1997.
20. W.D. Macrae, J.B. Hudson, G.H. Torres, Studies on the pharmacological activity of Amazonian Euphorbiaceae, *J. Ethnopharmacol.*, **22**, 143-172 (1988).
21. S. Sahpaz, Cytotoxic and antiparasitic activity from *Annona senegalensis* seeds, *Planta Med.*, **60**, 538 (1994).

22. T. Ojala, A bioassay using *Artemia salina* for detecting phototoxicity of plant coumarins, *Planta Med.*, **65**, 715-718 (1999).
23. E.S. Fernandes, G.F. Passos, R. Medeiros, F.M. da Cunha, J. Ferreira, M.M. Campos, L.F. Pianowski, J.B. Calixto, Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*, *Eur. J. Pharmacol.*, **569**, 228-236 (2007).
24. S. Martin, E. Padilla, M.A. Ocete, J. Gálvez, J. Jiménez, A. Zarzuelo, Anti-inflammatory activity of the essential oil of *Bupleurum fruticosens*, *Planta Med.*, **59**, 533-536 (1993).
25. D.Q. Cho, V.G. Billerbeck, C.G. Roques, G. Michel, C. Marquier-Vinuales, J.M. Bessiere, The antifungal activity of essential oils as determined by different screening methods, *J. Essent. Oil Res.*, **12**, 256-266 (2000).
26. Y. Tambe, H. Tsujiuchi, G. Honda, Y. Ikeshiro, S. Tanaka, Gastric cytoprotection of the non-steroidal anti-inflammatory sesquiterpene, β -caryophyllene, *Planta Med.*, **62**, 469-470 (1996).
27. D. Yang, L. Michel, J.P. Chaumont, J. Millet-Clerc, Use of caryophyllene oxide as an antifungal agent in an *in vitro* experimental model of onychomycosis, *Mycopathologia*, **148**, 79-82 (1999).
28. G. Zheng, P.M. Kenney, L.K.T. Lam, Sesquiterpenes from clove (*Eugenia caryophyllata*) as potential anticarcinogenic agents, *J. Nat. Prod.*, **55**, 999-1003 (1992).
29. J.L. Mclaughlin, "Crown-gall tumours in potato discs and brine shrimp lethality: Two simple bioassays for higher plant screening and fractionation", En: "Methods in plant biochemistry", editado por K. Hostettmannk, Academic Press, London, v. 6, 1991, pp. 1-31.

COMO CITAR ESTE ARTIGO

P.R. Barros-Gomes, V.E. Mouchrek-Filho, W. Ferreira-Rabêlo, A. Albuquerque do Nascimento, H. Costa-Louzeiro, W. da Silva-Lyra, M. Alves-Fontenele, Caracterização química e citotoxicidade do óleo essencial do cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **47**(1), 37-52 (2018).