

Área: Tecnologia de Alimentos

INIBIÇÃO DE *Escherichia coli* E *Staphylococcus aureus* POR ÓLEO ESSENCIAL DE CRAVO-DA-ÍNDIA (*SYZYGIUM AROMATICUM*, L.)

João Paulo de Paiva Lemos^{1*}, Pâmela Inchauspe Corrêa Alves², Eliezer Avila Gandra³

, ^{1*}Bolsista PVIP/UFPel, Discente do curso de Tecnologia em Alimentos, Laboratório de Ciência dos Alimentos e Biologia Molecular (LACABIM), Centro de Ciências Químicas Farmacêuticas e de Alimentos (CCQFA), Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas, RS - *E-mail:joaopaulopaivalemos@hotmail.com

²Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos (PPGNA), LACABIM, UFPel, Pelotas, RS - pam.inchauspe@hotmail.com

³ LACABIM, CCQFA, UFPel, Pelotas, RS - gandraea@hotmail.com

RESUMO – O cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*, L.) é uma especiaria muito apreciada desde a antiguidade por suas propriedades terapêuticas e qualidades culinárias. A presença de micro-organismos patogênicos e suas toxinas, principalmente patógenos como *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* podem causar sérios problemas à saúde dos consumidores. Óleos essenciais são produtos voláteis presentes em vários órgãos vegetais e estão relacionados ao metabolismo secundário das plantas exercendo diversas funções importantes à sobrevivência vegetal. Dentre os óleos essenciais, o de cravo-da-índia vem sendo foco de diversos estudos nos últimos anos. Objetivo deste trabalho foi verificar o potencial antibacteriano de óleo essencial de cravo-da-índia frente as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. O óleo essencial foi extraído de acordo com a Farmacopeia Brasileira (Brasil, 2010), e foram realizadas as técnicas de difusão em ágar, concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima de acordo com os protocolos propostos pelo *Manual Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI* (2015) e por Cabral et al., (2009). Verificou-se que o óleo essencial de cravo-da-índia apresentou halos de inibição e efeitos bacteriostático e bactericida frente as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Mais estudos são ainda necessários tanto para que se possa esclarecer o mecanismo de atuação deste óleo sobre as bactérias assim como para viabilizar a utilização deste óleo essencial como um conservante em alimentos.

Palavras-chave: Cravo-da-índia, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, concentração inibitória mínima, concentração bactericida mínima.

1 INTRODUÇÃO

O cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*, L.) é uma especiaria muito apreciada desde a antiguidade por suas propriedades terapêuticas e qualidades culinárias. Várias aplicações desta especiaria na cultura popular têm sido relatadas na literatura (AFFONSO et al., 2012).

A presença de micro-organismos patogênicos e suas toxinas, principalmente patógenos como *Escherichia coli* O157:H7 e *Staphylococcus aureus* podem causar sérios problemas à saúde dos consumidores, sendo considerado um problema de saúde pública. Além disso, o uso de conservantes químicos sintéticos, devido a muitos deles apresentarem potencial carcinogênico e teratogênico e a crescente resistência dos micro-organismos patogênicos aos produtos sintéticos, tem diminuído sua aceitação pelos consumidores, aumentando cada vez mais a procura por novos agentes antimicrobianos e antioxidantes naturais, a partir de plantas, para uso nas indústrias alimentícias (SILVESTRI et al., 2010).

Óleos essenciais são produtos voláteis presentes em vários órgãos vegetais (partes aéreas, cascas, troncos, raízes, frutos, flores, sementes e resinas) e estão relacionados ao metabolismo secundário das plantas exercendo diversas funções importantes à sobrevivência do vegetal, como por exemplo na defesa contra microrganismos, dentre os óleos essenciais destaca-se o de condimentos como o cravo-da-índia, que vem sendo foco de estudos nos últimos anos (SILVA et al., 2009).

Esse trabalho teve como objetivo verificar o potencial antibacteriano de óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*, L.) frente as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* por meio das técnicas de difusão em ágar, concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção do óleo essencial

As amostras de cravo-da-índia foram moídas em moinho de facas (Marconi). Após o óleo essencial foi extraído de acordo com a Farmacopeia Brasileira (Brasil, 2010), por meio do processo de hidrodestilação por arraste a vapor com o auxílio do equipamento Clevenger durante 3 h. Após a extração, o óleo essencial foi armazenado em frasco âmbar em temperatura de congelamento (-18°C).

2.2 Cultivo dos microrganismos

Foram utilizadas no experimento cepas padrão de *Escherichia coli* O157:H7 (ATCC 43895) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 10832). As bactérias utilizadas no experimento foram mantidas sob congelamento em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) e glicerol (propano-1,2,3-triol) na proporção 3:1 (v:v). Primeiramente foi realizada a reativação das bactérias em caldo Soja Trypticaseína (TSB) e incubadas por 24 horas a 37°C, posteriormente uma alçada do crescimento microbiano foi estriada em meio seletivo sendo ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) para *E.coli* e ágar Baird-Parker para *S. aureus* sendo incubadas por 24 horas a 37°C.

A partir do crescimento bacteriano nas placas de Petri, foi extraída uma alçada carregada e ressuspensa em solução salina (NaCl 0,85%), a qual foi padronizada na concentração 0,5 na escala de McFarland (equivalente a $1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹).

2.3 Difusão em Ágar

Para análise de difusão em ágar foram feitos três pequenos poços equidistantes (diâmetro 6 mm) no centro de placas de petri contendo ágar Muller-Hinton. A solução salina previamente inoculada foi semeada através de *swab* estéril na superfície das placas e 20 µL do óleo essencial de cravo-da-índia foram adicionados aos poços. As placas foram incubadas a 37°C e as leituras realizadas após 24 h de incubação, em que foi verificada a existência de halos de inibição e os resultados expressos em centímetros.

2.4 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A análise de concentração inibitória mínima foi realizada de acordo com protocolo proposto pelo *Manual Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI* (2015) com pequenas modificações. Foram utilizadas placas de microtitulação de 96 poços, onde foram acrescentadas em cada poço 100 µL de caldo BHI, 100 µL de inóculo (80 µL de caldo BHI e 20 µL de solução salina previamente inoculada) e óleo essencial em quatro diferentes concentrações: óleo puro (100 µL de óleo de cravo-da-índia); 1:5 (20 µL de óleo cravo-da-índia 80 µL de dimetilsulfóxido (DMSO)); 1:10 (10 µL de óleo cravo-da-índia e 90 µL de DMSO) e 1:100 (1 µL de óleo de cravo-da-índia e 99 µL de DMSO). Logo após o preparo as placas de microtitulação foram avaliadas em espectrofotômetro (Biochrom EZ Read 400) a 620 nm. As placas foram incubadas por 24 h a 37 °C e em seguida realizada nova leitura em espectrofotômetro. A CIM foi considerada como a menor concentração em que não houve crescimento bacteriano no meio de cultura.

2.5 Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A análise de concentração bactericida mínima foi realizada de acordo com o método descrito por (Cabral et al. 2009) com pequenas modificações. Após a realização da CIM, foram retirados 15 µL dos poços das amostras que tiveram inibição e estriados em placas de Petri com ágar BHA (*Brain Heart Infusion Agar*) e incubados por 24 h a 37 °C. Foi considerada a mínima concentração bactericida as placas onde não houve crescimento bacteriano.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 são expostos os resultados encontrados nos testes de difusão em ágar, concentração inibitória mínima (MIC) e concentração bactericida mínima (MIB).

Tabela 1 – Halos de inibição e resultados obtidos com o óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*, L.) frente as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*

Bactérias	Halo de inibição (cm)	CIM (mg.mL ⁻¹)	CBM (mg.mL ⁻¹)
<i>Staphylococcus aureus</i>	1,6	3,33	333.3

Escherichia coli

1,2

3,33

333,3

A partir dos diâmetros dos halos encontrados na técnica de difusão em ágar pode se dizer que houve efeito inibitório das bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* e também pode-se supor que *Escherichia coli* tem mais resistência ao óleo de cravo-da-índia do que *Staphylococcus aureus*, devido ao tamanho dos halos de inibição. Segundo Andrade et al., (2012), em um estudo similar, a espécie *Escherichia coli* apresentou-se como a mais resistente entre diversas bactérias testadas, pois não foi constatado efeito inibitório dos óleos essenciais de *C. Nardus*, e *Z. Officinale* sobre esse micro-organismo nas concentrações avaliadas.

Verificou-se que o óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*, L.) apresentou potencial inibitório frente as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, sendo encontrados halos de inibição, efeito bacteriostático e efeito bactericida, conforme pode ser visualizado na tabela 1.

Pode-se considerar que o efeito inibitório foi inferior ao verificado por outros autores em pesquisas similares, que encontraram valores menores na concentração inibitória mínima, como por exemplo Scherer et al., (2009) que frente as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* utilizando óleo essencial de cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus* L.) encontram como concentração inibitória mínima valores entre 0,40 a 0,60 mg.mL⁻¹. Segundo Alves et al. (2017) um óleo deve apresentar CIM de até 0,5 mg.mL⁻¹ para ter uma forte ação antimicrobiana; entre 0,6 a 1,5 mg.mL⁻¹ para moderada e acima de 1,6 mg.mL⁻¹ para fraca. De acordo com estes critérios podemos considerar como fraca a ação verificada do óleo de cravo-da-índia em nosso estudo, já que a CIM verificada ficou acima de 1,6 mg.mL⁻¹ (tabela 1).

Sobre a concentração bactericida mínima pode se considerar que houve efeito bactericida na concentração de 333,3 mg.mL⁻¹, segundo Alves et al.,(2017) a ação antibacteriana dos óleos pode ser atribuída à sua capacidade em penetrar pelas membranas bacterianas para o interior da célula, interferindo em propriedades funcionais e lipofílicas. Na literatura são encontrados diversos trabalhos com diferentes óleos essenciais e extratos como por exemplo Antunes et al., (2017) que inibiu as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* utilizando extrato de folha de oliveira (*Olea europaea* L.).

Mais estudos são ainda necessários tanto para que se possa esclarecer o mecanismo de atuação deste óleo sobre as bactérias como para viabilizar a utilização deste óleo essencial como um conservante em alimentos.

4 CONCLUSÃO

Verificou-se que o óleo essencial de cravo-da-índia apresenta efeito inibitório frente as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

5 REFERÊNCIAS

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 **Rev. Virtual Quim.**, 2012, v.4, n.2, 146161. Data de publicação na Web: 14 de maio de 2012

ALVES, P. I. C.; ROQUE, V. R.; RADÜNZ, M.; PEREIRA, E. S.; ANTUNES B. F.; GANDRA, E. A. ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE ÓLEO DE GIRASSOL (*Helianthus annuus* L.) Encontro de pós Graduação, UFPEL, 2017, **Anais**, disponível em: http://cti.ufpel.edu.br/siepe/arquivos/2017/CA_04600.pdf > acesso em 31 mar. 2018

ANTUNES B. F.; SILVA, L. A.; ALVES, P. I. C.; ROQUE, V. R.; PEREIRA, E. S.; GANDRA, E. A.; ZAMBIAZI, R. C.; ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE EXTRATOS DE FOLHAS DE OLIVEIRA (*Olea europaea* L.) Encontro de pós Graduação, UFPEL, 2017, **Anais**, disponível em: http://cti.ufpel.edu.br/siepe/arquivos/2017/CA_04077.pdf > acesso em 31 mar. 2018

ANDRADE, M. A.; CARDOSO, M. G.; BATISTA, L. R.; MALLET, A. C. T.; MACHADO, S. M. F. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, n. 2, p. 399-408, abr-jun, 2012

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**, v.2 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010. 546p., 1v/íl.

CABRAL, I. S. R.; PRADO, A.; BEZERRA, R.M.N.; ALENCAR, S.M.; IKEGAKI, M.; ROSALEN, P.L. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1523-1527, 2009.

CLSI, 2015a. M02-A12: **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests**; Approved Standard—Twelfth Edition. CLSI (Clinical Lab. Stand. Institute) 35

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 palmosa **Rev. bras. plantas med.**, Botucatu v.11, n.4, p.442-449, 2009

SILVA, M.T.N.; USHIMARU, P.I.; BARBOSA, L.N.; CUNHA, M.L.R.S.; FERNANDES JUNIOR, A. Atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas frente a linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos **Rev. bras. plantas med.** vol.11 no.3 Botucatu 2009.

SILVESTRI, J. D. F.; PAROUL, N.; CZYEWski, E.; LERIN, L.; ROTAVA, I.; CANSIAN, R. L.; MOSSI, A.; TONIAZZO, G.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL H.; Perfil da composição química e atividades antibacteriana



X SIMPÓSIO DE ALIMENTOS

Refinarias de Alimentos
Indústrias Sustentáveis

▶ 10 e 11 de maio de 2018

▶ Centro de Eventos
da UPF - *Campus I*

ISSN 2236-0409

v. 10⁰ (2018)

e anti-oxidante do óleo essencial do cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata* Thunb.) **Rev. Ceres**, Viçosa, v. 57, n.5, p. 589-594, set/out, 2010