



ESTUDO COMPARATIVO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO EXTRATO DE CRAVO-DA-ÍNDIA (*Eugenia caryophyllata* Thunb.) EXTRAÍDO POR VIA ETANÓLICA E METANÓLICA

A. C. CHESCA¹, D. S. TRISTÃO², M. S. TRISTÃ³, R. N. ALMEIDA⁴, M. L. BEGNINI⁵

^{1,2,3,4,5} Universidade de Uberaba - UNIUBE, Campus Aeroporto, Av. Nenê Sabino, 1801, Bairro Universitário, CEP: 38055-500, Uberaba-MG.

RESUMO – *Existem microrganismos patogênicos ao homem presentes em grande parte nos alimentos. Uma das formas de inibir a atuação desses contaminantes é utilizando compostos bioativos, tais como o cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata* Thunb) e o eugenol é o composto majoritário dos botões florais e pedúnculos dessa planta. Este trabalho teve como objetivo a extração de óleo essencial pelos métodos de infusão em etanol e metanol do cravo da índia e a verificação do seu potencial antimicrobiano frente a *Salmonella* sp., *Bacillus cereus* e *Escherichia coli*. Para a obtenção do óleo essencial utilizou-se a extração por agitação mecânica, com o uso dos solventes etanol e metanol. A atividade antimicrobiana foi aferida pelo método de difusão em placas. Os resultados mostram que emulsões com polissorbato 80 a base de extratos do cravo-da-índia formuladas com metanol e etanol aplicadas pelo método de difusão em placas possuem capacidade bactericida eficiente em *Bacillus cereus* e *Salmonella* sp., sendo os resultados mais efetivos à base de etanol, verificando-se que a aplicação em *Salmonella* sp. e em *Bacillus cereus* apresentaram halos de inibição iguais a 15 mm, de forma que para os mesmos microrganismos a emulsão pela via metanólica apresentou resultados iguais a 14 mm para ambos. Aplicações das emulsões dentro das mesmas condições não apresentaram halos de inibição para *Escherichia coli*. O presente trabalho sugere estudos futuros ainda mais abrangentes quanto à potencialidade antimicrobiana destes compostos.*

1. INTRODUÇÃO

As presenças de microrganismos patogênicos nos alimentos causam preocupação as autoridades da área de saúde, pois colocam em risco a saúde do consumidor e provocam a diminuição da vida de prateleira do alimento, gerando perdas econômicas. A ação inibitória das especiarias e de seus óleos nos diferentes microrganismos tem sido relatada em diversos estudos (Ouattaraa et al., 1997).

O interesse renovado no uso de especiarias como agentes antibacterianos é atribuído basicamente a duas razões: a segurança dos aditivos químicos é constantemente questionada, havendo



uma tendência ao uso de substâncias naturais de plantas, e a redução do sal ou do açúcar em alimentos por razões dietéticas tende a aumentar o uso de outros temperos (Ismail e Pierson, 1990).

A literatura científica na área da ciência e tecnologia de alimentos tem mostrado, nos últimos anos, um enfoque no estudo do potencial antimicrobiano das especiarias considerando a sua inclusão nos chamados sistemas de bioconservação de alimentos. A bioconservação de alimentos é um sistema de preservação amplamente aceito, sendo referido como um procedimento natural capaz de prover a extensão da vida útil e satisfatória segurança microbiológica de alimentos (Fiorentini et al., 2001, Ristori, Pereira e Gelli, 2002, Utama et al., 2002). Diante do aumento de casos de infecções de natureza bacteriana resistente e da dificuldade do controle da proliferação bacteriana em instalações da indústria alimentícia, o uso de bioativos provenientes da flora nativa, tem sido apontado como possível solução para esse problema (Dantas et al., 2010).

Pesquisas têm citado as propriedades antibacterianas e antifúngicas das especiarias *in natura*, seus óleos essenciais e seus extratos. Várias plantas usadas para aromatizar alimentos são apontadas por apresentarem atividade antimicrobiana como, por exemplo, louro (*Laurus nobilis* L.), manjerona (*Origanum majorana* L.), manjerição (*Ocimum basilicum* L.), cravo (*Eugenia caryophyllata*), canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume), coentro (*Coriandrum sativum* L.), melissa (*Melissa officinalis* L.), limão (*Citrus aurantiifolia* (Christm.) Swingle), laranja (*Citrus aurantium* L.), alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), menta (*Mentha piperita* L.), alho (*Allium sativum* L.) entre outras (Celiktas et al., 2007).

O cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata* Thunb.) é uma planta arbórea, nativa das Ilhas Molucas (Arquipélago da Insulíndia, Indonésia), possui odor fortemente aromático, sabor ardente e característico. 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, betacariofileno, ácido oleânico, e substâncias das classes: triterpeno, ceras vegetais, cetonas, resinas, taninos e esteróis. O eugenol apresenta efeito anti-inflamatório, cicatrizante, analgésico e é eficaz no combate e diminuição de bactérias presentes na boca. Seus efeitos medicinais compreendem o tratamento de náuseas, flatulências, indigestão, diarreia. Com propriedades bactericidas é também usado como anestésico e antisséptico para o alívio de dores de dente (Nascimento et al., 2000).

A composição final dos óleos essenciais é influenciada pelas condições climáticas do local de origem das plantas, além da temperatura de secagem do material vegetal, a qual pode levar a grandes perdas, por volatilização dos princípios ativos presentes nesses óleos (Dorman e Deans, 2000).

Diversos métodos de extração e também de estudo de compostos oriundos de plantas têm sido sugeridos pela literatura pertinente. Neste sentido, é importante e necessário que os estudos fitoquímicos sejam guiados pelos bioensaios, seja *in vivo* ou *in vitro*, quando o que se busca são compostos bioativos (Cechinel Filho e Yunes, 2001).

Pode-se utilizar diferentes solventes e suas combinações para a preparação de extratos vegetais. Um método considerado adequado para a análise químico-farmacológica é o de extração em solução hidroalcoólica (etanol/água) a fim de obter-se o extrato bruto. No caso de este extrato apresentar



atividades biológicas de interesse, pode-se partir para um método sistemático de estudo, em que o metanol, por possibilitar a extração de um maior número de compostos, é indicado como o solvente mais apropriado para a preparação do extrato bruto (Cechinel Filho e Yunes, 1998).

O presente trabalho teve como objetivo realizar um estudo comparativo da atividade antibacteriana do extrato de cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata* Thunb.) extraído por via etanólica e metanólica frente a algumas cepas bacterianas patogênicas de alimentos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

➤ *Microrganismos testes*

Foram utilizadas como microrganismos testes cepas de *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* e *Salmonella* sp. Para a realização dos ensaios antimicrobianos foram, preparadas suspensões das cepas testes em solução salina (NaCl a 0,85% p/v) esterilizada, as quais foram padronizadas de acordo com a turbidez do tubo 0,5 da escala McFarland correspondendo a aproximadamente 10^8 Unidades Formadoras de Colônia por mililitro (UFC.mL⁻¹).

➤ *Extração do óleo essencial*

O óleo essencial foi extraído utilizando-se como solvente o etanol e metanol, todos separadamente, sendo usados 25g de cravo para cada estágio, sendo os béqueres preenchidos com solventes até o nível de 200 mL, de forma que, promoveu-se o agitação por um tempo equivalente a 1h 40min. Ressalta-se que foi promovido o aquecimento controlado de forma a evitar que o solvente iniciasse fervura. Fez-se a seleção dos solventes quanto a polaridade dos mesmos.

Para se obter os extratos secos, usou-se o método da evaporação, sendo auxiliado pela agitação em capela ventilada. Com a obtenção dos extratos secos foram preparadas as emulsões com os mesmos e assim a fase orgânica foi vertida sobre uma fase aquosa (água destilada) contendo polissorbato 80, utilizando-se 65 gotas de água e 25 gotas de polissorbato 80 (Külkamp et al., 2009).

➤ *Avaliação antibacteriana dos óleos essenciais*

Para a análise da ação antibacteriana dos óleos essenciais, foi utilizado o procedimento de difusão em meio sólido (Bauer et al., 1966). Em placas de Petri, foi inoculado 1mL da suspensão de cada bactéria, em seguida foram adicionados 21 mL de Ágar Nutriente fundido a 50°C. Logo após a solidificação do meio de cultura, foram depositados discos de papel de filtro embebidos com 20 µL de cada produto em análise (óleo essencial na concentração absoluta) e o sistema foi incubado a 37°C por 48 horas (Hadacek e Greger, 2000).

Após a incubação das placas os resultados foram analisados medindo-se o diâmetro do halo de inibição de crescimento das bactérias, incluindo o diâmetro do disco de papel. Foi considerado como possuidor de atividade antimicrobiana aquele produto que apresentou a formação de um halo de inibição igual ou superior a 10 mm de diâmetro (Wong-Leung, 1988).



3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta os resultados obtidos da ação antimicrobiana das emulsões com os óleos extraídos via etanólica e metanólica. Para ambas as vias de extração, a *Escherichia coli* apresentou resistência, portanto não houve a formação do halo de inibição. Para a emulsão preparada a partir da extração pela via etanólica a *Salmonella* sp e o *Bacillus cereus* apresentaram a mesma medida, 15 mm, o que também ocorreu com a emulsão extraída via metanólica, porém com um halo de inibição de 14 mm.

Tabela 1: Resultados da ação antimicrobiana das emulsões.

Emulsão	Microrganismos		
	<i>Salmonella</i> sp	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus cereus</i>
	Halos de inibição (mm)		
Etanólica	15	Não houve formação	15
Metanólica	14	Não houve formação	14

Fonte: Laboratório de Microbiologia de Alimentos - UNIUBE.

Pode-se considerar que ambas emulsões apresentam atividade antimicrobiana, pois ocorreu a formação de um halo de inibição superior a 10 mm de diâmetro. Estes resultados são compatíveis aos resultados de Majhenic, Skerget e Knez (2007), que ao comparem a utilização de água, metanol, etanol (60%) e acetona (35%), utilizados como solventes em sementes de guaraná, verificaram que o extrato etanólico foi o mais eficiente como agente antioxidante e antimicrobiano.

A *Salmonella* sp apresentou halo de inibição de 14 e 15 mm, para a extração via metanólica e etanólica, respectivamente, estes valores são compatíveis com os resultados encontrados por Silvestri et al. (2010) que utilizou concentrações de óleo de cravo da Índia variando entre 5 e 15 µL por disco e os halos de inibição estão compreendidos entre 11,25 a 18,25 mm. Estudos realizados por Montovani et al. (2009), resultaram em halos de inibição para *B. cereus* de 13,11 mm para a emulsão metanólica, sendo que Silvestri et al. (2010) obtiveram diâmetros inibidores equivalentes a 22 mm para *Bacillus cereus*.

A *E. coli* apresentou-se imune à aplicação, contrária à alta sensibilidade aos compostos orgânicos do cravo-da-Índia proposta por De Martino (2009). Para Cansian et al. (2010) a utilização de óleo essencial de ho-sho em *E. coli* resultou em halo de inibição igual a 27,5 mm, mostrando Silvestri et al. (2010) resultados iguais a 25 mm para óleo essencial de cravo-da-Índia obtido por arraste a vapor. Quanto a isso, observam-se resultados menos favoráveis dos valores encontrados para a inibição em relação ao exposto na literatura.



Frequentemente, encontram-se diferenças significativas na atividade antimicrobiana reportada para óleos essenciais provenientes de uma mesma espécie vegetal. Estas diferenças devem-se, principalmente, às diferentes localizações geográficas, época de coleta, genótipo e condições climáticas (Celiktas et al., 2007), sendo portando necessária a caracterização da composição e da atividade biológica de óleos essenciais obtidos a partir de plantas de uma determinada região.

A ação antibacteriana dos componentes dos óleos essenciais pode ocorrer de três formas: pela interferência na dupla camada fosfolipídica da parede celular, pelo aumento da permeabilidade e perda dos constituintes celulares e por alteração de uma variedade de sistemas enzimáticos, incluindo aqueles envolvidos na produção de energia celular e síntese de componentes estruturais ou por inativação e destruição do material genético (Kalemba, Kunicka, 2003, Delamare et al., 2007). O mecanismo de ação do eugenol ocorre em nível de membrana plasmática, juntamente com a inativação de enzimas e/ou no material genético celular. Em *Bacillus cereus* concentrações de eugenol inibiram a produção de amilase e proteases, degradação da parede celular e lise celular também foram encontradas (Thoroski et al., 1989).

Um aspecto interessante no que concerne à atividade antimicrobiana de óleos essenciais é que o risco de que micro-organismos patogênicos venham a desenvolver resistência é muito baixo, uma vez que estes produtos contêm uma mistura de substâncias antimicrobianas, que atuam através de diversos mecanismos (Bakkali et al., 2008, Oke et al., 2009, Rahman e Kang, 2009). Esta é uma característica benéfica e vantajosa dos produtos derivados de plantas sobre outros agentes antimicrobianos, e pode vir a aumentar a segurança alimentar e a vida de prateleira dos alimentos.

4. CONCLUSÃO

Conclui-se que emulsões com polissorbato 80 a base de extratos do cravo-da-índia formuladas com metanol e etanol aplicadas pelo método de difusão em placas possuem capacidade bactericida eficiente em *Bacillus cereus* e *Salmonella* sp., sendo os resultados mais efetivos à base de etanol. Aplicações das emulsões dentro das mesmas condições não apresentaram halos de inibição para *Escherichia coli*.

5. REFERÊNCIAS

BAKKALI, F., AVERBECK, S., AVERBECK, D., IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils. *Food and Chemical Toxicology*, v. 46, p. 446-475, 2008.

BAUER, A. W., KIRBY, W. M., SHERRIS, J. C., TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, v. 45, n. 4, p. 493-496, 1966.

CANSIAN, R. L., MOSSI, A. J., de OLIVEIRA, D., TONIAZZO, G., TREICHEL, H., PAROUL, N., ASTOLFI, V., ATTI SERAFINI, L. Atividade antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial de ho-sho (*Cinnamomum camphora* Ness e Eberm Var. *Linaloolifera fujita*). *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas -SP, v. 30, n. 2, p. 378-384, abr.-jun. 2010.

CECHINEL FILHO, V., YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos



farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Química Nova*, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.

CECHINEL FILHO, V., YUNES, R. A. Estudo químico de plantas medicinais orientado para a análise biológica. Obtenção, determinação e modificação estrutural de compostos bioativos. In: YUNES, R. A., CALIXTO, J. B. (orgs.). *Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna*. Chapecó: Argos, 2001. 500 p.

CELIK TAS O.Y., KOCABAS E.E.H., BEDIR E., SUKAN F.V., OZEK T., BASER, K.H.C. Antimicrobial activity of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chemistry*, v. 100, n. 2, p. 553-559, 2007

DANTAS, L. I. S., DA ROCHA, F. Â. G., DE MEDEIROS, F. G. M., DOS SANTOS, J. A. B. Atividade antibacteriana do óleo essencial de *Lippia gracilis* Schauer sobre patógenos de importância na indústria de alimentos. *HOLOS*, v. 5, n. 26, 2010.

DELAMARE A.P., PISTORELLO I.T.M., ARTICO L., SERAFINI L.A., ECHEVERRIGARAY, S. Antibacterial activity of essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil. *Food Chemistry*, v.100, n. 2, p. 603-608, 2007.

DORMAN, H. J. D., DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, Oxford, v. 88, n. 2, p. 308-316, Apr. 2000.

FIORENTINI, Â.M., SANT'ANNA, E.S., PORTO, A., MAZO, J. Z., FRANCO, B.D. Influence of bacteriocins produced by *Lactococcus plantarum* BN in the shelf-life of refrigerated bovine meat. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 32, n. 1, p. 42-46, 2001.

HADACEK, F., GREGER, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. *Phytochemical Analysis*, v. 11, n. 3, p. 137-147, 2000.

ISMAIEL, A., PIERSON, M. D. Inhibition of Growth and Germination of *C. botulinum* 33A, 40B, and 1623E by Essential Oil of Spices. *Journal of Food Science*, v. 55, n. 6, p. 1676-1678, 1990.

KALEMBA, D. A. A. K., KUNICKA, A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current medicinal chemistry*, v. 10, n. 10, p. 813-829, 2003.

KÜLKAMP, I. C., PAESE, K., GUTERRES, S. S., POHLMANN, A. R. Estabilização do ácido lipóico via encapsulação em nanocápsulas poliméricas planejadas para aplicação cutânea. *Quim. Nova*, v. 32, n. 8, 2078-2084, 2009.

MAJHENIC, L., SKERGET, M., KNEZ, Z. Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. *Food Chemistry*, v. 104, n. 3, p. 1258-1268, 2007.

DE MARTINO, L. D., DE FEO, V., FORMISANO, C., MIGNOLA, E., SENATORE, F. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from three chemotypes of *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart growing wild in Campania (Southern Italy). *Molecules*, Suíça, v. 14, n. 8, p. 2735-46, 2009.

MONTOVANI, P.A.B., GONÇALVES JÚNIOR, A.C., MORAES, A., FIORENTINI, F., MEINERZ, C., SHIKIDA, S. Atividade antimicrobiana do extrato de açoita-cavalo (*Luehea* sp.). *Cadernos de Agroecologia*, v. 4, n. 1, 2009.



NASCIMENTO, G. G., LOCATELLI, J., FREITAS, P. C., SILVA, G. L. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 31, n. 4, p. 247-256, 2000.

OUATTARAA, B., SIMARD, R. E., HOLLEY, R. A., PIETTE, G. J. P., BÉGIN, A. Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. *International Journal of Food Microbiology*, v. 37, n. 2, p. 155-162, 1997.

OKE, F., ASLIM, B., OZTURK, S., ALTUNDAG, S. Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Satureja cuneifolia* Ten. *Food Chemistry*, v. 112, p. 874-879, 2009.

RAHMAN, A., KANG, S. C. Inhibition of foodborn pathogens and spoiling bacteria by essential oil and extracts of *Erigeron ramosus* (Walt.) B.S.P. *Journal of Food Safety*, v. 29, p. 176-189, 2009.

RISTORI, C. A., PEREIRA, M. A. dos S., GELLI, D. S. The effect in vitro of ground black pepper on contamination with *Salmonella rubislaw*. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v. 62, n.2, p. 131-133, 2002.

SILVESTRI, J. D. F., PAROUL, N., CZYEWSKI, E., LERIN, L., ROTAVA, I., CANSIAN, R.L., MOSSI, A., TONIAZZO, G., DE OLIVEIRA, D., TREICHEL, H. Perfil da composição química e atividades antibacteriana e antioxidante do óleo essencial do cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata* Thunb.). *Rev. Ceres*, v. 57, n. 5, 2010.

THOROSKI, J., BLANK, G., BILIADERIS, C. Eugenol induced inhibition of extracellular enzyme production by *Bacillus cereus*. *Journal of Food Protection*, 52, n.6, p.399-403, 1989.

UTAMA, I. M. S., WILLS, R. B., BEN-YEHOSHUA, S., KUEK, C. In vitro efficacy of plant volatiles for inhibiting the growth of fruit and vegetal decay microorganisms. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 50, n. 22, p. 6371-6377, 2002.

WONG-LEUNG, Y. L. Antibacterial activities of some Hong Kong plants used in Chinese medicine. *Fitoterapia*, v. 69, n. 1, p. 11-16, 1988.