



XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos
Alimentação: a árvore que sustenta a vida

X CIGR Section IV International Technical Symposium
Food: the tree that sustains life

24 a 27 de outubro de 2016 • FAURG S • GRAMADO/RS

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEO ESSENCIAL DE CRAVO-DA-ÍNDIA (*Syzygium aromaticum*) OBTIDO COM CO₂ EM FASE SUPERCRÍTICA

M. S. Oliveira¹, D. S. Pereira², W.A. Costa³, F. W. F. Bezerra¹, T. O. A. Menezes⁴, E. H. A. Andrade⁵, S. H. M. Silva⁶, R. N. Carvalho Jr¹

1- Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal do Pará, Instituto de Tecnologia – CEP: 66075-110 - Belém - PA - Brasil. Telefone: 55 (91) 3201-8861 - e-mail: (mozaniel.oliveira@yahoo.com.br)

2- Laboratório de Agroindústria - Embrapa Amazônia Oriental – CEP: 66095-100 – Belém – PA - Brasil. Telefone: 55 (91) 3276-9845 - e-mail: (santiagoesam@gmail.com)

3- Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Recursos Naturais da Amazônia – Universidade Federal do Pará, Instituto de Tecnologia – CEP: 66075-110 - Belém - PA - Brasil. Telefone: 55 (91) 3201-8858 - e-mail: (wanessa.almeida712@yahoo.com.br)

4- Faculdade de Odontologia - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde – CEP: 66075-900 Belém – Pará – Brasil. Telefone: 55 (91) 3201-7494 - e-mail: (tamenezes@ufpa.br)

5- Laboratório Adolpho Ducke - Museu Paraense Emílio Goeldi - CEP: 66077-830 - Belém - PA - Brasil. Telefone: 55 (91) 3075-6139 - e-mail: (eloisandrade@ufpa.br)

6- Instituto Evandro Chagas - Seção de Bacteriologia e Micologia – CEP: 67030-000 - Ananindeua – PA - Brasil. Telefone: 55 (91) 3214-2125 - e-mail: (silviasilva@iec.pa.gov.br)

RESUMO – Nas últimas décadas a humanidade vem buscando métodos de vida mais saudáveis, principalmente no âmbito alimentar, a busca por espécies de plantas ricas em compostos bioativos vêm motivando o desenvolvimento de novas pesquisas. Este trabalho teve por objetivo obter óleos essenciais de cravo-da-índia (*S. aromaticum*) com uso de CO₂ em fase supercrítica e verificar *in vitro* a atividade antimicrobiana. Os óleos essenciais de cravo-da-índia foram obtidos nas condições operacionais de temperatura e pressão de 40°C / 100bar, 40°C / 200bar, 40°C / 300bar, 50°C / 100bar, 50°C / 200bar e 50°C / 300bar. O Eugenol foi o principal composto identificado. A atividade antimicrobiana foi avaliada por meio do método de disco-difusão em meio sólido (CLSI, 2004). Todos os óleos essenciais demonstraram ter atividade antibacteriana, sendo o extrato obtido em 50°C / 300bar o que apresentou o maior halo de inibição para os microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*.

ABSTRACT – In recent decades, humanity has been seeking healthier methods of life, especially in the food area, the search for species of plants rich in bioactive compounds have been encouraging the development of new researches. This study aimed to obtain clove India extracts (*S. aromaticum*) using CO₂ in supercritical phase and ascertain the *in vitro* antimicrobial activity. The clove extracts were obtained at operating temperature and pressure of 40 °C / 100bar, 40 °C / 200bar, 40 °C / 300bar 50 °C / 100bar, 50 °C / 200bar and 50 °C / 300bar. The main compound identified was Eugenol. Antimicrobial activity was assessed by disk diffusion method on solid medium (CLSI, 2004). All extracts have demonstrated antibacterial activity, and the extract obtained at 50 °C / 300bar presented the largest inhibition zone for *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*.

PALAVRAS-CHAVE: Eugenol; antimicrobiano; óleo essencial.

KEYWORDS: Eugenol; antimicrobial; essential oil



XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos

Alimentação: a árvore que sustenta a vida

X CIGR Section IV International Technical Symposium

Food: the tree that sustains life

24 a 27 de outubro de 2016 • FAURG • GRAMADO/RS

1. INTRODUÇÃO

Os metabólitos secundários de plantas em especial os óleos essenciais normalmente são produzidos por células secretoras ou grupos de células, sendo encontrados em diversas partes do vegetal, como folhas, talos casca ou frutos e frequentemente apresentam composição diferente.

O cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry) é a gema floral seca sendo usado principalmente como condimento na culinária, devido ao seu marcante aroma e sabor, conferido por um composto fenólico volátil, o Eugenol. Atualmente, Zanzibar e Madagascar são os principais produtores de cravo-da-índia, seguidos pela Indonésia (Mazzafera, 2003).

A aplicação de óleos essenciais como ingredientes funcionais em formulações alimentícias, cosméticas ou ainda em formulações sanitizantes, tem despertado grande interesse neste setor industrial devido à grande aceitação dos consumidores por produtos naturais, bem como pelos danos à saúde propiciados pelos aditivos sintéticos (Conner, 1993; Scherer et al., 2009).

O óleo essencial de cravo-da-índia é um produto importante para a indústria de alimentos, pois apresenta um poderoso antioxidante e potencial antimicrobiano permitindo a sua utilização para a substituição de produtos comerciais sintéticos para a conservação de alimentos (Scopel et al., 2014).

A extração de óleos essenciais podem incluir o uso de dióxido de carbono, micro-ondas e principalmente destilação de baixa ou alta pressão empregando água fervente ou vapor quente. As suas propriedades bactericidas e fungicidas, as utilizações farmacêuticas e alimentares, são cada vez mais generalizadas como alternativas aos produtos químicos sintéticos. Devido às utilizações farmacêuticas, cosméticas e alimentares a extração com solventes lipofílicos como dióxido de carbono supercrítico é mais recomendável (Bakkali et al., 2008; Bizzo et al., 2009).

Este trabalho tem por objetivo obter diferentes frações de óleo essencial de Cravo-da-índia e verificar *in vitro* a atividade antimicrobiana.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Extração Supercrítica

Este equipamento pertence ao Laboratório de Extração (LABEX) do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFPA.

As extrações via CO₂ foram realizadas no *Spe-edTM SFE* (Allentown, PA, EUA) modelo 7071 da Applied Separations, acoplado ao compressor Schulz (Schulz S/A, modelo CSA, Brasil), cilindro de CO₂ (White Martins, Brasil), recirculador Polyscience F08400796 (Nilles, Illinois, EUA) e medidor de vazão de CO₂ na saída do sistema Alicat Scientific M 5SLPM (Tucson, AZ, EUA). O procedimento experimental foi realizado no Laboratório de Extração (LABEX - Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos – UFPA) usando 30 g de *S. aromaticum* triturado. Foram usadas as temperaturas de 40 °C e 50 °C, pressões de 100bar, 200bar e 300bar de acordo com o proposto por (Guan et al., 2007). A vazão do CO₂ foi de $8,85 \times 10^{-5}$ kg/s. A extração foi efetuada em duas etapas: um período estático (*S. aromaticum* com CO₂ supercrítico estavam em condições fechadas de operação no recipiente de extração) de 1.800 s e um período dinâmico (sistema foi aberto e apenas CO₂ e extrato foram continuamente liberados em recipiente fechado sob-banho de gelo para evitar volatilização dos compostos) de 7.200s.

2.2 Perfil Químico

A identificação química foi realizada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (gc/ms), de acordo com o proposto por (Ribeiro et al., 2014; Zoghbi et al., 2014).

3. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A atividade antimicrobiana foi realizada na Seção de Bacteriologia e Micologia do Instituto Evandro Chagas por meio do método de disco-difusão em meio sólido (CLSI, 2004), com modificações. Os micro-organismos (*Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*)



foram suspensos em solução salina (escala de turbidez 1 de McFarland), semeadas em placa de Petri contendo meio de cultura ágar Sabouraud, sendo em seguida adicionados os discos de papel (6mm) impregnados com 30 µL de cada um dos óleos essenciais obtidos por extração com CO₂ supercrítico. Em seguida, as placas foram incubadas a 30°C por 24h e 48h. Após este período foi realizada a leitura dos halos de inibição. Como droga antifúngica controle utilizou-se a Nistatina na concentração de 50µg/mL. Os isolados que apresentaram halos de inibição com diâmetro < 8 mm foram considerados resistentes e ≥ 8 mm como sensíveis.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tabela 1 apresenta os resultados do composto químico identificado em maior concentração, o Eugenol, que é um monoterpene oxigenado. É relatado na literatura que este composto tem atividade bactericida (Hemaiswarya & Doble, 2009), fungicida (Medvedeff et al., 1998) e anestésica (Cunha et al., 2010).

Tabela 1 - Composto majoritário encontrado nas diferentes frações

IR	OE1	OE2	OE3	OE4	OE5	OE6
23.802 Eugenol	62,88%	60,42%	58,77%	57,12%	58,70%	60,61%

IR. Índice de retenção em Rtx-5MS. (OE) - Óleo essencial.

4.1 Atividade Antimicrobiana

O ensaio para avaliar a ação antifúngica e antibacteriana dos óleos essenciais foram testados sobre os patógenos *C. albicans* (levedura), *E. coli* e *S. aureus* (bactérias).

Foi observado que os microorganismos manifestam-se sensíveis aos compostos presente nos óleos essenciais, independente da temperatura e pressão empregada na obtenção dos óleos essenciais. Foram observados halos de inibição que variam de 17 a 25 mm para a levedura, e 13 a 22 mm para as bactérias *E. coli* e *S. aureus* (Tabela 2, Figuras 1 e 2). Contudo, os maiores halos de inibição foram observados para o extrato E6 (50°C / 300bar). Ao analisar a Tabela 2 e a Figura 4, podemos observar que os microrganismos foram sensíveis à presença do Eugenol isolado com halo de inibição variando de 20 mm para *E. coli* e *S. aureus* e 36 mm para *C. albicans*. Desta forma, a *C. albicans* demonstrou ser o patógeno mais sensível aos compostos presentes nos óleos essenciais de cravo-da-índia, o presente trabalho demonstra que o composto responsável pela inibição do crescimento dos microrganismos pode estar relacionado à presença do Eugenol.

Os trabalhos que relatam a atividade antimicrobiana com óleos essenciais de cravo obtidos com uso de CO₂ em fase supercrítica ainda são escassos, o trabalho de (Ivanovic et al., 2013), é o primeiro relato sobre a avaliação da atividade antibacterianas dos óleos essenciais de cravo obtidos via com CO₂ supercrítico, eles demonstraram que os óleos essenciais tiveram atividade antimicrobiana moderada sobre as estirpes de *S. aureus* e *Enterococcus*.

Tabela 1 - Ação dos óleos essenciais de cravo-da-índia (*S. aromaticum*) e o padrão de Eugenol sobre os patógenos *C. albicans*, *E. coli* e *S. aureus*, com os halos de inibição em (mm).

Óleos; Substância majoritária	<i>C. albicans</i> INCQS - 40175	<i>E. coli</i> ATCC - 25911	<i>S. aureus</i> INCQS - 00015
	Diâmetro do halo	Diâmetro do halo	Diâmetro do halo
OE1- 40°C / 100 bar	17 (mm)	17 (mm)	13 (mm)
OE2- 40°C / 200 bar	21 (mm)	18 (mm)	15 (mm)
OE3 - 40°C / 300 bar	21 (mm)	20 (mm)	15 (mm)
OE4 - 50°C / 100 bar	21 (mm)	20 (mm)	17 (mm)
OE5 - 50°C / 200 bar	23 (mm)	20 (mm)	17 (mm)
OE6 - 50°C / 300 bar	25 (mm)	22 (mm)	17 (mm)



Eugenol	36 (mm)	20 (mm)	20 (mm)
---------	---------	---------	---------

Figura 1 - Ação dos óleos essenciais de cravo-da-índia (*S. aromaticum*) obtidos via CO₂ no estado supercrítico em diferentes condições de temperatura e pressão, sobre levedura de *C. albicans*. EO1, 100bar/40°C; EO2, 200 bar/40°C; EO3, 300bas/40°C; EO4, 100bar/50°C; EO5, 200 bar/50°C; EO6, 300 bar/50°C (Fonte: Autor).

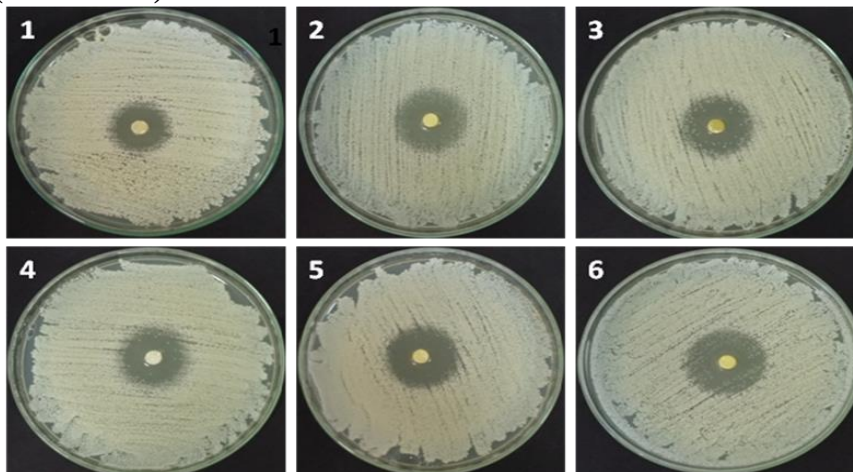


Figura 2 - Ação dos óleos essenciais de cravo-da-índia (*S. aromaticum*) obtido obtidos via CO₂ no estado supercrítico em diferentes condições de temperatura e pressão, sobre a bactéria *cherichia coli*. EO1, 100bar/40°C; EO2, 200 bar/40°C; EO3, 300bas/40°C; EO4, 100bar/50°C; EO5, 200 bar/50°C; EO6, 300 bar/50°C (Fonte: Autor).

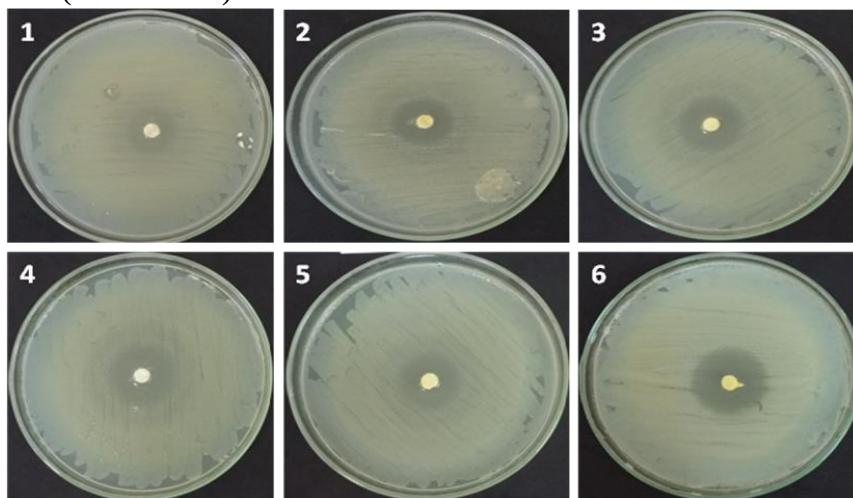


Figura 3 - Ação dos óleos essenciais de cravo-da-índia (*S. aromaticum*) obtido obtidos via CO₂ no estado supercrítico em diferentes condições de temperatura e pressão, sobre a bactéria *Staphylococcus aureus*. EO1, 100bar/40°C; EO2, 200 bar/40°C; EO3, 300bas/40°C; EO4, 100bar/50°C; EO5, 200 bar/50°C; EO6, 300 bar/50°C (Fonte: Autor).

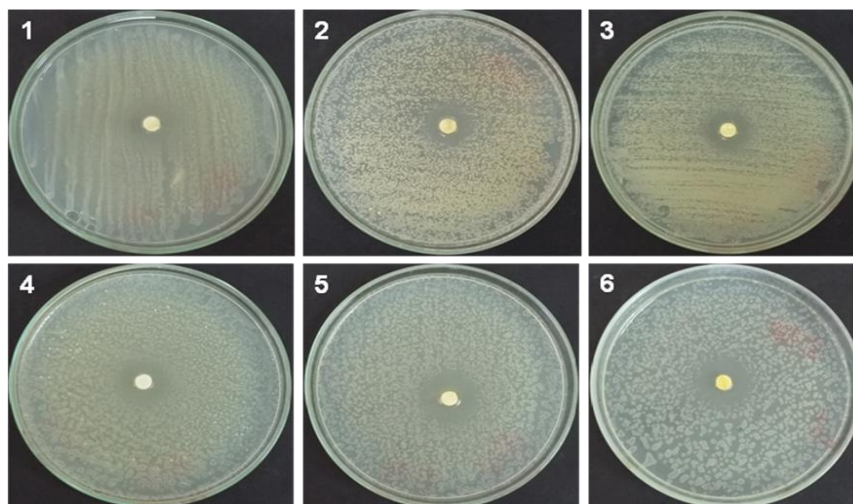
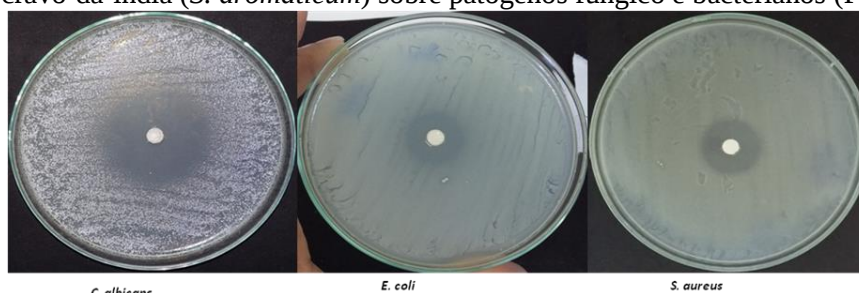


Figura 4 - Ação do metabolito secundário Eugenol principal composto identificado nos óleos essenciais de cravo-da-índia (*S. aromaticum*) sobre patógenos fúngico e bacterianos (Fonte: Autor).



Várias literaturas relatam a atividade antimicrobiana do Eugenol, como sendo um bom substituto para o controle de vários patógenos animais e vegetais (Oliveira & Abreu, 2012; Valeriano et al., 2012; Chaibub et al., 2013; Pereira et al., 2014).

Scopel et al. (2014) analisaram óleos essenciais de cravo-da-índia obtidos por CO₂ em fase supercrítica, sobre os microrganismos *E. coli*, *S. aureus* e *E. faecalis* pelo método de microdiluição e verificaram que todas as amostras inibiram o crescimento bacteriano.

Djeussi et al. (2013) realizaram ensaios antimicrobianos com 27 bactérias gram-negativas e os resultados dos testes indicaram que todos os óleos essenciais fitoquímicos continham fenóis triterpenos, e outras classes de substâncias químicas. Os óleos essenciais estudados exibiram vários graus de atividade, além de todos os óleos essenciais apresentarem atividade antimicrobiana.

5. CONCLUSÃO

A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS) evidenciou que os óleos essenciais obtidos possuem composição química variada, variando principalmente em termos quantitativos o Eugenol foi o principal composto identificado e pode ser o responsável pelos afeitos apresentados pelas frações de óleo essenciais de cravo de índia.

6. REFERÊNCIAS

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology*, 46(2), 446-475.



XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos

Alimentação: a árvore que sustenta a vida

X CIGR Section IV International Technical Symposium

Food: the tree that sustains life

24 a 27 de outubro de 2016 • FAURGVS • GRAMADO/RS

- Bizzo, H. R., Hovell, A. M. C., & Rezende, C. M. (2009). Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. *Química Nova*, 32(3), 588-594.
- Chaibub, B. A., Oliveira, T. B., Fiuza, T. S., Bara, M. T. F., Tresvenzol, L. M. F., & Paula, J. R. (2013). Composição química do óleo essencial e avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial, extrato etanólico bruto e frações das folhas de *Spiranthera odoratissima* A. St.-Hil. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 15(2), 225-229.
- Conner, D. E. Naturally occurring compounds. In: Davidson, P.; Brannen, A. L. (1993). *Antimicrobials in foods*. New York: Marcel Dekker, Inc., 441-468.
- Cunha, M. A. D., Zeppenfeld, C. C., Garcia, L. D. O., Loro, V. L., Fonseca, M. B. D., Emanuelli, T., & Baldisserotto, B. (2010). Anesthesia of silver catfish with Eugenol: time of induction, cortisol response and sensory analysis of fillet. *Ciência Rural*, 40(10), 2107-2114.
- Godoy, H. T., Duarte, M. C. T., Wagner, R., & Scherer, R. (2009). Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 11(4), 442-449.
- Guan, W., Li, S., Yan, R., Tang, S., & Quan, C. (2007). Comparison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and other three traditional extraction methods. *Food Chemistry*, 101(4), 1558-1564.
- Hemaiswarya, S., & Doble, M. (2009). Synergistic interaction of Eugenol with antibiotics against Gram negative bacteria. *Phytomedicine*, 16(11), 997-1005.
- Ivanovic, J., Dimitrijevic-Brankovic, S., Mistic, D., Ristic, M., & Zizovic, I. (2013). Evaluation and improvement of antioxidant and antibacterial activities of supercritical extracts from clove buds. *Journal of functional Foods*, 5(1), 416-423.
- Mazzafera, P. (2003). Efeito alelopático do extrato alcoólico do cravo-da-índia e Eugenol. *Revista Brasileira de Botânica*, 26(2), 231-238.
- Medvedeff, M. G., Lloret, M. A., Vedoya, M. C., Zaneck, M., Reca, M., & Herszage, L. (1998). Efecto fungicida de la solución sobresaturada de azúcar, Eugenol y polietilenglicol 400 sobre *Candida albicans*. *Revista argentina de micología*, 21(3), 14-7.
- Oliveira, J. G. D., & Abreu Filho, B. A. D. (2012). Antimicrobial properties of Eugenol on *Alicyclobacillus* spp. isolated from orange juice. *Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)*, 71(2), 410-414.
- Ribeiro, A. F., Andrade, E. H. A., Salimena, F. R. G., & Maia, J. G. S. (2014). Circadian and seasonal study of the cinnamate chemotype from *Lippia origanoides* Kunth. *Biochemical Systematics and Ecology*, 55, 249-259.
- Schalcher Pereira, Á. I., Schalcher Pereira, A. D. G., Lopes Sobrinho, O. P., Pereira Cantanhede, E. D. K., & Saldanha Siqueira, L. F. (2014). Atividade antimicrobiana no combate as larvas do mosquito *Aedes aegypti*: Homogeneização dos óleos essenciais do linalol e Eugenol. *Educación Química*, 25(4), 446-449.
- Scopel, R., Falcão, M. A., Lucas, A. M., Almeida, R. N., Gandolfi, P. H., Cassel, E., & Vargas, R. M. (2014). Supercritical fluid extraction from *Syzygium aromaticum* buds: Phase equilibrium, mathematical modeling and antimicrobial activity. *The Journal of Supercritical Fluids*, 92, 223-230.
- Valeriano, C., Piccoli, R. H., Cardoso, M. G., & Alves, E. (2012). Antimicrobial activity of essential oils against sessile and planktonic pathogens of food source. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 14(1), 57-67.
- Zoghbi, M. D. G. B., Pereira, R. A., Lima, G. D. S. L. D., & Bastos, M. D. N. D. C. (2014). Variation of essential oil composition of *Tapirira guianensis* Aubl (Anacardiaceae) from two sandbank forests, north of Brazil. *Química Nova*, 37(7), 1188-1192.