

EFETOS *in vitro* E *in situ* DA ADIÇÃO DE EXTRATO AQUOSO DE CRAVO SOBRE O DESENVOLVIMENTO MICROBIANO.

Marília Gonçalves Cattelan ✉

Arthur Mendes Soares Oliveira

Ana Sílvia Mattos Gonçalves

Vanessa Tomé Faim

Fernando Leite Hoffmann (in memoriam)

Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – UNESP, São José do Rio Preto – SP

✉ mariliagcattelan@gmail.com

RESUMO

Foram avaliados os efeitos da adição *in situ* e *in vitro*, de extrato aquoso de botões de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) sobre *Escherichia coli* (ATCC 8739) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Para o estudo *in vitro* foram empregadas concentrações de 100%, 75%, 50% e 25% (v/v) de extrato de cravo, diluídas em água destilada estéril, utilizando a técnica de difusão em ágar por disco. O estudo *in situ* foi conduzido inoculando amostras de doce de abóbora em pasta, adicionadas ou não de extrato aquoso de cravo puro, com as cepas bacterianas (10^8 UFC/g), separadamente. Os resultados revelaram que o extrato aquoso de cravo propiciou um aumento na contagem *in vitro* de *E. coli* e *S. aureus*. De modo análogo, no estudo *in situ*, a contagem de *S. aureus* foi favorecida pela adição do extrato puro de cravo em doce de abóbora em pasta. Sugere-se, portanto, estudos mais detalhados sobre o emprego de extratos aquosos

de especiarias em alimentos a fim de elucidar o efeito sobre o desenvolvimento microbiano e possíveis interações com a composição dos alimentos em que são empregados.

Palavras-chave: Cravo.

Antimicrobiano. *Escherichia coli*. *Staphylococcus aureus*. Abóbora.

ABSTRACT

In vitro and in situ activity of clove (Syzygium aromaticum) bud extract were evaluated against Escherichia coli (ATCC 8739) and Staphylococcus aureus (ATCC 25923). Concentrations of 100%, 75%, 50% and 25% (v/v) of clove bud extract, diluted in sterile water, were employed for the in vitro study using the disk diffusion method on agar. The in situ study was conducted by inoculating pumpkin candy samples, added or not of pure clove extract, with the bacterial strains (10^8 CFU/g) separately. The in vitro results showed that the clove bud extract provided

an increase in the E. coli and S. aureus counts. Similarly, the in situ method showed that S. aureus count was enhanced by the addition of pure clove extract on pumpkin candy. It is suggested more detailed studies on the use of aqueous extracts of spices in food in order to elucidate the effect on microbial growth and possible interactions with the composition of the food.

Keywords: Clove. Antimicrobial. *Escherichia coli*. *Staphylococcus aureus*. Pumpkin.

INTRODUÇÃO

A ocorrência de doenças transmitidas por alimentos (DTA) é um constante foco de discussões em órgãos reguladores e produtores de alimentos, devido à preocupação mundial com estratégias que permitam seu controle e, conseqüentemente, garantam a inserção de produtos seguros no mercado consumidor. No

Brasil, o perfil epidemiológico das doenças transmitidas por alimentos ainda é pouco conhecido, pois somente alguns estados e/ou municípios dispõem de dados estatísticos e levantamentos reais sobre os agentes etiológicos mais comuns, alimentos mais frequentemente envolvidos e fatores contribuintes. Além disso, doenças transmitidas por alimentos nem sempre são oficialmente notificadas (VAN OMSON et al., 2006), porém, dentre os micro-organismos comumente envolvidos em doenças, pode-se destacar *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* e *Staphylococcus aureus* (MATASYOH et al., 2007 apud RANDRIANARIVELLO et al., 2009).

Na busca por compostos que possam ser empregados na conservação de alimentos, em substituição aos conservantes químicos, destacam-se os óleos essenciais e seus extratos, obtidos a partir de especiarias, ervas e plantas medicinais (HUSSAIN et al., 2010). A composição química dos óleos essenciais e extratos pode variar, bem como a concentração dos compostos que possuem o efeito inibitório sobre micro-organismos. Alguns desses compostos naturais podem ser mais eficientes quando comparados a compostos antibacterianos artificiais, e sua aceitação entre consumidores que buscam produtos saudáveis com baixo teor de aditivos tem aumentado consideravelmente (INOUE et al., 2003; MILITELLO et al., 2011).

Dentre os produtos naturais com efeito antimicrobiano bem documentado, destaca-se o cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), uma planta da família *Myrtaceae* originária da Indonésia. A especiaria possui destaque por seu valor medicinal e culinário, sendo empregada no preparo de diversos alimentos, como carnes, molhos e doces (HOSSAIN et al., 2014).

Embora sejam conhecidos os efeitos *in vitro* de diversas especiarias sobre distintas cepas microbianas, a atividade *in situ* ainda é pouco conhecida.

O estudo dos efeitos dos compostos naturais sobre o desenvolvimento microbiano é de fundamental importância a fim de determinar a possível ação antimicrobiana, bem como a avaliação da interação entre esses compostos e aqueles presentes nos alimentos, atuando sobre o desenvolvimento microbiano (GONÇALVES CATTELAN et al., 2013). Deste modo, o presente estudo avaliou o efeito da adição do extrato aquoso de cravo sobre duas cepas bacterianas: *Escherichia coli* (ATCC 8739) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *in vitro* e *in situ*.

MATERIAL E MÉTODOS

Cultura microbiana

Escherichia coli (ATCC 8739) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) foram mantidos em PCA (Ágar para Contagem Padrão - Acumedia) a 4°C, e reativadas em PCA a 35°C por 24 horas. A contagem microbiana foi padronizada de acordo com a escala 0,5 de Mc Farland, proporcionando uma concentração de 10⁸ UFC/mL (GONÇALVES-CATTELAN et al., 2013).

Obtenção do extrato aquoso de cravo

O extrato aquoso de botões de cravo (*Syzygium aromaticum*) foi preparado homogeneizando 10g da especiaria e 90mL de água destilada estéril. Em seguida, a mistura foi submetida à ebulição por 2 horas, conforme Fazio et al. (2009). A amostra foi, então, filtrada em recipientes de vidro estéreis. Para tanto, fez-se uso de filtros (Cromafil® Xtra PTFE-45/25 0,45 µm) e seringas (10 mL) estéreis.

Desenvolvimento do doce de abóbora em pasta

A formulação básica do produto foi obtida após estudo preliminar e resultou nas características sensoriais similares às de um doce de abóbora em pasta geralmente consumido no Brasil. As amostras foram elaboradas com abóbora (*Curcubita maxima*) e açúcar cristal (União - Companhia União dos

Refinadores – Açúcar e Café S. A.), em uma proporção 80:20 (p/p). Os produtos foram homogeneizados em um multiprocessador Walita Ri2044 e submetidos ao cozimento por 20 minutos. Em seguida, o doce foi envasado em recipientes de vidro estéreis e empregado no estudo *in situ*.

Estudo do efeito *in vitro* da adição do extrato aquoso de cravo

A avaliação do efeito *in vitro* da adição do extrato de cravo sobre o desenvolvimento microbiano foi efetuada por meio da técnica de diluição em ágar por disco, empregando o inóculo na concentração de 10⁸ UFC/mL. Água destilada estéril foi empregada como diluente, sendo as concentrações de extrato empregadas de 100% (extrato puro), 75%, 50% e 25%. Os testes foram efetuados em triplicata, após impregnação dos discos de papel filtro estéreis (Ø = 6 mm) com 20 µL de solução teste, cujas concentrações foram empregadas individualmente, conforme Gonçalves-Cattelan et al. (2013), com modificações.

Estudo do efeito *in situ* da adição do extrato aquoso de cravo em doce de abóbora

A avaliação do efeito *in situ* da adição do extrato de cravo em doce de abóbora sobre o desenvolvimento microbiano foi efetuada por meio da inoculação do doce de abóbora com cada cepa bacteriana, separadamente, de modo a obter uma contagem bacteriana de 10⁸ UFC/g. As amostras foram homogeneizadas e mantidas por 24 horas a 4°C. Foram preparadas amostras com e sem extrato aquoso de cravo (controle), para efeito comparativo. A concentração do extrato aquoso de cravo empregada no teste foi de 2,0% (v/p). Diluições decimais seriadas foram conduzidas para que a contagem microbiana fosse efetuada. As metodologias empregadas para contagem de *E. coli* e *S. aureus* foram as descritas por Kornacki;

Johnson (2001) e Lancette; Bennett (2001), respectivamente, fazendo uso dos Ágares Eosina Azul de Metileno (EMB) e Telurito de Potássio e Gema de Ovo (TEY). O período de incubação dos meios de cultura inoculados foi de 24 horas para *E. coli* e 48 horas para *S. aureus*.

Análise dos resultados

Os estudos *in vitro* e *in situ* foram conduzidos em triplicata, sendo o planejamento inteiramente casualizado. O fator estudado foi a influência da concentração do extrato de cravo sobre o desenvolvimento bacteriano. A análise estatística foi realizada por meio de uma análise descritiva e teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, com teste de comparação múltipla de Dunn a 5% de significância, para o estudo do efeito antibacteriano *in vitro*. Por sua vez, para a avaliação antibacteriana *in situ*, empregou-se, além da estatística descritiva dos dados, o teste t-Student a 5% de significância. Todos os testes estatísticos foram efetuados com suporte do software GraphPad InStat®, versão 3.05 (GrapPad Software Inc., La Jolla, EUA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 ilustra os resultados do efeito da adição de extrato aquoso de

cravo sobre os micro-organismos empregados no estudo. É imprescindível observar que os halos obtidos não foram de inibição, ou seja, o extrato aquoso de cravo favoreceu o desenvolvimento bacteriano no meio de cultura empregado. Para o *S. aureus* não foi possível verificar diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) entre as concentrações do extrato de cravo sobre o desenvolvimento bacteriano, sendo que as variações no fator analisado auxiliaram no desenvolvimento da cepa. De modo análogo, o desenvolvimento de *E. coli* foi favorecido apenas pela adição do extrato de cravo puro (100%).

Hill et al. (2013) relataram que extrato de botões de cravo possuem propriedades antimicrobianas consideráveis sobre *E. coli* e *S. aureus*. Segundo Wang et al. (2011), o eugenol comumente presente no óleo essencial de cravo é um antimicrobiano seletivo eficaz contra *E. coli* (GIM 1.173), porém ineficaz contra *Salmonella paratyphi* B (GIM1.224) e *Staphylococcus aureus* (CICC 21600), quando da microencapsulação do eugenol em complexos de beta-ciclodextrina.

É difícil prever a susceptibilidade aos agentes antimicrobianos uma vez que os estudos reportam o uso de distintas técnicas de avaliação e cepas microbianas. Além disso, para a

identificação correta de um agente antimicrobiano é necessário o estudo sobre diferentes cepas e múltiplas espécies (ABDALI; AJJI, 2014). Sabe-se que a composição química de substâncias vegetais, que pode exercer efeito antimicrobiano, varia dependendo da localização geográfica do cultivo, parte da planta a partir da qual tais substâncias são obtidas e variações sazonais (BURT, 2004; BAJPAI et al., 2012).

Os dados do estudo do efeito *in situ* (Tabela 2) permitem pressupor que, para a *E. coli*, não houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos com e sem a adição do extrato concentrado de cravo. Desse modo, o extrato da especiaria não produziu efeitos significativos sobre o desenvolvimento da bactéria. Para o *Staphylococcus aureus*, porém, houve diferença estatisticamente significativa entre as contagens bacterianas quando comparados os tratamentos. A maior contagem microbiana foi propiciada pela adição do extrato aquoso de cravo no doce de abóbora, evidenciando mais uma vez o efeito sinérgico ao desenvolvimento microbiano.

A eficácia de muitos antimicrobianos naturalmente presente nos alimentos ou intencionalmente adicionados pode ser influenciada pela composição química do alimento. Gill et al. (2002) sugeriram que a grande

Tabela 1 - Efeito *in vitro* da adição de extrato aquoso de cravo sobre *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Escherichia coli* (ATCC 8739).

Extrato de Cravo (%)	Diâmetro do halo (mm)*		
	<i>Staphylococcus aureus</i>		
	Média ± Desvio Padrão	Md	Valor P
100	12,33±1,15	13,00 ^a	0,220
75	10,67±1,15	10,00 ^a	
50	10,33±1,15	11,00 ^a	
25	11,67±1,15	11,00 ^a	
	<i>Escherichia coli</i>		
100	8,90±1,91	10,00 ^a	0,013
75	0,00±0,00	0,00 ^b	
50	0,00±0,00	0,00 ^b	
25	0,00±0,00	0,00 ^b	

*Os halos obtidos foram de efeito sinérgico para o desenvolvimento microbiano. Md = mediana. ^{a, b} (coluna): medianas seguidas da mesma letra minúsculas não diferem estatisticamente entre si, ao nível de significância de 5% pelo teste de Dunn.

Tabela 2 - Contagem microbiana (log UFC/g) para o efeito *in situ* da adição de extrato aquoso de cravo sobre de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Escherichia coli* (ATCC 8739).

Tratamento	Contagem microbiana (log UFC/g)	
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Extrato de cravo	7,97±0,04 ^a	7,97±0,06 ^a
Controle	7,86±0,11 ^a	7,85±0,01 ^b

Resultados expressos como média±desvio padrão. ^{a, b} (coluna): médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, ao nível de significância de 5%, pelo teste t-Student.

disponibilidade de nutrientes em alimentos permite que as bactérias reparem as células danificadas com mais rapidez. Devlieghere e colaboradores (2004) mencionam ser imprescindível o estudo das possíveis interações entre a composição química dos alimentos e a atuação de substâncias naturais visando o controle do desenvolvimento microbiano em alimentos.

CONCLUSÃO

O extrato aquoso de cravo auxiliou no desenvolvimento *in vitro* de *E. coli* e *S. aureus*. De modo análogo, no estudo *in situ*, a contagem de *S. aureus* foi favorecida pela adição do extrato puro de cravo em doce de abóbora em pasta. Sugere-se, portanto, estudos mais detalhados sobre o emprego de extratos aquosos de especiarias em alimentos a fim de elucidar o efeito sobre o desenvolvimento microbiano e possíveis interações com a composição dos alimentos em que são empregados.

REFERÊNCIAS

- ABDALI, H; AJJI, A. **Development of antibacterial structures and films using clove budpowder**. Industrial Crops and Products. (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.09.050>.
- BAJPAL, VK; BAEK, K.-H; KANG, SC. Control of *Salmonella* in foods by using essential oils: A review. **Food Research International**, v.45, p.722-734, 2012.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.94, n.3, p.223-253, 2004.
- DEVLIEGHERE, F; VERMEIREN, L; DEBEVERE, J. New preservation technologies: possibilities and limitations. **International Dairy Journal**, Barking, v.14, n.4, p.273-285, 2004.
- FAZIO, MLS; GONÇALVES, TMV; HOFFMANN, FL. Determinação da atividade antibacteriana de romã (*Punica granatum L.*). **Rev Hig Alimentar**, v.23, n.168/169, p.54-56, 2009.
- GILL, AO et al. Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham. **International Journal of Food Microbiology**, v.73, p.83-92, 2002.
- GONÇALVES CATTELAN, M et al. Antibacterial activity of oregano essential oil against foodborne pathogens. **Nutrition & Food Science**, v.43, p.169-174, 2013.
- HILL, LE; GOMES, C; MATTHEW TAYLOR, T. Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing essential oils (trans-cinnamaldehyde, eugenol, cinnamon bark, and clove bud extracts) for antimicrobial delivery applications. **Food Science and Technology – LWT**, v.51, p.86-93, 2013.
- HOSSAIN, MA et al. Comparison of chemical constituents and antimicrobial activities of three essential oils from three different brands' clove samples collected from Gulf region. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v.4, p.262-268, 2014.
- HUSSAIN, AI et al. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of spearmint (*Mentha spicata L.*) from Pakistan. **Journal of Essential Oil Research**, v.22, p.78-88, 2010.
- INOUE, S et al. Comparative study of antimicrobial and cytotoxic effects of selected essential oils by gaseous and solution contacts. **International Journal of Aromatherapy**, v.13, p.33-41, 2003.
- KORNACKI, JL; JOHNSON, JL. *Enterobacteriaceae*, coliforms, and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. In: DOWNES, F. P. and K. ITO (ed.). **Compendium of Methods for the Microbiological Examinations of Foods**. 4. ed. American Public Health Association, Washington, D. C., Chapter 8, p.69-82, 2001.
- LANCETTE, GA; BENNETT, RW. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins. In: DOWNES, FP and K. ITO (ed.). **Compendium of Methods for the Microbiological Examinations of Foods**, 4. ed. American Public Health Association, Washington, DC, Chapter 39, p.387-403, 2001.
- MATASYOH, JC et al. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Tarhonanthus camphoratus*. **Food Chemistry**, v.101, n.3, p.1183-1187, 2007.
- MILITELLO, M et al. Chemical composition and antibacterial potential of *Artemisia arborescens L.* essential oil. **Current Microbiology**, v.62, n.4, p.1274-1281, 2011.
- RANDRIANARIVELO, R et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils of *Cinnamosma fragrans*. **Food Chemistry**, v.114, p.680-684, 2009.
- VAN OMSON, G et al. Levantamento de dados epidemiológicos relativos à ocorrência/surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) no estado do Paraná – Brasil, no período de 1978 a 2000. **Ciênc Agrotecnol**, v.30, n.6, p.1139-1145, 2006.
- WANG, T et al. Release characteristics and antibacterial activity of solid state eugenol/b-cyclodextrin inclusion complex. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v.71, p.207-213, 2011.