



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

WALÉRIA FERREIRA RABÊLO

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, TOXICIDADE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIBACTERIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DO CRAVO DA ÍNDIA (*Syzygium
aromaticum*)**

São Luís
2010

WALÉRIA FERREIRA RABÊLO

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, TOXICIDADE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIBACTERIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DO CRAVO DA ÍNDIA (*Syzygium
aromaticum*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Maranhão como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Victor Elias Mouchrek Filho

São Luís
2010

Rabêlo, Waléria Ferreira

Caracterização química, toxicidade e avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial do Cravo da Índia (*Syzygium aromaticum*)/ Waléria Ferreira Rabêlo – São Luís, 2010.

77 f.

Orientador: Prof. Dr. Victor Elias Mouchrek Filho
Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Química, Universidade Federal do Maranhão, 2010.

1. Química analítica. 2. Cravo da Índia – óleo essencial – análise química. 3. Atividade antibacteriana. I. Título.

CDU 543:582.883:665.52/.54

WALÉRIA FERREIRA RABÊLO

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, TOXICIDADE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DO CRAVO DA ÍNDIA (*Syzygium aromaticum*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Maranhão como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Victor Elias Mouchrek Filho

BANCA EXAMINADORA

Aprovada em: 24/ 09/ 2010

Prof. Dr. Victor Elias Mouchrek Filho (Orientador)
Doutor em Química Analítica – UFMA

Profa. Dra. Adenilde Ribeiro Nascimento
Doutora em Ciência dos Alimentos – UFMA

Profa. Dra. Luce Maria Brandão Torres
Doutora em Química Orgânica - USP

Dedico este trabalho em primeiro lugar à **Deus**, que sempre me deu forças nas horas mais difíceis e me presenteou com a família e amigos, que tanto amo.

A minha querida mãe, **Aldenora J. Ferreira Rabêlo**, pelo amor, carinho, dedicação e ensinamento de vida. Obrigada mãe, por ser essa mulher batalhadora e fazer parte de todos os momentos de minha vida e por ter contribuído em realizar mais um sonho.

Ao meu pai, **José Ribamar Campos Rabêlo**, por ser um homem forte, dedicado à família, sempre presente, e pelo amor incondicional que temos um pelo outro.

À minha querida avó, **Nercy Campos Rabêlo** (in memoriam), pelo amor, alegria, força, garra, vontade de viver, principalmente nos seus últimos dias, obrigada por cada riso, história, ensinamento e tudo que plantou em nossas vidas, nosso verdadeiro anjo de luz.

Ao meu irmão, **Ricardo Ferreira Rabêlo**, que sempre me incentiva, companheiro que tanto admiro e torço a cada dia pela sua vitória.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar à Deus, que nos dá o dom da vida e concebe maravilhas inexplicáveis todos os dias.

Aos meus pais, motivos de alegria e razão do meu viver, José Ribamar Campos Rabêlo e Aldenora Joaquina Ferreira Rabêlo, meu agradecimento eterno, pelo incansável apoio e por tudo que representam em minha vida e nas minhas realizações;

Ao meu irmão Ricardo Ferreira Rabêlo, pelo incentivo, amor, disponibilidade nos momentos difíceis ao longo dos meus estudos;

Aos meus tesouros, avós Nercy Campos Rabêlo (*in memoriam*) e Maria Vitória Ferreira, por todas as orações que fizeram para o meu sucesso acadêmico;

Ao Prof. Dr. Victor Elias Mouchrek Filho, pela orientação deste trabalho, pela amizade, paciência, compreensão e ensinamentos compartilhados durante estes vários anos de convívio;

A minha querida Prof^a. Dra. Adenilde Ribeiro Nascimento, pela amizade, dedicação, discussão e colaboração prestada na realização deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Nestor Everton Filho, pela ajuda e sua amizade durante todo esse percurso e realização deste trabalho;

Aos amigos do Laboratório de análises Físico-Química, Microbiologia e de Bromatologia do Programa de Controle de Qualidade de Alimentos, em especial a Rayone, Francisca, André, Diogo, Natanael, Natale pelos cuidados e atenção dispensada;

Aos amigos do Laboratório de Biodiesel da Universidade Federal do Maranhão, em especial Sinara, Cássio, Hilton, Karlene, Natividade, Mauro, Regina, Sérgio, Augusto e Sergiane, pela paciência, e acima de tudo, pela amizade;

Aos meus grandes e preciosos amigos que conquistei em toda essa caminhada, que me ajudaram e acreditaram em mim na concretização desse trabalho: Patrícia, Isabela, Glecyanna, Flavio, Manoel, Alan, Anderson, William, Wendell, Marquinho, Ethiane, Fernanda, Milena, Epifânia, Alex, Schalcher, Valdez e VLAR.

Aos parceiros da UNICAMP.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Nunca deixe que lhe digam que não vale à pena acreditar nos sonhos que se têm ou que os seus planos nunca vão dar certo ou que você nunca vai ser alguém...”

Renato Russo

RESUMO

A espécie vegetal do *Syzygium aromaticum*, conhecida popularmente como Cravo da Índia, é uma árvore de 12 a 15 m de altura, que pertence à família das Mirtaceae. No Brasil, a planta é encontrada em regiões quentes, principalmente na região do baixo sul da Bahia. Seus botões florais contêm um óleo essencial de grande valor econômico no mercado internacional, devido ao elevado teor de eugenol (seu composto majoritário) o qual é largamente usado nas indústrias químicas e farmacêuticas. Neste trabalho, realizou-se a extração do óleo essencial dos botões florais secos do cravo da Índia pelo método da hidrodestilação, utilizando um sistema de Clevenger. Observou-se que o volume máximo de óleo é extraído em um tempo de 4 horas com um rendimento de 3,54 % m/m. Além dos parâmetros físico-químicos como a densidade, índice de refração, solubilidade, cor e aparência; foi possível – pela técnica da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas – identificar com segurança o eugenol como constituinte majoritário do óleo essencial do *Syzygium aromaticum*. Pelo método da normalização foi possível identificar e quantificar os componentes: eugenol (52,53 %), cariofileno (37,25 %), humuleno (4,11 %), acetato de eugenila (4,05 %) e copaeno (2,05 %). Com a aplicação do óleo essencial do cravo e do padrão de eugenol no bioensaio com a toxicidade observou-se um grande potencial tóxico frente às larvas da *Artemia salina*. Avaliou-se ainda a atividade antibacteriana do óleo essencial e do padrão de eugenol sobre as bactérias *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella ssp*, isoladas de alimentos e água. O estudo microbiológico revelou que o óleo essencial do cravo da Índia apresentou uma boa atividade antibacteriana contra as cepas testadas, sendo que o eugenol é o principal responsável por essa eficácia.

Palavras-Chave: Óleo essencial; *Syzygium aromaticum*; Cravo; Eugenol; Toxicidade, Atividade antibacteriana.

ABSTRACT

The vegetable specie *Syzygium aromaticum*, known as clove is a 12 to 15 meters high tree that belongs the Mirtaceae family. In Brazil, the plants are found in warm regions, especially at the lower southern region of the state of Bahia. Their floral bud contains an essential oil of high economical value in the international market, due to the high content of eugenol (its main compound) which is widely used in the chemical and pharmaceutical industries. In this work the extraction of essential oil from dried flower buds of cloves by the hydrodistillation method, using a Clevenger's system. Was observed that the maximum volume of oil is extracted in a time of 4 hours with a 3,54 % m/m yield. Besides the physical-chemical parameters as density, refraction rate, solubility, color and appearance, was possible- the techniques of gas chromatography and mass spectrometry identify – with security the eugenol as majority constituent of the essential oil of *Syzygium aromaticum*. The method of normalization was possible to identify and quantify the components: eugenol (52.53 %), caryophyllene (37.25 %), humulene (4.11 %), eugenol acetate (4.05 %) and copaene (2.05 %). With the application of the essential oil of clove and eugenol in the standard bioassay of toxicity observed a high toxic potential against the larvae of *Artemia salina*. It was also still evaluated the essential oil's antibacterial activity of the essential oil and eugenol standard over the bacteria *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella ssp*, isolated from food and water. The study microbiological showed that the essential oil of cloves presented a good antibacterial activity against the strains tested, being eugenol the main responsible for this efficiency.

Key-words: Essential oils, *Syzygium aromaticum*, Cloves, Eugenol, Toxicity, Antibacterial activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Árvore, botões florais ainda não abertos, botões secos.....	24
Figura 2 – Óleo essencial do cravo da Índia	26
Figura 3 – Fórmula estrutural do eugenol	27
Figura 4 – Estágios de desenvolvimento da <i>Artemia salina</i> : ovos (a); eclosão (b); náuplio (c) e metanáuplio (d).....	31
Figura 5 – <i>Escherichia coli</i>	33
Figura 6 – <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	34
Figura 7 – <i>Salmonella ssp.</i>	35
Figura 8 – Sistema Extrator de Clevenger	39
Figura 9 – Esquema do bioensaio de toxicidade em <i>Artemia salina</i>	45
Figura 10 – Bioensaio com <i>Artemia salina</i>	46
Figura 11 – Cromatograma do óleo essencial do cravo da Índia	51
Figura 12 – Espectro de massa do eugenol.....	52
Figura 13 – Fragmentação do eugenol e formação dos picos característicos	53
Figura 14 – Espectro de massa do Copaeno	53
Figura 15 – Espectro de massa do Cariofileno.....	54
Figura 16 – Espectro de massa do Humuleno	55
Figura 17 – Espectro de massa do acetato de eugenila	55
Figura 18 – Regressão linear do percentual de animais mortos do óleo essencial do cravo da Índia (DL_{50})	57
Figura 19 – Regressão linear do percentual de animais mortos do padrão de eugenol (DL_{50}).....	58
Figura 20 – Comparação da atividade antibacteriana do óleo essencial contra as cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> padrão e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isoladas da água	61
Figura 21 – Comparação da atividade antibacteriana do eugenol contra as cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> padrão e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isoladas da água. ..	61
Figura 22 – Comparação da atividade antibacteriana do óleo essencial contra as cepas de <i>E.coli</i> padrão e <i>E.coli</i> isoladas do alface.....	62

Figura 23 – Comparação da atividade antibacteriana do eugenol contra as cepas <i>E.coli</i> padrão e <i>E.coli</i> isolada do alface.....	63
Figura 24 – Comparação da atividade antibacteriana do óleo contra as cepas <i>Salmonella ssp</i> padrão e <i>Samonella</i> isoladas do sururu.....	63
Figura 25 – Comparação da atividade antibacteriana do eugenol contra as cepas <i>Salmonella ssp</i> padrão e <i>Samonella</i> isoladas do sururu.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros físico-químicos do óleo essencial do <i>Syzygium aromaticum</i> (cravo da Índia)	49
Tabela 2 – Composição química do óleo essencial	52
Tabela 3 – Porcentagem de mortalidade por doses analisadas e valores de DL ₅₀ obtidos no bioensaio com <i>Artemia salina</i> para o óleo essencial do cravo da Índia (<i>Syzygium aromaticum</i>).....	56
Tabela 4 – Porcentagem de mortalidade por doses analisadas e valores de DL ₅₀ obtidos no bioensaio com <i>Artemia salina</i> para o padrão de eugenol.	57
Tabela 5 – Sensibilidade das cepas de <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella spp</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ao óleo essencial do <i>Syzygium aromaticum</i> e do padrão de eugenol, utilizando-se o método de difusão em disco.....	60

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AMDIS – Automated Mass Spectral Deconvolution Mass & Identification System

CG – Cromatografia Gasosa

CG-EM – Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute

DL50 – Dosagem Letal a 50%

EM – Espectrometria de Massas

HC – Colites Hemorrágicas

HUS – Síndrome Urênico Hemolítica

IE – Impacto de elétrons

ISSO – International Organization of Standardization

IV – Infravermelho

LPQA – Laboratório de Pesquisa em Química Analítica

UFMA – Universidade Federal do Maranhão

UV – Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 Plantas Medicinais	18
2.2 Considerações sobre Óleos Essenciais	19
2.2.1 Processos de extração	20
2.2.2 Aplicações dos óleos essenciais	22
2.2.3 Funções biológicas dos óleos essenciais	22
2.2.4 Avaliação da qualidade dos óleos essenciais	23
2.3 Cravo da Índia (<i>Syzygium aromaticum</i>)	24
2.3.1 Eugenol.....	26
2.4 Técnicas Analíticas para Análise de Óleos Essenciais	29
2.4.1 Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM).....	29
2.5 Determinação da Toxicidade Usando a <i>Artemia salina</i>	30
2.6 Testes da Atividade Antibacteriana pelo Método da Difusão em Disco	32
2.7 Considerações Sobre as Bactérias Testadas	33
2.7.1 <i>Escherichia coli</i>	33
2.7.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	34
2.7.3 <i>Salmonella spp.</i>	34
3 OBJETIVOS	37
3.1 Geral	37
3.2 Específicos	37
4 PARTE EXPERIMENTAL	39
4.1 Equipamentos	39
4.1.1 Sistema extrator.....	39
4.1.2 Refratômetro	40
4.1.3 Moinho elétrico	40
4.1.4 Estufa bacteriológica.....	40
4.1.5 Balança analítica	40
4.1.6 Peagâmetro	40
4.2 Soluções e Reagentes	40
4.3 Metodologia Experimental	41
4.3.1 Obtenção do óleo essencial do Cravo da Índia (<i>Syzygium aromaticum</i>).....	41
4.3.1.1 Coleta dos frutos do cravo da Índia.....	41
4.3.1.2. Moagem dos botões florais	41
4.3.1.3. Extração, tratamento e armazenamento do óleo essencial.....	41
4.4 Características Físico-Químicas do Óleo Essencial	42
4.4.1 Densidade.....	42
4.4.2 Solubilidade em etanol (90 %)	42
4.4.3 Índice de refração	43
4.4.4 Cor	43
4.4.5 Aparência.....	43
4.5 Caracterização Química do Óleo Essencial do Cravo da Índia	43
4.5.1 Análise por cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massas (CG-EM)	43

4.6 Determinação pelo Método da Normalização	44
4.7 Bioensaio do Oleo Essencial Frente à <i>Artemia Salina</i>.....	44
4.7.1 Incubação	44
4.7.2 Exposição	45
4.7.3 Contagem	46
4.8 Testes da Atividade Antibacteriana	46
4.8.1. Bactérias testadas	46
4.8.2 Antibiograma.....	47
4.8.3 Preparo do inóculo.....	47
4.8.4 Semeadura das placas	47
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1 Características Físico-Químicas e o Rendimento do Óleo Essencial do Cravo da Índia (<i>Syzygium aromaticum</i>)	49
5.2 Caracterização Química.....	51
5.2.1 Análise por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas .	51
5.3 Bioensaio da Toxicidade Frente à <i>Artemia Salina</i>.....	55
5.4 Susceptibilidade Microbiana	60
6 CONCLUSÃO	66
REFERÊNCIAS.....	69

Capítulo 1

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Os 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 vegetal, como por exemplo na defesa contra microrganismos (LIMA et al., 2006). A composição química depende de vários fatores, tendo como exemplos os climáticos, ação de predadores, idade da planta, etc. (GOBBO NETO & LOPES, 2007). Segundo Bertini e colaboradores (2005) a atividade antibacteriana vai depender do tipo, composição e concentração da espécie ou do óleo essencial, a composição do substrato, o processamento e condições de estocagem e tipo do microrganismo em questão. Eles apresentam ação contra bactérias gram-positivas e gram-negativas (DORMAN & DEANS, 2000; ALVARENGA et al., 2007; USHIMARU et al., 2007) e ainda sobre leveduras (HAMMER; CARSON; RILEY, 1999) e fungos filamentosos (SOUZA et al., 2004; VIEGAS et al., 2005).

O Cravo da Índia (*Syzygium aromaticum*) é da família da *Mirtaceae*, cultivado em alguns países da Ásia, África e na região Ocidental (FERRÃO, 1993). O cravinho 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 que é seu componente majoritário. Nas folhas ele chega a representar aproximadamente 95 % do óleo extraído (RAINA et al., 2001). O eugenol é muito usado na odontologia como componente de seladores e outros produtos antissépticos de higiene bucal, tendo comprovado efeito bactericida (CAI & WU, 1996; CHONG; FORD; KARIYAWASAM, 1997; KAPLAN et al., 1999; SHAPIRO; MEIER; GUGGENHEIM, 1994). Essa aplicação comercial direta tem como consequência vários estudos sobre a obtenção do óleo essencial do cravo-da-índia (CLIFFORD; BASILE; AL-SAIDI, 1999; ROVIO et al., 1999). Além disso, o eugenol tem sido empregado para a produção de outros fenólicos e em estudos tóxicos (PRIEFERT; RABENHORST; STEINBUCHER, 2001).

Esses óleos vêm sendo cada vez mais alvo de muitos estudos como fontes alternativas, mais naturais e menos nocivas ao meio ambiente. A evaporação das essências da superfície das plantas é considerada um mecanismo de defesa

contra as bactérias e fungos além de mecanismo de aproximação de insetos e pássaros polinizadores, garantindo a sua reprodução, principalmente quando se percebe que alguns óleos aromáticos apresentam propriedades anti-sépticas em diversos graus, devido à sua riqueza química em fenóis, aldeídos e alcoóis. O conhecimento da constituição química das plantas aplicado na medicina popular envolve o estudo de interações do organismo com os efeitos das inúmeras classes de compostos e moléculas que podem existir numa única planta. Os testes de toxicidade são elaborados com os objetivos de avaliar ou prever os efeitos tóxicos nos sistemas biológicos e dimensionar a toxicidade relativa das substâncias (FORBES & FORBES, 1994). Muitos ensaios podem ser utilizados, como o ensaio de letalidade com o microcrustáceo *Artemia salina*, que foi desenvolvido para detectar compostos bioativos em extratos, óleos (MEYER et al., 1982).

A *Artemia salina* é uma espécie de microcrustáceo da ordem *Anostraca*, utilizada neste trabalho como bioindicador de toxicidade. Esta espécie é utilizada em testes de citotoxicidade devido à sua capacidade de formar cistos dormentes, fornecendo desse modo material biológico que pode ser armazenado durante longos períodos de tempo sem perda de viabilidade e sem necessidade de se manterem culturas contínuas de organismo-teste. É uma espécie de fácil manipulação em laboratório e baixo custo econômico (CALOW, 1993).

Portanto, este trabalho visa colaborar com os conhecimentos acerca dos óleos essenciais como agente antimicrobiano, servindo como proposta, estudos foram realizados com o óleo essencial dos botões florais secos do Cravo da Índia (*Syzygium aromaticum*) com o propósito de testar sua toxicidade frente à *Artemia salina*, além da sua atividade antibacteriana sobre as cepas de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella ssp.*

Capítulo 2

Revisão da Literatura

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Plantas Medicinais

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a definição de plantas medicinais é tida como “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, compostos que podem ser utilizados com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semi-sintéticos”. No início da década de 1990, a OMS divulgou que 65-80% da população dos países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde (MARTINS, 2010).

As plantas são uma importante fonte de produtos biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em modelos para a síntese de um grande número de fármacos. Simões (2003) relata que pesquisadores da área de produtos naturais mostram-se impressionados pelo fato desses produtos encontrados na natureza revelarem uma gama quase inacreditável de diversidades em termos de estrutura e de propriedades físico-químicas e biológicas.

Essas plantas medicinais devem ser consideradas não apenas matéria-prima, mas ponto de partida para a descoberta de novas moléculas e também como um recurso natural potencialmente ativo na forma de fitoterápico padronizado e eficaz. O desenvolvimento desta área de pesquisa deve-se a vários fatores, dos quais se destaca a participação de um número cada vez maior de profissionais. As investigações científicas envolvem inúmeros elementos, sendo um deles o próprio caráter inter e multidisciplinar que, se por um lado, representa problemas, obstáculos e cuidados, por outro, permite aos pesquisadores obterem conhecimentos mais amplos e ricos que aqueles obtidos em linhas específicas de pesquisa. Um dos assuntos mais fascinantes nessas pesquisas com plantas medicinais é a origem desse conhecimento, as formas e os procedimentos que foram utilizados para descobrir as virtudes terapêuticas de várias espécies vegetais. Seguramente, o método mais utilizado foi o de tentativa e erro, ainda muito comum e útil em diversas áreas do conhecimento científico, o que revela a íntima ligação entre o conhecimento popular e o científico (MONTEIRO, 2004).

2.2 Considerações sobre Óleos Essenciais

De acordo com Mouchrek Filho (2000), o termo “óleo essencial” é empregado para designar líquidos oleosos voláteis, dotados de aroma forte – quase sempre agradável e são extraídos de plantas por algum processo específico, sendo o mais frequente a destilação por arraste de vapor d’água.

A Organização Internacional de Padronização (*International Organization for Standardization - ISO*), na sua Reunião Plenária realizada em março de 1968, em Lisboa, definiu óleos essenciais como sendo óleos voláteis, geralmente odoríferos, que ocorrem em certas plantas ou partes especificadas de plantas e que são obtidos por destilação por arraste a vapor d’água ou por prensagem dos pericarpos de frutos cítricos (limão, laranja, etc). Por outro lado, o Ministério da Saúde, no seu Decreto nº 50040, de 24 de janeiro de 1961, estabeleceu como sendo óleo essencial o produto aromático, sávido, volátil, sob a forma oleosa, extraído de vegetais (MONTEIRO, 2004).

A constituição química dos óleos essenciais é muito complexa chegando a centenas de compostos com funções orgânicas diferentes. A esse respeito Simões e Spitzer (2003) relatam que os constituintes dos óleos variam desde hidrocarbonetos terpênicos, alcoóis simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, éteres, fenóis, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas, até compostos contendo enxofre. Na mistura, tais compostos apresentam-se em diferentes concentrações; normalmente um deles é o composto majoritário, existindo outros em menores teores e alguns em baixíssimas quantidades (traços). Nem todos os óleos essenciais possuem aroma agradável, apesar das suas propriedades terapêuticas (WILLIAMS, 1996).

É interessante notar que os óleos essenciais (óleos vegetais voláteis) diferem-se quimicamente dos óleos vegetais fixos e dos minerais. Os primeiros são misturas de terpenos oxigenados, juntos com outros tipos de compostos orgânicos. Já os óleos vegetais fixos são ésteres da glicerina com ácidos graxos de longas cadeias. Enquanto que os últimos óleos citados são parafinas líquidas misturadas a outros hidrocarbonetos de peso molecular elevado (MONTEIRO, 2004).

A composição química de um óleo essencial extraído de uma mesma espécie vegetal pode variar significativamente, de acordo com, por exemplo, a

época de coleta, condições climáticas, tipo de solo, quimiotipos e ciclo vegetativo. (SIMÕES & SPITZER, 2003). No que se refere aos métodos de extração dos óleos essenciais, os mesmos variam de acordo com a região da planta em que ele se encontra, bem como com a proposta de utilização dos mesmos. Os mais comuns são: enfloração, arraste por vapor d'água, extração com solventes orgânicos, prensagem (ou expressão) e extração por CO₂ supercrítico. Sendo que fatores extrínsecos como a influência do clima e solo dos locais de cultivo podem ocasionar variações nos teores e nas composições químicas dos óleos essenciais (MOUCHREK FILHO, 2000).

Dentre as características físicas apresentadas pelos óleos essenciais está a coloração, os quais são geralmente incolores ou ligeiramente amarelados quando recentemente extraídos; são poucos os óleos que apresentam cor, como o óleo essencial de camomila, de coloração azulada, pelo seu alto teor em azulenos, o sabor geralmente acre (ácido) e picante, a densidade que em geral é inferior a da água (os óleos essenciais de canela e de cravo constituem exceções), índice de refração elevado e a maioria desviam a luz polarizada (opticamente ativos), propriedades estas usadas na sua identificação e controle de qualidade. Na sua maioria, os óleos essenciais não são muito estáveis, principalmente na presença de ar, luz, calor, umidade e metais, são lipossolúveis e solúveis nos solventes orgânicos habituais (MARTINS, 2010).

A pesquisa com plantas aromáticas já é bastante disseminada no mundo todo e tem sido utilizada com os mais variados fins pelo homem, como por exemplo, alguns estudos relacionando seus constituintes majoritários e minoritários, com efeitos combinados ou não, e sua ação sobre os mais variados patógenos (MOUCHREK FILHO, 2000; MATOS; SOUSA; OLIVEIRA, 2004).

2.2.1 Processos de extração

Os métodos de extração dos óleos essenciais variam de acordo com a região da planta em que ele se encontra bem com a proposta de utilização do mesmo. Os mais utilizados são: enfloração (enfleurage), extração com solventes

orgânicos, arraste por vapor d'água, prensagem (ou expressão) e extração por CO₂ supercrítico (SIMÕES & SPITZER, 2003).

A enfloração é um método que já foi bastante utilizado, mas atualmente é empregado apenas por algumas indústrias de perfumes, no caso de algumas plantas com baixo teor de óleo de alto valor comercial. É empregada para extrair óleo essencial de pétalas de flores onde as pétalas são depositadas, a temperatura ambiente, sobre uma camada de gordura, durante certo tempo. Em seguida, estas pétalas esgotadas são substituídas por novas até a saturação total, quando a gordura é tratada com álcool. Para se obter o óleo essencial, o álcool é destilado a baixa temperatura e o produto assim obtido possuem alto valor comercial. Na prensagem os pericarpos de frutos cítricos são prensados e a camada que contém o óleo essencial é, então, separada. Posteriormente, o óleo essencial é separado da emulsão formada com a água por decantação, centrifugação ou destilação fracionada (WILLIANS, 1996).

A extração de óleos essenciais com solventes orgânicos envolve o uso de compostos como o éter, éter de petróleo ou diclorometano que, entretanto, extraem outros compostos lipofílicos, além do óleo essencial. Por isso, os produtos obtidos assim raramente possuem valor comercial (MOUCHREK FILHO, 2000).

A extração por arraste por vapor d'água é um dos métodos mais simples e mais utilizados. Na indústria de óleos essenciais existem três tipos de extrações, distinguidas pela forma como se estabelece o contato entre a amostra e a água, na fase líquida ou de vapor; a primeira é chamada de hidrodestilação, onde a amostra fica imersa na água contida numa caldeira; a segunda de destilação pela água e vapor, onde uma rede colocada na parte inferior de uma caldeira mais alta separa a água da amostra e a terceira de destilação pelo vapor de água, onde a amostra é colocada em uma caldeira e o vapor de água ali injetado provém de um gerador próprio, independente. A indústria utiliza, de preferência, o vapor d'água por ser reduzido o contato com a água, relativamente aos métodos anteriores, é menos acentuada a hidrólise dos ésteres e a polimerização de outros constituintes, em particular dos aldeídos (WILLIANS, 1996).

Pela extração por fluido supercrítico consegue-se recuperar os aromas naturais de vários tipos não somente óleo essencial, de modo bastante eficiente e, atualmente, é um dos métodos de escolha para extração industrial de óleos

essenciais. Nenhum traço de solvente permanece no produto obtido, tornando-o mais puro do que aqueles obtidos por outros métodos. Para tal extração, o CO₂ é primeiramente liquefeito por compressão e, em seguida, aquecido a uma temperatura superior a 31 °C. Nessa temperatura, o CO₂ atinge um quarto estado, no qual sua viscosidade é análoga a de um gás, mas sua capacidade de dissolução é elevada como a de um líquido. Uma vez efetuada a extração, faz-se o CO₂ retornar ao estado gasoso, resultando na sua total eliminação (SIMÕES & SPITZER, 2003).

2.2.2 Aplicações dos óleos essenciais

Os óleos essenciais são largamente usados em muitas indústrias para conferir aromas especiais em inúmeros produtos, tais como perfumes, cosméticos, sabonetes, condimentos etc. São empregados também para mascarar odores desagradáveis em ambientes de trabalho e instalações sanitárias, além de serem usados como insumos em diversos produtos das indústrias de plásticos, tintas, borrachas, inseticidas e outras. Muitos oferecem compostos de partida para sínteses de outras substâncias úteis nas indústrias químicas, farmacêuticas e mais recentemente na conservação de alimentos (SIMÕES & SPITZER, 2003).

2.2.3 Funções biológicas dos óleos essenciais

As substâncias odoríferas em plantas foram consideradas por muito tempo como “desperdício fisiológico”, ou mesmo produtos de desintoxicação (SIMÕES, 1999). Atualmente, considera-se a existência de funções ecológicas, especialmente como inibidoras da germinação, proteção contra predadores, atração de polinizadores, proteção contra perda de água e aumento de temperatura, entre outras (CRAVEIRO et al., 1986).

Existem trabalhos demonstrando que a toxicidade de alguns componentes dos óleos voláteis constitui uma proteção contra predadores e infestantes. Mentol e mentona, por exemplo, são inibidores do crescimento de vários

tipos de larvas. Há evidências de que alguns insetos utilizam óleos voláteis para defenderem-se de seus predadores. Certos himenópteros, por exemplo, seqüestram (sem alteração química) α e β -pineno, entre outros componentes, de *Pinus sylvestris* L. (uma conífera européia) e dessa forma, as larvas desses insetos se defendem de predadores como as formigas (SIMÕES, 1999).

2.2.4 Avaliação da qualidade dos óleos essenciais

Problemas na qualidade de óleos essenciais podem ter origem na variabilidade da sua composição química, na adulteração ou falsificação ou, ainda, na identificação incorreta do produto e sua origem. Os produtores de grande parte dos óleos essenciais comercializados não apresentam a identificação correta da planta da qual o produto foi obtido (nome científico), a partir do vegetal que foi empregado e a procedência do mesmo. A adulteração de óleos essenciais já é conhecida desde os tempos mais antigos. Além da fraude ao consumidor, dependendo do tipo de falsificação, esta pode acarretar conseqüências negativas para a saúde do usuário e, portanto, especial atenção deve ser reservada a esse tipo de problema.

Tipicamente, os óleos essenciais são adulterados por adição de compostos sintéticos, de baixo custo, tais como: álcool benzílico, ésteres do ácido ftálico e até hidrocarbonetos clorados; por mistura do óleo essencial de qualidade com outros de menor valor para aumentar o rendimento; por adição de substâncias sintéticas que são os compostos principais do óleo em questão; falsificação completa do óleo através de misturas de substâncias sintéticas dissolvidas num veículo inerte (SIMÕES & SPITZER, 2003).

Estima-se que aproximadamente 80 % dos óleos essenciais disponíveis no mercado não mais apresentam sua composição original. Sabe-se que existe uma grande variedade de estratégias sofisticadas de falsificações e, dessa forma, torna-se cada vez mais difícil detectá-las. Assim sendo, existem vários métodos que podem ser usados para realizar a avaliação da qualidade, não somente de matérias primas que contêm os óleos essenciais, como também dos próprios óleos. Dentre os métodos, podem se citados: os organolépticos, controle de pureza, análise

qualitativa de seus componentes, análise do teor de óleo volátil em drogas vegetais, métodos cromatográficos, dentre outros (SIMÕES & SPITZER, 2003).

2.3 Cravo da Índia (*Syzygium aromaticum*)

O cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) é da família *Myrtaceae*, é uma árvore de grande porte, chegando a atingir de 12 a 15 m de altura (Figura 1) e o seu ciclo vegetativo alcança mais de cem anos. O seu nome científico antigo era *Eugenia caryophyllata* Thunb, derivada da palavra grega "*karyophyllon*" que significa "folha-noz". A copa é bem verde, de formato piramidal. As folhas são semelhantes às do louro, ovais, opostas e de coloração verde brilhante, com numerosas glândulas de óleo visíveis contra a luz. As flores são pequenas, branco-amareladas, agrupadas em cachos terminais. O fruto é do tipo baga e de formato alongado, suculentos, vermelhos e comestíveis. Aroma forte e penetrante. Os cravos-da-índia (Figura 1) que usamos na culinária e nas análises são na realidade, os botões florais (ainda não abertos) e secos.



Figura 1 – Árvore, botões florais ainda não abertos, botões secos
Fonte: CEPLAC, 2009

Da China é que veio a primeira indicação do uso do cravo-da-índia como condimento, medicamentos e elemento básico para elaboração de perfumes

especiais e incensos aromáticos. Na China, era então conhecida por "*ting hiang*" e na dinastia Han (206 a.C.- 220 d.C.) seus frutos foram levados para a corte do imperador por enviados da Ilha de Java. Conta-se que os próprios javaneses mantinham um pequeno fruto na boca para melhorar o hálito, antes de ir falar pessoalmente com o imperador.

A primeira pessoa a fazer uma descrição completa do cravo-da-índia foi um botânico alemão chamado Everard Rumph que dizia: "*é a mais bela, a mais elegante: e a mais preciosa de todas as árvores*". Na culinária da Idade Média, o cravo-da-índia era usado como aromatizante para conservas e como adorno para pratos selecionados. Na época do reinado de Ricardo II, era ingrediente do *Hippocras*, um vinho quente tomado costumeiramente pelos nobres (JARDIM DAS FLORES, 2009).

No século XVI, quando chegaram às Ilhas Moluccas, os portugueses imediatamente dominaram as plantações, destruindo aquelas que não podiam vigiar de perto. Esse monopólio fez com que o preço do cravo-da-índia no mercado ficasse muito alto. Os holandeses que sucederam aos portugueses agiram da mesma forma e ganharam o monopólio ao destruir todos os craveiros-da-índia, exceto aqueles que cresciam em uma ilha de sua propriedade: Ambon. Finalmente, a França rompeu o monopólio e, no começo do século XIX, a planta já era cultivada em grandes plantações em muitas regiões tropicais. No Brasil, o cravo-da-índia é cultivado em regiões quentes. Praticamente apenas a Bahia produz esta especiaria de forma comercial na Região do Baixo Sul, representada pelos municípios de Valença, Ituberá, Taperoá, Camamu e Nilo Peçanha, sendo estes os principais produtores e mais ao Sudeste o município de Una (CEPLAC, 2009).

De acordo com algumas literaturas, o cravo-da-índia 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. Nas folhas ele chega a representar aproximadamente 95% do óleo extraído (RAINHA et al., 2001) e no cravo também é o principal componente do óleo (Figura 2) , variando de 70 a 85%. 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 do Cravo da Índia confirmam que esses óleos são ricos em eugenol. Os botões florais do Cravo da Índia de boa qualidade chegam a produzir até 15% de óleo essencial

(TAINTER & GRENIS, 1993). As folhas verdes, folhas secas na estufa e folhas secas ao sol apresentaram bons rendimentos de óleos essenciais em torno de 2,26% para as folhas verdes e em torno de 6,57% para folhas secas (REIS, 2006). Outros componentes dessa fração do óleo são acetato de eugenila (15%) e β -cariofileno (5 a 12%), que juntos com eugenol somam 99%. (BROWN & MORRA, 1995, BROWN et al., 1991; ORTIZ, 1992).



Figura 2 – Óleo essencial do cravo da índia

2.3.1 Eugenol

O eugenol (Figura 3), com fórmula molecular $C_{10}H_{12}O_2$ e massa molar $164,2 \text{ g.mol}^{-1}$, apresenta-se como um líquido incolor a amarelo claro (que escurece quando exposto à luz), volátil, baixa solubilidade em água, cheiro forte e aromático de cravo, sabor ardente e picante. Sendo o eugenol o componente majoritário do óleo essencial do cravo da índia, recomenda-se guardar o tal óleo em frasco âmbar e em geladeira por questão visual e pela possível decomposição térmica, além da perda do seu componente majoritário. Ele é muito usado na odontologia como componente de seladores e outros produtos antissépticos de higiene bucal, tendo comprovado efeito bactericida (CAI & WU, 1996; CHONG; FORD; KARIYAWASAM, 1997; KAPLAN et al., 1999; SHAPIRO; MEIER; GUGGENHEIM, 1994). Essa aplicação comercial direta tem como consequência vários estudos sobre a obtenção do óleo essencial do cravo-da-índia, por ter como constituinte majoritário o eugenol

(CLIFFORD; BASILE; AL-SAIDI, 1999; ROVIO et al., 1999). Além disso, o eugenol tem sido empregado para a produção de outros fenólicos, tal como a vanilina importante matéria-prima na aromatização de doces, chocolates e sorvetes (PRIEFERT; RABENHORST; STEINBUCHER, 2001).

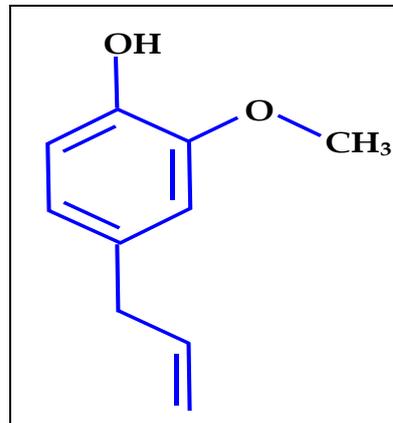


Figura 3 – Fórmula estrutural do eugenol

Pesquisas têm demonstrado que o eugenol ou extratos de cravinho apresentam atividade nematocida (TSAO & YU 2000; WALKER & MELIN, 1996), inseticida (EL-HAG; EL-NADI; ZAITOON, 1999), antiviral (YUKAWA et al., 1996), bactericida (DORMAN & DEANS, 2000; NASCIMENTO et al., 2000, OUATTARA et al., 1997) e fungicida (DELESPAUL et al., 2000). Os efeitos bactericidas e fungicidas do eugenol talvez expliquem porque a pulverização de sementes de cravo com fungicidas não melhora a germinação (MAEDA et al., 1991).

De acordo com estudos, além do *Syzygium aromaticum*, o eugenol é também encontrado em algumas espécies de manjeriço (MAROTTI; PICCAGLIA; GIOVANELLI, 2005), nas espécies de canela do gênero *Cinnamomum* (LIMA et al., 2005), nas espécies de pimenta do gênero *Pimenta dioica* Lindl (MOUCHREK FILHO, 2000) e no louro (*Laurus nobilis*), sendo que é atribuído a esse fenol o aparecimento de doenças, como dermatite, queilites e estomatites, em pessoas que mantêm o contato freqüente com tais plantas ou com o óleo extraído delas (DIÓGENES & MATOS, 1999).

Monteiro (2004), testou a ação antibacteriana do óleo essencial dos frutos da *Pimenta dioica* Lindl que também possui o eugenol como agente majoritário, encontrando significantes resultados sobre cepas de *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Serratia* sp. e *Vibrio alginolyticus*. Ele comparou ainda sua atividade com as

de antibióticos de largo espectro, constatando que (na maioria das vezes) a ação do óleo essencial se mostrou mais eficaz que a dos antibióticos testados. O autor também demonstrou a capacidade do óleo essencial em atrair abelhas euglossina (*Eulaema cingulata*), resultado esse até então possível somente com o padrão de eugenol (SOFIA & SUZUKI, 2004). Já López e colaboradores (1998) estudaram o efeito analgésico e antipirético do extrato da *Pimenta dioica* Lindl em ratos e coelhos “in vivo”, bem como a sua toxicidade. Os resultados mostraram que o extrato apresentou atividade antipirética e analgésica similares ao antiinflamatório ibuprofeno, porém em concentrações bem pequenas. Para os autores, o eugenol encontrado em grandes quantidades nas folhas da planta, que atua inibindo a liberação de prostaglandinas, pode ser o maior responsável por essas atividades, além disso, o ensaio toxicológico permitiu classificar o extrato como não tóxico.

Segundo Ranasinghe e colaboradores (2002) o óleo essencial do cravo-da-índia pode ser usado também como agente fungicida no combate de doenças no cultivo da banana e como alternativa em seu tratamento pós-colheita. Como antioxidante natural, reduz a atividade da peroxidase em vegetais folhosos (PONCE; VALLE; ROURA, 2003). Extratos dessa espécie também apresentam atividades biológicas.

Nascimento et al. (2000) relataram o alto potencial antimicrobiano e atividade bactericida frente a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* testados com o extrato de *S. aromaticum*. Dietas a base de cravo-da-índia podem ter efeitos benéficos para o tratamento da diabete (PRASAD et al., 2005). Testes do óleo essencial de *S. aromaticum* mostram atividade inibitória frente aos fungos *Candida* e *Aspergillus* (PINTO et al., 2009) e frente as bactérias *Vibrio spp.*, *Edwardsiella ssp.*, *Aeromonas spp.*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas ssp.* (LEE et al., 2009). Enfim, o eugenol, principal constituinte químico dos óleos essenciais das espécies *P. dióica* e *S. aromaticum*, exibe comprovadas atividades como antibacteriano, antimicótico antimicrobiano, antiinflamatório, anestésico, anti-séptico, antioxidante, alelopático e repelente (GOBBO NETO & LOPES, 2007).

Os trabalhos aqui apresentados mostram que o extrato e o óleo de uma variedade de plantas possuem importantes propriedades úteis para o homem, entre elas a ação antibacteriana, antiviral, analgésica, anti-séptica, antifúngica do seu óleo (extraído das folhas, talos ou dos frutos) frente a alguns patógenos, considerando

que tais propriedades se devem, principalmente, ao seu componente majoritário, no nosso caso em estudo o eugenol.

2.4 Técnicas Analíticas para Análise de Óleos Essenciais

Durante o desenvolvimento da química, várias técnicas analíticas foram desenvolvidas, desempenhando importantíssimo papel na análise das mais variadas matrizes. Na análise de óleos essenciais estas técnicas auxiliam na verificação de sua qualidade, quantificação de componentes majoritários ou não, e até na separação destes componentes para sua utilização individual. Com o desenvolvimento tecnológico estas técnicas foram se aperfeiçoando cada vez mais, chegando hoje em dia, a equipamentos acoplados a computadores que conseguem sensibilidades em nível de ppt (parte por trilhão) para os mais variados fins. A avaliação quantitativa e qualitativa dos óleos essenciais envolve a utilização de diversas técnicas básicas, que passam desde a dedução de uma estrutura coerente para um dado composto de interesse, até sua quantificação. Dentre as mais utilizadas podemos citar: a Cromatografia Gasosa (CG), Espectroscopia Eletrônica de Ultravioleta (UV), Espectroscopia Vibracional de Infravermelho (IV) e Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM), (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007).

2.4.1 Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM)

Existem no mercado várias empresas que oferecem o conjunto cromatográfico a gás-espectrometria de massas (CG-EM), acoplado por meio de uma interface que aumenta a concentração da amostra no gás de arraste, aproveitando a maior difusibilidade do gás. A velocidade de varredura é grande o suficiente para permitir a obtenção de diversos espectros de massas por pico eluído no cromatógrafo. A conexão direta de colunas capilares de cromatografia gasosa ao espectrômetro de massas sem a interface de enriquecimento permite várias varreduras de massas rápidas em pontos diferentes de um pico cromatográfico, de

modo a testar sua homogeneidade. Desse modo, é possível resolver picos cromatográficos parcialmente superpostos. Assim, a espectrometria de massas acoplada à cromatografia gasosa fornece as fragmentações dos componentes individuais separados (ADAMS, 1995).

Na técnica de Impacto de Elétrons (IE), mais comumente usada em espectrometria de massas, um espectrômetro de massas bombardeia moléculas na fase vapor com um feixe de elétrons de alta energia e registra o resultado do impacto dos elétrons como um espectro de íons separados na base da razão massa/carga (m/z). A maior parte dos íons formados tem carga unitária. Os espectros de massas são obtidos rotineiramente com o uso de um feixe eletrônico de energia de 70 eV. O evento mais simples que pode ocorrer em fase gasosa é a remoção de um único elétron pelo feixe, com formação do íon molecular, um cátion-radical (M^+). O ponto simples representa o elétron desemparelhado. A maior parte dos íons desintegra-se de 10 em 10 s e depois de 10 em 3 s, dando, no caso mais simples, um fragmento carregado positivamente e um radical. Assim, forma-se certo número de fragmentos iônicos que podem ser posteriormente decompostos em fragmentos menores (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007).

Pode-se apresentar o espectro na forma de um gráfico ou uma tabela. O gráfico tem a vantagem de mostrar seqüências de fragmentação que com a prática podem ser facilmente reconhecidas. No espectro de massas por impacto de elétrons, gerado por um computador na forma de um gráfico de barras, a abundância relativa dos picos apresentados como percentagem do pico base (100 %), é lançada contra a razão massa/carga [m/z] (ADAMS, 1995).

2.5 Determinação da Toxicidade Usando a *Artemia salina*

A *Artemia salina* é um invertebrado que, quando na forma de larva, possui de 8 a 10 mm de comprimento, pertence ao filo *Artropoda*, classe *Crustácea*, subclasse *Brachiopoda*, ordem *Anostraca* e família *Artemiidae*. É conhecida como “camarão de salmoura” e internacionalmente como *brine shrimp* e é amplamente usado como alimento para peixes. É de fácil cultivo e pode viver por mais de 4 meses possuindo quatro estágios de desenvolvimento depois dos ovos (Figura 4a)

e da eclosão (Figura 4b) que são: náuplio (Figura 4c), metanáuplio (Figura 4d), pré-adulto e adulto.



Figura 4 – Estágios de desenvolvimento da *Artemia salina*: ovos (a); eclosão (b); náuplio (c) e metanáuplio (d)

Na determinação da toxicidade, há necessidade da realização de ensaios pré-clínicos e clínicos. Os ensaios pré-clínicos são realizados em laboratório através de testes *in vivo* e *in vitro*. Os testes *in vivo* utilizam animais de laboratório, principalmente roedores e mamíferos, como camundongos, ratos, macacos, cães, etc. Os ensaios *in vitro* empregam freqüentemente órgãos isolados, fluidos corpóreos, organismos inferiores e cultura de células e tecidos (BRASIL, 2004).

Os grupos em defesa dos direitos dos animais têm realizado manifestações contra o uso destes em ensaios pré-clínicos, tanto para avaliação farmacológica como de toxicidade. Estes grupos têm estimulado o desenvolvimento de técnicas *in vitro*, que não envolvam o sacrifício de animais. Estes ensaios alternativos vêm contribuindo não só pela questão ética, mais também minimiza os custos dos ensaios *in vivo*. Testes de letalidade com organismos simples vêm sendo

largamente empregados para uma avaliação relativamente rápida e simples, permitindo, dessa forma, um monitoramento da resposta biológica desses produtos. A resposta a esses testes de toxicidade depende da concentração, das propriedades da substância química à qual o organismo é exposto e também ao tempo de exposição destes (RAND; WELLS; McCARTY, 1995).

2.6 Testes da Atividade Antibacteriana pelo Método da Difusão em Disco

Corresponde a um dos métodos mais amplamente utilizados para o ensaio de susceptibilidade bacteriana, devido à simplicidade da realização e interpretação dos resultados, além de ser um método reconhecido e recomendado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* – CLSI. Modificado e padronizado por Bauer e colaboradores em 1966, esse método é baseado nos princípios de difusão inibitória de agentes antimicrobianos em um meio de cultura apropriado contendo o agente patógeno a avaliar.

Nesse teste, pequenos discos de papel de filtro com 6 mm de diâmetro impregnados com o óleo essencial a ser testado são dispostos numa placa de Petri contendo ágar Mueller Hinton solidificado, e sobre o qual encontram-se inoculadas as bactérias a serem testadas, sendo em seguida incubadas por 18 a 24 horas em estufas a 35 °C. Durante esse período, o agente antimicrobiano irá difundir pelo meio e atuará negativamente (ou não) sobre o crescimento do microrganismo, o qual será visualmente identificado pelo aparecimento de uma área em volta do disco contendo o óleo onde as cepas não se desenvolverão, denominada halo de inibição. Quanto maior for o seu diâmetro, mais susceptível é o microrganismo enquanto que a pequena ou nenhuma zona de inibição indica resistência por parte da bactéria (TAVEIRA et al., 2004).

2.7 Considerações Sobre as Bactérias Testadas

2.7.1 *Escherichia coli*

A importância da *E. coli* como patógeno humano tem sido reconhecida desde seu descobrimento, em 1885, pelo Dr. Theodor Escherich. Está relacionada com casos de diarreias, principalmente infantil, colites hemorrágicas (HC), infecções da bexiga, dos rins, infecções de feridas cirúrgicas, septicemia, síndrome urêmico-hemolítica (HUS), pneumonia e com meningite (BELL & KYRIAKIDES, 2000).

Segundo Jay (2005), seis tipos principais de *E. coli*, (Figura 5) são classificados em grupos específicos, os quais são baseados nos fatores de virulência, mecanismos de patogenicidade, síndrome clínica e distintos sorotipos de O:H, sendo eles: *E. coli* enteropatogênica, *E. coli* enterotoxigênicas, *E. coli* enteroinvasiva, *E. coli* difuso aderente, *E. coli* enteroagregativa e *E. coli* enteroemorrágica.

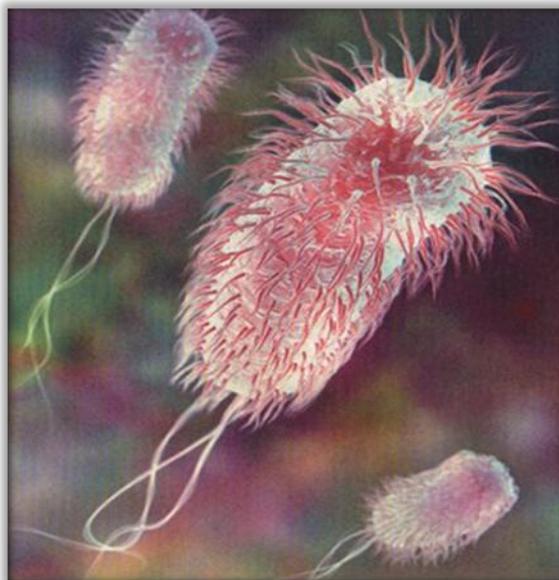


Figura 5 – *Escherichia coli*
Fonte: FOOD SAFETY SMART, 2010

São capazes de se desenvolverem entre 7 e 50 °C, tendo 37 °C como temperatura ideal. Conseguem sobreviver em estado de latência por vários meses em temperaturas de refrigeração; algumas cepas de *E.coli* enteroemorrágica. podem crescer em alimentos ácidos (até pH 4,4) e com mínimo de atividade de água (Aa), de 0,95. São facilmente destruídos sob cozimento a 70°C (WHO, 2005).

2.7.2 *Pseudomonas aeruginosa*

As *Pseudomonas* pertencem a um grande grupo de bastonetes gram-negativos aeróbicos não fermentadores. São resistentes aos antimicrobianos mais comumente utilizados, inclusive as penicilinas e as cefalosporinas (SCHAECHTER et al., 2002)

A espécie *Pseudomonas aeruginosa*, (Figura 6) encontra-se bastante difundida na natureza e recebeu por vários autores a definição de bactérias ubíqua. Apesar de ser considerado um organismo que predominantemente tem a água fresca como habitat ideal (WHO, 2003), é uma bactéria patógena oportunista porque freqüentemente encontra-se envolvida em infecções hospitalares (LOUREIRO et al., 2002).

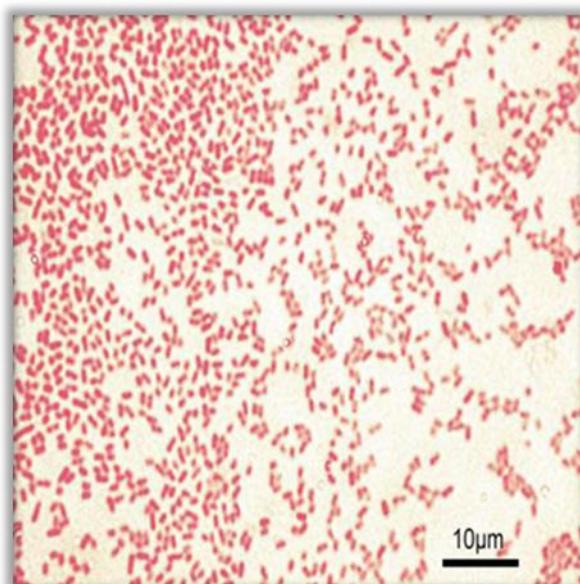


Figura 6 – *Pseudomonas aeruginosa*

Fonte: http://pt.wikipedia.org/wiki/Pseudomonas_aeruginosa

2.7.3 *Salmonella ssp.*

São bactérias Gram-negativas, pertencente à família *Enterobacteriaceae*, em forma de bacilo, na sua maioria móveis (com flagelos peritríquios), não esporulado, não capsulado, sendo que a maioria não fermenta a lactose. As salmonelas são um gênero extremamente heterogêneo, composto por três espécies,

Salmonella subterranea, *Salmonella bongori* e *Salmonella Enterica*, esta última possuindo quase 2000 sorotipos.

A *Salmonella ssp.* (Figura 7) é uma bactéria entérica responsável por graves intoxicações alimentares, sendo um dos principais agentes envolvidos em surtos registrados em vários países (MAIJALA; RANTA; SEUNA, 2005). A sua presença em alimentos é um relevante problema de saúde pública que não deve ser tolerado nos países desenvolvidos, e principalmente nos países em desenvolvimento, porque os sinais e sintomas podem ser mal diagnosticados, sobrecarregando ainda mais todo o sistema de saúde. Devemos ressaltar que a maioria dos sorotipos desse gênero são patogênicas ao homem, apresentando diferenças de sintomatologia em decorrência da variação no mecanismo de patogenicidade, além da idade e da resposta imune do hospedeiro (TRABULSI & ALTERTHUM, 2004).

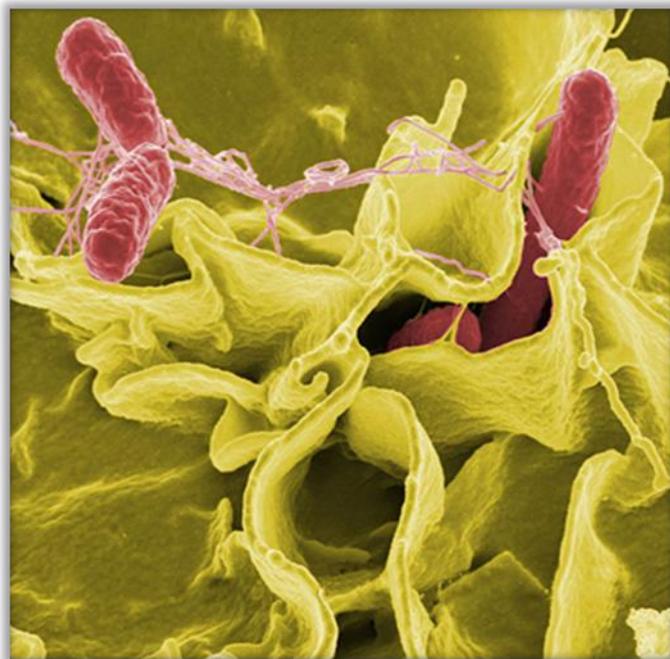


Figura 7 – *Salmonella ssp.*

Fonte: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Salmonella>

Capítulo 3

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Caracterizar analiticamente o óleo essencial extraído do Cravo da Índia (*Syzygium aromaticum*) para testar sua citotoxicidade frente à artemia salina e a sua atividade como agente antibacteriano.

3.2 Específicos

- Extrair quantitativamente o óleo essencial do cravo da Índia;
- Caracterizar físico-quimicamente o óleo essencial do cravo da Índia;
- Identificar analiticamente os componentes do óleo usando a cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massa (CG/EM);
- Quantificar os componentes do óleo essencial pelo método da normalização por Cromatografia Gasosa (CG);
- Avaliar a atividade tóxica do óleo essencial do Cravo da Índia, frente à Artemia salina;
- Testar e comparar a atividade antibacteriana do óleo essencial do Cravo da Índia e do padrão de eugenol pelo método da difusão em disco.

Capítulo 4

Parte Experimental

4 PARTE EXPERIMENTAL

O presente trabalho foi desenvolvido com a utilização de vários equipamentos e contou com a parceria dos seguintes laboratórios e instituições: Laboratório de Pesquisa em Química Analítica (LPQA), Central Analítica, Laboratório de Físico-Química e Microbiologia do Pavilhão Tecnológico da Universidade Federal do Maranhão – UFMA e da Central Analítica da Unicamp-SP.

4.1 Equipamentos

4.1.1 Sistema extrator

Para a extração do óleo essencial do *Syzygium aromaticum*, utilizou-se a hidrodestilação com extrator de Clevenger – empregado para extração de óleo menos denso que a água (SANTOS et al., 2004), acoplado a um balão de fundo redondo, tendo uma manta aquecedora como fonte geradora de calor (Figura 8).



Figura 8 – Sistema Extrator de Clevenger

4.1.2 Refratômetro

Utilizou-se um refratômetro AABE de bancada, modelo 2 WAJ, para as medidas de índice de refração.

4.1.3 Moinho elétrico

As amostras foram trituradas no moinho elétrico de facas (TECNAL, modelo TE-340) do Pavilhão Tecnológico-UFMA.

4.1.4 Estufa bacteriológica

A estufa utilizada para as culturas bacteriológicas foi da marca Fanem, modelo 502.

4.1.5 Balança analítica

Utilizou-se uma balança analítica da METTLER, modelo AE - 240, com precisão de 10^{-4} unidades.

4.1.6 Peagâmetro

As medidas de pH foram efetuadas no peagômetro digital Metrohm, modelo 827, o qual foi calibrado com os tampões monohidrogenoborato de sódio (meio ácido) e biftalato de potássio (meio básico), resultando numa incerteza de 0,046% conforme certificado de calibração (nº E-7362/08) expedido pela DIGIMED.

4.2 Soluções e Reagentes

Todos os reagentes usados foram de pureza analítica. A água utilizada no preparo das soluções e na limpeza dos materiais empregados nas análises

espectroscópicas foi destilada e posteriormente purificada em um sistema NANOPURE (Ultrapure Water System), modelo D4741, já a água utilizada nas análises microbianas era destilada, porém esterilizada.

4.3 Metodologia Experimental

Relaciona-se a seguir todos os procedimentos práticos envolvidos no desenvolvimento do trabalho.

4.3.1 Obtenção do óleo essencial do Cravo da Índia (*Syzygium aromaticum*)

4.3.1.1 Coleta dos frutos do cravo da Índia

Os frutos utilizados neste trabalho foram provenientes do mercado informal do projeto Reviver, no município de São Luís, no período de novembro de 2009. O material foi selecionado e em seguida acondicionado em sacos plásticos devidamente lacrados e guardados em local seco e arejado.

4.3.1.2 Moagem dos botões florais

Os botões secos foram triturados no moinho e o material obtido foi armazenado em frasco de polietileno para posterior extração do óleo essencial.

4.3.1.3 Extração, tratamento e armazenamento do óleo essencial

Para extração do óleo essencial do *Syzygium aromaticum*, utilizou-se o Sistema Extrator de Clevenger acoplado a um balão de fundo redondo de 1000 mL e uma manta elétrica como fonte geradora de calor. Na extração do óleo essencial, pesou-se aproximadamente 69 gramas da biomassa dos botões florais secos do

cravo da Índia e adicionou-se 200 mL de água destilada. Em seguida, ligava-se a manta elétrica e mantinha-se a temperatura de 100° C e após 5 horas, encerrava-se a destilação recolhendo-se o óleo essencial. O óleo era seco por meio de percolação em Na₂SO₄ anidro. Essas etapas foram realizadas em triplicatas e as amostras eram armazenadas em recipientes de vidro sobre refrigeração para evitar possíveis perdas de constituintes voláteis.

O rendimento da extração foi calculado na relação massa/volume e massa/massa, observando o volume obtido no próprio sistema de extração.

4.4 Características Físico-Químicas do Óleo Essencial

Na caracterização dos parâmetros físico-químicos do óleo essencial foram realizadas as análises para densidade, solubilidade em etanol a 90% v/v, índice de refração, cor e aparência.

4.4.1 Densidade

A densidade do óleo essencial foi determinada com o emprego de um picnômetro de 1,0 mL previamente seco, tarado e aferido. Em seguida era cheio com a amostra do óleo essencial a 25 °C e então pesado.

4.4.2 Solubilidade em etanol (90 %)

Para esse teste, foi utilizado balão volumétrico de 10 mL contendo um volume constante do óleo essencial, sobre o qual era adicionado proporcionalmente volume crescente da mistura de álcool/água destilada a 90% (v/v) até a sua completa solubilização.

4.4.3 Índice de refração

A leitura foi feita a 25 °C com o óleo colocado diretamente sobre o prisma de Flint do refratômetro, para o qual era utilizada uma micropipeta.

4.4.4 Cor

A técnica utilizada foi visual, foi avaliado visualmente comparando-se a cor da mistura do óleo essencial com cores conhecidas e sobre um fundo branco, com as cores conhecidas e descritas na literatura especializada.

4.4.5 Aparência

A técnica empregada, também nesse caso, foi à visual na qual se fez uma comparação da essência no que diz respeito à sua transparência ou limpidez por testes sensoriais.

4.5 Caracterização Química do Óleo Essencial do Cravo da Índia

4.5.1 Análise por cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massas (CG-EM)

Para a determinação química do óleo, foi utilizada a análise por meio da cromatografia gasosa contendo uma coluna capilar HP-5MS, 5% difenil, 95% dimetil polisiloxano (30 m x 0,25 mm; 0,25 µm de espessura de filme) com fase estacionária. O cromatógrafo do modelo QP-500 fabricado pela Shimadzu tendo hélio como gás de arraste, com fluxo na coluna de 1 mL min⁻¹.

Para as análises, foram injetadas alíquotas de 0,3 µL da amostra diluída (1,0 mg do óleo em 1000 µL de diclorometano com pureza de 99,9 %), fixando-se as seguintes condições: temperatura do injetor em 280 °C; split de 1:10; programação de temperatura do forno de 40 °C (5,0 min.) a 240°C (com taxa de aquecimento de 4°C/min.) e de 240 a 300°C (com taxa de aquecimento de 8 °C/ min., 7,5 min).

No Espectrômetro de Massas do tipo quadrupolo linear o modo de varredura foi de 0,5 seg/scan, a faixa de varredura variou de 40 a 500 daltons cada uma, a linha de transferência foi de 280°C e o filamento desligado em 0,0 a 4,0 min.

Os constituintes foram identificados por comparação dos resultados obtidos (índices de retenção e espectros de massa) com os dados da espectroteca do aparelho e literatura.

4.6 Determinação pelo Método da Normalização

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.

4.7 Bioensaio do Óleo Essencial Frente à *Artemia Salina*

A metodologia utilizada para os ensaios de toxicidade utilizando *Artemia salina* foi baseada em Meyer et al. (1982) e em Nascimento e Araújo (1999).

4.7.1 Incubação

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 9). 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 a 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.

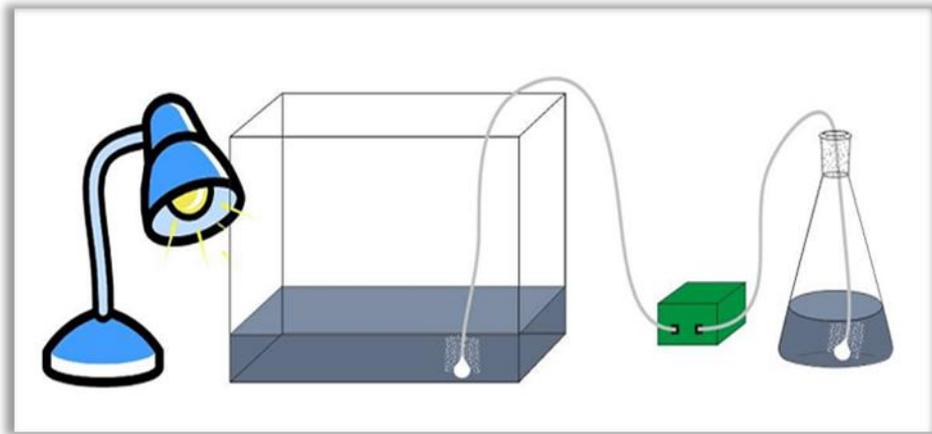


Figura 9 – Esquema do bioensaio de citotoxicidade em *Artemia salina*

4.7.2 Exposição

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 deflagra-se 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 (Figura 10). 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 (CARBALLO et al., 2002).



Figura 10 – Bioensaio com artemia salina

4.7.3 Contagem

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.

4.8 Testes da Atividade Antibacteriana

4.8.1. Bactérias testadas

As cepas de *Escherichia coli*, *Salmonella sp*, *Pseudomonas aeruginosa* utilizadas neste trabalho foram provenientes de alimentos cedidos pelo Laboratório

de Microbiologia do Programa de Controle de Qualidade de Alimentos e Água (PCQA) da Universidade Federal do Maranhão.

4.8.2 Antibiograma

A atividade antibacteriana do óleo essencial e do padrão de eugenol foi avaliada utilizando-se o método de difusão em disco recomendado pela CLSI (2008).

4.8.3 Preparo do inóculo

As culturas bacterianas foram inoculadas em caldo BHI (Brain and Heart Infusion), e, após 24 horas de incubação a 37 °C procedeu-se a diluição até a obtenção de uma suspensão padronizada pelo grau 0,5 da escala de McFarland (10^8 microrganismos $m.L^{-1}$).

4.8.4 Semeadura das placas

O inóculo de 0,1 mL de cada cultura bacteriana foi semeado com swab estéril na superfície das placas contendo Agar Mueller Hinton solidificado, e sobre a mesma foram aderidos, com auxílio de uma pinça previamente flambada, pequenos discos de papel de filtro com 6 mm de diâmetro impregnados, individualmente, com 75 μ L do óleo essencial e com o padrão de eugenol, sendo pressionados levemente sobre a superfície do meio.

As placas foram então incubadas a 37°C por 24 horas, e a leitura dos halos de inibição foi feita com a utilização de uma régua milimetrada, certificada pelo INMETRO.

Capítulo 5

Resultados e Discussão

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Características Físico-Químicas e o Rendimento do Óleo Essencial do Cravo da Índia (*Syzygium aromaticum*)

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 (2000) a cinética de extração do óleo essencial é um dos principais parâmetros físico-químico da indústria de essências, pois além de estar diretamente relacionada com a qualidade do óleo essencial, se reflete no tempo de extração e na natureza econômica do processo, além de ser peculiar a cada tipo de essências a ser extraída.

Uma destilação rápida pode conduzir a um produto contendo, predominantemente, constituintes mais voláteis, mas, destituídos das melhores características; ao contrário, uma destilação prolongada encarece o produto e também pode sobrecarregá-lo de compostos de aroma menos importantes (COSTA, 1994).

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

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 ^o)	1,526
Cor	Transparente
Aparência	Límpido
Odor	Característico
Rendimento (%)	3,54

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.

Reis (2006) 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 (ALDRICH, 2001). 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 $0,973 \text{ g.mL}^{-1}$, rendimento m/m foi calculado em 3,54 %.

Segundo Ozcan e Chalchat (2002) o rendimento do óleo essencial de diferentes variedades de plantas é dependente da variação sazonal e da localidade. Sendo assim, de acordo com Reis (2006) 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.

5.2 Caracterização Química

5.2.1 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 11, seguindo a ordem de eluição.

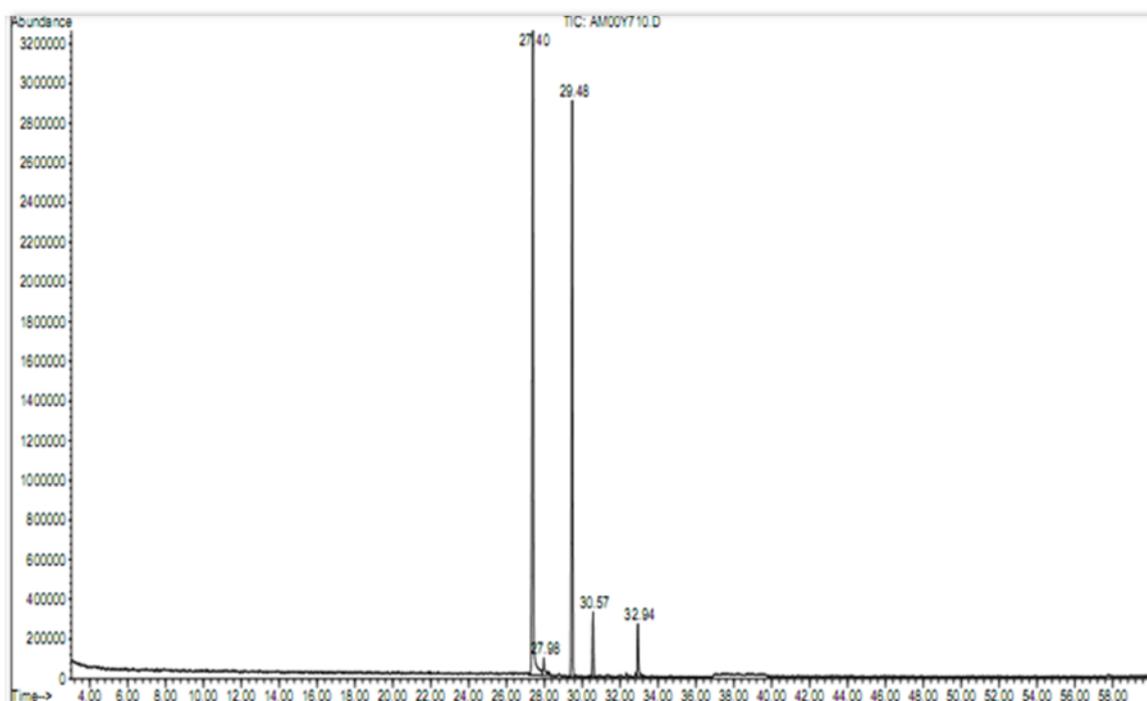


Figura 11 – Cromatograma do óleo essencial do cravo da Índia

Na Figura 11 apresentam cinco picos cromatográficos, sendo que o pico cromatográfico 1 é o Eugenol, cujo tempo de retenção foi 27,40 min; o pico cromatográfico 2 é o Copaeno, com tempo de retenção 27,99 min; o pico cromatográfico 3 é o Cariofileno, o qual apresentou o tempo de retenção 29,47 min; o pico cromatográfico 4 é o Humuleno, cujo tempo de retenção foi 30,57 min; o pico cromatográfico 5 é o Acetato de Eugenila, com tempo de retenção 32,94 min.

A Tabela 2 mostra a identificação de cada pico apresentados na Figura 11, 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

A seguir serão discutidos os cinco picos cromatográficos da Tabela 2 que se apresentaram com seus respectivos teores.

Segundo a literatura (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007), fenóis apresentam um pico intenso correspondente ao íon molecular, o que facilita sua identificação. Observando-se a Figura 12, nota-se um pico intenso com m/z 164 [M^+], que é correspondente à fórmula $C_{10}H_{12}O_2$, confirmando a presença majoritária do eugenol no óleo essencial do *Syzygium aromaticum*.

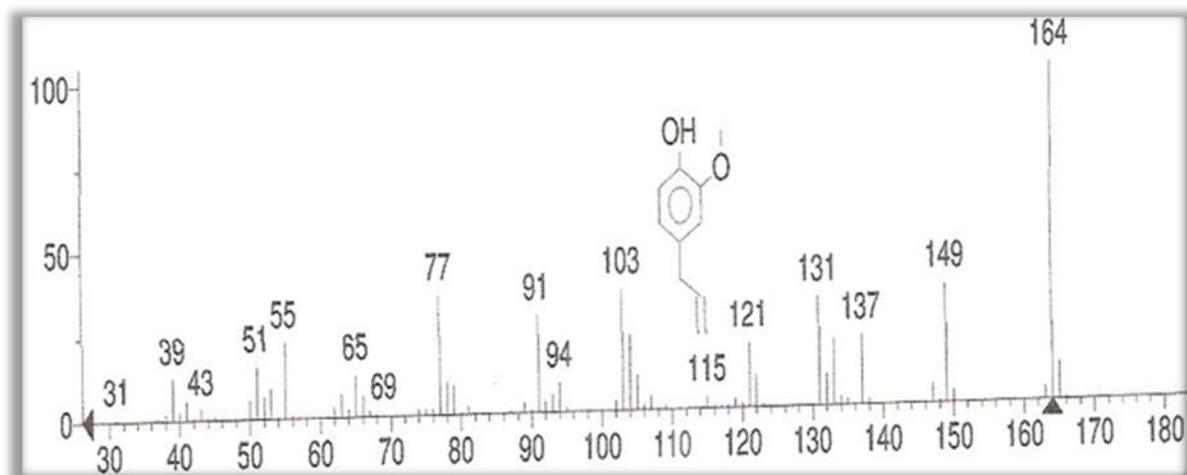


Figura 12 – Espectro de massa do eugenol

Os espectros mostraram ainda picos típicos da quebra de fenóis e éteres aromáticos, sendo que o pico m/z 149 [$M - 15$] é característico da perda do radical metila e os picos m/z 77 e m/z 65 são correspondentes, respectivamente, aos íons [$C_6H_5^+$] e [$C_5H_5^+$] originados por rearranjo — com a saída do grupo CO; já o

fragmento com pico em m/z 133 [M-31] é referente à perda do grupo OCH_3 do éter (CORTEZ et al., 1998; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007). A Figura 13 ilustra o mecanismo de fragmentação dos principais picos característicos formados pelo eugenol (CORTEZ et al., 1998).

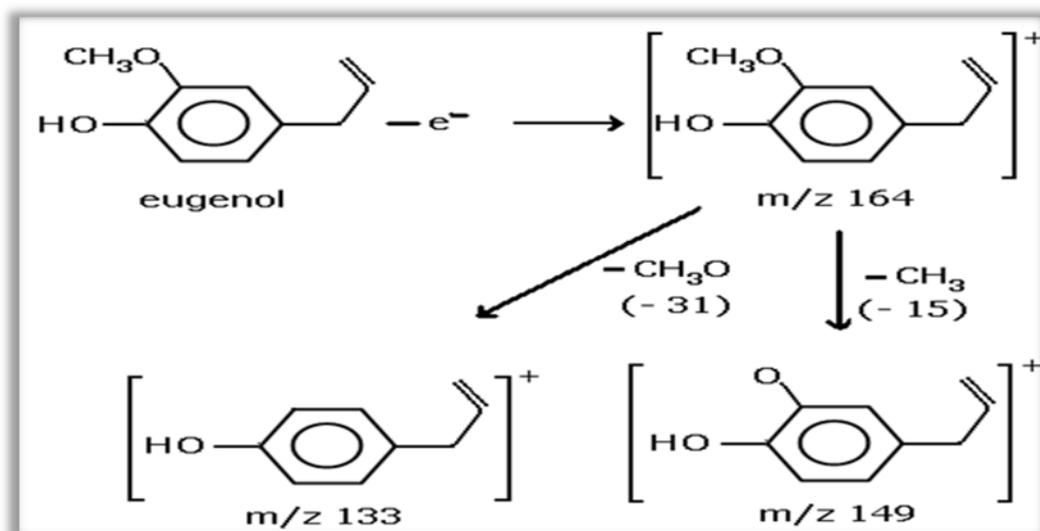


Figura 13 – Fragmentação do eugenol e formação dos picos característicos

O pico 2 do cromatograma ilustrado na Figura 11, foi identificado como sendo o Copaeno de fórmula $\text{C}_{15}\text{H}_{24}$ e massa molecular $204 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Esse hidrocarboneto sesquiterpeno (Figura 14), apresenta o pico do íon molecular m/z 204 e o pico base em m/z 161[M-43], o qual é referente ao íon C_3H_7^+ com o pico de fragmentação m/z 119[M-42] que é referente à C_3H_6^+ . Geralmente picos intensos em hidrocarbonetos aromáticos com m/z 105 se da pela presença de íons C_8H_9^+ , segundo a literatura (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007).

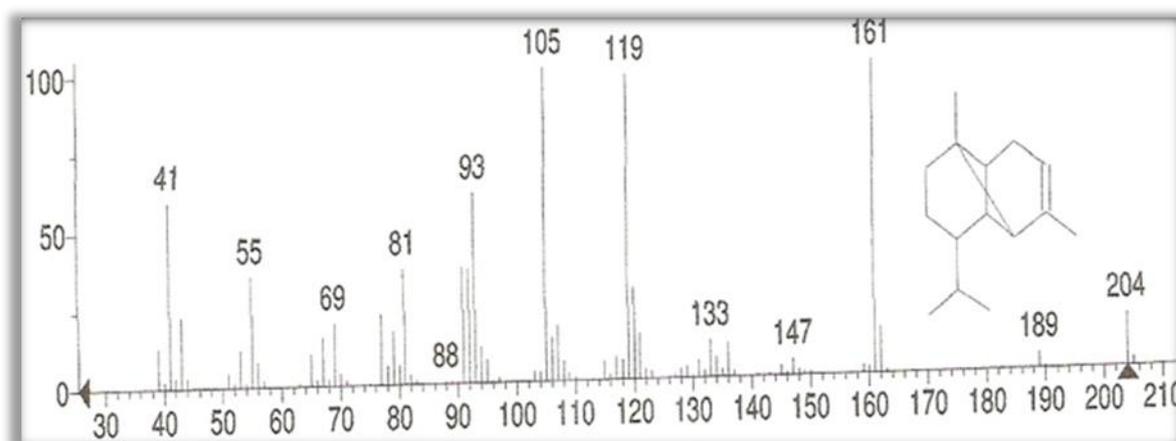


Figura 14 – Espectro de massa do Copaeno

O pico 3 do cromatograma da Figura 11, corresponde ao Cariofileno, de fórmula $C_{15}H_{24}$ com massa molecular correspondente a 204 g mol^{-1} , evidenciado pela presença do íon molecular m/z 204 ilustrado no espectro de massa na Figura 15. O referido espectro de massa mostra ainda picos característicos de alquilaromáticos: o pico base intenso m/z 93 é resultante do íon C_7H_9 que indica um anel benzênico com cadeia lateral alquila podendo sofrer ramificações no carbono e o seu substituinte maior pode ser eliminado mais rapidamente. Com o pico m/z 69, geralmente em hidrocarbonetos aromáticos é evidenciado pela presença do íon $C_5H_9^+$. E o pico m/z 41 $[M-28]$ é relacionado ao fragmento C_2H_4 .

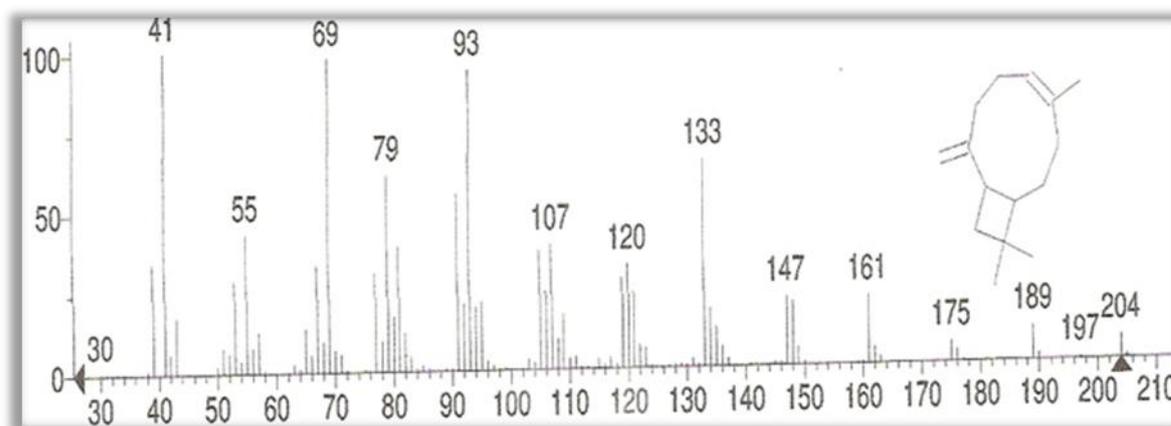


Figura 15 – Espectro de massa do Cariofileno

No cromatograma da Figura 11, o pico 4 foi identificado como sendo o Humuleno de fórmula $C_{15}H_{24}$ e massa molecular correspondente a 204 g mol^{-1} (Figura 16). Esse hidrocarboneto apresenta o pico do íon molecular m/z 204 e o pico característico em m/z 93. O pico em m/z 41 é atribuído ao fragmento $C_3H_5^+$ formado durante a clivagem da ligação carbono-carbono, acompanhado de perda de hidrogênio (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007).

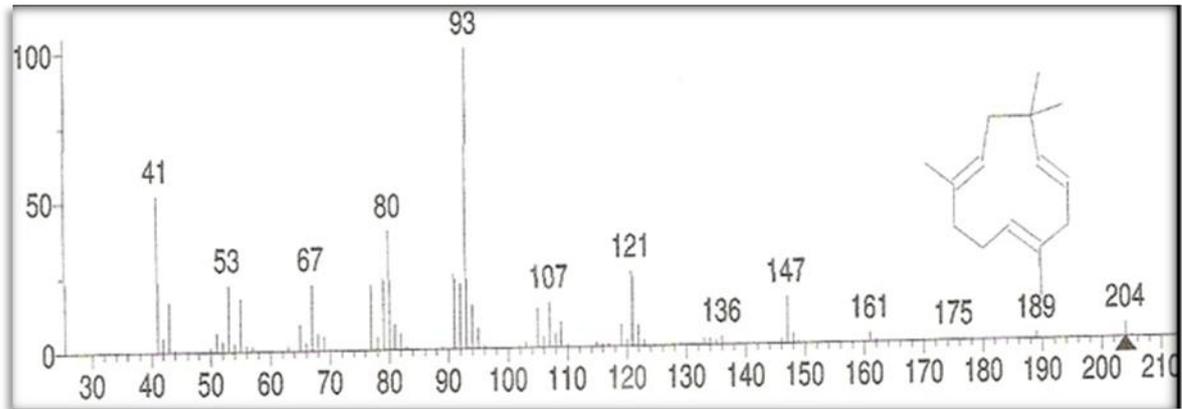


Figura 16 – Espectro de massa do Humuleno

O pico 5 do cromatograma da Figura 11 trata-se do Acetato de eugenila, $C_{12}H_{14}O_3$, confirmado pela presença do íon molecular m/z 206 no espectro de massa da Figura 17. A fácil clivagem da estrutura alifática em fenóis substituídos origina um pico mais intenso que o pico do íon molecular, o qual foi observado em m/z 164 [M-42] que é referente à fragmentação do grupo C_2H_2O . O pico m/z 149 [M-15] é referente à perda do grupo metila e a do pico m/z 131 [M-18] é resultante da perda da molécula de água (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007).

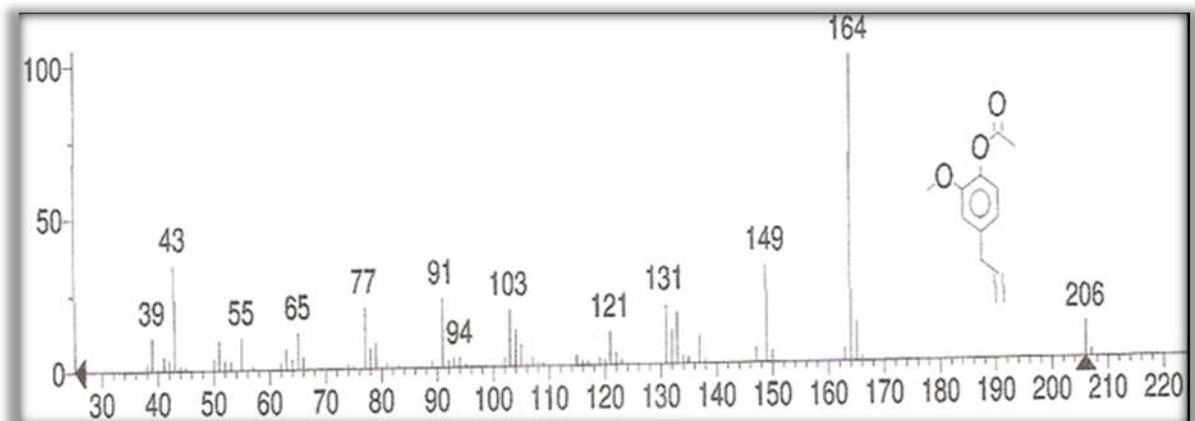


Figura 17 – Espectro de massa do acetato de eugenila

5.3 Bioensaio da Toxicidade 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 (MEYER et al., 1982). 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 (BAROSA, 2003).

O critério de classificação do óleo do *Syzygium aromaticum* (cravo da índia) frente *Artemia salina* com base nos valores das DL₅₀ foi estabelecido por (DOLABELA, 1997), sendo definido como DL₅₀ ≤ 80 µg/mL, o produto é altamente tóxico; DL₅₀ entre 80 a 250 µg/mL, o produto é moderadamente tóxico e DL₅₀ ≥ 250 µg/mL, o produto é levemente tóxico ou atóxico (MEYER et al., 1982) utilizam o critério de avaliação em que considera a amostra tóxica ou ativa as que apresentarem DL₅₀ < 1000 µg/mL e amostras atóxicas ou inativas as que apresentarem DL₅₀ > 1000 µg/mL (Cálculos de DL₅₀).

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, antiviral, antimicrobiana, inseticida e tripanossomicida (MEYER et al., 1982; MACRAE; HUDSON; TORRES, 1988; McLAUGHLIN, 1991; SAHPAZ, 1994; ALVES et al., 2000; OJALA, 1999). Na Tabela 3 e Figura 18 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 DL₅₀ 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 % (DL₅₀) 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 µg/mL, considerado altamente tóxico de acordo com (DOLABELLA, 1997).

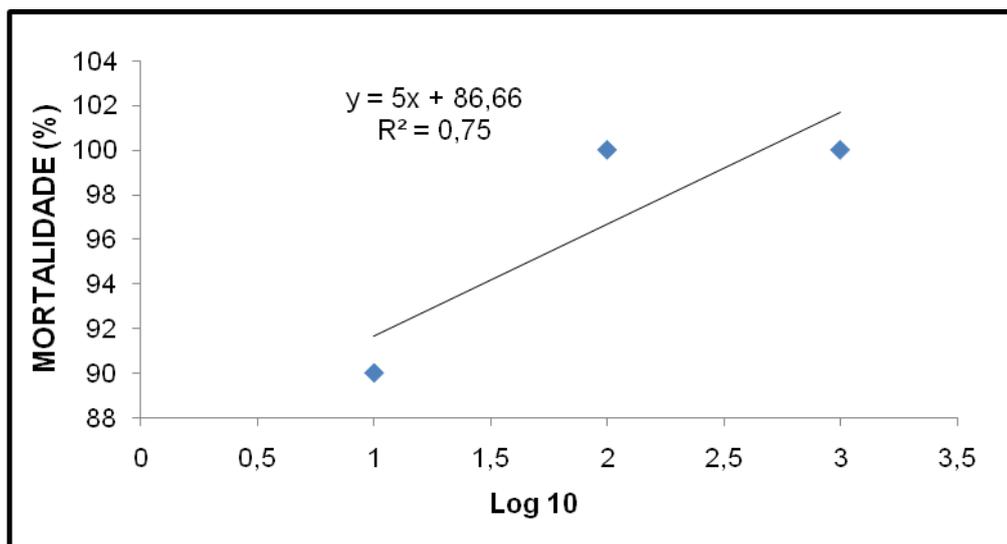


Figura 18 – Regressão linear do percentual de animais mortos do óleo essencial do cravo da Índia (DL_{50})

Na Tabela 4 e Figura 19 estão expostos os valores encontrados para o bioensaio frente à *Artemia salina* com o componente majoritário do óleo, o eugenol.

Tabela 4 – Porcentagem de mortalidade por doses analisadas e valores de DL_{50} 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 dose letal a 50 % (DL_{50}) do padrão de eugenol a partir do teste de toxicidade (a atividade larvívora frente à *Artemia salina*, avaliando o grau de letalidade pelo produto) foi igual a 18,53 $\mu\text{g}/\text{mL}$, considerado altamente tóxico, ou seja ativo, de acordo com (DOLABELLA, 1997).

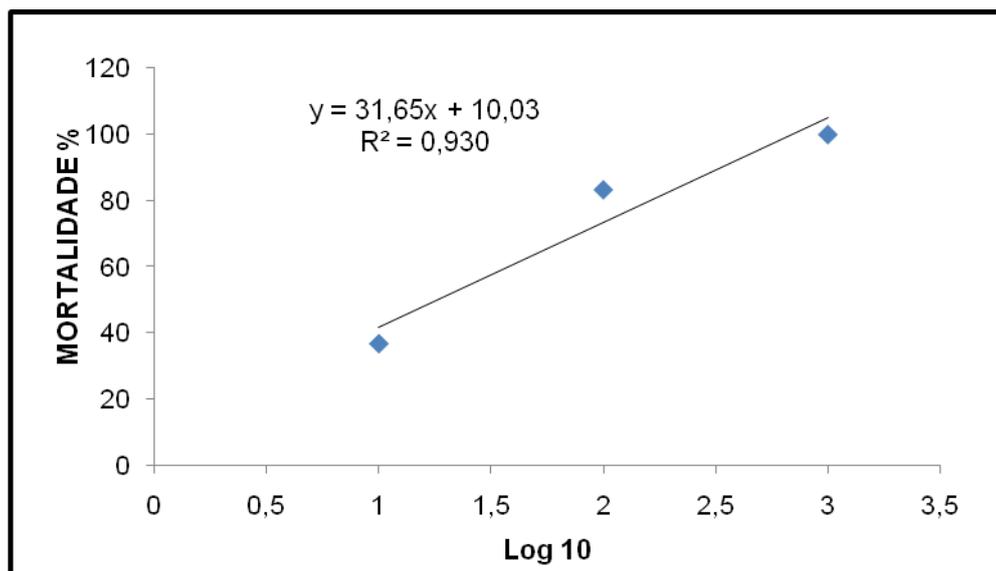


Figura 19 – Regressão linear do percentual de animais mortos do padrão de eugenol (DL_{50})

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 toxicidade. 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.

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, ele isolado do óleo essencial de *Cordia verbenacea*, mostrou atividade antiinflamatória em diferentes modelos experimentais utilizando ratos (FERNANDES et al., 2007). Esta atividade do cariofileno também foi demonstrada no estudo da espécie *Bupleurum frutescens*, 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. frutescens* (MARTIN et al., 1993). 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 (CHO et al., 2000).

Tambe et al. (1996) relatam 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 (YANG et al., 1999). 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 (ZHENG; KENNEY; LAM, 1992).

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 (McLAUGHLIN, 1991; SIQUEIRA et al., 1998).

Segundo Mclaughlin (1991), 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.

5.4 Susceptibilidade Microbiana

A atividade antibacteriana do óleo essencial do *Syzygium aromaticum* (cravo da Índia) pelo método da difusão em disco em relação às cepas de *Escherichia coli*, *Salmonella spp* e *Pseudomonas aeruginosa*, estão apresentadas na Tabela 5. Para efeito de comparação, foram realizados ainda testes de susceptibilidade de tais bactérias ao seu padrão de eugenol.

Tabela 5 – Sensibilidade das cepas de *Escherichia coli*, *Salmonella spp* e *Pseudomonas aeruginosa* ao óleo essencial do *Syzygium aromaticum* e do padrão de eugenol, utilizando-se o método de difusão em disco

Componentes	E.coli (mm)		Salmonella spp (mm)		Pseudomonas aeruginosa (mm)	
	Padrão	Alface	Padrão	Sururu	Padrão	Água
Óleo Essencial	16	16	15	18	12	-
Eugenol	19	16	15	18	12	12

Os resultados mostraram que as cepas de *Escherichia coli* e *Salmonella* isoladas de alimentos foram sensíveis à ação do óleo essencial do Cravo da Índia com halos de inibição de 16 e 18 mm, respectivamente.

As cepas de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de água, no entanto, não apresentaram atividade frente ao óleo essencial, como mostra a Figura 20.

O resultado positivo tanto do óleo do cravo da Índia como do padrão eugenol para as cepas testadas, corroboram com os estudos realizados por Novacosk e Torres (2006), quando verificaram que de cinco óleos essenciais extraídos de plantas medicinais, os que apresentaram maior atividade antimicrobiana eram aqueles que possuíam elevados teores de álcoois, fenóis e aldeídos, bem como com àqueles obtidos por Asolini et al. (2006) que observaram atividade antimicrobiana de todos os compostos fenólicos extraídos de dez plantas usadas como chás.

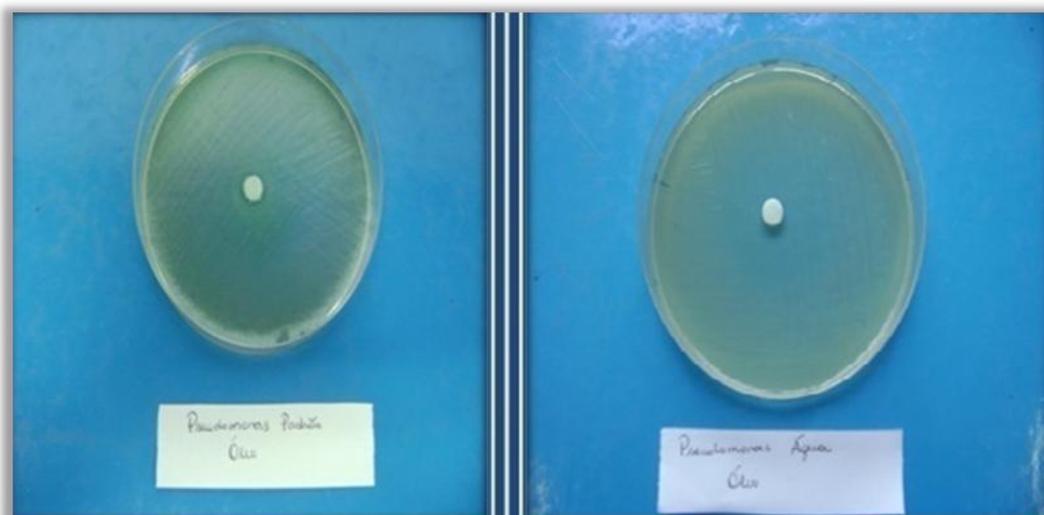


Figura 20 – Comparação da atividade antibacteriana do óleo essencial contra as cepas de *Pseudomonas aeruginosa* padrão e *Pseudomonas aeruginosa* isoladas da água.



Figura 21 – Comparação da atividade antibacteriana do eugenol contra as cepas de *Pseudomonas aeruginosa* padrão e *Pseudomonas aeruginosa* isoladas da água.

Segundo Alzoreky e Nakahara (2003), halos com valores menores que 12 mm não são indicativos de atividade antibacteriana. No entanto, com relação a diferentes óleos essenciais que apresentam o eugenol como componente majoritário, é quase um consenso entre os autores classificar sua eficiência como agente antibacteriano quando apresentar um halo com diâmetro mínimo entre 8 e 10 mm para testes feitos pelo método da difusão em disco (CIMANGA et al., 2002; FARAGO et al., 2004; MOREIRA et al., 2005). Por outro lado, como a zona de inibição de crescimento no teste de difusão é bastante influenciada pela velocidade

de difusão das substâncias no ágar, o qual apresenta natureza hidrófila, e sendo o óleo essencial viscoso e de baixa polaridade, o que dificultaria a sua difusão nesse meio, então qualquer valor do halo obtido, por menor que seja, dá suporte para classificar tal óleo como um agente de atividade antibacteriana (FONSECA et al., 2006; GLISIC et al., 2007).

O estudo da atividade antibacteriana do óleo essencial do Cravo da Índia e do padrão de eugenol frente às cepas *Escherichia coli* padrão e a cepa isolada do alface resultou em halos de inibição considerados sensíveis, Figuras 22 e 23 para inibição do crescimento antibacteriano. Segundo Matan et al. (2006), os compostos ativos presentes em óleos ricos em presença de eugenol e outros aldeídos possuem uma boa capacidade de interferir com síntese de algumas enzimas nas bactérias, além de provocarem danos à estrutura da parede bacteriana. Também se verificou que os óleos essenciais de outros compostos ricos em eugenol como o óleo da canela não apresentaram diferenças significativas quando comparado ao potencial inibidor sobre linhagens de *E. coli*. Desta forma, embora não tenha sido feita análise fotoquímica dos óleos estudados possivelmente a presença de compostos ativos e tendo o eugenol como um dos componentes majoritários, foi decisivo para a maior atividade antibacteriana dos óleos.

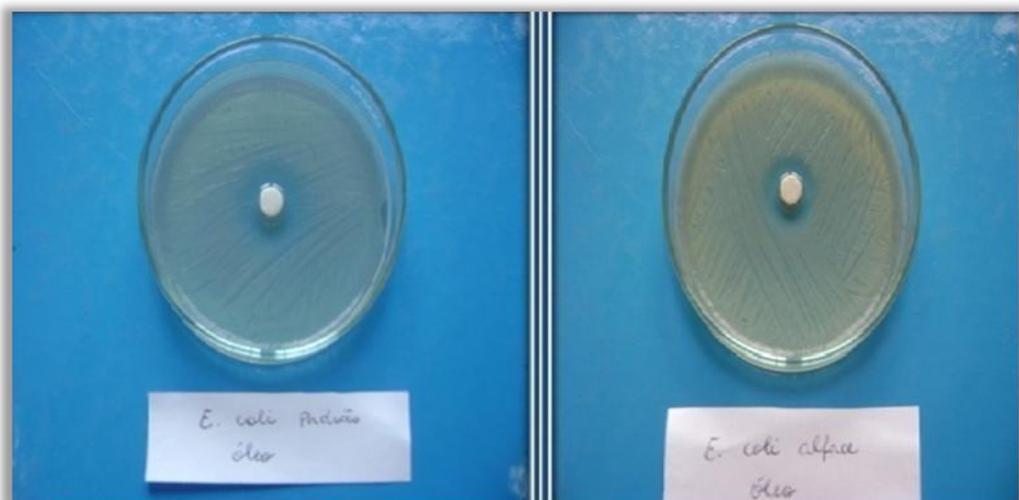


Figura 22 – Comparação da atividade antibacteriana do óleo essencial contra as cepas de *E.coli* padrão e *E.coli* isoladas do alface.



Figura 23 – Comparação da atividade antibacteriana do eugenol contra as cepas *E.coli* padrão e *E.coli* isolada do alface.

O óleo essencial do *Syzygium aromaticum* e o seu padrão de eugenol apresentou ainda atividade antimicrobiana contra as cepas gram-negativas *Salmonella ssp* e *Salmonella* isoladas do sururu (Figura 24 e 25), onde resultou em halos de inibição iguais tanto para o óleo quanto para o eugenol que foi de 15 mm, respectivamente, sendo que para ambos quando testados com a *Salmonella* isoladas de alimentos (sururu), obteve-se uma inibição superior aos halos obtidos com o padrão das cepas, tendo um valor de 18 mm.

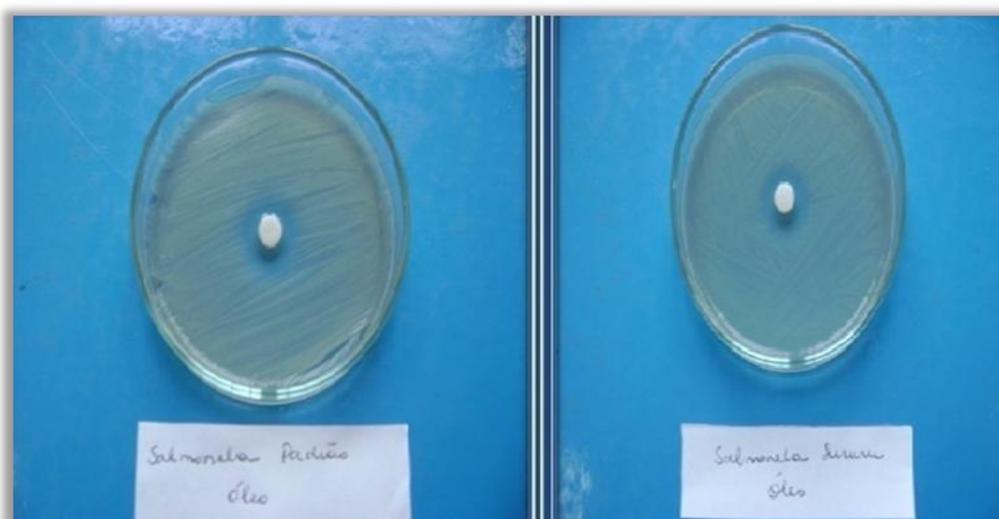


Figura 24 – Comparação da atividade antibacteriana do óleo contra as cepas *Salmonella ssp* padrão e *Samonella* isoladas do sururu.

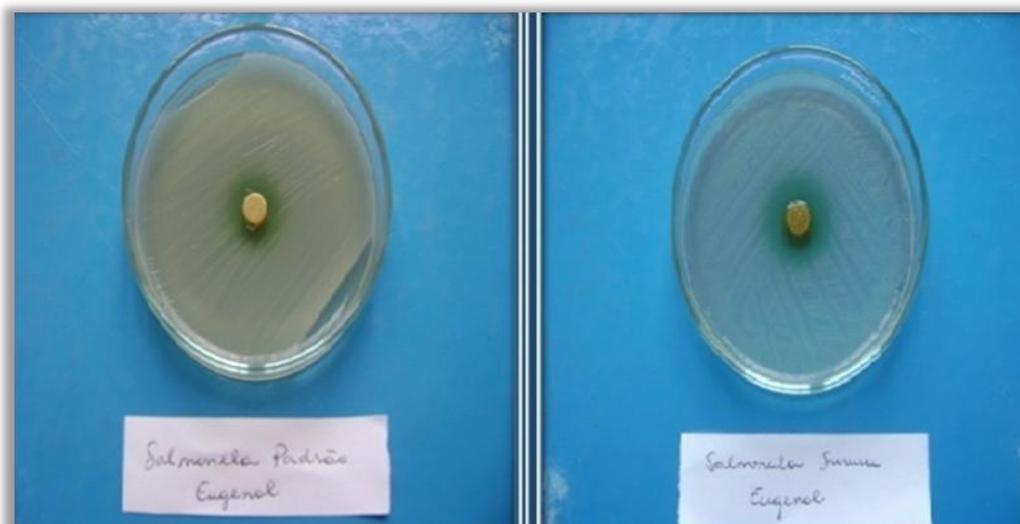


Figura 25 – Comparação da atividade antibacteriana do eugenol contra as cepas *Salmonella ssp* padrão e *Samonella* isoladas do sururu.

Para Cimanga e colaboradores (2002), óleos essenciais que resultem em halos de inibição de crescimento abaixo de 10 mm, são classificados como inativos, ativos se resultarem em halos entre 10 e 15 mm e muito ativo para valores acima de 15 mm. Dessa forma, pode-se observar que o óleo essencial dos botões florais secos do *Syzygium aromaticum* apresentou atividade antibacteriana de excelente nível para duas das três cepas testadas (*Escherichia coli* e *Salmonella ssp*), para os quais o halo de inibição foi igual ou acima de 15 mm. Para as cepas de *Pseudomonas aeruginosa* o óleo apresentou halo de 12 mm, sendo assim, classificado como moderadamente ativo.

Ainda não se sabe ao certo qual o mecanismo de ação dos óleos essenciais frente às bactérias. Algumas pesquisas, no entanto, apontam como sendo a membrana celular o primeiro ponto de ataque dos óleos essenciais e isso se deve às suas características físicas intrínsecas: apresentam componentes lipófilos e voláteis (STAMMATI et al., 1999). Para Burt (2004), essa ação conjunta dos componentes do óleo, denominado sinergismo, é que o torna eficaz como agente antibacteriano. Tal efeito justifica a atividade do óleo essencial frente às bactérias testadas e esse ganho de eficiência é atribuído aos demais componentes do óleo.

Capítulo 6

Conclusão

6 CONCLUSÃO

A caracterização química, citotóxica e a sua avaliação da atividade antibactericida do óleo essencial extraído do Cravo da Índia (*Syzygium aromaticum*) levaram a concluir o que se segue:

- 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;
- Os parâmetros físico-químicos do óleo essencial do Cravo da Índia (*Syzygium aromaticum*) apresentaram resultados satisfatórios, no que se diz respeito à avaliação da qualidade do óleo extraído;
- 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 e comparando com seus padrões e seus fragmentos de massas nas mesmas condições de análises);
- Usando a técnica de Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas, identificou-se o eugenol, copaeno, cariofileno, humuleno e acetato de eugenila como principais componentes do óleo essencial dos botões do *Syzygium aromaticum* (cravo da Índia), onde o eugenol é o componente majoritário;
- O bioensaio demonstrou que o óleo essencial do cravo da Índia e o seu componente majoritário o eugenol apresentaram alta toxicidade frente às larvas de *Artemia salina*, o que pode demonstrar ser um poderoso agente antitumoral assim como um medicamento, dependendo da dosagem;
- O óleo essencial do *Syzygium aromaticum* (cravo da Índia), frente às cepas isoladas de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella ssp*, apresentou atividade antibacteriana de excelente nível para duas das três bactérias testadas (*Escherichia coli* e *Salmonella ssp*) e moderadamente ativa para *Pseudomonas aeruginosa*, logo sugere-se que esse condimento poderia oferecer

CONCLUSÃO

uma alternativa natural e de baixo custo na conservação de alguns alimentos, bem como no combate a certas enfermidades.

Capítulo 7

Referências

REFERÊNCIAS

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy**. Illinois: Allured, 1995. p. 118.

ALDRICH. **Handbook of fine chemicals and laboratory equipment**. Brasil. 2001. p. 804.

ALVARENGA, A. L. et al. Atividade antimicrobiana de extratos vegetais sobre bactérias patogênicas humanas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 9, n. 4, p. 86-91, 2007.

ALZOREKY, N. S.; NAKAHARA, K. Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. **Inter. J. Food Microbiology**, v. 80, n. 3, p. 223, 2003.

ASOLINI, F. C. et al. Atividade antioxidante e antibacteriana dos compostos fenólicos dos extratos de plantas usadas como chás. **Braz. J. Food Technol.**, v. 9, n. 3, p. 209, 2006.

BAROSA, J. **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. Disponível em: <<http://siweb.ualg.pt>> Acesso em: 30 jan. 2010.

BELL, C.; KYRIAKIDES, A. **Escherichia coli una aproximacion práctica al microorganismo y su control en los alimentos**. Zaragoza-España: Acribia, 2000. 243 p.

BERTINI, L. M. et al. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. **Revista Infarma**, v. 17, n. 314, p. 80-83, 2005.

BROWN, P. D. et al. Allelochemicals produced during glucosinolate degradation in soil. **Journal of Chemical Ecology**, n. 17, p. 2021-2034, 1991.

BROWN, P. D.; MORRA, M. J. Glucosinolate-containing plant tissues as bioherbicides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 43, p. 3070-3074, 1995.

REFERÊNCIAS

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. **Int. J. Food Microb.**, v. 94,n. 3, p. 223, 2004.

CAI, L. N.; WU, C. D. Compounds from *Syzygium aromaticum* possessing growth inhibitory activity against oral pathogens. **Journal of Natural Products**, v. 59, p. 987-990, 1996.

CALOW, P. **Marine and estuarine invertebrate toxicity tests**. In: HOFFMAN, D. et al. Handbook in cytotoxicology. Oxford: Blackwell Scientific Publication, 1993. v. 1. p. 1-5.

CARBALLO, J. L. et al. Acomparison between two brine shrimp assays to detect in vitro citotoxicity in marine natural products. **BMC Biotechnology**, v. 2, p. 17, 2002.

CEPLAC. Disponível em: <<http://www.ceplac.gov.br/radar/cravo.htm>> Acesso em: 15 dez. 2009.

CHO, D. Q. et al. The antifungal activity of essential oils as determined by different screening methods. **Journal of Essential Oil Research**, v. 12, p. 256-266, 2000.

CHONG, B. S., FORD, T. R. P.; KARIYAWASAM, S. P. Short-term tissue response to potential root-end filling materials in infected root canals. **International Endodontic Journal**, v. 30, p. 240-249, 1997.

CIMANGA, K. et al. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. **J. Ethno-pharmacology**, v. 79, n. 2, p. 213, 2002.

CLIFFORD, A. A.; BASILE, A.; AL-SAIDI, S. H. R. A. Comparison of the extraction of clove buds with supercritical carbon dioxide and superheated water. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, 1999.

CLSI – CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Normas de desempenho para testes de sensibilidade antimicrobiana**. 15º suplemento informativo. ANVISA, 2008. Disponível em: <<http://www.ANVISA.com.br>> Acesso em: 11 nov. 2009.

CORTEZ, D. A. G. et al. Análise do óleo essencial da alfavaca *Ocimum gratissimum* L. (LABIATAE). **Arq. Ciênc. Saúde**, v. 2, n. 2, p. 125, 1998.

COSTA, A. F. **Farmacognosia I, II e III Volumes**. Ed. Calouste Gulbenkiansboa, 1994.

CRAVEIRO, A. A. et al. **Óleos essenciais de plantas do Nordeste**. Fortaleza: EUFC, 1986. 210 p.

DADALIOGLU, I.; EVRENDILEK, G. A. Chemical Compositions and Antibacterial Effects of Essential Oils of Turkish Oregano (*Origanum minutiflorum*), Bay Laurel (*Laurus nobilis*), Spanish Lavender (*Lavandula stoechas L.*), and Fennel (*Foeniculum vulgare*) on Common Foodborne Pathogens. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, p. 8255-8260, 2004.

DIÓGENES, M. J. N.; MATOS, F. J. A. Dermatite de contato por plantas (DCP). **An. Bras. Dermatol.**, v. 74, n. 6, p. 629, 1999.

DOLABELLA, M. E. **Triagem in vitro para a atividade antitumoral e anti-*T. cruzi* de extratos vegetais, produtos naturais e sintéticos**. Belo Horizonte: UFMG, 1997. 128 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1997.

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

EL-HAG, E. A., EL-NADI, A. H.; ZAITOON, A. A. Toxic and growth retarding effects of three plant extracts on *Culex pipiens* larvae (*Diptera: Culicidae*). **Phytotherapy Research**, v. 13, p. 388-392, 1999.

FARAGO, P. V. et al. Atividade antibacteriana de óleos essenciais de *Ocimum selloi benth.* (*lamiaceae*). **Cien. Biol. Saúde**, v. 10, p. 59, 2004.

FERNANDES, E. S. et al. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. **European Journal of Pharmacology**, v. 569, p. 228–236, 2007.

FERRÃO, J. E. M. **Especiarias: cultura, tecnologia, comércio**. Instituto de Investigação Tropical: Lisboa, 1993. p. 413.

REFERÊNCIAS

FONSECA, E. N. et al. Análise química e atividade antimicrobiana do óleo essencial dos frutos de *Vitex cymosa* Bertero. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v.8, n.4, p. 87, 2006.

FOOD SAFETY SMART. **An introduction to E. coli part 1**. Disponível em: <<http://foodsafetysmart.com>> Acesso em: 20 mai. 2010.

FORBES, V. E.; FORBES, T. L. **Ecotoxicology in theory and practice**. Londres: Chapman and Hall, 1994. 247 p.

GLISIC, S. B. et al. Antimicrobial activity of the essential oil and different fractions of *Juniperus communis* L. and a comparison with some commercial antibiotics. **J. Serb. Chem. Soc**, v. 72, n. 4, p. 311, 2007.

GOBBO NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-81, 2007.

HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, n. 6, p. 985-90, 1999.

JARDIM DAS FLORES. Disponível em: <<http://www.jardimdeflores.com.br>> Acesso em: 12 dez. 2009.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 712 p.

KAPLAN, A. E. et al. Antimicrobial effect of six endodontic sealers: an in vitro evaluation. **Endodontics and Dental Traumatology**, v. 15, p. 42-45, 1999.

LIMA, I. O. et al. Atividade antifúngica e óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 16, n. 2, p.197-201, 2006.

LIMA, M. P. et al. Constituintes voláteis das folhas e dos galhos de *Cinnamomum zeylanicum* Blume (*Lauraceae*). **Acta Amaz.**, v. 35, n. 3, p. 363, 2005.

LÓPEZ, A. B.; CAPÓ, J. T.; GONZÁLEZ, Y. C. Actividad analgésica y antipirética de un extracto fluido de *Pimenta dioica* L. y evaluación de su toxicidad aguda oral. **Rev. Cubana Farm.**, v. 32, n. 3, p.198, 1998.

REFERÊNCIAS

LOUREIRO, M. M. et al. *Pseudomonas aeruginosa*: study of antibiotic resistance and molecular typing in hospital infection cases in a neonatal intensive care unit from Rio de Janeiro city, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 3, p. 387, 2002.

MACRAE, W. D.; HUDSON, J. B.; TORRES, G. H. Studies on the pharmacological activity of Amazonian Euphorbiaceae. **J. of Ethnopharmacology**, v. 22, p.143-172, 1988.

MAEDA, J. A. et al. Germination of clove seeds - effect of temperature, fruit pulp and fungicide treatment. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 26, p. 893-899, 1991.

MAIJALA, R.; RANTA, J.; SEUNA, E. The efficiency of the Finnish *Salmonella* Control Programme. **Food Control**, v. 16, n. 8, p. 669-675, 2005.

MAROTTI, M.; PICCAGLIA, R.; GIOVANELLI, E. Differences in Essential Oil Composition of Basil (*Ocimum basilicum* L.) Italian Cultivars Related to Morphological Characteristics. **J. Agric. Food Chem.**, v. 44, p. 3926, 2005.

MARTIN, S. et al. Anti-inflammatory activity of the essential oil of *Bupleurum frutescens*. **Planta Medica**, v. 59, p. 533-536, 1993.

MATAN, N. et al. Antimicrobial activity of cinnamon and clove oils under modified atmosphere conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 107, n. 2, p.180-185, 2006.

MATOS, F. J. A.; SOUSA, M. P.; OLIVEIRA, M. E. **Constituintes químicos ativos e propriedades biológicas de plantas medicinais brasileiras**. 2 ed. Fortaleza: Editora UFC, 2004.

McLAUGHLIN, J. L. **Crown-gall tumours in potato discs and brine shrimp lethality: two simple bioassays for higher plant screening and fractionation**. In: HOSTETTMANNK (Ed). *Methods in plant biochemistry*. London: Academic Press, v. 6, p. 1-31, 1991.

MEYER, B. N. et al. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Médica**, v. 45, n. 1, p. 31-34, 1982.

MONTEIRO, O. S. **Estudo analítico do eugenol contido no óleo essencial extraído dos frutos da espécie *Pimenta dioica* Lindl e sua aplicação como**

agente bactericida. São Luís: UFMA, 2004 Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Química Analítica, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2004.

MOREIRA, M. R. et al. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. **LWT**, v. 38, p. 565, 2005.

MOUCHREK FILHO, V. E. **Estudos analíticos e modificações químicas por metilação e acetilação do eugenol contido no óleo essencial extraído das folhas da espécie *Pimenta dioica* Lindl.** São Carlos: USP, 2000. 124 p. Tese (Doutorado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2000.

NASCIMENTO, G. G. F. et al. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 247-256, 2000.

NASCIMENTO, I. A.; ARAÚJO, M. M. S. Testes ecotoxicológicos marinhos: análise de sensibilidade. **Ecotoxicology and Environmental Restoration**, v. 2, n. 1, p. 41-47, 1999.

NOVACOSK, R.; TORRES, R. S. L. A. Atividade antimicrobiana sinérgica entre óleos essenciais de lavanda (*Lavandula officinalis*), melaleuca (*Melaleuca alternifolia*), cedro (*Juniperus virginiana*), tomilho (*Thymus vulgaris*) e cravo (*Eugenia caryophyllata*). **Rev. Analytica**, v. 21, 2006.

OJALA, T. A bioassay using *Artemia salina* for detecting phototoxicity of plant coumarins. **Planta Medica**, v. 65, p. 715-718, 1999.

ORTIZ, E. L. **The Encyclopedia of Herbs, Spices, and Flavourings.** London: Dorling Kindersley Publishers, 1992.

OUATTARA, B. et al. Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. **International Journal of Food Microbiology**, v. 37, p. 155-162, 1997.

PINTO, E. et al. Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* (*Eugenia caryophyllus*) on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. **J. Med. Microbiol.**, v.58, p.1454-1462, 2009.

REFERÊNCIAS

PONCE, A. G.; VALLE, C. E.; ROURA, S. I. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss Chard. **Lebensm Wiss Technol.**, v. 37, p. 679-784, 2003.

PRASA, D. R. C. et al. An extract of *Syzygium aromaticum* represses genes encoding hepatic gluconeogenic enzymes. **J. Ethnopharmacol.**, v. 9, p. 295-301, 2005.

PRIEFERT, H., RABENHORST, J.; STEINBUCHER, A. Biotechnological production of vanillin. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 56, p. 296-314, 2001.

RAINA, V. K. et al. **Essential oil composition of *Syzygium aromaticum* leaf from Little**, 2001.

RANASINGHE, L.; JAYAWARDENA, B.; ABEYWICKRAMA, K. Fungicidal activity of essential oils of *Cinnamomum zeylanicum* (L.) and *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. pathogens isolated from banana. **Lett Appl. Microbiol.**, v. 35, p. 208-211, 2002.

RAND, G. M.; WELLS, P. G.; McCARTY, L. S. **Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate, and risk assessment**. 2 ed. cap. 1. Washington: Taylor & Francis, 1995.

REIS, T. V. **Potencialidade das folhas do Craveiro-da-Índia cultivados no Sul da Bahia para extração de óleos essenciais**. In: XLVI Congresso Brasileiro de Química, Associação Brasileira de Química, Salvador, 25 a 29 de setembro de 2006.

ROVIO, S. et al. Extraction of clove using pressurized hot water. **Flavour Fragrance Journal**, v.14, p. 399-404, 1999.

SAHPAZ, S. Cytotoxic and antiparasitic activity from *Annona senegalensis* seeds. **Planta médica**, v. 60, p. 538, 1994.

SCHAECHTER, M. et al. **Microbiologia. *Pseudomonas aeruginosa*: um patógeno ubíquo**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-KOOGAN, 2002.

SHAPIRO, S., MEIER, A.; GUGGENHEIM, B. The antimicrobial activity of essential oils and essential oil components towards oral bacteria. **Oral Microbiology Immunology**, v. 9, p. 202-208, 1994.

REFERÊNCIAS

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7 ed. Rio de Janeiro: LTC, 490 p, 2007.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. **Óleos voláteis**. In: SIMÕES, C. M. et al. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, cap. 18, p.467-495, 2003.

SIMÕES, M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre, Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC, 1999.

SOFIA, S. H.; SUZUKI, K. M. Comunidades de abelhas Euglossina (*Hymenoptera: Apidae*) em fragmentos florestais no sul do Brasil. **Neotropical Entomology**, v. 33, n.6, p.693, 2004.

SOUZA, S. M. C. et al. Avaliação de óleos essenciais de condimentos sobre o desenvolvimento micelial de fungos associados a produtos de panificação. **Ciência Agrotécnica**, v. 28, n. 3, p. 685-90, 2004.

STAMMATI, A. L. et al. Toxicity of selected plant volatiles in microbial and mammalian short-term assays. **Food chem. Toxicol.**, v. 37, p. 813, 1999.

TAINTER, D. P.; GRENIS, A. T. **Especies y aromatizantes alimentarios**. Zaragoza: Acribia S.A., 1993.

TAMBE, Y. et al. Gastric cytoprotection of the non-steroidal anti-inflammatory sesquiterpene, β -caryophyllene. **Planta Medica**, v. 62, p. 469-470, 1996.

TAVEIRA, N. et al. **Manual prático de microbiologia**. Caparica, Lisboa: Instituto Superior de Ciências da Saúde-Sul, Cap. 5, p. 49, 2004.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, L. F. **Microbiologia**. São Paulo: Atheneu, 2004.

TSAO, R.; YU, Q. Nematicidal activity of monoterpenoid compounds against economically important nematodes in agriculture. **Journal of Essential Oil Research**, v. 12, p. 350-354, 2000.

USHIMARU, P. I. et al. Antibacterial activity of medicinal plants. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 4, p. 717-9, 2007.

VIEGAS, E. C. et al. Toxicidade de óleos essenciais de alho e casca de canela contra fungos do grupo *Aspergillus flavus*. **Revista Horticultura Brasileira**, v. 23, n. 4, p. 915-9, 2005.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Microbial aspects**. In: Guidelines for drinking water, Geneva: WHO, p. 130-188, 2003.

WHO. maio 2005. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs125/en/>>. Acesso em: 02 nov. 2009.

WIKIPEDIA. **Escherichia coli**. Disponível em: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Escherichia_coli> Acesso em: 11 abr. 2010.

WIKIPEDIA. **Salmonella**. Disponível em: <<http://pt.wikipedia.org/wiki/Salmonella>> Acesso em: 11 abr. 2010.

WIKIPEDIA. **Pseudomonas aeruginosa**. Disponível em: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Pseudomonas_aeruginosa> Acesso em: 11 abr. 2010.

WILLIAMS, D. G. **The chemistry of essential oils**. England: Micelle Press, 1996. 334 p.

YANG, D. et al. Use of caryophyllene oxide as an antifungal agent in an in vitro experimental model of onychomycosis. **Mycopathologia**, v. 148, p. 79-82, 1999.

YUKAWA, T. A. et al. Prophylactic treatment of cytomegalovirus infection with traditional herbs. **Antiviral Research**, v. 32, p. 63-70, 1996.

ZHENG, G.; KENNEY, P. M.; LAM, L. K. T. Sesquiterpenes from clove (*Eugenia caryophyllata*) as potential anticarcinogenic agents. **Journal of Natural Products**, v. 55, p. 999-1003, 1992.