



ARTIGO

Atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato aquoso e do óleo essencial do alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) e do cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus* L.) frente a cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*

Caroline de Castro Guimarães¹, Tatiane Caroline Ferreira¹, Roselene Canato Felipe de Oliveira¹,
Patrícia Ucelli Simioni^{1,2*} e Leila Aidar Ugrinovich¹

Recebido: 16 de novembro de 2016 Recebido após revisão: 30 de março de 2017 Aceito: 5 de abril de 2017
Disponível on-line em <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/3877>

RESUMO: (Atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato aquoso e do óleo essencial do alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) e do cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus* L.) frente a cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*). *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* apresentam fatores de virulência que lhes permitem grande capacidade de adaptação, culminando no crescente aumento de sua resistência antimicrobiana, o que é agravado pelo uso indiscriminado e incorreto dos antibióticos. Portanto, torna-se essencial a busca por novos compostos para uma terapia antimicrobiana eficaz, sendo as plantas medicinais possíveis alternativas para esta finalidade. Este trabalho avaliou a atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato aquoso e do óleo essencial das espécies *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim) e *Caryophyllus aromaticus* L. (cravo da índia) frente a linhagens padrão de *S. aureus* e *E. coli*. Os dados obtidos permitem concluir que o óleo essencial de cravo da índia apresentou atividade antimicrobiana para ambas as estirpes analisadas, quando utilizadas metodologias de difusão em disco e difusão em poços, nas diferentes concentrações avaliadas. O óleo essencial de alecrim apresentou atividade inibitória de crescimento sobre a linhagem de *E. coli* em todas as metodologias empregadas. Porém, só apresentou atividade sobre *S. aureus* pelo método de difusão em poços. Por outro lado, os extratos de ambas as plantas não inibiram o crescimento das cepas bacterianas. Foi possível concluir que os óleos de alecrim e cravo apresentaram atividade antimicrobiana *in vitro*, ao passo que os extratos aquosos não apresentaram atividade inibitória de crescimento bacteriano. Na literatura consultada, não foram encontrados outros estudos que relatam os efeitos do extrato aquoso de cravo da índia sobre linhagens bacterianas.

Palavras-chave: resistência bacteriana; antimicrobianos; extrato de plantas; testes de suscetibilidade; plantas medicinais.

ABSTRACT: (*In vitro* antimicrobial activity of the aqueous extract and essential oil of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and clove (*Caryophyllus aromaticus* L.) against strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*). *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* have virulence factors that provide them with high adaptability, culminating in their ever-increasing antimicrobial resistance, which in turn is worsened by the indiscriminate and incorrect use of antibiotics. Therefore, the search for new compounds to be used in an effective antimicrobial therapy is essential, and in that context medicinal plants are promising alternatives for such purpose. We evaluated the *in vitro* antimicrobial activity of the aqueous extract and essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. (rosemary) and *Caryophyllus aromaticus* L. (clove) against standard strains of *S. aureus* and *E. coli*. Clove essential oil has antimicrobial activity against both analyzed strains, when analyzed by both disc diffusion and well diffusion methods, at the evaluated concentrations. Rosemary essential oil showed growth-inhibitory activity on the *E. coli* strain by all methods used, but it showed activity against *S. aureus* only by the well diffusion method. On the other hand, extracts of neither plants inhibited growth of the bacterial strains. We concluded that both clove and rosemary essential oils have *in vitro* antimicrobial activity, whereas their aqueous extracts show no growth-inhibitory activity. To our knowledge, this is the first report of the effects of clove aqueous extract on bacterial strains.

Keywords: Bacterial resistance, antimicrobials, plant extract, susceptibility assays, medicinal plants.

INTRODUÇÃO

As doenças infecciosas são a segunda maior causa de mortalidade mundial. Esta problemática, atrelada às altas taxas de resistência dos microrganismos, especialmente em ambientes hospitalares, justifica a urgência no desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos (Guimaraes *et al.* 2010). As doenças infecciosas são consideradas como grave problema de saúde coletiva, em virtude do impacto que geram à sociedade. São provocadas por microrganismos patogênicos que

invadem o organismo do hospedeiro, evitam suas defesas e provocam danos aos tecidos (Guido *et al.* 2010). As infecções bacterianas podem ser ocasionadas por diversas espécies, sendo que os principais patógenos encontrados em infecções comunitárias e nosocomiais são *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (Rodrigues & Barroso 2011).

S. aureus, embora presente na microbiota normal do organismo humano é considerada uma das bactérias patogênicas mais importantes, pois pode causar uma

1. Faculdade de Americana (FAM). Rua Joaquim Boer 733, Jardim Luciene, CEP 13477-360, Americana, SP, Brasil.

2. Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes, Instituto de Biologia (IB), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). CP 6109, CEP13083-970, Campinas, SP, Brasil.

*Autor para contato: E-mail: patsimio@unicamp.br

variedade de infecções, desde superficiais até disseminadas, com alta gravidade. Esse patógeno apresenta fatores de virulência que conferem a ele características peculiares, como os componentes de superfície celular, toxinas, capacidade de produção de biofilme, entre outros, que permitem uma considerável capacidade de adaptação e resistência deste microrganismo (Costa *et al.* 2011, Vuong *et al.* 2016). *E. coli* é o patógeno que mais frequentemente causa infecções do trato urinário (ITU). Este microrganismo apresenta fatores de virulência relacionados a infecções severas invasivas, além de possibilitar crescente resistência aos antimicrobianos (Costa *et al.* 2011, Narciso *et al.* 2010).

Os antimicrobianos são drogas com capacidade de interferir em distintas atividades da célula bacteriana, eliminando ou inibindo o crescimento do microrganismo (Frieri *et al.* 2016). Atualmente, a procura por produtos naturais derivados de plantas como alternativa para a utilização em terapias tem aumentado consideravelmente (Figueredo *et al.* 2014, Gonçalves *et al.* 2013, Silva *et al.* 2008). A partir dessa busca, a fitoterapia é a medicina alternativa que mais tem se disseminado na sociedade moderna (Santos *et al.* 2011). O Brasil é o país que apresenta a maior biodiversidade do planeta, possuindo cerca de 60.000 espécies vegetais catalogadas. A ampla biodiversidade brasileira está atrelada a longa aceitação de uso de plantas medicinais, visto que, atualmente, cerca de 50% dos medicamentos utilizados são originados, direta ou indiretamente, de produtos naturais, principalmente de plantas medicinais que são muito importantes como fonte para se obter medicamentos (Silva *et al.* 2010).

A espécie *Rosmarinus officinalis* L., conhecida popularmente como alecrim, é uma planta pertencente à família *Lamiaceae*, de origem da região mediterrânea da Europa (May *et al.* 2010). *Caryophyllus aromaticus* L., popularmente conhecido como cravo da índia, é uma espécie pertencente à família *Myrtaceae*, originalmente da Indonésia. Possui aroma e sabor muito característicos, devido ao eugenol, um composto fenólico volátil. Pode ser empregado como aromatizante e também como uma planta medicinal (Vanin 2014).

Os óleos essenciais e os extratos aquosos podem ser utilizados sem diferentes segmentos, abrangendo principalmente a indústria alimentícia e a farmacêutica, de acordo com suas propriedades. Ambos podem ser obtidos de algumas espécies vegetais, como *Rosmarinus officinalis* e *Caryophyllus aromaticus*. Estudos têm demonstrado a importância de extratos aquosos e óleos essenciais no desenvolvimento de novos antimicrobianos e controle de doenças (Vanin 2014, Venturoso *et al.* 2010).

Em virtude da resistência crescente aos antimicrobianos, bem como do alto custo e difícil acesso de algumas populações no Brasil a esses medicamentos, torna-se fundamental o desenvolvimento de novos medicamentos que possibilitem uma diminuição de efeitos adversos e dos riscos de intoxicação por uso inadequado, bem como apresentem um custo acessível para a população. Neste

contexto, algumas plantas podem representar uma excelente fonte para a busca de novos compostos, visto que a flora brasileira é altamente diversificada em espécies. Assim, é primordial a realização de testes que permitam a avaliação da atividade antimicrobiana de plantas como o cravo-da-índia e o alecrim, consideradas popularmente como terapêuticas, sobre microrganismos de notável importância clínica como *S. aureus* e *E. coli*. O presente trabalho teve por objetivo avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato aquoso e do óleo essencial do alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e do cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus*) frente a cepas de *S. aureus* (ATCC 25923) e *E. coli* (ATCC 25922).

METODOLOGIA

Preparação dos extratos aquosos

O extrato aquoso de *Rosmarinus officinalis* (alecrim) foi obtido por infusão a 25% (p/v), segundo adaptação de metodologia (Barbosa *et al.* 2007). Foram utilizados 25 g da folha seca de *Rosmarinus officinalis*, picados separadamente, em 100 mL de água destilada estéril fervente. Essa mistura permaneceu tampada e em repouso durante 15 minutos. O extrato aquoso de *Caryophyllus aromaticus* (cravo da índia) foi obtido por processo de decocção 20% (p/v), conforme adaptações dos métodos empregados por Santos *et al.* (2015) e Venturoso *et al.* (2011). Foi realizada a fervura de 20 g do botão floral em 100 mL de água destilada estéril, durante 15 minutos. Posteriormente os extratos aquosos de alecrim e cravo da índia foram filtrados, resfriados e acondicionados em tubos de ensaio nomeados e armazenados sob refrigeração a 4 °C até sua utilização.

Obtenção dos óleos essenciais

Os óleos essenciais de alecrim e cravo-da-índia foram adquiridos na forma pronta, em Farmácia de manipulação na cidade de Campinas, São Paulo, Brasil. O óleo essencial de Alecrim foi comprado da marca Terraflor Essencial® (ANVISA nº 25351.680558/2013-39), sendo o principal componente o quimiotipo (Qt.) cineol ou eucaliptol. O método de obtenção deste óleo foi de destilação a vapor d'água. O óleo essencial de Cravo da Índia (ANVISA nº 2.04408-3, Lazlo Aromaterapia®) teve extração por destilação por arraste de vapor d'água dos botões. Os principais constituintes descritos: eugenol (65%), β -cariofileno (28-32%), acetato de eugenil (3-5%), isoeugenol (menos que 1%), α -humuleno (menos que 1-2%), óxido de cariofileno (menos que 1-2%).

Testes de sensibilidade bacteriana

Os testes foram realizados no laboratório de Microbiologia da Faculdade de Americana (FAM), Americana, SP. Para os ensaios de suscetibilidade a antimicrobianos foram utilizadas bactérias padrão *American Type Culture Collection* (ATCC) de *S. aureus* (ATCC 25923) e *E. coli* (ATCC 25922) cedidos pela FAM. Foram utilizadas placas de Petri contendo Ágar Mueller-Hinton para

semeadura das bactérias por *swabs*. Para o preparo da suspensão bacteriana foram transferidas de três a cinco colônias de cada microrganismo para dois tubos de ensaio com água estéril, ajustando-se a turbidez do inóculo com padrão de 0,5 da escala de McFarland, correspondendo à aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL

Teste de difusão com discos

Os ensaios da atividade antibacteriana foram realizados pelo método de difusão em disco de papel de filtro, utilizando-se o método de Kirby & Bauer (Nardeli *et al.* 2014), com alterações. Em papéis filtro cilíndricos esterilizados, de 6 mm de diâmetro, foram embebidos 10 µL dos extratos e dos óleos, conforme realizado por Haida e colegas (2007), e os discos foram aplicados sobre os meios de cultura contendo as bactérias semeadas. Os meios de cultura foram mantidos em estufa por 24 horas a 36,5 °C. Para controle positivo de sensibilidade, foram utilizados os antimicrobianos Ampicilina (10 µg) e Sulfazotrim (25 µg) para *E. coli* e Claritromicina (15 µg) e Penicilina G (10 µn) para *S. aureus*. Como controle negativo foi utilizada solução fisiológica estéril. Após a incubação, foi realizada a leitura dos resultados, através da medição do diâmetro dos halos de inibição. Os testes foram realizados em triplicata. Considerou-se como resultado final a média das três medidas, expressas em termos do diâmetro (mm) da zona de inibição do crescimento bacteriano (Azevedo 2014, Guimarães *et al.* 2010).

Teste de difusão em poços

Para avaliar a atividade antibacteriana, foi realizada a técnica de difusão em poços, com adaptações (Moody *et al.* 2004, Okeke *et al.* 2001). Foram confeccionados poços de 6 mm em placas previamente inoculadas com ambas as bactérias. Os poços foram devidamente identificados e testados com 60 µL dos extratos e dos óleos, com uso de ponteiras esterilizadas. As placas foram incubadas em estufa, por 24 horas a 36,5 °C. Foi realizada a leitura dos resultados por meio da medição do diâmetro dos halos, cujas medidas foram expressas em milímetros. Os

testes foram realizados em triplicata, sendo considerado como resultado final de cada extrato e cada óleo a média das três medidas.

Análises Estatísticas

O software Prism (versão 5.0, Graph Software, Inc. San Diego, CA, EUA) foi utilizado para a análise estatística. As comparações estatísticas foram realizadas pelo *one-way* ANOVA seguido pelo teste post hoc de Bonferroni. Os dados são apresentados como a média ± erro padrão da média (S.E.M). Probabilidade valor (p) menor que 0,05 são considerados estatisticamente significativos.

RESULTADOS

As análises dos efeitos dos óleos essenciais demonstraram que o óleo de cravo da índia apresentou maior capacidade inibitória sobre as cepas bacterianas de *S. aureus* e *E. coli*, em todos os métodos avaliados (Tabs. 1 e 2). O óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) demonstrou atividade inibitória sobre ambas as cepas testadas, quando utilizado o método de orifício em Ágar, com impregnação de 60 µL do composto (Tab. 2) mas não pelo método de difusão em disco, quando avaliadas as culturas de *S. aureus* (Tab. 1). Já para *E. coli*, foi verificada sensibilidade a este composto também no método de disco difusão (Tab. 1).

Dessa forma, os dados apresentados na figura 1 permitem inferir que os diâmetros dos halos de inibição apresentados nas culturas de *S. aureus* foram discretamente maiores do que os encontrados nas culturas de *E. coli* pelo método de difusão com discos (Tab. 1). Contudo, quando utilizada a análise pelo método de difusão em poços, a medição do halo inibitório para *E. coli* foi consideravelmente maior do que para *S. aureus*.

O óleo essencial de alecrim, por sua vez, apresentou maior potencial inibitório sobre bactérias Gram negativas, pela maior sensibilidade de *E. coli*, sendo observados halos inibitórios em ambas as metodologias empregadas (Fig. 1 e Tabs. 1 e 2). É possível concluir que os dados obtidos demonstram que óleo essencial de cravo da índia

Tabela 1. Média dos halos de inibição (mm) apresentados pelos compostos testados pelo método de difusão em discos.

Cepa	Extrato aquoso		Óleo essencial	
	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	<i>Caryophyllus aromaticus</i> L.	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	<i>Caryophyllus aromaticus</i> L.
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	0	0	8	11
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	0	0	0	12

Dados representativos de dois ensaios independentes.

Tabela 2. Média dos halos de inibição (mm) apresentados pelos compostos testados método de orifício em Ágar.

Cepa	Extrato aquoso		Óleo essencial	
	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	<i>Caryophyllus aromaticus</i> L.	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	<i>Caryophyllus aromaticus</i> L.
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	0	0	11	19
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	0	0	10	17

Dados representativos de dois ensaios independentes.

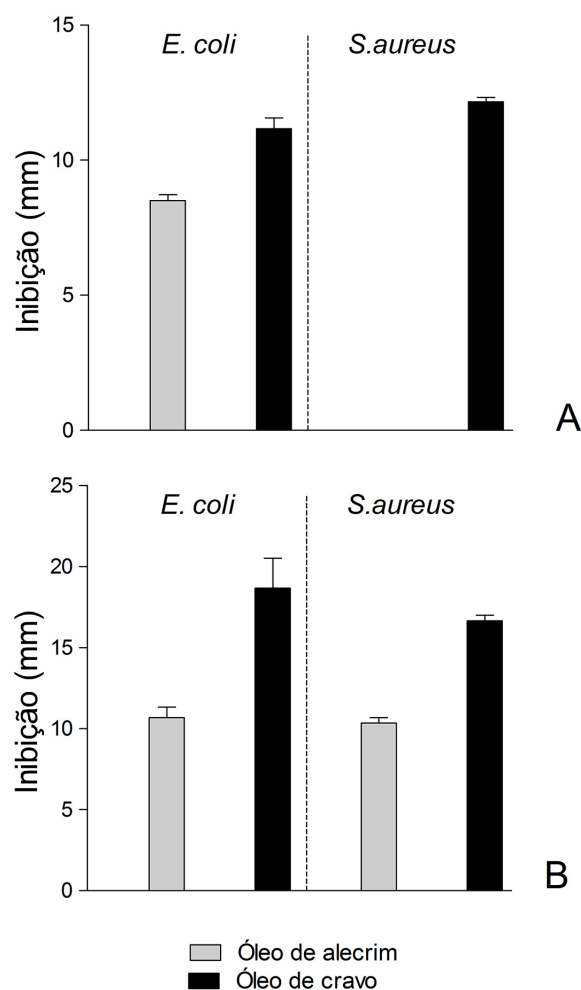


Figura 1. Atividade inibitória do óleo essencial de cravo da índia sobre *E. coli* (ATCC 25922) e *S. aureus* (ATCC 25923). A. Difusão em discos. B. Difusão em poços.

e de alecrim apresentaram ação antimicrobiana sobre as culturas avaliadas (Fig. 1 e Tabs. 1 e 2).

A avaliação dos efeitos antimicrobianos dos extratos aquosos de cravo da índia e alecrim demonstrou que esses não apresentaram potencial inibitório sobre *E. coli* e *S. aureus* por nenhuma das metodologias aqui empregadas. A ausência de atividade antimicrobiana no presente estudo, para os extratos aquosos de cravo da índia e alecrim pode ser decorrente da concentração dos extratos, do modo de obtenção (decocção e infusão), da parte das plantas utilizadas para a produção dos extratos

(folha seca de alecrim e botão floral de cravo da índia), da quantidade de compostos impregnada nos meios de cultura.

Os controles positivos apresentaram atividade antimicrobiana para as cepas analisadas, compatíveis com os valores esperados previstos na literatura, conforme evidenciado na Tabela 3.

DISCUSSÃO

Os dados aqui observados para avaliação dos efeitos antimicrobianos dos óleos essenciais de cravo da índia e de alecrim corroboram com os dados apresentados na literatura.

Os estudos de Silvestri *et al.* (2010), por metodologia de difusão com discos de 7 mm de diâmetro, confirmaram a ação antimicrobiana do óleo essencial de cravo da índia, corroborando com os dados aqui apresentados. Esses autores utilizaram doses de 5, 10 e 15 μ L de impregnação do composto nos discos, obtendo halos de inibição de 19,00; 19,75 e 20,50 mm, respectivamente. Entretanto, o método de extração do óleo utilizado foi por hidrodestilação, distinta da empregada neste trabalho, que foi por arraste de vapor d'água. Nesse contexto, Busato *et al.* (2014) afirmam que a composição química do óleo pode apresentar notável variação dependendo do método de extração empregado. A extração por arraste de vapor d'água produz compostos mais voláteis em curtos intervalos de tempos de extração (Gomes 2012). Assim, a diferença de rendimento do óleo essencial de cravo da índia utilizado neste trabalho pode ter culminado na distinção dos halos de inibição observados (Tabs. 1 e 2) quando comparados aos estudos de Silvestri e colegas (2010).

Xu e colaboradores (2016) confirmaram a ação inibitória do óleo essencial de cravo da índia sobre *S. aureus*. A metodologia aplicada em seus estudos foi de Oxford Cup. Os halos de inibição obtidos foram de 16,5 mm e 20,4 mm quando as concentrações do composto foram de 25% e 50%, respectivamente. Esses autores verificaram também o potencial inibitório dos principais componentes presentes nesta planta: eugenol e β -cariofileno. Para o eugenol os halos de inibição encontrados foram de 17,1 mm e 21,2 mm e para o β -cariofileno, 12,3 mm e 15,8 mm. Outros trabalhos descrevem que o potencial antimicrobiano do cravo da índia é atribuído, principalmente, a ação do eugenol. O eugenol inibe a produção

Tabela 3. Valores dos halos de inibição (mm) obtidos no presente trabalho, em comparação com os controles positivos realizados com antibióticos descritos na literatura (CLSI 2013).

Agente	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)		<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	
	Resultados obtidos	Controle de Qualidade*	Resultados obtidos	Controle de Qualidade*
Solução fisiológica estéril	0	0	0	0
Sulfazotrim (25 mcg)	27	23-29	-	-
Ampicilina (10 mcg)	17	16-22	-	-
Claritromicina (15 mcg)	-	-	28	26-32
Penicilina G (10 un)	-	-	37	26-37

*Fonte: CLSI (2013).

de amilase e proteases pela célula, promovendo sua lise e degradação (Pereira *et al.* 2008, Xu *et al.* 2016). Segundo Dalmarco (2012), o cineol, também presente no cravo da índia, apresenta propriedades farmacológicas características como: efeito expectorante, anestésico, bactericida e antisséptico.

Pesquisa atual aponta que o óleo essencial de cravo da índia pode deteriorar a parede celular do *S. aureus*, levando ao aumento da permeabilidade celular e ao extravasamento dos componentes intracelulares. Além disso, o óleo essencial pode invadir o citoplasma celular e inibe a síntese de DNA e proteínas, culminando na morte celular (Xu *et al.* 2016). Estes resultados confirmam os dados aqui apresentados.

Diversos estudos, embora utilizando-se de metodologias distintas da aplicada aqui, confirmaram ação antimicrobiana do óleo essencial de cravo da índia sobre *E. coli* e *S. aureus* (Pereira *et al.* 2008, Oussalah *et al.* 2007, Scherer *et al.* 2009). Em concordância com os dados aqui obtidos, dentre as plantas testadas nessas pesquisas, os melhores resultados de inibição para ambos os microrganismos foram atribuídos ao cravo-da-índia. Prabuseenivasan *et al.* (2006) confirmaram a ação inibitória do óleo essencial de cravo da índia e alecrim, por metodologia de difusão em discos em que foram impregnados 50 µL dos compostos em diferentes concentrações. Foram considerados como positivos halos de inibição com valor superior a 7 mm de diâmetro. A zona inibitória obtida para o óleo essencial de cravo da índia na concentração de 1:1 sobre *E. coli* e *S. aureus* foi de, respectivamente, 17,4 mm e 16,3 mm; e para o óleo essencial de alecrim os valores obtidos para *E. coli* e *S. aureus* foram de 17,5 mm e 12,5 mm.

No método de difusão com discos ocorreu discreta sensibilidade de *E. coli*. Hussain *et al.* (2010) confirmaram a atividade inibitória do óleo essencial de alecrim sobre *E. coli* e *S. aureus*. A metodologia empregada para a extração do óleo foi por hidrodestilação, distinta da utilizada neste trabalho, que foi por arraste de vapor d'água. O teste de suscetibilidade antimicrobiana foi realizado através de difusão com discos de 6 mm de diâmetro, semelhante a este trabalho, e impregnação de 15 µL do composto. Os halos de inibição obtidos foram de 14,3 mm para *E. coli* e 22 mm para *S. aureus*.

Por metodologia distinta da utilizada neste trabalho, Silva *et al.* (2009) verificaram a atividade antimicrobiana de óleos essenciais, como o alecrim, sobre estirpes de *E. coli* e *S. aureus* isoladas de casos clínicos humanos, através da Concentração Inibitória Mínima (CIM). *S. aureus* apresentou maior suscetibilidade frente a ação dos demais óleos, enquanto que para a inibição do crescimento de *E. coli* foram necessárias maiores concentrações do composto. Estes resultados foram distintos dos obtidos neste trabalho e nos estudos de Prabuseenivasan *et al.* (2006), em que *E. coli* foi mais sensível ao óleo essencial de alecrim do que *S. aureus*.

As variações na composição química do óleo essencial de alecrim são dependentes de fatores como: região

de cultivo, metodologia de extração e análise, parte da planta utilizada e preparo da matéria prima (seca ou *in natura*) para a extração. Estes fatores podem auxiliar na justificativa da variação de halos inibitórios observada neste trabalho e nos estudos citados, sendo primordial que a composição do óleo essencial de alecrim utilizada seja conhecida, pois, as alterações de composição química podem modificar o teor do princípio ativo presente no óleo (Ribeiro *et al.* 2012).

As propriedades antimicrobianas do alecrim são atribuídas aos compostos pinenos, 1-8 cineol, borneol, canfeno e cânfora. Estes, geralmente, estão presentes no óleo essencial (Ribeiro *et al.* 2012, Teixeira 2012). O óleo essencial utilizado neste trabalho apresentava como principal quimiotipo o cineol, que pode ser considerado como o responsável pela ação inibitória encontrada. Silva *et al.* (2008) afirma que o óleo essencial pode atuar sobre a estrutura lipídica externa das bactérias Gram positivas e Gram negativas, apresentando capacidade de inibição do crescimento bacteriano e síntese de glucano.

As discrepâncias apresentadas entre os resultados observados em estudos já existentes com os obtidos neste trabalho evidenciam a complexidade de comparação com pesquisas anteriores, pois, mesmo utilizando-se de metodologias semelhantes, a sensibilidade de estirpes distintas de determinado microrganismo pode ser diferente para um mesmo produto antimicrobiano vegetal. A ausência de valores pré-determinados para a positividade ou negatividade também dificulta relacionar os resultados obtidos com os estudos relatados. Algumas hipóteses explicam a diferença entre a ação antimicrobiana dos óleos, entre elas, as características estruturais das bactérias Gram positivas e negativas; a concentração e composição dos óleos e a interferência na concentração dos compostos após o processo de extração e obtenção do óleo (Barbosa *et al.* 2015). Estudos demonstram que bactérias Gram positivas apresentam uma maior sensibilidade frente a óleos essenciais, quando comparadas com Gram negativas. Isso ocorre devido à membrana de lipopolissacarídeo, encontrada na parede das bactérias Gram negativas, que proporciona uma maior resistência, dificultando a disseminação e acúmulo do óleo essencial na célula bacteriana (Barbosa *et al.* 2015, Sivasothy *et al.* 2011).

Nos estudos de Ushimaru *et al.* (2007) também não foi comprovada maior ação dos componentes em Gram positivas. O extrato metanólico de cravo-da-índia demonstrou maior eficácia para as bactérias Gram positivas e os extratos metanólicos de alho foram mais eficazes contra as bactérias Gram negativas estudadas.

Não foram encontrados estudos em que foi investigada a atividade inibitória do extrato aquoso de cravo da índia sobre bactérias, como as estirpes analisadas neste trabalho. Venturoso e colaboradores (2010) confirmaram o potencial antifúngico do extrato aquoso de cravo da índia sobre o crescimento de *Fusarium solani* e Marcondes e colegas (2014) analisaram a influência deste composto no desenvolvimento dos fungos *Colletotrichum gloeosporioides* e *Fusarium moniliforme*. Em ambos os estudos,

o extrato aquoso de cravo da Índia apresentou potencial inibitório de crescimento fúngico.

Ushimaru et al. (2007) comprovaram a ação antimicrobiana do extrato metanólico de cravo da Índia sobre *S. aureus* e *E. coli* por diluição em Ágar e CIM. Pandey & Singh (2011) analisaram o potencial antibacteriano do extrato etanólico e metanólico do cravo da Índia sobre *E. coli* e *S. aureus*, através da metodologia de difusão em poços, com impregnação de 50 µL dos compostos.

Haida et al. (2007) avaliaram a suscetibilidade de diferentes microrganismos, como *E. coli* e *S. aureus*, para distintos tipos de extratos de oito plantas, dentre elas *Rosmarinus officinalis*. A metodologia empregada foi a de difusão com discos, de 6 mm de diâmetro com 10 µL dos compostos, a mesma apresentada neste trabalho. O extrato aquoso de alecrim apresentou halos de inibição menores do que 7 mm de diâmetro para as estirpes *E. coli* e *S. aureus* e assim os autores não consideraram ação inibitória deste composto. Os extratos etanólico, cetônico e clorofórmico apresentaram inibição no crescimento de *S. aureus*, sendo o extrato clorofórmico o mais eficiente. Nenhum dos extratos de alecrim utilizados apresentaram resultado positivo para inibição do crescimento de *E. coli*. Kozłowska e seu grupo (2015) verificaram a ação antibacteriana dos extratos etanólico e metanólico do alecrim sobre 20 microrganismos, dentre eles *E. coli* e *S. aureus*, através do método de difusão com discos. *E. coli* não foi sensível a nenhum dos compostos, enquanto que *S. aureus* apresentou halos de inibição de 17 mm em ambos.

Em estudos em que se analisa a ação antimicrobiana de produtos naturais é importante avaliar a metodologia utilizada. Miranda e seu grupo (2013) afirmam que o teste de orifício em Ágar apresenta eficiência para substâncias solúveis a água, facilitando a difusão destas pelo meio de cultura, sendo que diversos fatores podem dificultar a difusão do composto através do meio, como a composição deste, enzimas bacterianas, densidade do inóculo, período de incubação, peso molecular, dentre outros

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados obtidos permitem concluir que os óleos essenciais do alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e do cravo-da-Índia (*Caryophyllus aromaticus*) apresentaram atividade inibitória *in vitro* sobre as cepas de *S. aureus* e *E. coli*. Já os extratos aquosos dessas mesmas espécies de plantas não apresentaram efeito inibitório sobre os microrganismos avaliados. Até onde é de nosso conhecimento, esse é o primeiro estudo que relata os efeitos do extrato aquoso de cravo da Índia sobre linhagens bacterianas. Análises detalhadas são necessárias para avaliar e quantificar os componentes ativos presentes nesses extratos e óleos.

AGRADECIMENTOS

Ao coordenador do laboratório da Faculdade de Americana (FAM), Odair Givaldo Lopes Marinho, e ao técnico

responsável, Domingos Sávio de Campos Machado, pelo apoio técnico na execução das análises experimentais.

REFERÊNCIAS

- AZEVEDO, S. M. 2014. *Farmacologia dos Antibióticos Beta-lactâmicos*. 70f. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Fernando Pessoa, Portugal, 2014.
- BARBOSA, F. S., LEITE, G. L., PAULINO, M. A., GUILHERME, D. O., MAIA, J. T., FERNANDES, R. C. & COSTA, C. A. 2007. Utilização de extratos de tiririca no controle de *Diabrotica speciosa*. *Revista Brasileira de Agroecologia*, 8: 2.
- BARBOSA, L. N., PROBST, I. S., ANDRADE, B. T., ALVES, F. B., ALBANO, M., CUNHA, M. L., DOYAMA, J. T., RALL, V. L. M. & FERNANDES JÚNIOR, A. 2015. *In vitro* Antibacterial and Chemical Properties of Essential Oils Including Native Plants from Brazil against Pathogenic and Resistant Bacteria. *Journal of Oleo Science*, 64(3):289–298.
- BUSATO, N. V., SILVEIRA, J. C., COSTA, A. O. S. & COSTA JÚNIOR, E. F. 2014. Estratégias de modelagem da extração de óleos essenciais por hidrodestilação e destilação a vapor. *Ciência Rural*, 44(9):1574–1582.
- CLSI. 2013. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement*. CLSI document M100-S23. Wayne: Clinical and Laboratory Standart Institute.
- COSTA, J. R., ALMEIDA, A. C., MARTINS, E. R., RODRIGUES, M. N., SANTOS, C. A. & MENEZES, I. R. 2011. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim-pimenta e do extrato bruto seco do barbatimão diante de bactérias isoladas do leite. *Biotemas*, 24(4): 1–6.
- DALMARCO, J. B. 2012. Estudo das propriedades químicas e biológicas de *Rosmarinus officinalis* L. Dissertação (Doutorado em Química Analítica). Universidade Federal de Santa Catarina, 129 p., 2012.
- FIGUEREDO, C. A., GURGEL, I. G. D. & JÚNIOR, G. G. 2014. A Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos: construção, perspectivas e desafios. *Physis: Revista de Saúde Coletiva*, 24(2): 381–400.
- FRIERI, M., KUMAR, K. & BOUTIN, A. 2016. Antibiotic resistance. *Journal of Infection and Public Health*, in press. <[http://www.jiph.org/article/S1876-0341\(16\)30127-7/fulltext](http://www.jiph.org/article/S1876-0341(16)30127-7/fulltext)>
- GOMES, E. S. 2012. Influência de níveis de sombreamento no desenvolvimento de plantio juvenil de paurosa (*Aniba rosaedora* Ducke), no oeste do Pará. 69f. Dissertação de mestrado (Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Amazônia) Universidade Federal do Oeste do Pará, 2012.
- GONÇALVES, N. T., VILA, M. C., GERENUTTI, M. & CHAVES, D. A. 2013. Políticas de Saúde para a Fitoterapia no Brasil. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 18(4): 632–637.
- GUIDO, R. C., ANDRICOPULO, A. D. & OLIVA, G. 2010. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. *Estudos Avançados*, 24 (7): 81–98.
- GUIMARAES, D. O., MOMESSO, L. S. & PUPO, M. T. 2010. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Química Nova*, 33(3): 667–679.
- HAIDA, K. S., PARZIANELLO, L., WERNER, S., GARCIA, D. R. & INÁCIO, C. V. 2007. Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de oito espécies de plantas medicinais. *Arq. Ciênc. Saúde Unipar*, 11(3):185–192.
- HUSSAIN, A. I., ANWAR, F., CHATHA, S. A. S., JABBAR, A., MAHBOOB, S. & NIGAM, P. S. 2010. *Rosmarinus officinalis* essential oil: antiproliferative, antioxidant, and antibacterial activities. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(4): 1070–1078.
- KOZŁOWSKA, M., LAUDY, A. E., PRZYBYŁ, J. L. & MAJEWSKA, E. 2015. Chemical composition and antibacterial activity of some medicinal plants from Lamiaceae family. *Acta Pol Pharm*, 72(4): 757–67.
- MARCONDES, M. M., BALDIN, I., MAIA, A. J., LEITE, C. D. & FARIA, C. R. 2014. Influência de diferentes extratos aquosos de plantas medicinais no desenvolvimento de *Colletotrichum gloeosporioides* e de *Fusarium moniliforme*. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 16(4):896–904.

- MAY, A., SUGUINO, E., MARTINS, A. N., BARATA, L. S. & PINHEIRO, M. Q. 2010. Produção de biomassa e óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) em função da altura e intervalo entre cortes. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 12(2): 195–200.
- MIRANDA, G. S., SANTANA, G. S., MACHADO B. B., COELHO, F. P. & CARVALHO, C. A. 2013. Atividade antibacteriana in vitro de quatro espécies vegetais em diferentes graduações alcoólicas. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 15(1): 104–111.
- MOODY, J. O., ADEBIYI, O. A. & ADENIYI, B. A. 2004. Do *Aloe vera* and *Ageratum conyzoides* enhance the anti-microbial activity of traditional medicinal soft soaps (Osedudu)? *Journal of Ethnopharmacology*, 92(1): 57–60.
- NARCISO, A., LITO, L., CRISTINO, J. M. & DUARTE, A. 2010. *Escherichia coli* Uropatogénica: Resistência aos Antibióticos Versus Factores de Virulência. *Acta Urológica*, 27(2): 11–20.
- NARDELI, J. V., CARVALHO, C. T., ARRUDA, E. J., NOVA, P. V., OLIVEIRA, L. S. & ARAKAKI, A. H. 2014. Síntese, Caracterização e Atividade Biológica do Acetato de Cu (II) para Larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) e Bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* e *Listeria monocytogenes*. *Orbital - The Electronic Journal of Chemistry*, 6(3): 122–129.
- OKEKE, M. I., IROEGBU, C. U., EZE, E. N., OKOLI, A. S. & ESIMONE, C. O. 2001. Evaluation of extracts of the root of *Landolphiaowerriencefor* antibacterial activity. *Journal of ethnopharmacology*, 78(2–3): 119–27.
- OUSSALAH, M., CAILLET, S., SAUCIER, L. & LACROIX, M. 2007. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 18(5): 414–420.
- PANDEY, A. & SINGH, P. 2011. Antibacterial activity of *Syzygiumaromaticum* (clove) with metal ion effect against food borne pathogens. *Asian journal of plant science and research*, 1(2): 69–80.
- PEREIRA, A. A., CARDOSO, M. G., ABREU, L. R., MORAIS, A. R., GUIMARAES, L.L. & SALGADO, A. P. 2008. Caracterização química e efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. *Ciência e agrotecnologia*, 32(3):887–893.
- PRABUSEENIVASAN, S., JAYAKUMAR, M. & IGNACIMUTHU, S. S. 2006. In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complement. Altern. Med.*, 6(1): 39–30.
- RIBEIRO, D. S., MELO, D. B., GUIMARAES, A. G. & VELOZO, E. S. 2012. Avaliação do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) como modulador da resistência bacteriana. *Semina: Ciências Agrárias*, 33(2): 687–696.
- RODRIGUES, F. J. & BARROSO, A. P. 2011. Etiologia e sensibilidade bacteriana em infecções do tracto urinário. *Revista Portuguesa de Saúde Pública*, 29(2): 123–131.
- SANTOS, R. L., GUIMARAES, G. P., NOBRE, M. S. C. & PORTELA, A. S. 2011. Análise sobre a fitoterapia como prática integrativa no Sistema Único de Saúde. *Revista brasileira de plantas medicinais*, 13(4): 486–491.
- SANTOS, I. C., CRUZ, R. D., CARVALHO, K. S., SILVA, S.C. & GUALBERTO, S. A. 2015. Bioatividade de extratos aquosos da parte aérea de *Poincianellabracteosa* sobre larvas de *Aedes aegypti*. *Enciclopédia Biosfera*, 11(21): 2908–2915.
- SCHERER, R., WAGNER, R., DUARTE, M. C. T. & GODOY, H. T. 2009. Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palma rosa. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 11(4): 442–449.
- SILVA, A. B., SILVA, T., FRANCO, E. S., RABELO, S. A., LIMA, E. R., MOTA, R. A., CAMARA, C. G. & PONTES-FILHO, N. T. 2010. Atividade antibacteriana, composição química, e citotoxicidade do óleo essencial de folhas de árvore de pimenta brasileira (*Schinus terebinthifolius* Raddi). *Brazilian Journal of Microbiology*, 41:158–163.
- SILVA, M. A., SILVA, M. R., HIGINO, J. S., PEREIRA, M. V. & CARVALHO, A. T. 2008. Atividade antimicrobiana e antiaderente in vitro do extrato de *Rosmarinus officinalis* Linn. sobre bactérias orais planctônicas. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 18(2): 236–240.
- SILVA, M. N., USHIMARU, P. I., BARBOSA, L. N., CUNHA, M.S. & FERNANDES JUNIOR, A. 2009. Atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas frente a linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 11(3):257–262.
- SILVESTRI, J. F., PAROUL, N., CZYEWski, E., LERIN, L., ROTAVA, I., CANSIAN, R. L., MOSSI, A., TONIAZZO, G., OLIVEIRA, D. & TREICHEL, H. 2010. Perfil da composição química e atividades antibacteriana e antioxidante do óleo essencial do cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata* Thunb.). *Revista Ceres*, 57(5): 589–594.
- SIVASOTHY, Y., CHONG, W. K., ELDEEN, I. M., SULAIMAN, S. F. & AWANG, K. 2010. Essential oils of *Zingiber officinale* var. *rubrum* Theilade and their antibacterial activities. *Food Chemistry*, 124(2): 514–517.
- TEIXEIRA, L. 2012. Avaliação do uso do Extrato de Alecrim de Jardim (*Rosmarinus officinalis* Linn) no controle do Biofilme Dental. Trabalho de Conclusão de Curso. (Odontologia). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.
- USHIMARU, P. I., SILVA, M. N., DI STASI, L. C., BARBOSA, L. & FERNANDES JUNIOR, A. 2007. Antibacterial activity of medicinal plant extracts. *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo, 38(4): 717–719.
- VANIN, A. B. 2014. Produção, propriedades biológicas, antioxidantes e toxicidade do bioaromatizante obtido via esterificação enzimática de óleo essencial do cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus*). 139f. Tese de Doutorado (Engenharia de Alimentos) Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – UR, Erechim, 2014.
- VENTUROSU, L. R., BACCHI, L. A., GAVASSONI, W. L., PONTIM, B. A. & CONUS, L. A. 2010. Influência de diferentes metodologias de esterilização sobre a atividade antifúngica de extratos aquosos de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 12(4): 499–505.
- VENTUROSU, L. R., BACCHI, L. M. A., GAVASSONI, W. L., CONUS, L. A., PONTIM, B. C. A. & BERGAMIN, A. C. 2011. Atividade antifúngica de extratos vegetais sobre o desenvolvimento de fitopatógenos. *Summa Phytopathologica*, 37(1): 8–23.
- VUONG, C., YEH, A. J., CHEUNG, G. Y. C. & OTTO, M. 2016. Investigational drugs to treat methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 25 (1): 73–93.
- XU, J.-G., LIU, T., HU, Q.-P. & CAO, X.-M. 2016. Chemical Composition, Antibacterial Properties and Mechanism of Action of Essential Oil from Clove Buds against *Staphylococcus aureus*. *Molecules*, 21(9): 1194.