

## ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO *Syzygium aromaticum* SOBRE O CRESCIMENTO DE *Candida albicans*

Ana Caroline Magalhães Melo<sup>1</sup>; Jean Parcelli Costa do Vale<sup>2</sup>; Pedro Henrique Lima Rodrigues<sup>3</sup>; Francisca Lidiane Linhares de Aguiar<sup>4</sup>; Raquel Oliveira dos Santos Fontenelle<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Discente do curso de Ciências Biológicas, CCAB, UVA; E-mail: [carolinemagalhaesmelo@gmail.com](mailto:carolinemagalhaesmelo@gmail.com);  
<sup>2</sup>Professor do curso de Química, UVA; <sup>3</sup>Graduando do curso de Ciências Biológicas, CCAB, UVA; <sup>4</sup> Pós Doutoranda – Centro de Ciências Agrárias e Biológicas, UVA; <sup>5</sup>Professora/Orientadora Raquel Oliveira dos Santos Fontenelle, do curso de Ciências Biológicas, CCAB, UVA. E-mail: [raquelbios@yahoo.com.br](mailto:raquelbios@yahoo.com.br).

**RESUMO:** A evolução de microrganismos resistentes a diversos medicamentos tem se tornado um desafio para a comunidade científica em todo o mundo. A busca por produtos naturais como métodos alternativos de tratamento de infecções microbianas está aumentando tentando minimizar os efeitos dessa resistência. O óleo essencial do cravo da Índia (*Syzygium aromaticum*) tomou destaque devido suas atividades biológicas como, antibacteriana, antifúngica, herbicida, nematicida, antitumoral e anti-inflamatória. Este trabalho teve como objetivos caracterizar e avaliar a atividade antifúngica do óleo essencial do óleo de cravo (*Syzygium aromaticum*) contra isolados clínicos de *Candida albicans*. Foram identificados 7 compostos presentes no óleo essencial, onde o composto majoritário foi o Eugenol com 62,81%, além disso, o mesmo demonstrou eficácia contra cepas de *Candida albicans* testadas apresentando CIM 2,5 e CFM de 5,0 mg/mL. Portanto o óleo demonstrou eficácia para novos avanços de pesquisa na busca de tratamentos alternativos.

**Palavras chave:** Eugenol; produtos naturais; resistência.

### INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

Nos últimos anos há um aumento na pesquisa de produtos naturais para fins medicinais. O óleo do cravo-da-Índia (*Syzygium aromaticum*) é um exemplo desses produtos, sendo amplamente utilizado na medicina alternativa e em produtos de higiene bucal devido às suas propriedades antimicrobianas e analgésicas (Batiha *et al.*, 2020). O uso do cravo da Índia é de suma importância na agricultura e na culinária, atuando como repelente natural e nutricional como exemplo típico de especiarias (alimentos) na interface da dieta e da medicina, especificamente, para mostrar que alimento pode ser remédio (Ogunola *et al.*, 2022).

O ser humano apresenta naturalmente fungos e bactérias que participam do sistema fisiológico, quando os indivíduos apresentam baixa na imunidade, como no caso de pacientes HIV positivo, esses microrganismos podem se tornar patogênicos e causar infecções. Como por exemplo a *Candida albicans*, que é natural da microbiota humana, mas pode causar infecções sérias sendo considerada a espécie fúngica mais infecciosa, causando risco à saúde (Goulart *et al.*, 2018).

À medida que a resistência a antifúngicos evolui, há a necessidade de desenvolver novos compostos com produtos de fontes naturais como o óleo de alho e o óleo de orégano, possuem propriedades antifúngicas conhecidas. É de fundamental



importância compreender o alcance e os limites das propriedades do óleo do cravo (*Syzygium aromaticum*), bem como seu impacto na saúde de organismos vivos e sua capacidade de inibição de cepas que torna o óleo do cravo uma potencial fonte de agentes antimicrobianos naturais. Diante, disso os objetivos do trabalho foi caracterizar e avaliar a atividade antifúngica do óleo essencial do cravo (*Syzygium aromaticum*) contra isolados clínicos de *Candida albicans*.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### • COLETA BOTÂNICA E EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

O material vegetal (*Syzygium aromaticum*) foi obtido no comércio local na cidade de Sobral-CE. O óleo essencial foi obtido pelo método de hidrodestilação realizado na Universidade Estadual Vale do Acaraú, utilizando equipamento Clavenger modificado. Para isso 300g do material vegetal foi colocado em um balão de 5 litros com 2 litros de água e aquecida até a ebulição por 2 horas. Após 2 horas o óleo foi coletado, e foi adicionado ao mesmo sulfato de sódio para retirar gotículas de água que ficaram misturadas ao óleo no momento da coleta (RIBEIRO *et al*, 2012).

### • ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL

#### *Syzygium aromaticum*

A análise qualitativa dos óleos foi realizada por CG-EM utilizando um instrumento Agilent modelo GC-7890B/MSD-5977A (quadrupolo), com impacto de elétrons a 70 eV, coluna HP-5MS metilpolissiloxano (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, Agilent), gás carreador hélio com fluxo 1,00 mL.min<sup>-1</sup> (8,8 psi) e velocidade linear constante de 36,8 cm.s<sup>-1</sup>, temperatura do injetor 250 °C, temperatura do detector 150 °C, temperatura da linha de transferência 280 °C. Programação do forno cromatográfico: temperatura inicial de 70 °C, com rampa de aquecimento de 4 °C.min<sup>-1</sup> até 180 °C e acréscimo de 10 °C/min até 250 °C ao término da corrida (34,5 min). A identificação dos compostos foi realizada pela análise dos padrões de fragmentação exibidos nos espectros de massas com aqueles presentes na base de dados fornecidos pelo equipamento (NIST versão 2.0 de 2012 – 243.893 compostos) e de dados da literatura.

Cromatografia em fase gasosa acoplada ao detector de ionização em chama (CG-DIC):

A análise quantitativa foi realizada por CG-DIC utilizando um instrumento Shimadzu modelo CG-2010 Plus, coluna RTX-5 metilpolissiloxano (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), modo de injeção com divisão de fluxo 1:30, gás carreador nitrogênio com fluxo 1,00 mL.min<sup>-1</sup> (84,1 kPa) e velocidade linear constante de cm.s<sup>-1</sup>, temperatura do injetor 250 °C, temperatura do detector de 280 °C. Programação do forno cromatográfico: temperatura inicial de 70 °C com rampa de aquecimento de 4 °C.min<sup>-1</sup> até 180 °C por 27,5 min, seguida por rampa de aquecimento de 10 °C.min<sup>-1</sup> até 250 °C, ao término da corrida (34,5 min). A identificação dos compostos foi realizada através da comparação dos seus índices de retenção com os de compostos conhecidos, obtidos por injeção de uma mistura de padrões contendo uma série homóloga de alcanos C<sub>7</sub>-C<sub>30</sub>, e de dados da literatura.

### • MICRORGANISMO

As cepas utilizadas no trabalho foram de *Candida albicans* LABMIC 0104 e LABMIC 0105 que se encontra no Laboratório de Microbiologia - LABMIC da Universidade Estadual Vale do Acaraú - UVA.

## ● MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO

### Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), do óleo essencial foi realizada pelo método de microdiluição, utilizando placas de microdiluição com 96 poços em fundo U de acordo com CLSI, norma M27-A3 (CLSI, 2008). O meio de cultura usado foi o Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640 - contendo glutamina, indicador de fenol em coloração avermelhada e ausência de bicarbonato). Os compostos foram diluídos a 20 mg/mL. O óleo foi diluído em RPMI e DMSO 5%. Inicialmente foram adicionados 100 µL do RPMI em todos os poços, em seguida 100 µL dos compostos foram adicionados na primeira coluna e realizadas diluições seriadas no intervalo de concentração de 5-0,009 mg/ml. A anfotericina B foi utilizada como controle no intervalo de concentração de 16 – 0,0078 µg/ml. Por fim, foi feita a suspensão do inóculo de acordo com a escala McFarland 0.5 (106 UFC/mL). Em seguida foi realizada uma diluição em RPMI de 1:2000 para obtenção da concentração final do inóculo de 2x10<sup>2</sup> UFC/mL. 100 µL do inóculo foi adicionado em todos os poços. Também foram adicionados controles de crescimento do inóculo e controle de esterilidade do meio. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Depois foi feita leitura das placas na leitora de ELISA a 620nm. A Concentração Inibitória Mínima foi a menor concentração onde não foi observado crescimento visível do microrganismo na placa.

### Concentração Fungicida Mínima (CFM)

Para Determinação da Concentração Fungicida Mínima foram retiradas alíquotas de 100 µL do poços que não apresentaram crescimento fúngico e foram semeadas em placas de petri com meio de cultivo sabouraud dextrose agar (SDA). As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. A menor concentração onde não houve crescimento de colônias nas placas será o CFM.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram encontrados 7 compostos no OE, com o Eugenol (62,81%) como composto majoritário, seguido de β-Cariofileno (30,55%), Acetato de chavibetol (3,49%), α-Cariofileno(2,54), α-Copaeno (0,37%), γ-Muroleno (0,07%) e o δ-Cadineno (0,03) (Tabela 1). Os resultados analisados estão de acordo com diversos autores (Haro *et al.*,2021), mostrou que as composições do óleo avaliado em seu trabalho apresentou eugenol (66,9%), β-Cariofileno (24,8%), α-Copaene (0,8%), δ-Cadinene (0,6%).

Barros *et al.*,(2018), o eugenol apresentou (52,53%) e o α-Cariofileno (37,25%) , foi encontrado semelhança dos compostos nesses devidos trabalhos. Os óleos essenciais não seguem uma fórmula rígida e imutável em relação à espécie da planta. Em vez disso, seu rendimento, composição pode variar dependendo de fatores como a parte da planta usada, o estágio de crescimento da planta, as condições climáticas e a qualidade do solo. Essa flexibilidade torna os óleos essenciais sensíveis às influências do ambiente em que as plantas crescem, resultando em variações nas concentrações e nos constituintes desses óleos (De Moraes *et al.*,2009).

**Tabela I.** Composição química do óleo essencial de *Syzygium aromaticum*

Compostos	<sup>1</sup> IK <sub>calc</sub>	<sup>2</sup> IK <sub>lit</sub>	<i>S. aromaticum</i>
			Área (%)
Eugenol	1364	1359	62,81



$\alpha$ -Copaeno	1380	1376	0,37
$\beta$ -Cariofileno	1424	1419	30,55
$\alpha$ -Cariofileno	1458	1454	2,54
$\gamma$ -Muroleno	1480	1479	0,07
$\delta$ -Cadineno	1527	1523	0,03
Acetato de chavibetol	1534	1525	3,49
Total identificado	-	-	99,86

<sup>1</sup>IK<sub>cal</sub>= Índice de Kovats calculado    <sup>2</sup>IK<sub>lit</sub>= Índice de Kovats literatura

Foi observado que o OE do cravo *Syzygium aromaticum* foi eficaz contra as cepas de *Candida albicans*, apresentando atividade com CIM de 2,5mg/ml, CFM 2,5mg/ml e a Anfotericina com CIM 1,0  $\mu$ g/mL e o CFM 2,0  $\mu$ g/mL (Tabela II). Um outro estudo com *C.albicans* o óleo essencial de *S.aromaticum* apresentou CIMs um pouco menores, variando de 625-1250  $\mu$ g/ml (Hekmatpanah et al., 2022). Essas diferenças nas atividades dos óleos essenciais podem ocorrer devido a fatores ambientais que influenciam na composição química do óleo.

**Tabela II.** Resultados dos testes do óleo essencial do cravo *Syzygium aromaticum* contra cepas de *Candida albicans*.

CEPAS	Óleo		Anfotericina B	
	CIM (mg/mL)	CFM (mg/mL)	CIM ( $\mu$ g/mL)	CFM ( $\mu$ g/mL)
<b>LABMIC 0104</b>	<b>2,5</b>	<b>5,0</b>	<b>1,0</b>	<b>2,0</b>
<b>LABMIC 0105</b>	<b>2,5</b>	<b>5,0</b>	<b>1,0</b>	<b>2,0</b>

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O potencial antifúngico do óleo de cravo-da-índia representa uma alternativa viável e promissora no tratamento de infecções por *Candida albicans*. O presente estudo destaca a relevância do óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) como um candidato promissor no combate a cepas de *Candida albicans*. Sua composição química, com ênfase no eugenol e no  $\beta$ -cariofileno como componentes majoritários, demonstra potencial para atividade antifúngica e com a resistência crescente aos medicamentos antifúngicos convencionais torna imperativo a busca por alternativas naturais e eficazes.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Vale do Acaraú e ao PBIC/FUNCAP por propiciar meu acesso ao universo da pesquisa científica, área essa que pretendo seguir. À Professora Raquel Fontenelle pela orientação e oportunidade de participar da sua equipe do Laboratório de Microbiologia. Também meus agradecimentos a Maria Alyce albuquerque Fernandes, Pedro Henrique, Rita Ingrid Fernandes, Professor Jean Parcelli, Lidiane Linhares por toda coorientação e paciência e aos demais colaboradores por todo suporte e companheirismo durante toda essa jornada.

## REFERÊNCIAS

BATIHA, G. E.; ALKAZMI, L. M.; WASEF, L. G.; BESHBIHY, A. M.; NADWA, E. H.; RASHWAN, E. K. *Syzygium aromaticum* L. (Myrtaceae): Usos Tradicionais, Constituintes Químicos Bioativos, Atividades Farmacológicas e Toxicológicas. *Biomoléculas*. 30 de janeiro de 2020; 10(2):202. DOI: 10.3390/biom10020202. PMID: 32019140; PMCID: PMC7072209.



GOMES, P. R. B. *et al.* "Caracterização química e citotoxicidade do óleo essencial do cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*).*"* Revista Colombiana de Ciências Químico-Farmacéuticas 47.1 (2018): 37-52.

CLSI. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard—Third Edition.** CLSI document M27-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.

DE MORAIS, L. A. S. "Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais." Horti Bras 27.2 (2009): S4050-4063.

GOULART, L. S. *et al.* "Oral colonization by *Candida* species in HIV-positive patients: association and antifungal susceptibility study." Einstein (Sao Paulo) 16 (2018).

HARO-GONZÁLEZ, J. N.; CASTILLO-HERRERA, G. A.; MARTÍNEZ-VELÁZQUEZ, M.; ESPINOSA-ANDREWS, H; (2021). **Óleo Essencial de Cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): Extração, Composição Química, Aplicações Alimentares e Bioatividade Essencial para a Saúde Humana.** Moléculas (Basileia, Suíça), 26(21), 6387. <https://doi.org/10.3390/molecules26216387>

HEKMATPANAH, A.; SHARIFZADEH, A.; SHOKRI, H.; ABBASZADEH, S.; NIKAEIN, D. **Eficácia de *Syzygium aromaticum* óleo essencial sobre o crescimento e atividade enzimática de agentes patogênicos *Candida albicans* Cepas.** Curr Med Mycol. 2022; 8(1):12-19. DOI:10.18502/cmm.8.1.9209.

OTUNOLA, G. A. **Especiarias culinárias em alimentos e medicina: uma visão geral de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. e L. M. Perry [Myrtaceae].** Fronteiras da farmacologia, 12, 793200. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.793200>, 2022.