

UNILEÃO
CENTRO UNIVERSITÁRIO LEÃO SAMPAIO
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

FABRÍCIO FERNANDES DE MELO CARDOSO

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIBACTERIANA E MODULATÓRIA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Cinnamomum
verum* (CANELA)**

Juazeiro do Norte – CE
2018

FABRÍCIO FERNANDES DE MELO CARDOSO

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIBACTERIANA E MODULATÓRIA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Cinnamomum*
verum (CANELA)**

Artigo científico apresentado à Coordenação do
Curso de Graduação em Biomedicina do Centro
Universitário Leão Sampaio, em cumprimento às
exigências para a obtenção do grau de bacharel
em Biomedicina.

Orientador: Esp. Cícero Roberto Nascimento
Saraiva

Juazeiro do Norte – CE
2018

FABRÍCIO FERNANDES DE MELO CARDOSO

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIBACTERIANA E MODULATÓRIA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Cinnamomum*
verum (CANELA)**

Artigo científico apresentado à Coordenação do
Curso de Graduação em Biomedicina do Centro
Universitário Leão Sampaio, em cumprimento às
exigências para a obtenção do grau de bacharel
em Biomedicina.

Orientador: Esp. Cícero Roberto Nascimento
Saraiva

Data de aprovação: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof(a): Esp. Cícero Roberto Nascimento Saraiva
Orientador

Prof(a): Esp. Francisco Yhan Pinto Bezerra
Examinador 1

Prof(a): Esp. Livia Maria Garcia Leandro
Examinador 2

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E MODULATÓRIA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Cinnamomum verum* (CANELA)

Fabício Fernandes de Melo Cardoso¹; Cicero Roberto Nascimento Saraiva²

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo realizar a caracterização química e avaliar a atividade microbiana e modulatória do óleo essencial de *Cinnamomum verum*. Foi obtido o óleo essencial das cascas de *Cinnamomum verum*, e identificado os compostos químicos do óleo essencial por meio de Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas, verificou-se o efeito antimicrobiano de *Cinnamomum verum* frente a bactérias padrões e multirresistentes e realizou-se diferentes combinações com concentrações diferentes de óleo essencial, e antibióticos. Para avaliar o óleo essencial como modulador da ação antibiótica, a CIM de antibióticos (aminoglicosídeos) foi avaliado na presença e ausência das substâncias e do óleo em microplacas estéreis. Os componentes majoritários observados após a realização da cromatografia foram: linalol (53,53%) e aldeído cinâmico (30,66%). Em relação à atividade antibacteriana, o óleo essencial extraído das cascas de *Cinnamomum verum*, não apresentou atividade, sendo obtidos resultados $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$ em todas as espécies de bactérias testadas. Em relação à modulação, obteve resultados satisfatórios quando associou o produto natural com os antibióticos apenas para *Staphylococcus aureus*, ou seja, o produto natural possui efetividade na inibição de crescimento. Conclui-se que não foi possível observar que a ação antibacteriana do óleo essencial de *Cinnamomum verum* frente a cepas testadas, porém obteve-se resultados satisfatórios apenas para *S. aureus* no teste de modulação. Porém é necessário realização de novas pesquisas, para analisar a toxicidade e efetivação das atividades antimicrobianas desse produto natural.

Palavras-chave: Atividade Antimicrobiana. *Cinnamomum verum*. Óleo essencial.

CHEMICAL CHARACTERIZATION AND EVALUATION OF THE ANTIBACTERIAL AND MODULATORY ACTIVITY OF ESSENTIAL OIL OF *Cinnamomum verum* (CANELA)

ABSTRACT

The objective of the present work was to perform the chemical characterization and to evaluate the antibacterial and modulatory activity of the essential oil of *Cinnamomum verum*. The essential oil was obtained from the shells of *Cinnamomum verum*, and the chemical compounds of the essential oil were identified by means of Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry, the antimicrobial effect of *Cinnamomum verum* was verified against standard and multiresistant bacteria and different combinations with different concentrations of essential oil, and antibiotics. To evaluate the essential oil as a modulator of the antibacterial action, the MIC of antibiotics (aminoglycosides) was evaluated in the presence and absence of the substances and the oil in sterile microplates. The major components observed after the chromatography were: linalol (53.53%) and cinnamic aldehyde (30.66%). In relation to the antibacterial activity, the essential oil extracted from the barks of *Cinnamomum verum*, did not present activity, obtaining results $\geq 1024 \mu\text{g} / \text{mL}$ in all species of bacteria tested. Regarding

¹ Discente do Curso de Biomedicina do Centro Universitário Leão Sampaio, Juazeiro do Norte - CE

² Docente do Curso de Biomedicina do Centro Universitário Leão Sampaio, Juazeiro do Norte - CE

the modulation, it obtained satisfactory results when it associated the natural product with the antibiotics only for *Sthaphylococcus aureus*, that is, the natural product has effectiveness in the inhibition of growth. It was concluded that it was not possible to observe that the antibacterial action of *Cinnamomum verum* essential oil against tested strains, however, results were satisfactory only for *S. aureus* in the modulation test. However, new research is needed to analyze the toxicity and effectiveness of the antimicrobial activities of this natural product.

Keywords: Antibacterial. *Cinnamomum verum*. Essential oil.

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais são na maioria das vezes utilizadas por comunidades tradicionalmente com intuito de prevenções, alívios e curas de algumas patologias. Desde as primeiras civilizações, o homem procura uma relação com o ambiente que o rodeia com intuito de aprimorar seus conhecimentos para uma melhor utilização de seus recursos, como por exemplo, as plantas medicinais. Essas propriedades dos produtos naturais estão sendo mais utilizadas e suas descobertas estão sendo repassada pra seus sucessores (BADKE, 2008; DUTRA, 2009).

Com a relevância dos estudos com plantas medicinais com possíveis terapias para a saúde, é preciso um controle de qualidade e uma segurança vigorosa para a legalização dos fármacos produzidos por plantas, para que seu uso e comercio seja mais seguro. Na fitoterapia, o profissional deve possuir um bom entendimento sobre produtos naturais, identificando suas atividades biológicas, toxinas, preparo, contra-indicações e dosagens, podendo disponibilizar um maior conhecimento sobre o conteúdo, com a intenção de produzir uma qualidade, eficácia e aceitação da população (BRASIL, 1988; DUTRA, 2009).

Os compostos que são extraídos dos produtos naturais podem ser usadas em diferentes áreas, em especial, nas indústrias farmacêuticas e alimentícias. Pesquisas vêm mostrando a importância do extrato e óleos essenciais na produção de novos antibióticos e no combate a diversas patologias. Com o aumento do crescimento na resistência de antibióticos, o custo elevado e uma dificuldade de parte população no acesso a esses medicamentos, há uma necessidade de desenvolvimento de novos fármacos, com menores efeitos adversos e intoxicações pelo uso inapropriado, e um custo mais acessível à população (VANIN, 2014; VENTUROSO et al., 2010; GUIMARÃES, 2017).

O Brasil é um país que apresenta espécies variadas de plantas medicinais, entre elas está a *Cinnamomum verum*, conhecido popularmente como canela. A canela é uma das mais remotas especiarias utilizadas. Seu consumo é relatado desde os tempos bíblicos e o controle de seu

comércio foi um dos motores das grandes explorações marítimas. O produto é constituído pela casca seca de diversas espécies do género *Cinnamomum*, família Lauraceae. Os óleos essenciais adquiridos a partir das cascas e das folhas, tem amplo aproveitamento nas indústrias de alimentos e bebidas, de perfumaria e farmacêutica (PURSEGLOVE, 1981)

Atualmente, são necessários estudos para confirmação da eficácia na utilização tradicional de produtos naturais, bem como pesquisas com o intuito de analisar seu metabolismo secundário para observar uma correlação com as atividades biológicas, com isso, na perspectiva de compreender como funcionam as diversas propriedades desenvolvidas por espécies vegetais, o presente trabalho teve como objetivo realizar a caracterização química e avaliar atividade antibacteriana e modulatória do óleo essencial de *Cinnamomum verum*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 TIPO DE ESTUDO

A pesquisa foi do tipo experimental, visto que foram realizados ensaios para evidenciar a atividade antimicrobiana do material vegetal, bem como avaliar o efeito modulador diante a antibióticos utilizados na clínica.

2.2 LOCAL E PERÍODO DE REALIZAÇÃO DOS TESTES

As atividades foram realizadas no Laboratório de Microbiologia do Centro Universitário Leão Sampaio (UNILEÃO), Juazeiro do Norte – CE, durante o período de Agosto e Setembro de 2018.

2.3 MATERIAL VEGETAL

As cascas da espécie *Cinnamomum verum* foram obtidas comercialmente no Mercado Central da Cidade de Juazeiro do Norte – CE.

2.4 OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Cinnamomum verum*

A extração do óleo essencial de *Cinnamomum verum* foi realizada utilizando-se sistema de arraste de vapor, e coletado em um aparelho doseador tipo Cleavenger, modificado por Gottlieb; Magalhães (1960). O procedimento se deu de forma que as cascas de *Cinnamomum verum* foram colocadas em um balão de 5 litros juntamente com 2,5 L de água, e mantido em ebulição por 2 horas. Após obtida a mistura água/óleo no doseador, esta foi separada, tratada com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) e filtrada para haver separação total do óleo e da água.

2.5 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Cinnamomum verum*

A análise dos constituintes químicos do óleo essencial de *Cinnamomum verum* foi realizada usando o equipamento Shimadzu Cromatografia Gasosa, acoplada à Espectrometria de Massas (CG/EM) – QP2010 séries (GC/MS system). A identificação dos componentes individuais foi baseada nas suas fragmentações fundamentadas na biblioteca NIST 08 e por comparação com dados da literatura.

2.6 MEIO DE CULTURA

O Meio Brain Heart Infusion (BHI) foi o meio de cultura das cepas de escolha, preparado de acordo com as especificações sugeridas pelo fabricante.

2.7 MICRORGANISMOS

Os microrganismos utilizados nos testes foram linhagens padrão das seguintes bactérias: *Escherichia coli* 27, *Escherichia Coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* 358 e *Staphylococcus* todas ATCC 6538, ambas disponibilizadas pelo Centro Universitário Leão Sampaio.

2.8 PREPARO E PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO BACTERIANO

As linhagens foram inoculadas em caldo BHI, na concentração indicada pelo fabricante e ficaram incubadas durante 24 horas à temperatura de 35°C para propiciar o desenvolvimento

das cepas bacterianas. Estas suspensões acrescidas de bactérias desenvolvidas foram diluídas na proporção de 1:10 em caldo BHI até o equivalente a 10^5 céls/mL (NCCLSI, 2005).

2.9 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

Para determinação da CIM foi seguido o método de microdiluição em caldo, com concentrações variando de 512 a 8 µg/mL.

2.9.1 Execução e leitura dos ensaios

Esse método utiliza o menor volume de meio de cultura e das soluções teste preparadas a partir do óleo essencial distribuídos em poços nas microplacas estéreis. Os poços de cada placa continham meio de cultura, alguns acrescidos da diluição da solução feita a partir do óleo essencial, outros tinham um controle negativo (contendo somente o meio) e um controle positivo (meio + inóculo), assim como controles de inibição que utilizaram em sua composição solução em concentrações variando de 512 a 8 µg/mL. Foi utilizada concentração dobrada das soluções teste (1024 µg/mL) em relação à inicial definida, e volumes de 100 µL que posteriormente foram diluídas na proporção de 1:2 em caldo BHI. Para cada cavidade, foi distribuído 100 µL do meio e nesse, diluído amostra da suspensão de bactéria na proporção 1:10. As placas preenchidas foram incubadas durante 24 horas a uma temperatura de 35°C.

Para leitura da CIM das amostras, foi preparada uma solução de resazurina sódica (Sigma) em água destilada estéril na concentração de 0,01% (p/v). Após a incubação, 20 µL da solução indicadora foram adicionados em cada cavidade e após o período de 1 hora à temperatura ambiente, foi possível realizar a interpretação dos resultados. A mudança de coloração azul para rosa devido à redução da resazurina indicou o crescimento bacteriano (MANN; MARKHAM, 1998; PALOMINO et al., 2002).

2.10 AVALIAÇÃO DA INTERFERÊNCIA DO ÓLEO ESSENCIAL SOBRE A RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS

Para avaliar o óleo essencial como modulador da ação antibiótica, a CIM de antibióticos (aminoglicosídeos: amicacina e gentamicina) foi avaliada na presença e ausência do óleo em microplacas estéreis. Todos os antibióticos testados foram obtidos junto à Sigma.

2.10.1 Execução e Leitura dos Ensaios

As amostras foram diluídas em caldo BHI 10% em concentrações subinibitórias (MIC/8). A preparação das soluções de antibióticos foi realizada com a adição de água destilada estéril em concentração dobrada (1024 µg/mL) em relação à concentração inicial definida e volumes de 100 µL diluídas de forma seriada 1:2 em caldo BHI 10%. Cada cavidade contém a suspensão bacteriana diluída de 1:10 e os mesmos controles utilizados na determinação da CIM foram utilizados. As placas foram incubadas a 35°C por 24 horas e posteriormente foi adicionada resazurina para a leitura dos resultados.

2.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os testes foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos em média geométrica. Para análise estatística será aplicada ANOVA two-way seguida do teste de Bonferroni, considerando significância de $p \leq 0,05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O óleo essencial das cascas de *Cinnamomum verum* apresentou rendimento de aproximadamente 0,5 %. A identificação e quantificação dos constituintes do óleo essencial obtidos por Cromatografia Gasosa estão representados na tabela 1.

Tabela 1: Principais componentes químicos (%) do óleo essencial das cascas de *Cinnamomum verum*

Componentes	(%)
α -Pino	1,03
Eucaliptol	9,26
Linalol	53,53
4-Thujanol	2,30
α -Terpineol	2,42
Aldeído Cinâmico	30,66
Acetato de Bornila	0,80
Total	100,00

Os componentes majoritários observados após a realização da cromatografia foram: linalol (53,53%) e aldeído cinâmico (30,66%), resultados semelhantes a pesquisas anteriores. Em estudos desenvolvidos por Lima et al. (2005), utilizando óleo essencial extraído dos galhos de *Cinnamomum zeylanicum*, também mostrou linalol, como o composto majoritário, no entanto, em uma concentração diferente. Já Andrade et al. (2012), utilizando óleo essencial da casca de *Cinnamomum zeylanicum*, observou o aldeído cinâmico, como composto majoritário (77,72%),

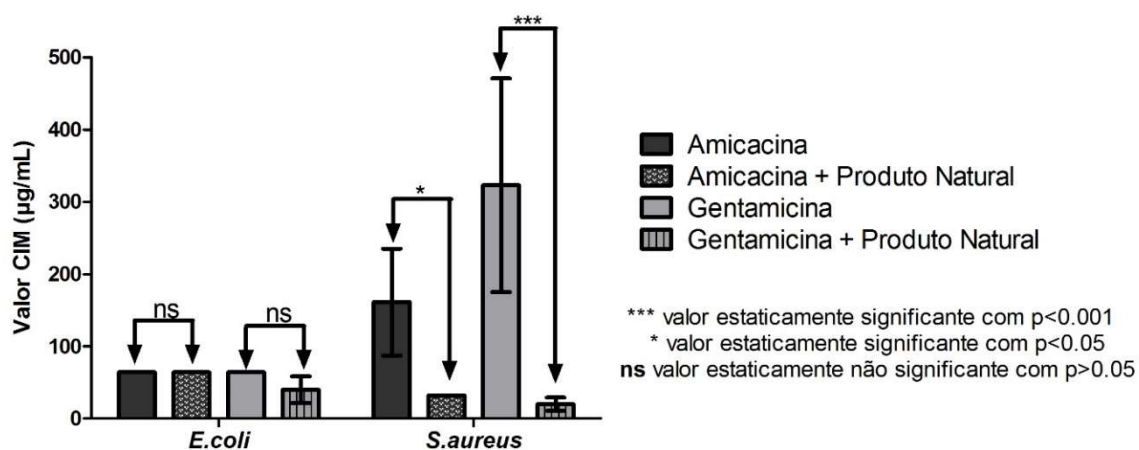
Em outro estudo realizado por Koketsu et al. (1997), utilizando óleo essencial das cascas de *Cinnamomum verum*, mostrou aldeído cinâmico como composto principal, a uma concentração de 40,43%. Essas modificações na composição química podem ser ocasionados por conta do clima, da estação do ano, condições geográficas, período de colheita e a técnica de destilação utilizada para a sua extração (MACIEL et al., 2002).

Em relação à atividade antibacteriana, o óleo essencial extraído das cascas de *Cinnamomum verum*, não apresentou atividade, sendo obtidos resultados $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$ em todas as espécies de bactérias testadas.

Santurio et al. (2007) utilizando óleo essencial da espécie *Cinnamomum zeylanicum*, também obteve resultado de CIM $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$ (3098 $\mu\text{g/mL}$), para *E. coli*, corroborando com o resultado apresentado no presente trabalho.

Na modulação, o óleo essencial do produto foi associado aos antibióticos Amicacina e Gentamicina, para as bactérias multirresistentes *Escherichia coli* 27 e *Staphylococcus aureus* 358. Os resultados obtidos estão representados no Gráfico 1.

Gráfico 1: Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos antibióticos aminoglicosídeos: amicacina e gentamicina na presença e na ausência do óleo essencial.



Com a análise do gráfico, é possível observar que o produto natural associado aos antibióticos, quando testado para *E. coli*, não obteve resultados significativos, entretanto, quando testado para *Staphylococcus aureus*, o produto natural possuiu efetividade na inibição de crescimento quando associado à antibióticos aminoglicosídeos.

Foi observado a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *C. verum* por Chalchat et al. (1991) e observaram uma sensibilidade de cepas bacterianas gram-positivas e gram-negativas, principalmente do gênero *Staphylococcus*, à ação do óleo essencial de *C. verum*.

Na grande parte das vezes, as bactérias Gram-negativas podem ser menos sensíveis contra os óleos essenciais do que as bactérias Gram-positivas, devido a parede celular das Gram-negativas ser rica em polissacarídeos o que dificulta a entrada das substâncias antimicrobianas (BURT, 2004).

Segundo Andrade et al. (2012), o óleo essencial de canela obteve uma inibição favorável do crescimento bacteriano, esse resultado pode estar relacionado com a presença do componente majoritário aldeído cinâmico em elevada concentração (77,72%), quando comparada com as outras plantas estudadas. Segundo Burt (2004), seu mecanismo de ação seria, portanto, semelhante a outros aldeídos, que é normalmente considerado como aquele que provoca danos a lipídios e proteínas.

4. CONCLUSÃO

Conclui-se que não foi possível observar que a ação antibacteriana do óleo essencial de *Cinnamomum verum* frente a cepas testadas, porém obteve-se resultados satisfatórios apenas para *Staphylococcus aureus* no teste de modulação, mostrando que esse produto, quando associado à antibióticos aminoglicosídeos, pode ser uma alternativa para tratar doenças causadas por essa bactéria. Porém é necessária realização de novas pesquisas, para analisar a toxicidade e efetivação das atividades antibacteriana desse produto natural.

REFERENCIAS

ANDRADE, M. A. et al. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. **Revista Ciência Agronômica**. v. 43, n. 2, 2012.

BADKE, M. R. **Conhecimento popular sobre o uso de plantas medicinais e o cuidado de enfermagem**. Dissertação (Mestrado em Enfermagem) Programa de Pós-Graduação em Enfermagem, Universidade Federal de Santa Maria-UFSM, Santa Maria-RS. 2008.

BRASIL. Constituição da República Federativa do Brasil de 1998, **Senado Federal**, 5 de outubro de 1988.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 2004.

CHALCHAT J.C. et al. Correlation chimique/activité antimicrobienne: V – contribution a la comparaison de 2 methodes de detremination des CMI. **Plantes Medic Phytother.** v. 25, n. 1, 1991.

DUTRA, M. G. **Plantas medicinais, fitoterápicos e saúde pública: um diagnóstico situacional em Anápolis, Goiás.** Dissertação (Mestrado Multidisciplinar em Sociedade, Tecnologia e Meio) Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu, Centro Universitário de Anápolis–UniEVANGÉLICA, Anápolis, Goiás. 2009.

GOTTLIEB, O. R.; MAGALHÃES, M. T. Modified distillation trap. **Chemist Analyst.** v. 49, n. 1, 1960.

GUIMARÃES. C. C. 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*. **Revista Brasileira De Biociencias**, v. 15, n.2. 2017.

KOKETSU, M. et al. Óleos essenciais de cascas e folhas de canela (*Cinnamomum verum* presl) cultivada no Paraná. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos.** v. 17, n. 3, 1997.

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

MACIEL, M. A. M. et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Revista Química Nova.** v. 25, n. 3, 2002.

MANN, C. M.; MARKHAM, J. L. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. **Journal of Applied Microbiology.** v. 84, n. 4, 1998.

NCCLS. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement.** CLSI/NCCLS document M100-S15 [ISBN 1-56238-556-9]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2005.

PALOMINO, J. C. et al. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.** v. 46, n. 8, 2002.

PURSEGLOVE, J.W. et al. Cinnamon and cassia. In: Spices. **Tropical Agriculture Series.** v. 2, n. 1, 1981.

SANTURIO, D. F. et al. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos frente a amostras de *Escherichia coli* isoladas de aves e bovinos. **Revista on line de Ciência Rural.** Santa Maria (RS), 2011.

VANIN, A. B. **Propriedades biológicas, antioxidantes e toxicidade do bioaromatizante obtido via esterificação enzimática de óleo essencial do cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus*)**. Dissertação (Doutorado em Engenharia de Alimentos) Programa de Pós Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Regional Integrada, Erechim-RS. 2014.

VENTUROSOSO, L. R. et al. Influência de diferentes metodologias de esterilização sobre a atividade antifúngica de extratos aquosos de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 12, n. 4. 2010.