



UFAM

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE SAÚDE E BIOTECNOLOGIA
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

WARLESON PARENTE DA SILVA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ES-
SENCIAL DO CRAVO DA INDIA (*Syzygium aromaticum*) FRENTE A
CEPAS BACTERIANAS ORIUNDAS DA ÁGUA PARA CONSUMO
HUMANO.

COARI - AM
2022

WARLESON PARENTE DA SILVA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DO CRAVO DA INDIA (*Syzigium aromaticum*) FRENTE A CEPAS BACTERIANAS ORIUNDAS DA ÁGUA PARA CONSUMO HUMANO.

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia do Instituto de Saúde e Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, Instituto de Saúde e Biotecnologia, como requisito avaliativo para aprovação na disciplina TCC IV, bem como para a obtenção do diploma em bacharel em Biotecnologia

Orientador: Prof. Me.: Michel Nasser Correa Lima Chamy

COARI - AM
2022

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S586a Silva, Warleson Parente da Silva
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DO CRAVO DA INDIA (*Syzygium aromaticum*) FRENTE A CEPAS BACTERIANAS ORIUNDAS DA ÁGUA PARA CONSUMO HUMANO. / Warleson Parente da Silva Silva, Warleson Parente . 2022
18 f.: 31 cm.

Orientador: Michel Nasser Correa Lima Chamy
TCC de Graduação (Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Cravo da índia. 2. Efeitos antimicrobianos. 3. Água para consumo humano. 4. Microrganismos patogênicos. I. Chamy, Warleson Parente. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

Folha de aprovação

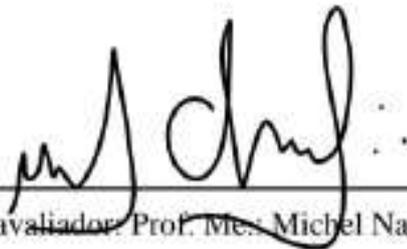
Warleson Parente da Silva

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO
ESSENCIAL DO CRAVO DA ÍNDIA (*Syzygium aromaticum*) FRENTE A
CEPAS BACTERIANAS ORIUNDAS DA ÁGUA PARA CONSUMO
HUMANO.**

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado como requisito parcial para a obtenção de grau de Bacharel em Biotecnologia, pela Universidade Federal do Amazonas.

Data de aprovação: 22 / 09 / 2022

Banca Examinadora:



Presidente/avaliador: Prof. Me.: Michel Nasser Correa Lima

Chamy



Avaliador: Prof. Dr.: Klenicy Kazumy de Lima Yamaguchi



Avaliador: Prof. Me.: Giuliana Rosana da Silva Souza

Sumário

RESUMO

1. INTRODUÇÃO	7
2 OBJETIVOS	9
2.3 GERAL	9
2.4 ESPECÍFICOS	9
2. MATERIAIS E MÉTODOS	10
2.3 AQUISIÇÃO DO CRAVO DA ÍNDIA E EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL	10
2.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	10
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES	11
3.1 OBTENÇÃO DO RENDIMENTO DO ÓLEO	11
3.2 ANÁLISE DO EFEITO ANTIMICROBIANO DO ÓLEO ESSENCIAL	12
CONCLUSÃO	16
CRONOGRAMA DE ATIVIDADES	17
REFERENCIAS	18

RESUMO

Á água é um elemento químico indispensável e essencial para a manutenção da vida, o que a torna um componente importante na saúde pública. Em contrapartida, a água pode ser considerada como uma via para a transmissão de doenças, especialmente, aquelas causadas por microrganismos patogênicos que podem ou não apresentar resistência a antibióticos. Atualmente, sabe-se que microrganismos, em especial, resistentes a antibióticos são considerados uma grande ameaça para os tratamentos modernos, ceifando a vida de milhões de pessoas ao redor do mundo. Nesse cenário, tem sido crescente a busca por novas alternativas com potencial de amenizar tal problemática. Dessa forma, os componentes provenientes dos produtos naturais, mostram-se promissores no combate a disseminação de cepas bacterianas patogênicas ao homem, dentre os quais podemos destacar, o óleo essencial de *Syzigium aromaticum*, que têm se demonstrando como um potente agente antimicrobiano. Portanto, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana de *Syzigium aromaticum* frente a cepas bacterianas oriundas de água para consumo humano. As cepas bacterianas foram isoladas a partir de amostras de água para consumo humano oriundas do projeto maior intitulado “IMPACTO DOS EVENTOS CLIMÁTICOS (INUNDAÇÕES E SECA) NA QUALIDADE DA ÁGUA DE CONSUMO DE INDIVÍDUOS MORADORES DE CASAS FLUTUANTES NO AMAZONAS”. Os efeitos do óleo essencial foram avaliados por meio da Técnica de Difusão em Disco em adaptação com o Teste de Sensibilidade aos antimicrobianos. Os resultados mostram que o óleo essencial, em todas as concentrações, apresentou atividade antibacteriana satisfatória com diâmetros máximo de 26, 22 e 21 mm para *Salmonella spp.* (C13_Tefé), *Vibrio spp.* (C1_Coari) e *Salmonella spp.* (C5_Tefé). Ademais, apresentou atividade notável aos que apresentaram resistência ao Cloranfenicol (30 µg), em especial, *Vibrio spp.* (C13_Tefé) e *Vibrio spp.* (C4_Tefé) com diâmetro de 24 e 23 mm respectivamente. Nossos achados sugerem tal componente como uma possível alternativa válida para tratar infecções, especialmente, aquelas causadas por cepas bacterianas de *Vibrio spp.* e *Salmonella spp.* presentes na água para consumo humano. No entanto, estudos adicionais precisam ser realizados para elucidar o perfil de citotoxicidade do óleo essencial em modelos experimentais.

Palavras - chave: Cravo da Índia, Efeitos antimicrobiano, água para consumo humano, microrganismos patogênicos.

1. INTRODUÇÃO

A água é um componente químico essencial e imprescindível para a manutenção e, conseqüentemente, a existência da vida, em nosso planeta, o que a torna um elemento importante na saúde pública (FRAZÃO; PERES; CURY, 2011). Nesse parâmetro, de acordo com a Portaria GM/MS Nº 888, de 4 de maio de 2021, a água para consumo humano: água potável destinada a ingestão, preparação de alimentos e à higiene pessoal, independentemente de sua origem (BRASIL, 2021). Apesar disso, a água é considerada um importante veículo de transmissão de doenças e estima-se, globalmente, que 2 milhões de pessoas usam uma fonte de água contaminada com fezes (MARQUEZI; GALLO; DIAS, 2010.; OMS, 2022). Ademais, a água contaminada pode transmitir doenças como diarreia, cólera, desinteira, febre tifoide e poliomielite, assim, causando, anualmente, aproximadamente, 485.000 mortes por doenças diarreicas (Organização Mundial de Saúde, 2022).

Em meio a esses microrganismos patogênicos, podemos destacar, também, aqueles resistentes aos antibióticos, que, por sua vez, circulam, por meio de uma rede complexa, entre humano, animal e ambiente (LARSON et al, 2019). Nesse aspecto, estudos anteriores realizados em uma comunidade remota, na Amazônia peruana, evidenciou *Escherichia coli* com altos níveis de resistência adquirida a antibióticos de primeira geração, com exposição mínima a antibióticos (BARTOLONI et al, 2008). Outro estudo nos revela que lagos andinos de alta altitude, no deserto de Puna, completamente isolados, abrigavam uma abundante diversidade de bactérias resistentes a antibióticos (DIB et al, 2009). A partir desses dados, percebe-se que a resistência a antibióticos de certos microrganismos não se dá, somente, por meio do uso repetido e prolongado de antibióticos, mas, também, por fatores ambientais.

Nesse cenário, é sabido que os microrganismos resistentes são considerados uma grande ameaça para os tratamentos modernos, comprometendo a saúde de muitos e, em algumas situações, levando a morte (CASSINI et al, 2018). Estima-se que, na Europa, por paciente infectado por organismo resistente a antibiótico, os hospitais gastam cerca de US\$ 10.000 a 40.000, o que resulta a impactos econômicos severos (FRIEDMAN; TEMKIN; CARMELI, 2016). Ademais, estima-se que só na União Europeia ocorram mais de 670,000 infecções por patógenos resistentes a antibióticos, em consequência, ceifando mais de 33,000 vidas e causando um impacto econômico de mais de 1 bilhão de

euros (KAKOULLIS et al, 2021). Nesse aspecto, em comparação com a Europa e Estados Unidos, o Brasil e os Países da América Latina, em geral, apresentam níveis mais altos de resistência bacteriana entre a maioria dos seus principais patógenos (ROSSI, 2011).

Mediante a estes fatos, torna-se imperativo medidas para amenizar esse problema de saúde pública ocasionado por microrganismos de importância médica resistentes a antibióticos ou não que podem estar, também, presentes na água para consumo humano. Em vista disso, os componentes químicos provenientes dos produtos naturais apresentam-se como um recurso infinito para o desenvolvimento de novas opções terapêuticas direcionadas para uma infinidade de doenças (RATES, 2012). Historicamente, os produtos naturais têm sido a espinha dorsal do sistema tradicional na cura de doenças e também são parte integrante da cultura apresentando grande potencial para o desenvolvimento de medicamentos modernos, inclusive, para agentes antibacterianos (VEERESHAM, 2012).

Nesse seguimento, estudos destacam o óleo essencial do Cravo da Índia (*Syzigium aromaticum*) como um potente agente antimicrobiano, apresentando atividade inibitória frente a vários microrganismos patogênicos, tais como *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. typhimurium* (XU et al, 2016; DEVI et al, 2010; RADÜNZ et al, 2019). Ademais, inibiu significativamente o crescimento de *S. suis* multirresistente a antibióticos, assim, sugerindo como um produto alternativo promissor para o controle de doenças infecciosas em humanos e animais ocasionadas por esse patógeno (WONGSAWAN et al, 2020).

Embora esses dados demonstrarem o efeito antibactericida do óleo essencial do Cravo da Índia, em diferentes microrganismos, ainda não existem evidências quanto a avaliação dos seus efeitos antimicrobianos frente cepas bacterianas de importância médica obtidas da água para consumo humano, na região amazônica. Logo, o objetivo deste trabalho é investigar o efeito antimicrobianos do óleo essencial de *Syzigium aromaticum* de amostras de água para consumo humano.

2 OBJETIVOS

2.3 GERAL

Avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial do cravo da índia, frente a microrganismos de importância médica isolados de amostras de água para consumo humano.

2.4 ESPECÍFICOS

Testar a atividade antimicrobiana do óleo essencial do cravo da índia em diferentes concentrações;

Comparar a zona de inibição do antibiótico com a do óleo essencial;

Medir o perfil de resistência a antibióticos das cepas bacterianas isoladas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.3 AQUISIÇÃO DO CRAVO DA ÍNDIA E EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

O cravo da Índia foi obtido comercialmente e levado para o Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Amazonas, onde os botões de cravo foram lavados com água destilada, pesados em balança analítica. O óleo essencial foi extraído por meio do processo de hidrodestilação por arraste a vapor com o auxílio de um Clevenger (ASBAHANI et al, 2015).

Os botões de cravo (98g) foram transferidos ao erlenmeyer de 1L e adicionado 700mL de água destilada, em seguida, montou-se o sistema de destilação, que foi ligado ao erlenmeyer, foi aplicado calor (100°C), por meio da chapa aquecedora. Feito a extração, o óleo foi transferido para tubos falcon de 15 ml e centrifugados a 2,500 rpm por 3 minutos, para separar a água do óleo, que, por sua vez, foi retirado com o auxílio de uma pipeta e transferido para um tubo falcon de 15 mL, em sequência, foi calculado o rendimento, identificado com data e nome e transferido para a geladeira para evitar a perda e para uso posterior nos testes de ação antimicrobiana. Por fim, para fins experimentais, o óleo foi diluído com dimetilsulfóxido (DMSO) em diferentes concentrações (90%, 70% e 40%).

2.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

As cepas bacterianas foram isoladas a partir de amostras de água para consumo humano oriundas do projeto maior intitulado “IMPACTO DOS EVENTOS CLIMÁTICOS (INUNDAÇÕES E SECA) NA QUALIDADE DA ÁGUA DE CONSUMO DE INDIVÍDUOS MORADORES DE CASAS FLUTUANTES NO AMAZONAS”.

Para avaliar a sensibilidade das cepas aos antimicrobianos, empregou-se o Teste de Sensibilidade aos Antibióticos (TSA). Esse teste é um procedimento laboratorial realizado por tecnólogos médicos (cientistas de laboratório clínicos) para identificar qual regime antimicrobiano é especificamente eficaz para pacientes individuais (BAYOT; BRAGG et al, 2021).

Inicialmente, o meio de cultura foi preparado por meio de ágar Müeller Hinton, o qual foi esterilizado em autoclave, por 20 minutos a 1 atm (121°C), e dispensado nas placas de Petri, posteriormente, armazenado na geladeira. Na etapa seguinte, as placas de Petri contendo ágar Müeller Hinton foram retiradas da geladeira, a fim de atingir a temperatura ambiente, em seguida, com o auxílio de um *swab*, realizou-se a inoculação bacteriana uniformemente por toda a placa, na suspensão bacteriana na escala 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Em sequência, os discos utilizado como controle positivo (Cloranfenicol) foram adicionados ao meio bacteriano com o auxílio de uma pinça estéril. Feito isso, as placas foram incubadas por 24 horas na temperatura de 36° C. Após esse período, os halos de inibição foram mensurados com o auxílio de um paquímetro.

Os testes de sensibilidade ao óleo essencial foram realizados pela técnica de difusão em disco. Por meio dessa técnica, é possível saber a suscetibilidade de um microrganismo quanto entra em contato com substancias específicas, como é o caso dos produtos naturais (BAUER et al, 1966). Os padrões do procedimento da técnica quanto ao preparo do meio, esterilização, adição dos discos e incubação foram os mesmos realizados no Testes de Sensibilidade aos Antimicrobianos (TSA).

Para isso, foram confeccionados discos de papel filtro seco medindo 6 mm de diâmetro, posteriormente, foram esterilizados por autoclave, acondicionados dentro de placas, a 1 atm (121°C). Em sequência, foram impregnados com o óleo essencial, que foi diluído com DMSO em concentrações distintas (90%, 70% e 40%). Como controle positivo usou-se o antibiótico Cloranfenicol, e o DMSO como controle negativo.

Por fim, verificou-se a presença ou ausência de halos, os quais foram mensurados com o auxílio de um paquímetro e comparados com o halo de inibição dos antibióticos, de acordo com os parâmetros da Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI (CLSI, 2020).

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 OBTENÇÃO DO RENDIMENTO DO ÓLEO

O rendimento foi calculado em função do volume do óleo (4mL) dividido pela massa (98 g) de material utilizado. Após 8 horas de extração, obteve-se um rendimento de 4%.

3.2 ANÁLISE DO EFEITO ANTIMICROBIANO DO ÓLEO ESSENCIAL

Atualmente, está documentado que o óleo essencial do cravo da Índia tem efeitos antibactericida ou bacteriostático quando testadas em diferentes cepas bacterianas de importância médica (XU et al, 2016; DEVI et al, 2010; RADÜNZ et al, 2019; WONGSAWAN et al, 2020).

Existem evidências de que o efeito antimicrobiano do óleo essencial do cravo da Índia se dá pela sua característica lipofílica, o que permite uma interação do óleo e os lipídeos da membrana bacteriana, alterando sua permeabilidade (RADÜNZ et al, 2019). Outros estudos sugerem que o eugenol, também, esteja por trás do mecanismo de ação através do qual o óleo inibe o crescimento de bactérias (WENDAKOON; SAKAGUCHI, 1993; THOROSKI; BLANK; BILIADERIS, 1989.). Destaca-se que o eugenol é o componente majoritário do óleo essencial de *S. aromaticum* representando pelo menos 50% de sua composição, os 10-40% restantes são compostos de acetato de augenila, β -cariofileno e α -humuleno (GONZÁLEZ et al, 2021). Nesse sentido, o óleo exerce seus efeitos por meio de suas características lipofílicas e pela presença de eugenol em associação com os demais componentes químicos, onde potencializam sinergicamente a ação antimicrobiana do óleo essencial (LEE et al, 2009).

Nossos dados mostram, nas tabelas abaixo, sua eficácia frente a cepas bacterianas de *Vibrios spp.* e *Salmonela spp.* isoladas de amostras de água para consumo humano.

Tabela 1 - Diâmetro dos halos de acordo com as concentrações testadas em *Vibrio sp.* isolados de amostras de água. Coari e Tefé, Amazonas, Brasil. 2022.

<i>Vibrio spp.</i>	Diâmetro dos halos (mm)				
	90%	70%	40%	DMSO	Clor. (30 μ g)
C1_Coari	22	15	12	0	32
C7_Coari	6	11	13	0	16
C8_Coari	10	11	9	0	27
C12_Coari	14	15	13	0	20
C15_Coari	9	9	8	0	6
C16_Coari	8	11	13	0	6
C4_Tefé	23	26	8	0	6
C8_Tefé	9	9	19	0	11
C13_Tefé	24	22	16	0	6

Clor.: Cloranfenicol (30 μ g).

Tabela 2- Perfil de sensibilidade da cepa de *Vibrio spp.* ao antibiótico Cloranfenicol (30µg), Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI, 2020.

Perfil de Sensibilidade ao antibiótico Cloranfenicol (30µg)		
S	I	R
≥18	13-17	12 ≤

Critérios interpretativos: **S** = Sensível; **I** = Intermediário; **R** = Resistente

Os valores dos halos de inibição são representados na tabela 1 e comparados com as normas da Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI, 2020, na tabela 2, onde nota-se que o óleo essencial apresentou efeito antimicrobiano frente as cepas isoladas testadas. Como esperado, não houve zona de inibição no controle negativo (DMSO), porém houve no controle positivo (Cloranfenicol 30µg) com halos em diferentes diâmetros.

O *Vibrios spp.* é um patógeno de importância médica, Gram-negativo, causador da vibriose, que é uma infecção transmitida por meio da água contaminada levando a manifestações clínicas gastrointestinais leves e autolimitadas (AUSTIN et al, 2018). De maneira semelhante, a *Salmonela spp.*, Gram-negativo, é considerada um dos principais patógenos causadores de doenças diarreica aguda, onde o quadro clínico varia de uma gastroenterite comum a febres entéricas que são potencialmente fatais e requerem tratamento com o antibiótico correto e de imediato (POPA; PAPA, 2021).

Na tabela 1, percebe-se que de *Vibrio spp.* das amostras C15, C16_Coari apresentaram resistência tanto ao antibiótico quanto ao óleo e, somente, em *Vibrio spp.* relativo a C16_Coari, o óleo na concentração de 40% demonstrou efeito antimicrobiano dentro dos parâmetros considerado intermediários do antibiótico. Concomitantemente, as cepas de *Vibrio spp.* provenientes das amostras C4, C13_Tefé, também, demonstraram resistência ao Cloranfenicol (30µg) com halos no diâmetro menor que dezessete mm (17 mm). Porém, em particular, o óleo de *Syzygium aromaticum* (70%) apresentou ação antimicrobiana de amplo espectro com diâmetro máximo de 26 mm para *Vibrio spp.* da C4_Tefé e 24 mm em *Vibrio spp.* da C13_Tefé para a concentração de 90%, o que indica que o óleo também apresentou atividade contra uma cepa resistente a antibiótico.

Com relação a *Salmonella spp.*, os efeitos antimicrobiano do óleo, também, demonstrou ser promissor, em todas as concentrações, particularmente, frente as cepas de C5 e C13_Tefé, onde os halos apresentaram valores superiores, quando comparados aos parâmetros de sensibilidade da Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI.2020 para cloranfeicol (30µg). Já a cepa de *Salmonella sp.* da C9_Codajás apresentou uma baixa sensibilidade ao óleo, mas exibiu sensibilidade considerável ao antibiótico, como mostrado na **Tabela 3** em comparação com os parâmetros estabelecidos pela Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI, 2020, na tabela 4.

Tabela 3 - Diâmetros dos halos de acordo com as concentrações testadas em *Salmonella spp.* isolados de amostras de água. Codajás e Tefé, Amazonas, Brasil. 2022

<i>Salmo- nela spp.</i>	Diâmetro dos halos (mm)				
	90%	70%	40%	DMSO	Clora. (30µg)
C9_Co- dajás	11	11	12	0	19
C5_Tefé	21	20	19	0	24
C13_Tefé	26	23	19	0	34

Clor.: Cloranfenicol (30µg)

Tabela 4 - Perfil de sensibilidade da cepa de *Salmonella spp.* ao antibiótico Cloranfenicol (30µg), Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI, 2020.

Perfil de Sensibilidade ao antibiótico Cloranfenicol (30µg)		
S	I	R
≥18	13-17	12 ≤

Critérios interpretativos: **S** = Sensível; **I** = Intermediário; **R** = Resistente.

De maneira geral, o óleo essencial apresentou afeito antimicrobiano frente a todas as cepas testadas, em diferentes intensidades, onde, das doze (12) cepas testadas, seis (6) apresentaram sensibilidade notável ao óleo essência de *Syzigium aromaticum* para todas as concentrações, enquanto uma baixa atividade antibactericida foi exercida pelas demais cepas quando comparadas com os valores intermediários do antibiótico utilizado.

Nessa perspectiva, somando nossos dados com os da literatura o óleo essencial de *Syzigium aromaticum* tem potencial de reduzir ou inibir o crescimento de cepas bacterianas, especialmente, aquelas oriundas de água para consumo humano, *Salmonella spp.* e *Vibrio spp.* provando ser um possível antimicrobiano no controle ou combate da disseminação desses patógenos. No entanto, apesar dos produtos naturais serem mais bem tolerados no corpo humano, geralmente, com menos efeitos colaterais, estudos necessitam ser realizado para esclarecer o perfil de citotoxicidade em modelos experimentais (WINSKA et al, 2019).

CONCLUSÃO

Com base em nossos resultados, o óleo essencial do Cravo da Índia (*Syzygium aromaticum*) demonstrou atividade antimicrobiana promissora contra patógenos de importância médica oriundos da água para consumo humano, quando comparados com os diâmetros do óleo essencial com o do antibiótico, pois, em algumas concentrações, os diâmetros dos halos se equiparavam. Em relação ao antimicrobiano Cloranfenicol utilizado como controle positivo, como observado nas tabelas, foi capaz de inibir o crescimento microbiano de algumas cepas e outras não, quando comparados com o efeito do óleo essencial, que demonstrou efeito positivo frente cepas resistentes.

Esses dados sugerem uma possível alternativa válida para o tratamento de infecções ocasionadas por cepas de *Vibrio spp.* e *Salmonella spp.* oriundas de água para consumo humano. Nessa perspectiva, estudos adicionais quanto ao perfil de citotoxicidade precisam ser realizados em modelos experimentais, *in vivo* ou *in vitro*, a fim de elucidar os principais efeitos no organismo humano.

CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

Descrição	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set
Revisão de literatura	x	x		x	x	x	x
Aquisição do comercial do produto	x						
Extração do óleo essencial	x	x					
Avaliação da atividade antimicrobiana		x		x	x	x	x
Interpretação dos resultados		x		x	x	x	x
Apresentação dos resultados obtidos							X

REFERENCIAS

- AUSTIN. C, B. et al. *Vibrio spp.* Infections. **Nature Reviews Disease Primers**. 2018. Weymouth, v. 4, n. 1, p. 1-19, jun./dec. 2018.
- ASBAHANI. A. E. et al. Essential oils: From extraction to encapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**. Lyon, v. 483, n.2, p. 220-243, abr. 2015.
- BAYOT. M, I.; BRAGG.; B, N. Antimicrobial Susceptibility Testing. **StatPearls Publishing**, Florida, oct. 2021.
- BAUER. A, W. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **Am J Clin Patho**. v. 45, n. 4, p. 493-6, 1966.
- BARTOLONI. A. et al. Antibiotic resistance in a very remote Amazonas community. **Int J Antimicrob Agents**. Firenze, v. 33, n. 2, p. 125-129, ver. 2008.
- BRASIL. PORTARIA GM/MS Nº 888, DE 4 DE MAIO DE 2021. Ministério da saúde. Gabinete do ministro. 2021.
- Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI, 2020.
- DEVI. K, P. et al. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. **J Ethnopharmacol**. v. 130, n. 1, p. 107-115, jul. 2010.
- CASSINI. A. et al. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. **Lancet Infect Dis**. Solna, v. 19, n.1, p. 56-66, p. 107-115, jan. 2018.
- DIB. J. et al. Isolation of bacteria from remote high altitude Andean lakes able to grow in the presence of antibiotics. **Recent Pat Antiinfect Drug Discov**, v. 4, n. 1, p. 66-76, jan. 2009.
- FRAZÃO. P.; PERES. M, A.; CURY. J, A. Qualidade da água para consumo humano e concentração de fluoreto. **Rev Saúde Pública**. São Paulo. v. 45, n. 5, p. 964-73, ago. 2011.
- FRIEDMAN. N. D.; TEMKIN. E.; CARMELI. Y. The negative impact of antibiotic resistance. **Clin Microbiol Infect**, Aviv, v. 22, n. 5, p. 416-422, mai. 2016.
- GOZÁLEZ. J. N. H. et al. Clove Essential Oil (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): Extraction, Chemical Composition, Food Applications, and Essential Bioactivity for Human Health. **Molecules**. Guadalajara, v. 26, n. 21, p. 2-25, ago./ oct., 2021.
- LARSON. A. et al. Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* in Drinking Water Samples from Rural Andean Households in Cajamarca. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. Lima, v. 100 n. 6, set./ fev. 2019.
- LEE. S. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Syzygium aromaticum* flower bud (Clove) against fish systemic bacteria isolated from

aquaculture sites. **Frontiers of Agriculture in China**. Kuala Terengganu. v. 3, n. 3, p.332-336, jan./Feb. 2009.

MARQUEZI. M, C.; GALLO. C, R.; DIAS. C, T, S. Comparação entre métodos para a análise de coliformes totais e *E. coli* em amostras de água. **Rev Inst Adolfo Lutz**. São Paulo, v. 69, n. 3, p. 291-6, set. 2010.

Organização Mundial de Saúde. (2022, 21 de março). Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/drinking-water#:~:text=Contaminated%20water%20and%20poor%20sanitation,hepatitis%20A%2C%20typhoid%20and%20polio>. Acesso em: 18 de agosto, 2022.

POPA. G, L.; PAPA. M, L. *Salmonella spp.* infection - a continuous threat worldwide. **GERMS**. Bucharest, v. 12, n. 2, p.88-96, Ago./ Ferv. 2021.

RATES. S, M, K. Plants as a source of drugs. **Toxicon**, Rio Grande do Sul, v. 39, n. 5, p. 603-613, mai, 2001.

RADÜNZ. M. et al. Antimicrobial and antioxidant activity of unencapsulated and encapsulated clove (*Syzygium aromaticum*, L.) essential oil. **Food Chemistry**. Pelotas, v. 276, p. 180-186, mar. 2019.

ROSSI. F. The Challenges of Antimicrobial Resistance in Brazil. **Clinical Infectious Diseases**. São Paulo, v. 52, n. 9, p.1138-1143, mai. 2011.

THOROSKI. J.; BLANK. B.; BILIADERIS. C. Eugenol Induced Inhibition of Extracellular Enzyme Production by *Bacillus subtilis*. **J Food Pro. Manitoba**, v. 52, n. 6, p. 399-403, jun. 1989.

KAKOULLIS. L. et al. Mechanisms of Antibiotic Resistance in Important Gram-Positive and Gram-Negative Pathogens and Novel Antibiotic Solutions. **Antibiotics**, Patras, v. 10, n. 4, p. 415, Apr. 2021.

VEERESHAM. S. Natural products derived from plants as a source of drugs. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**. Andhra Pradesh, v. 3, n. 4, p. 200-201, dez. 2011.

XU. J, G. et al. Chemical Composition, Antibacterial Properties and Mechanism of Action of Essential Oil from Clove Buds against *Staphylococcus aureus*. **Molecules**. Linfen, v. 21, n. 9, p. 1-194, 2016.

WINSKA. K. et al. settings Open AccessReview Essential Oils as Antimicrobial Agents—Myth or Real Alternative?. **Molecules**. Norwida, v. 24, n. 11, ab./ jun. 2019.

WONGSAWAN. K. et al. Bactericidal Effect of Clove Oil against Multidrug-Resistant *Streptococcus suis* Isolated from Human Patients and Slaughtered Pigs. **Pathogens**, Chiang, v. 9, n. 1, p.2-12, dec. 2020.

WENDA KOON. C.; SAKAGUCHI. C. Combined Effect of Sodium Chloride and Clove on Growth and Biogenic Amine Formation of *Enterobacter aerogenes* in Mackerel Muscle Extract. **J Food Prot**. Kyoto, v.56, n. 5, p. 410-413, mai. 1993.