

UNIVERSIDADE VILA VELHA – ES

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE CONSTITUINTES DO ÓLEO
ESSENCIAL DE *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March e
DERIVADOS DO EUGENOL**

DIDLEY SÂMIA PAIVA CAZELLI

VILA VELHA

ABRIL DE 2014

UNIVERSIDADE VILA VELHA – ES

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE CONSTITUINTES DO ÓLEO
ESSENCIAL DE *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March e
DERIVADOS DO EUGENOL**

Dissertação apresentada à
Universidade Vila Velha, como pré-
requisito do Programa de Pós-
graduação em Ciências
Farmacêuticas, para a obtenção do
grau de Mestre em Ciências
Farmacêuticas.

DIDLEY SÂMIA PAIVA CAZELLI

VILA VELHA

ABRIL DE 2014

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

C386a Cazelli, Didley Sâmia Paiva.

Atividade antimicrobiana de constituintes do óleo essencial de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March e derivados do eugenol / Didley Sâmia Paiva Cazelli. – 2014.

58 f.: il.

Orientador: Denise Coutinho Endringer.

Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Vila Velha, 2014.

Inclui bibliografias.

1. Microorganismos. 2. Antissépticos. 3. Agentes antiinflamatórios. I. Endringer, Denise Coutinho. II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 581

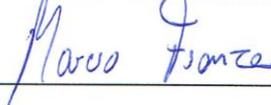
DIDLEY SÂMIA PAIVA CAZELLI

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE CONSTITUINTES DO ÓLEO
ESSENCIAL DE *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March e
DERIVADOS DO EUGENOL

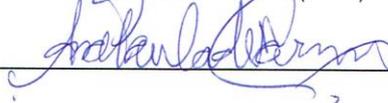
Dissertação apresentada à Universidade Vila
Velha como pré-requisito do Programa de
Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas,
para obtenção do grau de Mestre em
Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 25 de abril de 2014.

Banca examinadora:



Prof. Dr.^a Marcio Fronza (UWV)



Prof. Dr.^a Ana Paula do Carmo (IFES)



Prof. Dr.^a Denise Coutinho Endringer (UWV)

(Orientadora)

A Deus por me dar a oportunidade de conhecer o novo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela concretização de mais um sonho, ao meu marido Celton por entender e me apoiar desde o início na busca da minha realização profissional e pessoal, por cuidar da casa tão bem e por abrir mão de vários feriados. Você é um exemplo de homem!

A minha família por acreditar na minha capacidade de conciliar o trabalho com estudo, em especial a minha querida mãe pelo apoio incondicional e oração. A minha irmã Juliana pela ajuda e por estar ao meu lado nos momentos de necessidade. A minha secretária do lar, Josi pelos lanchinhos espontâneos e pelas palavras de incentivo.

Ao meu novo amigo Otávio, que tem o dom de ensinar e ser gentil. Você nasceu para ser mestre. Esta é a sua vocação! Obrigada por tudo.

A minha amiga Michelle Barrella pela torcida super positiva e ajuda! A minha amiga Mayara, pela ajuda e alegria de sempre e a Ana Cláudia pela ajuda no laboratório e incentivo. Ao Denis, por ser prestativo, na ajuda com os slides.

A Professora Fernanda Lessa pela ajuda com a microbiologia, e pelas conversas que nunca nos faltava. Muito obrigada pela ajuda!

A minha querida professora Denise Endringer, que tive a oportunidade de reencontrar, depois da graduação. Muito obrigada por dividir comigo seus conhecimentos, pela paciência, pela agilidade impressionante como respondia os meus e-mails e por sempre estar disposta a me atender. Meu Deus, como ela dá conta de tudo isso? Ainda estando grávida de dois juvenzinhos! Desejo o melhor para vocês, e que sejam uma família abençoada.

A minha instituição de ensino atual Chales Darwin, pela compreensão e por me apoiar na busca de qualificação profissional e pessoal, obrigada a todos os meus amigos de trabalho que sempre tiveram uma palavra positiva quando estava literalmente cansada! Ah, meus queridos alunos também! Vocês são fundamentais nesta busca pelo conhecimento.

É claro, ao baby que acabou de avisar que está chegando, com muita inteligência só esperou a notícia que teria uma mãe mestre. Estamos muito felizes com sua chegada, já te amamos! (in memoriam).

"Só é lutador quem sabe lutar consigo mesmo."
Carlos Drummond de Andrade

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1	Composição química do óleo de <i>Protium heptaphyllum</i> obtidos nos anos de 2009, 2011 e 2013.	29
Tabela 2	Composição química das frações e sub-frações do óleo de <i>Protium heptaphyllum</i> em 2013.	30
Tabela 3	Concentração inibitória mínima dos óleos e das frações de <i>Protium heptaphyllum</i> .	31

CAPÍTULO II

Tabela 1	Concentração inibitória mínima (mg/mL) do eugenol e derivados	57
-----------------	---------------------------------------------------------------	----

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

- | | | |
|-----------------|----------------------------------------------|----|
| Figura 1 | Estrutura molecular do eugenol. | 57 |
| Figura 2 | Estrutura molecular dos derivados do eugenol | 58 |

RESUMO

Cazelli, Didley Sâmia Paiva, M. Sc., Universidade Vila Velha-ES, abril de 2014. **Atividade Antimicrobiana de Constituintes do Óleo Essencial de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March e Derivados do Eugenol.** Orientadora: Denise Coutinho Endringer. Co-orientadora: Fernanda Campus Rossetti Lessa

O óleo essencial da espécie *Protium heptaphyllum* e o eugenol apresentam atividade antimicrobiana, anti-inflamatória e anticarcinogênica. Objetivou-se analisar a atividade antimicrobiana do óleo essencial do *P. heptaphyllum* e do eugenol e seus derivados. As resinas de *P. heptaphyllum* foram coletadas nos anos de 2009, 2011 e 2013, no mesmo espécime, sendo o óleo essencial obtido por hidrodestilação, utilizando o destilador Clevenger. Sua composição química foi determinada por CG/EM. Os derivados do eugenol foram sintetizados por métodos clássicos. A análise antimicrobiana foi pela determinação da concentração inibitória mínima contra os micro-organismos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*. O óleo essencial *P. heptaphyllum* coletado em 2013 foi submetido a fracionamento em sílica gel, usando série eluotrópica. Os componentes majoritários de *P. heptaphyllum* identificados nos anos de 2009 foram terpinoleno, limoneno e 3-careno. Os óleos obtidos nos três anos foram classificados como fortes contra as linhagens de *S. mutans* (CIM = 0,5 mg/mL), contra *C. albicans* (CIM = 0,5 mg/mL), (CIM = 0,06 mg/mL) nos anos de 2009 e 2013, respectivamente, e *E. faecalis* (CIM = 0,5 mg/mL), em 2009. Em 2013, a mistura das frações de p-cimeno-8-ol e cis-pinocarveol; p-cimeno-8-ol e α -felandreno apresentaram resultados mais satisfatórios de CIM contra as linhagens testadas de *C. albicans*, *S. mutans*, *S. aureus* e *E. coli*, sendo mais ativas que o óleo bruto de *P. heptaphyllum*. O eugenol não apresentou atividade antimicrobiana, com CIM superior a 0,5 mg/mL. Entretanto, os derivados 2-metoxi-4-(prop-2-en-1-il) fenoxi metanol (2), O-galactosídeo do eugenol (9) e O-acetil eugenol (10) apresentaram forte atividade antimicrobiana contra as três linhagens testadas de *S. aureus*, *E. coli* e *S. mutans*. Sendo que os derivados (2) e (10) apresentaram a mesma média de inibição. Em todos os casos, durante o uso do óleo essencial de *P. heptaphyllum* e suas frações; do eugenol e seus derivados foi confirmado a morte ou inativação de determinados micro-organismos testados, sendo que, alguns micro-organismos foram mais sensíveis dependendo da amostra e da sua concentração analisada.

Palavras chaves: *Protium heptaphyllum*, Eugenol, Derivados, Micro-organismos.

ABSTRACT

Cazelli, Didley Sâmia Paiva, M. Sc., Vila Velha-ES University, March 2014. **Antimicrobial Activities of Constituents of essential oil of *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March and eugenol derivatives.** Advisor: Denise Coutinho Endringer. Co-advisor: Fernanda Lessa Campus Rossetti.

The essential oil of *Protium* species *heptaphyllum* and eugenol have antimicrobial, anti-inflammatory and anticarcinogenic activities. This study aimed to analyze the antimicrobial activity of the essential oil of *P. heptaphyllum* and eugenol and its derivatives. Resins *P. heptaphyllum* were collected in the years 2009, 2011 and 2013, in the same specimen, and the essential oil obtained by hydrodistillation with the use of Clevenger distiller. Its chemical composition was determined by GC/MS. The derivatives were eugenol synthesized by conventional methods. The antimicrobial analysis was by determination of minimal inhibitory concentrations against the microorganisms *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans* and *Streptococcus mutans*. The essential oil *P. heptaphyllum* collected in 2013 was fractionated on silica gel, using eluotropic series. The major components identified in *P. heptaphyllum* year 2009 were terpinolene, limonene and 3-carene. The oils obtained in the three years were classified as strong against strains of *S. mutans* (MIC = 0.5 mg / mL) against *C. albicans* (MIC = 0.5 mg/mL), (MIC = 0.06 mg/mL) in the years 2009 and 2013, respectively, and *E. faecalis* (MIC = 0.5 mg/mL) in 2009 in 2013, the mixture of fractions of p-cymene-8-ol and cis-pinocarveol; p-cymene-8-ol and α -phellandrene showed more satisfactory MIC results against tested strains of *C. albicans*, *S. mutans*, *S. aureus* and *E. coli*, being more active than the crude oil from *P. heptaphyllum*. The eugenol showed no antimicrobial activity, with more than 0.5 mg/mL CIM. However, derivatives 2-methoxy-4-(prop-2-en-1-yl) phenoxy Methanol (2) eugenol O-galactoside (9) and O-acetyl eugenol (10) showed strong antimicrobial activity against all three tested strains of *S. aureus*, *E. coli* and *S. mutans*. Since derivative (2) and (10) showed similar average inhibition. In all cases, during the use of essential oil and its fractions *P. heptaphyllum*; eugenol and derivatives was confirmed death or inactivation of certain microorganisms tested, with some micro-organisms were more sensitive depending on the sample analyzed and its concentration.

Key words: *Protium heptaphyllum*, Eugenol, Derivatives, Micro-organisms.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO GERAL	14
2. REFERÊNCIAS	17
3. CAPÍTULO 1: Atividade antimicrobiana dos constituintes do óleo essencial de <i>Protium heptaphyllum</i> (Albl) March	20
INTRODUÇÃO.....	22
MATERIAL E MÉTODOS.....	23
Material.....	23
Matéria vegetal	23
Linhagens microbianas	24
Métodos.....	24
Extração do óleo essencial da resina.....	24
Obtenção das frações.....	25
Análises cromatográficas.....	26
Determinação da composição dos óleos essenciais e das frações.....	26
Atividade antimicrobiana.....	27
Análises estatísticas.....	28
RESULTADOS.....	28
DISCUSSÃO.....	32
CONCLUSÃO.....	37
REFERÊNCIAS.....	38

4. CAPÍTULO 2: Estrutura-atividade antimicrobiana de derivados do Eugenol.	41
INTRODUÇÃO.....	43
Experimental.....	44
Materiais	44
Linhagens microbianas.....	45
Atividades antimicrobianas.....	45
Análise estatística.....	46
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
CONCLUSÃO.....	51
REFERENCIAS.....	52
ANEXOS: Normas das revistas	

1. INTRODUÇÃO GERAL

O potencial antimicrobiano das plantas está em grande parte ligado à sua capacidade de sintetizar substâncias químicas relativamente complexas como alcalóides, flavonóides, isoflavonóides, glicosídeos, terpenos, fenilpropenos, e ácidos orgânicos (SOUZA et al., 2005). Este potencial antimicrobiano ocorre por diferentes mecanismos de ação, sendo os mais comuns aqueles que envolvem componentes fenólicos, os quais sensibilizam a bicamada lipídica da membrana celular e modificam a atividade dos canais de cálcio, causando aumento da permeabilidade e liberação dos constituintes intracelulares vitais (ISMAEL; PIERSON, 1990; KIM; MARSHALL; WEI 1995; OUATTARA et. al, 1997). A morte do micro-organismo também pode ocorrer devido a danos ao seu sistema enzimático, ou por destruir ou inativar o material genético (KIM; MARSHALL; WEI 1995).

Os óleos essenciais, presentes em diversas partes da planta, são amplamente estudados em função da atividade antimicrobiana (BERTINI et al., 2005).

Para a identificação óleos de essenciais, por exemplo, a cromatografia gasosa é amplamente empregada.

As técnicas empregadas na identificação e quantificação de substâncias de origem vegetal evoluíram bastante, e a partir de tais avanços, alguns princípios ativos puderam ser isolados, sendo utilizados até os dias atuais no tratamento de doenças (VIEIRA-JUNIOR et al., 2005). Com a finalidade de obter resultados ainda mais satisfatórios, diversas substâncias além de isoladas foram sintetizadas a partir dos protótipos isolados (CARRASCO et al., 2008).

A Família Burseraceae apresenta 16 gêneros e mais de 800 espécies, as espécies desta família são bem conhecidas pela produção de exsudados e resinas ricas em substâncias aromáticas, muito utilizadas em produtos de

perfumaria, produção de verniz e para diversos fins medicinais (LE COINTE, 1934).

A espécie *Protium heptaphyllum* (Aubl) March, é que mais se destaca na família Burseraceae, sendo conhecida popularmente como almécega, almíscar e breu-branco-verdadeiro, presente em várias regiões do Brasil (VIEIRA-JUNIOR et al., 2005; PINTO et al., 2008; ARAUJO et al., 2011). A árvore apresenta cerca de 10 metros de altura, suas folhas são opostas e imparipinadas, as flores são pequenas e os frutos são drupas avermelhadas que contém quatro sementes (MATOS, 1997).

Popularmente, várias atividades farmacológicas têm sido atribuídas à resina de *Protium*, tais como anti-inflamatória, cicatrizante, analgésica e expectorante, sendo estas atividades, dentre outras identificadas no óleo essencial da *P. heptaphyllum* (SIANI et al., 1999).

A família *Myrtaceae* também se destaca pela atividade terapêutica, entre as espécies dessa família, destacam-se a espécie *Syzygium aromaticum* (L.) Merr.&L.M Perry, popularmente a espécie é conhecida como cravo-da-índia, sendo muito difundida na Indonésia e no Brasil (OLIVEIRA et al., 2007, 2009).

O significado do nome cravo em português deriva do latim *clavus* que significa “prego” devido a sua aparência física. Seus botões florais podem ser utilizados na culinária como tempero (AFFONSO et al., 2012).

O componente majoritário do cravo-da-índia identificado por eugenol (4-alil-2-metoxi-fenol), apresenta atividades antimicrobiana, anti-inflamatória, antioxidante, anestésica e anti-séptica no alívio de dores de dentes (SIANI et al., 1999; GOBBO-NETO & LOPES 2007; NAGASHIMA et al., 2008). Além de ser utilizado na odontologia acompanhado do óxido de zinco para formação do cimento aplicado ao meio oral (MARKOWITZ et al. 1992).

Portanto, devido à atividade antimicrobiana comprovada do óleo essencial de *P. heptaphyllum* e do eugenol, este trabalho visa identificar o perfil fitoquímico do óleo essencial de *P. heptaphyllum* e a relação das substâncias identificadas com atividade antimicrobiana. Para a substância eugenol, o presente estudo objetiva avaliar a relação estrutura-atividade de dez derivados sintetizados. E, em ambos os casos, determinar a atividade antimicrobiana pela concentração inibitória mínima, método utilizado por diversos pesquisadores (HANCOCK, 2008; KLANCNIK et al., 2010; MOURA-COSTA et al., 2012), para determinar a menor concentração do agente antimicrobiano em determinadas condições capazes de inibir o crescimento visível, ao olho nu, do micro-organismo analisado (WIEGAND; HILPERT; HANCOCK, 2008).

2. REFERENCIAS

ARAUJO, D. A. O. V.; TAKAYAMA, C.; FARIA, F. M., SOCCA, E. A. R.; DUNDER, R. J.; MANZO, L. P.; FERREIRA, A. L.; BRITO, A. R. M. S. Gastroprotective effects of essential oil from *Protium heptaphyllum* on experimental gastric ulcer models in rats. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 21, p. 721-729, 2011.

AFFONSO, S. R.; RENNÓ, M. N.; SLANA, G. B. C. A.; FRANÇA, T. C. C. Aspectos Químicos e Biológicos do Óleo Essencial de Cravo da Índia. *Revista Virtual de Química*, v. 4, n. 2, p. 146 -161, 2012.

BERTINI, L. M.; FERREIRA, A. F.; OLIVEIRA, C. L. L.; MENEZES, E. A.; MORAIS, S. M.; CUNHA F. A.; CAVALCANTI, E. S. B. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. *Infarma*, v. 17, p.80-83, 2005.

CARRASCO, A. H.; ESPINOZA C. L.; CARDILE C.; GALLARDO C, CARDONA W, LOMBARDO L, CATALAN M. K, CUELLAR F. M, RUSSO A. Eugenol and its Syntetic Analogues Inhibit Cell Growth of Human Cancer Cells (Part I), *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 19,p. 543-548, 2008.

GOBBO-NETTO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários, *Quimica nova*, v. 30, p. 374-381, 2007.

ISMAEL, A.; PIERSON, M. D. Inhibition of germination, out growth, and vegetative growth of *Clostridium botulinum* 67B by spice oils. *Journal of Food Protection*, v. 53, n. 9, p. 755-758, 1990.

KIM, J.; MARSHALL, M. R.; WEI, C. Antibacterial activity of some essential oil components against five food-borne pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 43, n. 11, p. 2839-2845, 1995.

KLANCNIK, A.; PISKERNIK, S.; JERSEK, B.; MOZINA, S. S. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *Journal of Microbiological Methods*, v. 81, p. 121-126, 2010.

LE COINTE, P. A Amazônia Brasileira: Árvores e Plantas Úteis. Belém, Brasil. *Companhia Editora Nacional*. 947. p. 506, 1934.

MATOS, F. J. A. O. Formulário fitoterápico do professor Dias da Rocha. 2. Edição, Fortaleza: UFC, p. 258, 1997.

MARKOWITZ, K.; MOYNIHAM. M. L.; Kim, S. K. Biologic properties of eugenol and zinc oxide-eugenol. *Oral Surgery Oral Phatology*, v. 73, p. 729-737, 1992.

MOURA-COSTA, G. F.; NOCCHI, S. R.; CEOLE, L. F.; MELLO, J. C. P. DE; NAKAMURA, C. V.; FILHO, B. P. D.; TEMPON, L. G.; NAKAMURA, T. U. Antimicrobial activity of plants used as medicinals on na indigenous reserve in Rio das Cobras, Paraná, Brazil. *Journal of Ethno pharmacolog*, v.143, p. 631–638, 2012.

NAGASHIMA, S. NAGATA, H. IWATA, M. YOKOTA, M. MORITOMO, H. ORITA, M. KUROMITSU, S. KOAKUTSU, A. OHGA, K. TAKEUCHI, M. OHTA, M. TSUKAMOTO, S. 2008. Identification of 4-benylamino-2-[(morpholin-4-ylphenyl) amino] pyrimidine-5-carboxamide derivatives as potent and orally bio available STAT6 inhibitors. *Bioorganic e Medicinal Chemistry*, p. 6509 - 6521

OLIVEIRA, A. R.; REIS, V. T.; SACRAMENTO, K. C.; DUARTE, P. L.; OLIVEIRA, F. F. Constituintes químicos voláteis de especiarias ricas em eugenol. *Revista Brasileira de farmacognosia*, v. 19, n.3, p. 771-775, 2009.

OLIVEIRA, F. Q.; GOBIRA, B.; GUIMARAES, C.; BATISTA, J.; BARRETO, M.; SOUZA, M. Espécies vegetais indicadas na odontologia. *Revista Brasileira Farmacognosia*, v. 17, p. 466-476, 2007.

OUATTARA, B.; SIMARD, R. E.; HOLLEY, R. A.; PIETTE, G. J. P.; BÉGIN, A. Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. *International Journal of Food Microbiology*, v. 37, n. 23, p. 155-162, 1997.

PINTO, S. A. H.; PINTO, L. M.; CUNHA, G. M. A.; CHAVES, M. H., SANTOS, F. A.; R. A. O, V. S.; Anti-inflammatory effect of a, b- amyryn, a pentacyclic triterpene from *Protium heptaphyllum* in rat model of acute periodontitis. *Inflammation Research*, v.16, p. 48-52, 2008.

SIANI, A. C.; RAMOS, M. F. S.; MENEZES-de-Lima Jr, O.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; FERNANDES-FERREIRA, E.; SOARES, R. O. A.; ROSAS, E. C.; SUSUNAGA, G. S.; GUIMARÃES, A. C.; ZOGHIBI, M. G. B.; HENRIQUES, M. G. M. O. Evaluation of anti-inflammatory-related activity of essential oil from the leaves and resin of species of *protium*. *Journal of Ethno pharmacology*, v 66, n.01, p.57-59,1999.

SOUZA, E. L.; LIMA, E. O.; FREIRE, K. R. L.; SOUZA, C. P. Inhibitory action of some essential oils and phytochemicals on the growth of various moulds isolated from foods. *Brasilian Archives of Biology and Techonology*. Curitiba, v. 48, n. 02, p. 245-250, marc. 2005.

VIEIRA-JUNIOR, G. M.; SOUZA, C. M. L.; CHAVES M. H., Resina de *protium heptaphyllum*: isolamento, caracterização estrutural e avaliação das propriedades térmicas. *Quimica nova*, v. 28, p.183-187, 2005.

WIEGAND, I.; HILPERT, K.; HANCOCK, R. E. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*, v. 3, p. 163–175, 2008.

3. CAPÍTULO 1

Atividade antimicrobiana dos constituintes do óleo essencial de *Protium heptaphyllum* (Aubl) March

Didley Sâmia Paiva Cazelli^a, Fernanda Endringer Pinto^a, Otávio Arruda Heringer^b, Fernanda Campus Rossetti Lessa^a, Denise Coutinho Endringer^{a,c*}

^a Universidade Vila Velha, Vila Velha, ES, Brazil. ^b Tommasi Analítica, Vila Velha, ES, Brazil. ^c Instituto Federal do Espírito Santo, Campus Vila Velha, Vila Velha, ES, Brazil

*Autor correspondente: Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Vila Velha, Av. Comissário José Dantas de Melo, nº21, 29102-920 – Boa Vista, Vila Velha, ES, Brasil – Tel.: +55 27 32412198. E-mail address: endringe@gmail.com

RESUMO

A espécie *Protium heptaphyllum* (Aubl) March, conhecida como almécega é bem difundida no meio científico, pois produz uma resina rica em óleo essencial, sendo utilizada popularmente como analgésico, anti-inflamatório e cicatrizante. Este trabalho tem como objetivo isolar e identificar os constituintes do óleo essencial da espécie *heptaphyllum*, coletados no mesmo espécime, nos anos de 2009, 2011 e 2013. A análise antimicrobiana foi realizada com os três óleos e as frações obtidas do óleo em 2013, pela determinação da concentração inibitória mínima, contra as linhagens de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Streptococcus mutans* e o fungo *Cândida albicans*. Os óleos essenciais foram obtidos por hidrodestilação utilizando destilador de Clevenger, sendo posteriormente os constituintes quantificados e identificados por cromatografia gasosa acoplada a espectrofotômetro de massas. Como resultado o óleo essencial apresentou predominância de substâncias monoterpênicas. Verificou-se que os óleos obtidos nos três anos foram classificados com forte atividade antimicrobiana

contra as linhagens de *S. mutans* (CIM = 0,5 mg/mL). Os óleos de 2009 e 2013 também foram classificados como fortes contra *C. albicans*. E contra *E. faecalis* o óleo foi classificado como forte apenas em 2009. Entretanto, os monoterpenos isolados e identificados nas frações em 2013 obtiveram resultados mais satisfatórios que os óleos, quando as substâncias atuavam juntamente com o p-cimeno-8-ol, monoterpeneo presente em todas as frações.

Palavras chaves: Óleo essencial, p-cimeno-8-ol, *Protium heptaphyllum*, atividade antimicrobiana.

Introdução

Diversos óleos essenciais apresentam atividade antimicrobiana contra um grande número de micro-organismos, incluindo espécies resistentes a antibióticos (Bertini *et al.*, 2005; Affonso *et al.*, 2012).

A espécie *Protium heptaphyllum* (Aubl) March, da família Burseraceae, conhecida popularmente como almécega, é encontrada em terrenos arenosos secos ou úmidos em todo Brasil (Corrêa, 1984), tendo despertado um grande interesse nos últimos anos, devido ao seu potencial farmacológico (Bandeira *et al.*, 2007; Violante *et al.*, 2012)

A resina coletada em seu tronco é um eficaz agente cicatrizante, além de apresentar propriedade anti-inflamatória e analgésica (Siani *et al.*, 1999). Da resina, além do óleo essencial, cujo teor é de aproximadamente 11%, foram isolados triterpenos α -amirina, β -amirina e breina (Bandeira, 2002).

Para o óleo essencial extraído da resina de *P. heptaphyllum*, foram relatados as atividades antimicrobiana, anti-inflamatória, antioxidante, antineoplásica e citotóxica (Citó *et al.*, 2003; Barbosa-Filho *et al.*, 2006; Carvalho *et al.*, 2009; Affonso *et al.*, 2009).

Porém, os constituintes dos óleos essenciais são influenciados por diversos fatores como genética, área de cultivo, partes da planta, temperatura, umidade e localização geográfica, sendo possível visualizar diferenças na constituição do óleo essencial (Soliman *et al.*, 1994; Siani *et al.*, 1999). Sendo assim, sua composição a ser obtida pode ser diferente mesmo quando coletado no mesmo espécime.

Os constituintes do óleo p-cimeno-8-ol, terpinoleno e o p-cimeno foram identificados e obtidos em maiores proporções no óleo essencial de *P. heptaphyllum* durante o estudo de Siani *et al.*, (1998), estas substâncias

também foram obtidas em maiores proporções no óleo em 2013, porém em porcentagens diferentes. A hipótese do trabalho é que o óleo essencial de *P. heptaphyllum* e suas frações apresentem atividade antimicrobiana. Objetivando determinar a amostra mais ativa frente aos micro-organismos testados.

Material e Métodos

Material

Anisaldeído, ácido sulfúrico, ácido acético glacial, metanol, ácido sulfúrico, tolueno, acetato de etila, éter de petróleo e o cloreto de trifetil tetrazólio (CTT), foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Dimetilsulfóxido (DMSO) é proveniente da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil) e etanol da empresa Dinâmica química contemporânea LTDA (São Paulo, Brasil). Hexano grau HPLC foi adquirido da empresa Panreac (Barcelona, Espanha). Ágar e o caldo Mueller-Hinton foram obtidos da Himedia Laboratories PVT (Mumbai, Índia). Sílica Gel 60M (Macherey-Nagel 0,04 – 0,0063mm e 230-400 mesh) placa de sílica gel (Duren, Alemanha).

Material vegetal

O exsudato de caule da espécie *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March foi coletado em maio de 2009 e 2011 e agosto de 2013, na ilha de Guriri, São Mateus, Espírito Santo. A coleta foi realizada no mesmo espécime. Uma exsicata foi preparada e identificada pela professora botânica MSc. Solange Zanotti Schneider, sendo tombada sob o número UVVES 1802.

Linhagens microbianas

Foram utilizadas linhagens bacterianas e fúngica padrão ATCC. Linhagem fúngica: *Candida albicans*. (ATCC 10231TM). Linhagens bacterianas: *Staphylococcus aureus* (ATCCTM 25923); *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212TM); *Escherichia coli* (ATCC 25922TM); *Streptococcus mutans* (ATCC 25175TM).

Métodos

Extração do óleo essencial da resina

O óleo essencial da resina do *P. heptaphyllum* foi extraído em aparelho de Clevenger (Logen, mod.LS 2015), ajustado por Skrubis (1982) e Ming et al. (1996) de acordo no método de hidrodestilação. Em 2009, 2011 e 2013 as massas das resinas obtidas foram de 250,00g, 25,00g e 28,80g, respectivamente. O tempo de extração do óleo, para as três resinas foi iniciado após o ponto de ebulição da água, sendo aproximadamente de três a quatro horas. Os hidrolatos obtidos foram mantidos em repouso ao abrigo de luz e a temperatura de -20°C, sendo os óleos separados em crio-separação. Em seguida os óleos foram secos usando o sulfato de magnésio anidro, sendo armazenado em vidro âmbar envolto por papel alumínio e mantido sob refrigeração de aproximadamente - 20°C até o momento do uso. O cálculo do rendimento foi determinado de acordo com a proporção entre a massa da resina e a do óleo obtido.

Obtenção das frações

O óleo essencial (1,0g), obtido em 2013, foi submetido à cromatografia em coluna de sílica gel (24x 2,0cm, mesh 230-400 e 25,7g), utilizando-se como série eluotrópica: hexano, hexano: acetato de etila (8:2); (6:4); (4:6) e (2:8). Foram coletadas frações de 10 mL resultando em 143 frações (0,70g), que foram agrupadas por similaridade em cromatografia em camada delgada (CCD, tolueno:acetato de etila, 9:1, anisaldeído sulfúrico), resultando em 19 frações (F₁ a F₁₉). Em função das massas disponíveis para as análises de identificação e análises biológicas, foram selecionadas as frações (F₂; F₇; F₁₁ e F₁₈). Estas frações e o óleo essencial foram submetidos à análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM).

A fração F₂ (0,05g) foi submetida à recromatografia em coluna Sílica gel (24x 2,0cm, mesh 230-400 e 8,3g); a eluição foi isocrática, utilizando-se o eluente (fase móvel) tolueno: acetato de etila (9:1). Foram coletadas frações de 5 mL, obtendo-se 59 subfrações (0,04g), as quais foram agrupadas por similaridade na (CCD), resultando em 14 subfrações (F₂₋₁ a F₂₋₁₄). As subfrações F₂₋₂; F₂₋₄; F₂₋₆; F₂₋₁₂ foram analisadas por CG/EM. Posteriormente, as subfrações e os óleos essenciais de 2009, 2011 e 2013 foram submetidos a testes microbiológicos, para verificar a concentração inibitória mínima (CIM) contra linhagens Gram positivas e Gram negativas e linhagem fúngica.

Análises cromatográficas

Determinação da composição dos óleos essenciais e frações

As análises cromatográficas foram realizadas no laboratório Tommasi Analítica Ltda (Vila Velha, ES). A identificação dos constituintes químicos do óleo essencial e das frações foram realizadas em um cromatógrafo gasoso (TraceUltra - Thermo) acoplado a um espectrômetro de massas (DSQII - Thermo). As substâncias voláteis foram separadas em uma coluna capilar DB-5ms (30 m x 0,25 mm d.i. x 0,25 μ m, J&W Scientific, Folsom Califórnia, USA). A programação de temperatura foi de: 60 °C, aumentando até 240 °C por uma rampa de temperatura de 3 °C/min, permanecendo por 7 min. O gás de arraste utilizado foi o hélio a uma vazão constante de 1 mL/min. As temperaturas do injetor e do detector foram mantidas em 230 e 250 °C, respectivamente. As amostras foram diluídas em hexano (1 mg/mL) e o volume injetado foi de 1,0 μ L com o injetor no modo *splitless*. A temperatura da interface (CG-EM) foi mantida em 240 °C. O detector de massas foi operado no modo de ionização por elétrons (+70 eV), utilizando o modo de varredura, realizada de 35 a 400 *m/z* e a tensão do detector foi de 1,6 kV. A identificação dos compostos foi realizada primeiramente pela comparação da similaridade dos espectros de massa obtidos com os da literatura (NIST 98; Adams, 1995), posteriormente pela comparação do Índice Kovats com a literatura (IK) (Adams, 1995). Analisou-se a série homóloga de alcanos (C10 – C28) nas mesmas condições cromatográficas e, a partir dos tempos de retenção destes, foram calculados os Índices de Kovats (IK) dos compostos voláteis.

Atividade antimicrobiana

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada em placas de cultura de 96 poços, segundo as normas do CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute, 2003*). Os micro-organismos utilizados foram: *S. aureus*, *E. coli*, *S. mutans*, *E. faecalis* e *C. albicans*. A concentração final de células foi ajustada na ordem de 10^4 UFC/mL pela escala de McFarland.

Em cada poço, exceto no utilizado para o branco, adicionaram-se meio de cultura Muller Hilton e inóculo, amostra ou controles positivos ou negativos. As concentrações intermediárias foram preparadas diluindo-se a solução estoque de 10mg/mL de DMSO e posteriormente diluídas em tampão fosfato salino (PBS), resultando nas concentrações finais de 0,5 a 0,03125 mg/mL avaliadas para óleos e frações, sendo o DMSO também analisado.

Em todas as placas, foram inseridos controles positivos e controles negativos, tendo a água oxigenada e o hipoclorito como controles negativos. Ao final do preparo, as placas foram incubadas a 36°C, por 24 h e posteriormente, adicionaram-se 50 µL do indicador cloreto de trifênil-tetrazólio (CTT) (0,5% em solução aquosa). Após 4 h de incubação, a CIM foi determinada como a menor concentração capaz de inibir o crescimento visível de células conferido pelo CTT (células mortas não são coradas). Todos os testes foram realizados em triplicata.

Análise estatística

Os resultados estão representados como Média \pm Desvio padrão. Para análise da atividade antimicrobiana foi empregado teste t de Student. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

Resultados

Obtenção do óleo essencial

O óleo essencial obtido das resinas de *P. heptaphyllum* apresentou uma coloração amarelada e um odor amadeirado refrescante. O rendimento (g/g) do processo extrativo dos óleos essenciais foi de 14,4% 10,2% e 9,7% para os anos de 2009, 2011 e 2013, respectivamente.

Determinação da composição química dos três óleos essenciais de *Protium heptaphyllum*.

A constituição química dos óleos de *P. heptaphyllum* coletadas nos três anos foi caracterizada por uma grande quantidade de monoterpenos (tabela 1). Para óleo essencial extraído em 2009, os constituintes majoritários foram o 3-careno, limoneno e terpinoleno. Em 2011, os constituintes majoritários encontrados na identificação foram o p-cimeno-8-ol, o α -tujeno, o p-cimeno e o terpinoleno (tabela 1). Para o óleo extraído em 2013 os constituintes majoritários foram o p-cimeno-8-ol, terpinoleno e o p-cimeno, na relação 1:6:6. A relação destes constituintes no óleo obtido em 2011 foi de 1:3:4, respectivamente. Os componentes identificados no óleo em 2009, com

exceção terpinoleno, não apresentavam os mesmos constituintes de 2013 como componentes majoritários.

Tabela 1. Composição química do óleo de *Protium heptaphyllum* obtidos nos anos de 2009, 2011 e 2013.

SUBSTÂNCIAS	IK	2009	2011	2013
		%	%	%
α -terpineno	1018	3,10	2,29	3,14
p-cimeno-8-ol	1206	2,50	10,12	6,6
terpinoleno	1088	32,70	35,81	37,78
α - tujeno	931	0,40	11,05	-
γ -terpineno	1062	2,40	-	-
α - felandreno	1005	-	-	3,97
α - pineno	939	4,20	4,35	-
o-cimeno	967	7,90	-	-
p-cimeno	1026	-	26,66	38,08
Mirtenal	1027	-	1,76	-
Camphor	1143	-	1,27	-
trans-carveol	1217	-	1,13	-
cis-limoneno oxida	1134	-	1,08	-
3-d-careno	1011	-	1,09	-
3-careno	NI	15,00	-	-
b-mirceno	NI	0,40	-	-
b- bouboneno	1384	-	-	1,25
Limoneno	NI	22,00	-	-
gemagreno D	NI	0,40	-	-
cis-pinocarveol	1183	-	-	0,54
Sabineno	976	-	-	4,04
d-cadineno	1524	-	-	0,38
g-cadineno	1520	-	-	0,09
Total identificado		91,00	96,61	95,87

IK: Índice de Kovats literatura (Adams, 1995); (%) Porcentagem relativa das substâncias; NI: Não identificado

Determinação da composição química das frações e de *Protium heptaphyllum* obtidas em 2013.

A composição química das frações está apresentada na tabela 2. A substância presente em todas as frações analisadas foi o *p*-cimeno-8-ol, porém em proporções distintas entre as frações.

Tabela 2. Composição química das frações e sub-frações do óleo de *Protium heptaphyllum* em 2013.

Frações	Substâncias	IK	Tr	(%)
F2	<i>p</i> -cimeno-8-ol	1206	13,15	85,01
	<i>p</i> -cimeno	1026	7,29	3,33
	β -bourboneno	1384	21,03	11,64
F7	<i>p</i> -cimeno-8-ol	1206	13,28	96,04
	<i>cis</i> -pinocarveol	1183	13,71	3,95
F11	<i>p</i> -cimeno-8-ol	1206	12,94	35,74
F18	<i>p</i> -cimeno-8-ol	1376	13,00	18,21
F2-2	<i>p</i> -cimeno-8-ol	1206	12,95	83,78
F2-4	α -felandreno	1005	6,68	16,21
	<i>p</i> -cimeno-8-ol	1206	12,98	56,55
F2-6	<i>p</i> -cimen-8-ol	1206	12,98	35,26
F2-12	<i>p</i> -cimeno-8-ol	1206	12,95	91,94

IK: Índice de Kovats literatura (Adams, 1995); Tr: tempo de retenção;(%): Porcentagem relativa das substâncias.

Atividade antimicrobiana dos óleos e frações.

A atividade antimicrobiana foi avaliada contra cinco micro-organismos, sendo uma bactéria Gram negativa (*E. coli*), três Gram positivas (*S. aureus*, *S. mutans* e *E. faecalis*) e um fungo (*C. albicans*) (Tabela 3). De acordo com os resultados obtidos as frações apresentaram um menor valor de concentração inibitória mínima que o óleo do *P. heptaphyllum*, sendo mais eficaz na inibição bacteriana.

O resultado da concentração inibitória mínima para o diluente DMSO foi superior a 0,5 mg/mL evidenciando o crescimento do micro-organismo, logo o diluente não foi o responsável pela atividade antimicrobiana observada para as amostras.

Das frações obtidas (Tabela 2), apenas três apresentaram atividade antimicrobiana a partir da concentração máxima de 0,5 mg/mL analisada, sendo elas a fração de p-cimeno-8-ol, e as misturas de p-cimeno-8-ol com α -Felandreno e p-cimeno-8-ol com cis-pinocarveol (Tabela 3).

Tabela 3. Concentração inibitória mínima dos óleos e das frações de *Protium heptaphyllum*.

Micro-organismos	Óleos essenciais			Frações 2013		
	2009	2011	2013	p-cimeno-8-ol	p-cimeno-8-ol α - Felandreno	p-cimeno-8-ol cis- pinocarveol
<i>C. albicans</i>	0,5	>0,5	0,06	0,25	0,25	0,18
<i>S. mutans</i>	0,5	0,5	0,5	>0,5	0,25	0,5
<i>E. faecalis</i>	0,5	>0,5	>0,5	0,31	-	-
<i>S. aureus</i>	>0,5	>0,5	>0,5	0,5	0,25	0,37
<i>E. coli</i>	>0,5	>0,5	>0,5	0,5	0,5	0,5

Concentração inicial máxima das amostras 0,5 mg/mL

Discussão

De acordo com os componentes majoritários identificados no óleo essencial de *P. heptaphyllum* (tabela 1), o teor dos óleos essenciais encontrado nos anos de 2009, 2011 e 2013 foi, respectivamente, 14,4% 10,2% e 9,7% resultado muito semelhante ao anteriormente relatado por Siani *et al.* (1999), de 10% (g/g).

As substâncias majoritárias identificadas (terpinoleno, p-cimeno, p-cimen-8-ol) foram também descritas por vários autores como os componentes principais do óleo essencial do *P. heptaphyllum* obtidos da resina (Marques *et al.*, 2010; Siane *et al.*, 1999; Rao *et al.*, 2007). Resultado semelhante ao observado no óleo em 2011 e 2013. Entretanto, nos três óleos essenciais de *P. heptaphyllum*, entre os componentes que foram identificados, diferenças percentuais foram observadas, e estas diferenças podem estar relacionadas às condições nutricionais da planta, fatores genéticos e às condições edafoclimáticas (diferentes condições de luz, temperatura e níveis de nutrição de água) (Figueredo *et al.*, 2012). Plantas medicinais derivadas de uma mesma espécie podem sofrer diferença na sua qualidade quando coletadas em locais diferentes (Asghari *et al.*, 2012).

Os resultados antimicrobianos das amostras (CIM) foram classificados de acordo com Aligiannis *et al.*(2001), sendo plantas com CIM abaixo de 2,0 mg/mL consideradas com atividade antimicrobiana. CIM até 0,5 mg/mL, como forte antimicrobiano; de 0,6 a 1,5 mg/mL, como moderadas e aquelas com CIM acima de 1,6 mg/mL antimicrobianos fracos.

Seguindo a classificação sugerida por Aligiannis *et al.* (2011), o óleo essencial de *P. heptaphyllum* foi classificado como antimicrobiano forte contra

as linhagens de *C. albicans* em 2009 e 2013. Embora o óleo obtido em 2013, tenha sido cerca de três vezes mais ativo contra *C. albicans*, e em 2011 por apresentar resultado de CIM superior a 0,5 mg/mL, o mesmo, não foi classificado, devido a não ocorrência da inativação da bactéria a partir desta concentração.

Contra as bactérias Gram positivas *S. mutans*, *E. faecalis* e *S. aureus*, os óleos essenciais foram classificados como fortes independente do ano de coleta (Tabela 3), apresentando o mesmo valor CIM nos três anos. Contra *E. faecalis*, em 2009 o óleo essencial de *P. heptaphyllum* foi classificado como forte, porém em 2011 e 2013 por apresentar um valor de CIM superior a 0,5 mg/mL não foi classificado.

Nas análises contra as linhagens de *S. aureus* e *E. coli*, os óleos essenciais também não foram classificados de acordo com Aligiannis et al. (2011), pois apresentaram CIM superior a 0,5 mg/mL (Tabela 3). Neste caso, teríamos que aumentar a concentração para ver em qual estágio a inibição bacteriana ocorreria para ser classificada.

Estudos relatam que a substância identificada no óleo bruto, o p-cimeno (1-metil-4-isopropil) apresenta atividade antimicrobianas, devido as suas propriedades lipofílicas. O mecanismo de ação se dá pelo rompimento da membrana citoplasmática do micro-organismo (Cristani, 2007).

Em 2013, as frações obtidas do óleo essencial de *P. heptaphyllum*, também seguiram a classificação de Aligiannis et al., (2011). A fração com o p-cimeno-8-ol foi classificada como forte principalmente contra *C. albicans* e *E. faecali*. Não foi possível classificá-la contra *S. mutans*, *S. aureus* e *E. coli*, pois a CIM encontrada no presente trabalho é superior a 0,5mg/mL (Tabela 3).

A fração composta da mistura de p-cimeno-8-ol: alfa-felandreno (3:1) foi classificada como forte contra o fungo *C. albicans*, e as linhagens Gram positivas *S. mutans*, *S. aureus* e contra a Gram negativa *E. coli*. Logo, a presença do felandreno pode sugerir uma modulação na ação do p-cimeno-8-ol, aumentando sua eficácia na inibição bacteriana. Porém, a menor atividade foi observada para a Gram negativa *E. coli*, pois a concentração foi duas vezes maior para ocorrer inibição.

O fato das Gram negativas apresentarem maior resistência de inativação aos compostos antimicrobianos presentes nos óleos essenciais pode estar associado à presença da bicamada lipídica (membrana externa) mais complexa na parede celular das bactérias Gram negativas, evitando que as amostras avaliadas, substâncias antimicrobianas, atinjam a membrana citoplasmática e exerçam ação de destruição das células (Tornuk *et al.*, 2011). De acordo com vários estudos a membrana externa das bactérias Gram-negativas possui um espaço periplasmático que contém enzimas capazes de inativar determinados antibióticos (Duffy *et al.*, 2001; Sartori *et al.*, 2003; Schaetechter *et al.* 2002).

A fração identificada como uma mistura de p-cimeno-8-ol e cis-pinocarveol (24:1) foi classificada como antimicrobiano forte contra o fungo *C. albicans* e contra as linhagens Gram positivas *S. mutans*, *S. aureus* e contra a Gram negativa *E. coli* (Tabela 3). Pressupõe-se que a presença do cis-pinocarveol auxilie na ação do p-cimeno-8-ol, mesmo em menor proporção. Portanto, as frações que apresentavam um sinergismo com o p-cimeno-8-ol apresentaram resultados mais satisfatórios.

Os terpenos têm sido descritos com atividade antimicrobiana, sobre as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Burt. 2004; Mimran *et al.*, 2007; Violante *et al.*, 2012), os terpenos são mais sensíveis as Gram-positivas do que

as Gram-negativas (Burt. 2004), dado semelhante ao observado no presente estudo.

A maior resistência dos antimicrobianos as Gram negativa deve-se em parte a sua estrutura, devido o seu envelope celular apresentar uma membrana externa complexa incluindo duas bicamadas lipídicas que funcionam como uma barreira física e funcional entre a célula bacteriana e o ambiente, sendo a membrana da Gram positiva é menos espessa, portanto mais permeável.(Perussi, 2007)

Os micro-organismos possuem uma sensibilidade variada, dependendo da parte da planta analisada e da composição química do óleo (Burt. 2004). Alguns estudos objetivam correlacionar à composição química e bioatividade dos óleos essenciais, porém, isso não tem sido confirmado (Onofre *et al.*, 2005; Cano *et al.*, 2006). A atividade biológica dos óleos essenciais não é determinada somente pela quantidade de monoterpenos, mas também por sua proporção (Sartori *et al.*, 2005; Cano *et al.*, 2006; Costa *et al.*,2009).

O p-cimeno substância identificada no óleo, dá origem a outros monoterpenos por hidroxilação, sendo precursor central dos compostos oxigenados, de onde se obtém o p-cimeno-8-ol ou outros derivados hidroxilados, tais como timol e carvacrol (Poulose, 1978).

O p-cimeno-8-ol, que foi identificado no óleo e isolado nas frações, foi ativo contra a maioria das linhagens neste estudo. Todavia, vale ressaltar que, com os resultados apresentados (Tabela 3), a sua atividade antimicrobiana foi maior quando o mesmo atuava em conjunto.

O p-cimeno apresenta menor atividade antimicrobiana ao ser comparado com o seu derivado hidroxilado carvacrol, sendo sua menor atividade atribuída

à falta do grupamento hidroxila do p-cimeno, fundamental para desempenhar a atividade antimicrobiana (Ultee; Bennik; Moezelaar, 2002).

Portanto, pressupõe-se que o derivado hidroxilado p-cimeno-8-ol obtido em todas as frações apresenta maior efeito antimicrobiano, devido à presença da hidroxila, que facilita a interação com a parte polar do peptidoglicano presente na parede celular bacteriana, esta interação ocorre por interação de hidrogênio (Silveira *et al.*, 2006).

A Atividade de terpenos contra *S. aureus* pode ser dependente do número de átomos de carbono na cadeia hidrofóbica e do grupo hidrofílico hidroxila. (Kubo *et al.* 1993). Outro estudo confirma que a atividade antibacteriana contra *S. aureus* depende dos comprimentos das cadeias alifáticas de álcoois terpênicos e da presença de ligações duplas (Inoue *et al.* 2004), o que intensifica a atividade do p-cimeno-8-ol.

Durante o presente estudo, para as três frações identificadas, foi observado que as frações que apresentavam um sinergismo de substâncias com grupos hidroxilas foram mais ativas contra os micro-organismos do que quando agindo isoladamente (Tabela 3).

Foi relatado que antibióticos que afetam o metabolismo na formação da parede celular do micro-organismo, por se ligar a um precursor do peptidoglicano, como por exemplo, vancomicina, apresentam em sua estrutura grupamentos hidroxila, por meio do qual realizam a interação hidrogênio, ao se ligar a porção terminal do peptidoglicano da bactéria (Silveira *et al.*, 2006).

É de interesse científico a busca por substâncias mais simples, com propriedades antibióticas, com o intuito de diminuir a resistência de determinados antibióticos. Estas substâncias devem incluir na sua estrutura grupos polares que favoreçam a formação de ligações hidrogênio, com os

grupos polares da parede celular, e de cadeias apolares que promovam a interação hidrofóbica com a camada celular fosfolipídica (Silveira *et al.*, 2006).

Conclusão

Os óleos essenciais de *Protium heptaphyllum* obtidos nos anos de 2009, 2011 e 2013 apresentaram forte atividade antimicrobiana contra *S. mutans*, e somente os obtidos em 2009 e 2013 foram ativos contra *C. albicans*, e contra *E. faecalis* somente o obtido em 2009.

Entretanto, os monoterpenos isolados e identificados nas frações durante o estudo obtiveram maior atividade antimicrobiana quando as substâncias atuavam em sinergismo. De maneira geral, as frações se mostraram mais ativas que os óleos nas CIM para uma concentração inicial de análise de 0,5 mg/mL.

Agradecimentos

Agradecemos à Tommasi Analítica e à UVV pelo auxílio financeiro a esta pesquisa.

Referências

- Adams RP (1995) Identification of essential oils components by gas chromatography/ quadrupole mass spectroscopy. Illinois (USA): Allured Publishing Corporation, Carol Stream, p 804.
- Affonso SR, Rennó MN, Slana GBCA, França TCC (2009) Aspectos Químicos e Biológicos do Óleo Essencial de Cravo da Índia. *Revista Virtual de Química*, v. 4, n. 2, p. 146 -16.
- Asghari G, Jalali M, Sadoughi E (2012) Antimicrobial activity and chemical composition of essential oil from the seeds of *Artemisia aucheri* Boiss. Jundishapur. *J Nat Pharm*, v. 7, p11-15.
- Aligiannis N, Kalpotzakis E, Mitaku S, Chinou IB (2001) Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 4168–4170,
- Barboza-filho JM, Medeiros KCP, Diniz MFFM, Batista LM, Athayde-Filho PF, Sllva MS, Cunha EVL, Almeida JRGS, Quintans-Júnior, LJ (2006) Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. *Rev. Bras. Farmacogn* v.16, p. 258-285.
- Barboza-Filho JM, Nascimento-Júnior FA, Tomaz ACA, Ataide-Filho PF, Silva MS, Cunha EVL, Souza MFV, Batista LM, Dinis MFFM (2007) Natural products with antileprotic activity. *Rev. Bras. Framacogn*. v. 17, p. 141-148.
- Bertini LM, Ferreira AF, Oliveira CLL, Menezes EA, Morais SM, Cunha FA, Cavalcanti ESB (2005) Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. *Infarma*, v. 17, p.80-83.
- Bandeira PN, Pessoa ODL, Trevisan MTS, Lemos TLG (2002) Metabólitos secundários de *Protium heptaphyllum* March. *Quim. Nova*, v. 25, p.1078-1080.
- Burt SA (2004) Essential oils: The antibacterial properties and potential applications in foods - A review. *International Journal Food Microbioly*, v. 94, p. 223-253.
- Carvalho AA, Souza CMM, Chaves MH (2009) Óleo essencial de *Protium heptaphyllum*: fracionamento e identificação. In: 32^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de química, Fortaleza, CE.

- Cano C, Bonilla P, Roque M, Ruiz J (2008) Actividad antimicótica in vitro y metabolitos del aceite esencial de lãs hojas de *Minthostachys mollis* (Muna). *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, v.25, p.298-301.
- Costa ACBP, Freire F, Pereira CA, Junqueira JC, Jorge AOC (2009) Atividade antifúngica da *Rosmarinus officinalis* Linn sobre cepas de *Candida albicans*. *Rev Odontol UNESP*,v.38, p.111-116.
- Corrêa MP (1984) *Dicionário de Plantas Uteis do Brasil*. Rio de Janeiro Ministério da Agricultura/ instituto brasileiro de Desenvolvimento florestal.
- Cristiani MT (2007) Interaction four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: implications for their antibacterial activity. *Journal of Agricultural and food Chemistry*, v. 55, p. 6300-6308.
- Citó AMGL, Souza AA, Lopes JAD, Chaves MH, Costa FB, Souza SAS, Amaral MPM (2003) Resina de *Protium heptapyllum* March (Bourceraceae): Composição química do óleo essencial e avaliação citotóxica frenre a *Artemia salina*. *Anais de Associação Brasileira de Química*, v. 52, p.74-76.
- Duffy CF, Power RF (2001) Antioxidant and antimicrobial properties of some Chinese plant extracts. *Int J Antimicrob Agents*, v.17, p.527-529.
- Figueredo G, Unver A, Chalchat JC, Arslan D, Ozcan MM (2012) A research on the composition of essential oil isolated from some aromatic plants by microwave and hydrodistillation. *J. of Food Biochem*, v. 36, p. 334-343.
- Inoue Y, Shiraishi A, Hada T, Hirose K, Hamashima H, Shimada J (2004) The antibacterial effects of terpene alcohols on *Staphylococcus aureus* and their mode of action. *FEMS Microbiology Letters*, v. 237, n. 2, p. 325–331,
- Kubo I, Muroi H, Himejima M, Kubo A (1993) Antibacterial activity of long-chain alcohols: the role of hydrophobic alkyl groups. *Bioorganic Medical Chemistry Letters*, v. 3, n. 6, p.1305–1308.
- Marques DD, Sartori RA, Lemos TLG, Machado LL, Souza JSN, Monte FJQ (2010) Chemical composition of the essential oils from two subspecies of *protium heptaphyllum*. *Acta Amaz*.
- Onofre SB, Ferronato R, Marchesan ED, Presenti E, Bednarski F (2007) Atividade antimicrobiana de óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* DC, *Baccharis uncinella* DC. (Asteraceae). *Revista Brasileira de Farmacologia*

Poulouse AJ, Croteau R (1978) Biosynthesis of aromatic Monoterpenes Conversion of γ -Terpinene to p-Cymene and Thymol in *Thymus vulgaris* L. Archives of Biochemistry and Biophysics, v. 187, n. 2, p. 307-314.

Sartori, MRK, Pretto JB, Cruz AB, Bresciani LFV, Yunes RA, Sortino M, Zachino SA, Cechinel-Filho V. (2003) Antifungal activity of fractions and two compounds of flowers from *Wedelia paludosa* (*Acmela brasilium*) (ASTERACEAE). Pharmazie, v.58, p.567-569.

Siani AC, Ramos MFS, Menezes-de-Lima JO, Ribeiro-Dos-Santos R, Fernandes-ferreira E, Soares ROA, Rosas EC, Susunaga GS, Guimarães, AC, Zoghihi MGB, Henriques MGMO (1999) Evaluation of anti-inflammatory-related activity of essential oil from the leaves and resin of species of protium. Journal of Ethno pharmacology, v 66, n.01, p.57-59.

Silveira PG, Nome F, Gesser CJ, Sá MM (2006) Estratégias utilizadas no combate à resistência bacteriana. Química nova, v. 29, p. 844-855.

Simões CM, Spitzer V (2004) Óleos voláteis, In Simões CMO, Sckenkel EP, Gosmann C, Mello JP, Mentz LA, Petrovick PR (Eds.). Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5. Ed. Florianópolis/Porto Alegre: Editora da UFSC/UFRGS, p. 467- 468.

Soliman FM, El-Kashory EA, Fathy MM, Gonaid MH (1994). Analysis and biological activity of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* from Egypt. Flavour and Fragrance Journal, 9(1), 29-33.

Schaetechter M, Engleberg NC, Eisenstéin BI, Medoff G (2002) Microbiologia: mecanismos das doenças infecciosas. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.642.

Violante IMP, Hamerski L, Garcez WS, Batista AL, Chang MR, Pott VJ, Garcez FR (2012) Antimicrobial activity of some medicinal plants from the cerrado of the central-western region of Brazil, v. 43, n.4.

Ultee A, Bennik MHJ, Moezellar R (2002) The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. Applied and Environmental Microbiology, v. 68, p. 1561-1568.

Tornuk F, Cankurt H, Ozturk I, Sagdic O, Bayram O, Yetim H (2011) Efficacy of various plant hydrosols as natural food sanitizers in reducing *Escherichia coli* O157:H7 and *S. typhimurium* on fresh cut carrots and apples. International Journal of Food Microbiology, 148, 30–35.

4. CAPÍTULO 2

Estrutura-atividade antimicrobiana de derivados do Eugenol

Didley Sâmia Paiva Cazelli^a, Fernanda Endringer Pinto^a, Maria Eduarda Sousa Barroso^a
Rafael Brianti Pizi^b, Marina Orlandi^b, Thiago Belarmino de Souza^b, Diogo Teixeira
Carvalho^b, Denise Coutinho Endringer^{a, c*}

^a Universidade Vila Velha, Vila Velha, ES, Brazil. ^b Universidade Federal de Alfenas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Laboratório de Pesquisa em Química Farmacêutica, Alfenas, MG, Brazil. ^c Instituto Federal do Espírito Santo, Campus Vila Velha, Vila Velha, ES, Brazil

*Autor correspondente: Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Vila Velha, Av. Comissário José Dantas de Melo, nº21, 29102-920 – Boa Vista, Vila Velha, ES, Brasil – Tel.: +55 27 32412198. E-mail address: endrings@gmail.com

Resumo

Introdução- O eugenol componente majoritário do óleo essencial do cravo-da-índia. Por apresentar atividades antimicrobiana, antioxidantes, antineoplásica, antiviral e anestésica, tem sido amplamente difundido em estudos farmacológicos.

Objetivo - Determinação antimicrobiana do eugenol e seus derivados contra as linhagens bacterianas *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Streptococcus mutans*.

Resultados- O eugenol não foi ativo na concentração de 0,5g/mL, porém três derivados obtidos 2, 9 e 10 foram ativos contra os três micro-organismos testados. O derivado 1 foi ativo apenas contra *E. coli* e o 3 contra *S. aureus*. A eficácia antimicrobiana foi confirmada pelo estudo da estrutura atividade dos análogos do eugenol contra as linhagens Gram-positivas e Gram-negativas analisadas.

Conclusão- De acordo com a relação estrutura atividade a substituição de grupos na molécula do eugenol para obtenção dos derivados se mostrou mais ativa que o próprio eugenol nas mesmas concentrações testadas.

Palavras chaves: Atividade antimicrobiana, eugenol, sintetizados, estrutura atividade.

Introdução

O eugenol (4-alil-2-metoxi-fenol) é o componente majoritário do cravo-da-índia e apresenta atividades antimicrobiana, anti-inflamatória, antioxidante, anestésica e anti-séptica (Siani *et al.*, 1999; Globbo-Neto & Lopes 2007), sendo amplamente na odontologia na composição de um cimento com óxido de zinco (Markowitz *et al.*, 1992).

As concentrações inibitórias mínimas (CIM) do óleo essencial do cravo-da-índia anteriormente descritas variaram de 0,2 mg/mL a 0,6 mg/mL para bactérias Gram-positivas e para Gram-negativas de 0,5 mg/mL a 0,8 mg/mL (Silvestre *et al.*, 2010). O eugenol apresentou CIM para as bactérias Gram positivas de 10 μ g/mL (0,01mg/mL) que provocam endocardites (Leite Medeiros *et al.*, 2007). A atividade antimicrobiana do eugenol pode ser devida à alta penetrabilidade na membrana citoplasmática, pelo seu rompimento, o que gera um extravasamento do conteúdo provocando a morte da bactéria (Affonso *et al.*, 2012).

A seleção de bactérias resistentes aos antibióticos é um dos problemas que dificultam o tratamento de doenças infecciosas, tornando-se um desafio para a indústria farmacêutica (Hirakata *et al.*, 1998; Guimarães *et al.*, 2010).

As bactérias Gram positivas fazem parte da microbiota humana, podendo provocar infecções simples (gastroenterites, espinhas, furúnculos) ou mais graves (pneumonia, endocardite, meningite) dentre outras patologias. Algumas bactérias Gram negativas, por apresentar estruturas mais complexas na sua formação, podem se tornar mais resistentes a determinados tratamentos antimicrobianos, geralmente estas são as causas mais comuns de infecções hospitalares, podendo provocar até a morte do paciente (Silveira *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2007).

Análogos ao antibiótico vancomicina, por exemplo, usados no tratamento de bactérias Gram-positivas resistentes, apresentavam CIM e 150 mg/mL, porém quando ocorreu alteração da cadeia lateral da estrutura desse antibiótico a CIM foi na faixa de 9-38 μ g/mL (Silveira *et al.*, 2006).

O eugenol apresenta elevada atividade antimicrobiana, quando testado contra micro-organismos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, (Affonso *et al.*, 2012), dentre outros, obtendo resultados satisfatórios na diminuição ou inibição significativa na taxa de crescimento. De modo geral, o eugenol apresenta maior atividade contra bactérias Gram-positivas.

A ação do *S. mutans* está bem relacionada com a odontologia, podendo ser uma das principais bacterias cariogênicas, facilitando a proliferação de micro-organismos anaeróbios, que causam periodontite (Juiz *et al.*, 2010; Kumarihamy *et al.*, 2011). A periodontite consiste numa inflamação que pode levar a uma absorção óssea alveolar, causando perda do dente (Pinto *et al.*, 2008), portanto é relevante o estudo de inibição de *S. mutans*, uma vez que esse micro-organismo está relacionado com problemas bucais, e o eugenol é utilizada na odontologia.

Os derivados do eugenol podem ser mais ativos que o eugenol (Hidalgo *et al.*, 2009). Desta forma, o presente estudo objetiva avaliar a atividade antimicrobiana de derivados do eugenol contra linhagens de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Streptococcus mutans*, empregando-se a análise da concentração inibitória mínima do eugenol e derivados, e estudo atividade versus estrutura.

Experimental

Materiais

Cloreto de trifetil-tetrazólio (CTT), foi adquirido da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). DMSO (Dimetilsulfóxido) é proveniente da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). Ágar e o caldo Mueller-Hinton foram obtidos da Himedia Laboratories PVT (Mumbai, India). Eugenol (**1**) foi obtido da Biodinâmica e os derivados (**derivado 1** = 2-metoxi-6-(morfolino-4-ilmetil)-4-(prop-2-en-1-il) fenol ; **derivado 2** = 2-metoxi-4-(prop-2-en-1-il) fenoxi-metanol; **derivado 3** = O-glicosídeo peracetilado do eugenol; **derivado 4** = 2-metoxi-6-(morfolino-4-ilmetil)-4-(prop-2-en-1-il) fenol; **derivado 5** = O-glicosídeo do eugenol; **derivado 6** = 2-metoxi-6-(morfolino-4-ilmetil)-4-(prop-2-en-1-il) benzoato fenílico; **derivado 7** = 2-metoxi-6-(morfolino-4-ilmetil)-4-(prop-2-en-1-il)-4-clorobenzoato fenílico; **derivado 8** = O-galactosídeo peracetilado do eugenol; **derivado 9** = O-galactosídeo do eugenol; **derivado 10** = O-acetil eugenol) foram sintetizados por metodologias clássicas (Karanov *et al.*, 1995; Gulay, 2011; Souza *et al.*, 2013) e fornecidos por colaboradores do Laboratório de Pesquisa em Química Farmacêutica da UNIFAL-MG.

Linhagens microbianas

Foram utilizadas linhagens bacterianas: *Staphylococcus aureus* (ATCCTM 25923); *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212TM); *Escherichia coli* (ATCC 25922TM); *Streptococcus mutans* (ATCC 25175TM).

Atividade antimicrobiana

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada em placas de cultura com 96 poços, segundo as normas do CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*, 2003). Os micro-organismos utilizados foram: *S. aureus*, *S. mutans* e *E. coli*. A concentração final de células foi ajustada na ordem de 10^4 UFC/mL pela escala de McFarland.

Em cada poço, exceto no utilizado para o branco, adicionaram-se meio de cultura Muller Hilton e inóculo, amostra ou controles positivos ou negativos.

As concentrações intermediárias foram preparadas diluindo-se a solução estoque de dimetilsulfóxido (DMSO) a 10 mg/mL. Essa solução foi posteriormente diluída em tampão fosfato salino (PBS), resultando concentrações finais de 0,5 a 0,03 mg/mL avaliadas para o eugenol e derivados.

Foi determinado a CIM do diluente (DMSO), sendo avaliadas as concentrações finais de 50% a 0,31%. Essa determinação foi feita para verificar se as concentrações de DMSO utilizadas exercem algum efeito inibitório sobre os micro-organismos testados.

Em todas as placas, foram inseridos controles positivos e controles negativos, tendo a água oxigenada e o hipoclorito concentrado como controles negativos. Ao final do preparo, as placas foram incubadas a temperatura de 36 °C, por 24 h, e posteriormente, adicionaram-se 50 µL do indicador cloreto de trifetil-tetrazolio (CTT) (0,5% em solução aquosa). Após 4 h de incubação, a CIM foi determinada como a menor concentração capaz de inibir o crescimento visível de células conferido pelo CTT(células mortas não são coradas). Todos os testes foram realizados em triplicata.

Análise estatística

Para análise da atividade antimicrobiana foi empregado teste t de Student. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

Resultados e Discussão

A atividade antimicrobiana foi avaliada contra três micro-organismos, sendo duas bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *S. mutans*) e uma Gram negativa *E. coli*.

O eugenol na sua concentração máxima avaliada 0,5 mg/mL, não apresentou inibição contra os três micro-organismos testados (Tabela 1). Os derivados mais ativos foram **2**, **9** e **10** (Tabela 1). O derivado **1** foi ativo apenas contra *E. coli* e o **3** contra *S. aureus*.

O resultado da CIM para o diluente DMSO foi superior a 0,5 mg/mL evidenciando que o DMSO a 5% não altera o crescimento do micro-organismo.

Os resultados obtidos para o efeito antimicrobiano das amostras (Tabela 1) foram classificados de acordo com Aligiannis *et al.* (2001), que embora utilizem extrato de plantas medicinais na classificação, apresentam uma classificação de força de atividade por valor de CIM, sendo CIM abaixo de 2,0 mg/mL consideradas substâncias com atividade antimicrobiana. CIM até 0,5 mg/mL, como forte antimicrobiano de 0,6 a 1,5 mg/mL como moderadas e aquelas com CIM acima de 1,6 mg/mL antimicrobianos fracos.

Os derivados do eugenol **2**, **9** e **10** foram classificados como antimicrobianos fortes contra as linhagens Gram-positivas *S. aureus* e *S. mutans* e a Gram-negativa *E. coli* (Tabela 1).

Os derivados **1** e **3** foram classificados como forte apenas contra as linhagens *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente. Para as outras amostras não foi possível classificá-las exatamente, pois a CIM encontrada no presente trabalho é superior a 0,5 mg/mL (Tabela 1).

As amostras **1**, **2**, **9** e **10** foram ativas contra a linhagem *E. coli*, sendo considerado um micro-organismo mais resistente, devido à presença da bicamada lipídica mais complexa na parede celular, o que tende a dificultar o acesso das amostras avaliadas à membrana citoplasmática (Tornuk *et al.*, 2011).

O efeito bactericida em determinadas moléculas, pode ser atribuído à presença de grupos fenólicos, por degenerarem as proteínas da camada celular da membrana em

altas concentrações, porém em baixas concentrações pode ser responsável por estabilizar as membranas (Hidalgo *et al.*, 2009, Cao *et al.*, 1997, Yang *et al.*, 2011).

Durante o estudo, as substâncias que apresentaram a estrutura fenólica foram o **derivado (1)** e o eugenol, sendo este último inativo na concentração inicial de 0,5 mg/mL, no presente trabalho. Porém o eugenol se mostrou ativo contra Gram-positivas na concentração de 10 ug/mL (Leite Medeiros *et al.*, 2007), logo a presença da hidroxila na estrutura do eugenol e dos derivados do eugenol que apresentaram atividade antimicrobiana pode ser devido ao fato da interação intermolecular do tipo ligação hidrogênio com a bicamada lipídica da bactéria, sendo observados no teste de concentração inibitória mínima contra as linhagens Gram-positivas *S. aureus*, *S. mutans* e a Gram-negativa *E.coli* (Silveira *et al.* 2006).

A atividade antimicrobiana do **derivado 1** contra a *E. Coli* pode estar relacionada ao sinergismo com o grupo morfolino, presente em antibióticos (Silveira *et al.*, 2006).

O **derivados 2 e 10** apresentaram uma melhor atividade que os demais, no caso do **derivado 2** pode estar relacionado à presença de hidroxila e o aumento relativo da cadeia alifática. A atividade antimicrobiana contra *S. aureus* é estreitamente dependente do número de átomos de carbono na cadeia hidrofóbica e do grupo hidrofílico hidroxila, bem como a presença de duplas ligações (Kubo *et al.*, 1993; Inoue *et al.*, 2004).

Desta forma, o aumento da cadeia alifática irá favorecer na interação com a parte lipofílica do peptidoglicano. Esta interação ocorre devido à livre rotação apresentado pelo carbono do tipo sp^3 presente na extensão da cadeia alifática uma vez que, promove a livre rotação e favorece o encaixe com a porção do peptidoglicano (Ibáñez *et al.*, 2007), em ambas as polaridades, o grupo $-CH_2$ apolar e hidroxila polar.

A atuação da hidroxila na cadeia alifática favorece a interação intermolecular por meio de ligação hidrogênio no **derivado 2**, sendo para cada hidroxila, duas como aceptoras (LHA), e uma como doadora (LHD). As LHA's e LHD's facilitam a interação com a região polar da porção terminal do peptidoglicano bacteriano, por apresentar em sua superfície grupos hidroxilas livres, onde ocorre a interação, ocasionando a morte da bactéria (Silveira *et al.*, 2006; Ibáñez *et al.*, 2007). Embora este não seja o único mecanismo envolvido na morte bacteriana, a inativação de uma das etapas na formação da parede celular da bactéria (transglicosilação ou transpeptidação), ou interação direta na síntese proteica também pode ocasionar a morte bacteriana (Ruiz *et al.*, 2001; Siveira *et al.*, 2006).

Outros estudos relatam que a ação antibacteriana pode ocorrer de três formas: aumento da permeabilidade dos constituintes celulares; interferência na bicamada fosfolipídica; por alterar sistemas enzimáticos, ou por inativação ou destruição do material genético (Kalemba E Kunick, 2003; Delamare *et al.*, 2007).

A presença do grupo acetil no **derivado 10** também pode estar relacionada com a atividade antimicrobiana. Em primeiro momento, o aumento de carbonos na cadeia alifática do grupo acetil favorece o aumento da lipofilicidade (Souza filho *et al.* 2006), que pode ser um fator importante para a interação com a membrana bacteriana.

O **derivado 10** (acetato de 4-alil-2-metoxifenil) também foi sintetizado, por Carrasco *et al.*, (2008), para avaliar a atividade *in vitro* do eugenol e dos derivados análogos sintetizados, sobre duas linhagens de células cancerosas de humanos: DU-145 (células do câncer de próstata) e KB (carcinoma oral). Durante o estudo foi observado que o derivado acetilado apresentou atividade sobre as células cancerosas em várias concentrações (Carrasco *et al.* 2008).

Em outro estudo, foi observado que atividade fungicida de determinada substância aumentava quando ocorria a substituição do grupo hidroxila pelo grupo acetil. Isso porque o grupo acetil reduz a densidade eletrônica do anel aromático a que está ligado, em relação ao grupo OH, tendendo a aumentar o potencial da substância quando acetilada (Souza Filho *et al.* 2006). A atividade anti-inflamatória também foi confirmada nos flavonóides durante a substituição da hidroxila pelos grupos acetilas (Coutinho *et al.* 2009).

Portanto, pressupõe-se que o derivado acetil do eugenol (**derivado 10**) apresenta atividade antimicrobiana, e que essa atividade pode estar relacionada à substituição do grupo hidroxila pelo grupo acetil, reduzindo a densidade do anel, característico dos grupos meta-dirigente (desativadores do anel) tendendo a aumentar sua atividade antimicrobiana conforme observado durante a pesquisa de Souza filho *et al.*, (2006). O aumento de grupos polares na molécula facilita a interação com a parte polar da camada de peptidoglicano (Silveira *et al.*, 2006).

A relação de moléculas de açúcares (glicosídeos) e suas interações com proteínas representam um papel fundamental em vários processos biológicos, do crescimento até a apoptose celular (Ibáñez *et al.*, 2007). Ainda de acordo com o autor, é importante o entendimento termodinâmico e cinético envolvido no processo de ligação desses glicosídeos a uma molécula aromática, ou resíduos aromáticos receptores da proteína ativa (triptofano, tirosina e fenilalanina), sendo ela enzima ou não, no reconhecimento de glicídeos.

Em relação aos derivados glicosilados (**derivado 5**) e (**derivado 9**) foi observada que o glicosídeo do eugenol (**derivado 5**) não apresentou atividade contra nenhum dos micro-organismos testados, mesmo apresentando a hidroxila na posição equatorial, apresentando menor impedimento espacial (Silva, 2011). Sugere-se que a posição equatorial possa impedir alguma etapa de formação da parede celular. Portanto, outros fatores são necessários, além do aumento da hidrosolubilidade do derivado, para a determinação da atividade antimicrobiana na concentração de 0,5 mg/mL.

Estudos indicam que a forma de aglicona promove uma melhor interação com a membrana celular por deixar a molécula mais lipossolúvel, elevando a biodisponibilidade para uma melhor absorção, diminuindo a hidrossolubilidade das moléculas com glicosídeos (Nilsen *et al.*, 2006; Salem *et al.*, 2010). Logo, enzimas glicosidases “*in vivo*” podem atuar por desglicosilação para obtenção da forma aglicona, já que a forma glicosilada na concentração analisada não teve efeito antimicrobiano.

Por outro lado, o isômero derivado do eugenol o- galactosídeo (**derivado 9**) apresentou atividade antimicrobiana, tendo a menor CIM observada, se comparado aos **derivados 2** e **10**. Entretanto, a atividade antimicrobiana do **derivado 9** pode estar relacionada à posição axial do derivado, uma vez que esta posição favorece a ligação hidrogênio (Ibáñez *et al.*, 2007), nas posições 4 e 6 do o-galactosídeo do eugenol (**derivado 9**) devido ao carbono 6, apresentar o grupo -CH₂-OH, favorecendo a livre rotação do carbono sp³ conforme mencionado, ocorrendo a ligação hidrogênio intramolecular e posteriormente intermolecular com membrana da bactéria, fato que poderia justificar a atividade do isômero na posição axial.

A estabilidade da energia obtida pela interação intermolecular foi observada durante o estudo de Ibáñez *et al.*, (2007) devido a livre rotação do grupo CH₂-OH dos glicosídeos ao interagir com anéis benzênicos, fenóis ou átomos de hidrogênio. Os carboidratos estão posicionados de tal maneira que pelo menos três átomos de hidrogênio da região hidrófoba, incluindo as ligações C-H do anel, são orientadas para o núcleo aromático de aminoácidos (Spinwok, *et al.*, 2004; Ibáñez *et al.*, 2007).

Estudos comprovam que a interação CH/ π desempenha um papel importante na interação com proteínas (Jorgensen *et al.*, 1996; Spinwok *et al.*, 2004; Milčić *et al.*, 2006; Endringer *et al.*, 2008).

Portanto de acordo com as pesquisas, pressupõe que a atividade antimicrobiana desempenhada pelo derivado (9) do eugenol, seja devido à estabilidade da energia

(diminuição) ao ocorrer interação com possível um aminoácido aromático na parede da membrana celular da bactéria.

Em relação aos derivados peracetilados, do eugenol: O-glicosídeo peracetilado (**derivado 3**) e O-galactosídeo do eugenol (**derivado 8**), que tiveram todas as suas hidroxilas acetiladas, em nenhuma das concentrações avaliadas ocorreu inibição bacteriana. Provavelmente que a presença do grupo hidroxila (posição axial) é importante para atividade antimicrobiana, conforme já mencionado.

Substâncias com mais grupos hidroxilas tendem apresentar maior atividade na diminuição de alergias ocasionadas por doenças respiratórias (Nagashima *et al.*, 2008). O fato do o-galactosídeo do eugenol (**derivado 9**) apresentar a atividade antimicrobiana, e devido à comprovação que o composto monoacetilado (**derivado 10**), apresentar atividade, sugere-se que tal interferência, dificultando a atividade antimicrobiana dos **derivados 3 e 8** sejam devido à presença de grupos volumosos, pois dois fatores são importantes para o reconhecimento molecular, o reconhecimento um do outro (complementaridade) e a presença de uma cavidade para posicionar o grupo hospedeiro complementar a do convidado (pré-organização), porém, devido às forças de dispersões presentes, as duas condições mais importantes para haver o reconhecimento molecular são a especificidade e a estabilização da energia (Ibáñez *et al.*, 2007). Os fatores citados têm uma relação direta com atividade de moléculas que apresentam grupos volumosos, que pode ter dificultado a interação com o substrato, pois durante o estudo quando ocorreu à redução na quantidade do mesmo grupo acetyl, a substância tornou-se ativa (**derivado 10**). O impedimento espacial dificulta a interação hidrofílica (Carvalho *et al.*, 2003), por meio da ligação hidrogênio com a membrana bacteriana, diminuindo a atividade, mesmo com o aumento da lipossolubilidade.

Os derivados **1, 4, 6 e 7** apresentam em sua constituição o ciclo morfolino ligado ao grupo $-CH_2$. A atividade antimicrobiana de substâncias que apresentavam este ciclo foi previamente relatada, assim como a piperazina (Dermibas *et al.*, 2008). O ciclo morfolino é característico do antibiótico linezolida, que tem se mostrado eficiente no combate a bactérias Gram positivas resistentes à vancomicina, por interagir com os ribossomos na síntese protéica bacteriana (Silveira *et al.*, 2006; Guimarães *et al.*, 2010).

O heteroátomo do anel morfolino na posição terminal atua interagindo com os átomos de oxigênio e nitrogênio por meio da ligação hidrogênio com proteínas, na parede da membrana bacteriana (Silveria *et al.*, 2006; Nagashima *et al.*, 2008, 2009). Porém, todos os derivados do eugenol que apresentaram o grupo morfolino, mostraram-

se inativos contra as linhagens bacterianas testadas no presente estudo a partir as concentração inicial de 0,5mg/mL (Tabela 1).

Conclusão

O eugenol (4-alil-2-metoxi-fenol) não apresentou atividade antimicrobiana contra linhagens Gram-positivas e Gram-negativas a partir da concentração máxima avaliada (0,5 mg/mL). Dos dez derivados apenas três (2, 9 e 10) apresentaram atividades antimicrobianas contra os três micro-organismos (bactérias Gram-positivas e Gram-negativas). Portanto, a substituição de determinados grupos na molécula do eugenol para obtenção dos derivados se mostrou mais ativa que o próprio eugenol nas mesmas concentrações testadas.

Agradecimentos

Ao professor Diogo Teixeira, por ceder as moléculas para a pesquisa. Agradecemos à Tommasi Analítica e à UVV pelo auxílio financeiro a esta pesquisa.

Referências

- Aliagiannis N, Kalpotzakis E, Mitaku S, Chinou IB. 2001. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 4168–4170,
- Affonso RS, Rennó MN, Slana GBCA, França TCC. 2012. Aspectos químicos e biológicos do óleo essencial de cravo da Índia. *Revista virtual de química*.p. 146 – 161.
- Carvalho I, Pupo MT, Borges ADL, Bernades LSC. 2003. Introdução a modelagem molecular de fármacos no curso experimental de química farmacêutica. *Quim. Nova*, Vol. 26, No. 3, 428-438.
- Carrasco A.H.; Espinoza C.L.; Cardile C.; Gallardo C, Cardona W, Lombardo L, Catalan M.K, Cuellar F.M, Russo A. 2008. Eugenol and its Syntetic Analogues Inhibit Cell Growth of Human Cancer Cells (Part I). *J. Braz. Chem.* v. 19,p. 543-548.
- Cao GL, Sofic E, Prior RL. 1997. Antioxidant and prooxidant Behavior os flavonóides: Structure-Ativity relationships. *Free Radical Biololy end Medicine*, v. 22, p. 749-760.
- Coutinho MAS, Muzitano MF, Costa SS. 2009. Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. *Revista virtual de química*. p. 241 – 256
- Demirbas A, Sahin D, Demiirbas N, Karaoglu SA. 2009. Synthesis of some new 1,3,4-thiadiazol-2-ylmethy-1,2,4-triazole derivatives and investigation of their antimicrobial activities. *European journal of Medicinal Chemistry*. p. 2896 – 2903
- Declamare AP, Pistorello ITM, Artico L, Serafini LA, Echeverrigaray S. 2007. Antibacterial activity of essential oils of salvia officinalis L. and Salvia triloba L. Cutivated in South Brazil. *Food Chemistry*. p. 603 - 608
- Endringer DC, Oliveira OV, Braga FC. 2013. In vitro and in silico inhibition of angiotensin-converting enzyme by carbohydrates and cyclitols. *Chemical Papers* 68 (1) p. 37–45.
- Gobbo-netto L, LOPES NP. 2007. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Quimica nova*, v. 30, p. 374-381.

Guimarães DO, Momesso LS, Pupo MT. 2010. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Quim. Nova.* v.33, n.3.

Hidalgo ME, Rosa C, Carrasco H, Cardona W, Gallardo C, Espinoza L. 2009. Antioxidant Capacity of Eugenol Derivatives. *Química nova*, v. 32,n.6, p. 1467-1470.

Hirakata Y, Izumikawa K, Yamaguchi T, Takemura H, Takana H, Yoshida R, Matsuda J, Nakano M, Tomomo K, Maesaki S, Kaku M, Yamada Y; Kamihira S, Kohno S. 1998. Rapid detection and evaluation of clinical Characteristics of emerging multiple-drug-resistant gram negative rods carrying the metallo-beta-lactamase gene bla_{IMP}. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 42, n08, p. 2006-2011.

Inoue Y, Shiraishi A, Hada T, Hirose K, Hamashima H, Shimada J. 2004. The antibacterial effects of terpene alcohols on *Staphylococcus aureus* and their mode of action. *FEMS Microbiology Letters*, v. 237, n. 2, p. 325–331,

Ibanez BI, Gualito RK, Garcia QB, Aguilar RA Cuevas G. 2007. Calorimetric Measurement of the CH/ π interaction involved in the molecular recognition of saccharides by aromatic compounds. *J Org. Chem.* p. 849 – 857

Juiz P JL, Alvez RJC, Barros TF. 2010. Uso de produtos naturais no tratamento de doença periodontal. *Bras. J. Pharmacog.* 20, 134-139.

Karanov E, Iliev L, Alexieva V, Georgiev GT, Thang NT, Natova L . 1995. Synthesis and plant growth regulating activity of some novel 2-methoxy-4-(1- or-2-propenyl)-6-substituted phenols. *Bulg. J. Plantphysiol.* 21(4), p.39–47.

Kalemba D, Kunica A. 2003. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current. Medicinal Chemistry.* p. 813 – 829.

Kubo I, Muroi H, Himejima M, Kubo A. 1993. Antibacterial activity of long-chain alcohols: the role of hydrophobic alkyl groups. *Bioorganic Medical Chemistry Letters*, v. 3, n. 6 , p.1305–1308.

Kumarihamy SLM, Subasinghe LD, Jayasekara P, Kularatna SM, Palipana PD. 2011. The prevalence of early childhood caries in 1-2 yrs olds in a semi-urban area of Sri Lanka, *BMC Res. Notes* 4, 336.

Leite AM, Lima EO, Souza EL, Diniz MFFM, Trajano VN, Medeiros IA. 2007. Efeito inibitório de eugenol, β -pineno e um α -pineno sobre o Crescimento de Bactérias Gram-Positivas potencialmente causadoras de endocardite infecciosa. *Rev. Bras. Cienc. Farm.* V. 43, n.1, p. 121-126.

MARKOWITZ, K.; Moynihan. M.L.; Kim, S.K. 1992. Biologic properties of eugenol and zinc oxide-eugenol. *Oral Surg. Oral Phatol.* V. 73, p. 729-737.

Milcic MK, Medaković VB, Zarić SD. 2006. CH/ π interactions of π -system of acetylacetonato chelate ring Comparison of CH/ π interactions of Ni(II)-acetylacetonato chelate and benzene rings. *Inorganica quimica acta.* p. 4427 – 4430.

Nagashima S, Nagata H, Iwata M, Yokota M, Moritomo H, Orita M, Kuromitsu S, Koakutsu A, Ohga K, Takeuchi M, Ohta M, Tsukamoto S. 2008. Identification of 4-benylamino-2-[(morpholin-4-ylphenyl) amino] pyrimidine-5-carboxamide derivatives as potent and orally bioavailable STAT6 inhibitors. *Bioorganic e Medicinal Chemistry.* p. 6509 – 6521.

Nagashima S, Hondo T, Nagata H, Ogiyama T, Maeda J, Hoshii H, Kontani T, Kuromitsu S, Ohga K, Orita M, Ohno K, Moritomo A, Shiozuka K, Furutani M, Takeuchi M, ohta M, Tsukamoto S. 2009. Novel 7H-pyrrolo [2,3-*d*] pyrimidine derivatives as potent and orally active STAT6 inhibitors. *Bioorganic e Medicinal Chemistry.* p. 6926 – 6936.

Nielsen ILF, Chee WSS, Poulsen L, Offord-Cavin E, Rasmussen SE, Frederksen H, Enslin M, Barron D, Horcajada MN, Williamson G. 2006. Bioavailability is improved by enzymatic modification of the citrus flavonoid hesperidin in humans: A randomized, double-blind, crossover trial. *Journal of Nutrition,* v.136 (2) p. 404-408.

Pinto SAH, Pinto LM, Cunha GMA, Chave SMH, Santos FA, Rao VS. 2008. Anti-inflammatory effect of α , β - amyrin, a pentacyclic triterpene from *Protium heptaphyllum* in rat model of acute periodontitis. *Inflam.* v.16, p. 48-52.

Santos AL, Santos DO, Freitas CC, Ferreira BLA, Afonso IF, Rodrigues CR, Castro HC. 2007. *Staphylococcus aureus*: visiting a strain of clinical importance. *J. Bras. Patol. Med. Lab,* v. 43, n.6.

Salem JH, Humeau C, Chevalot I, Harscoat-Schiavo C. 2010. Effect of donor chain length on isoquercitrin acylation and biological activities of corresponding esters. *Process Biochemistry*, v. 45(3):p. 382-389.

Siane AC, Ramos MSF, Lima Jr OM, Santos RR, Ferreira EF, Soares ROA, Rosas EC, Susunaga GS, Guimarães AC, Zoghbi MGB, Henriques MGMO. 1999. Evaluation of anti-inflammatory-related activity of essential oils from the leaves and resin of species of *Protium*. *J. of Ethnopharmac.* 56, 57-69.

Silveira PG, Nome F, Gesser CJ, Sá MM. 2006. Estratégias utilizadas no combate à resistência bacteriana. *Química nova*, v. 29, p. 844-855.

Silvestri JDF, Paroul N, Czyewski E, Lerin L, Rotava I, Cansian RL, 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. *Revista Ceres Viçosa*, vol. 57. p. 589 – 594.

Spiwok V, Lipovová P, Skálová T, Buchtelová E, Hasek J, Kralová B. 2004. Role of CH/ π interactions in substrate binding by *Escherichia Coli* β -galactosidase. *Carbohydrate Research*. p. 2275 – 2280.

Silva CO. Efeito anomérico em carboidratos fatos e hipóteses. 2011. *Rev. Virtual Quim.*3 (4), p. 235-246.

Souza TB, Orlandi M, Coelho LFL, Malaquias LCC, Dias ALT, Carvalho RR, Silva NC, Carvalho DT. 2013. Synthesis and in vitro evaluation of antifungal and cytotoxic activities of eugenol glycosides. *Med Chem Res*, v 23, p. 496–502.

Souza Filho APS, Borges FC, Santos LS. 2006. Análise comparativa dos efeitos alelopáticos das substâncias químicas tironina e tironina acetilada. Planta daninha. *Química nova*, v 24.

Tornuk F, Cankurt H, Ozturk I, Sagdic O, Bayram O, Yetim H. 2011. Efficacy of various plant hydrosols as natural food sanitizers in reducing *Escherichia coli* O157:H7 and *S. typhimurium* on fresh cut carrots and apples. *International Journal of Food Microbiology*, 148, 30–35.

Zengin G. 2011. Synthesis, Antimicrobial Activity, and Structure–Activity Relationships of Eugenol, Menthol, and Genistein Esters, *Khimiya Prirodnikh Soedinenii*, No. 4, p. 489–493.

Jorgensen WL, Maxwell DS, Tirado-Rives J. 1996. Development and Testing of the OPLS All-Atom Force Field on Conformational Energetics and Properties of Organic Liquids. *J. Am. Chem. Soc.* 1996, 118, 11225-11236

Gualito KR, Alonso-Rios RA, Quiroz-Garcia, Aquilar AR, Dias D, Jiménez-Barbero J, Cuevas G. 2009. Natureza de entalpia da interação CH/PI envolvido no reconhecimento de hidratos de carbono por compostos aromáticos, confirmado por um novo jogo de RMN, calorimetria, e os cálculos teóricos, *Journal of the American Chemical Society*, 131(50): 18129-38.

Ruiz N, Falcone BV, Branstrom AA, Goldman RC, Silhavy TJ, Kanne D. 2001. Base genética para as diferenças de atividade entre vancomicina e derivados glicolipídicos de vancomicina. *Cience*. Vol. 294 (5541) p. 361-364.

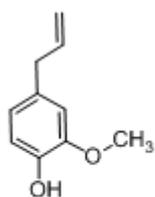
Tabela

Tabela 1. Concentração inibitória mínima (mg/mL) da CIM do eugenol e derivados.

Derivados do Eugenol	Micro-organismo		
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Escherichia coli</i>
1	>0,5	>0,5	0,5
2	0,25	0,125	0,25
3	0,5	>0,5	>0,5
4	>0,5	>0,5	>0,5
5	>0,5	>0,5	>0,5
6	>0,5	>0,5	>0,5
7	>0,5	>0,5	>0,5
8	>0,5	>0,5	>0,5
9	0,5	0,5	0,5
10	0,125	0,25	0,25
Eugenol	>0,5	>0,5	>0,5

Concentração inicial máxima das amostras 0,5 mg/mL.

Figura 1. Estrutura molecular do eugenol



Eugenol

Figura II. Estrutura molecular dos derivados do eugenol.