

URI - CAMPUS DE ERECHIM
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

ADRIANA BIASI VANIN

**PRODUÇÃO, PROPRIEDADES BIOLÓGICAS, ANTIOXIDANTES
E TOXICIDADE DO BIOAROMATIZANTE OBTIDO VIA
ESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DE ÓLEO ESSENCIAL DO
CRAVO-DA-ÍNDIA (*Caryophyllus aromaticus*)**

ERECHIM, RS – BRASIL

DEZEMBRO 2014

URI - CAMPUS DE ERECHIM
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**PRODUÇÃO, PROPRIEDADES BIOLÓGICAS, ANTIOXIDANTES
E TOXICIDADE DO BIOAROMATIZANTE OBTIDO VIA
ESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DE ÓLEO ESSENCIAL DO
CRAVO-DA-ÍNDIA (*Caryophyllus aromaticus*)**

ADRIANA BIASI VANIN

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da URI - Campus de Erechim, como requisito parcial à obtenção do Grau de Doutor em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos, da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Campus de Erechim.

ERECHIM, RS – BRASIL

DEZEMBRO 2014

PRODUÇÃO, PROPRIEDADES BIOLÓGICAS, ANTIOXIDANTES E TOXICIDADE DO BIOAROMATIZANTE OBTIDO VIA ESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DE ÓLEO ESSENCIAL DO CRAVO-DA-ÍNDIA (*Caryophyllus aromaticus*)

Adriana Biasi Vanin

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da URI - Campus de Erechim, como requisito parcial à obtenção do Grau de Doutor em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos, da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Campus de Erechim.

Comissão Julgadora:

Natalia Paroul, D. Sc.
(Orientadora)

Marcelo Mignoni, D. Sc.
URI-Campus de Erechim

Débora de Oliveira, D. Sc.
(Orientador)

Clarissa Dalla Rosa, D. Sc.
UFFS

Rogério Luís Cansian, D. Sc.
URI-Campus de Erechim

Helen Treichel, D. Sc.
UFFS

Erechim, 01 de dezembro de 2014.

NESTA PÁGINA DEVERÁ SER INCLUÍDA A FICHA CATALOGRÁFICA DA
TESE DE DOUTORADO. ESTA FICHA SERÁ ELABORADA DE ACORDO COM
OS PADRÕES DEFINIDOS PELO SETOR DE PROCESSOS TÉCNICOS DA
BIBLIOTECA DA URI – CAMPUS DE ERECHIM.

*“O êxito da vida não se mede
pelo caminho que você conquistou,
mas sim pelas dificuldades que superou no caminho”.*

(Abraham Lincoln)

Dedicatória

*Aos meus pais, Agenor e Anilde,
que por uma vida de dedicação, amor
e trabalho sempre possibilitaram a seus filhos a
oportunidade de realizar sonhos e conquistas.*

Ao meu irmão André, pelo incentivo.

*Ao meu marido Tiago pelo amor,
dedicação e companherismo.*

*A meu querido e amado filho Tiago
Gabriel, pelo simples fato de existir.*

AGRADECIMENTOS

Deixo aqui os meus sinceros agradecimentos às pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Inicio meus agradecimentos por meus pais, que sempre primaram pela minha educação. Obrigado Sr. Agenor e Sra. Anilde por, além de me oferecerem a oportunidade de estudar, sempre estarem ao meu lado.

Um obrigado muito especial mais uma vez a minha mãe e melhor amiga Anilde, porque é o meu porto seguro e a pessoa que cuida, entre outros momentos, nos momentos de dedicação a esta obra, do meu tesouro mais precioso, meu filho, sem você nada disso seria possível.

Ao meu marido Tiago, pelo apoio, companheirismo e paciência em momentos de mau humor e preocupação.

Ao meu filho Tiago Gabriel que em sua inocência infinita não entende as preocupações vividas.

Ao meu irmão André, pelo incentivo.

À orientadora Natália. Um ser humano iluminado, dotado de imensa sabedoria e humildade. Obrigado pela formação profissional e pessoal, pela oportunidade concedida e principalmente, pela paciência, dedicação e apoio em tantos momentos. Você é um exemplo a ser seguido, adoro e admiro você.

À minha também orientadora Débora por todos os ensinamentos, confiança, e apoio.

Ao professor Rogério Luiz Cansian pela sua orientação, seus ensinamentos e disponibilidade em ajudar em muitas etapas do trabalho.

Às queridas companheiras de trabalho Bruna, Tainara e Suelen pela ajuda, dedicação e amizade. Vocês foram fundamentais para a realização deste trabalho. Muito obrigado.

A todos que, de uma forma ou de outra, contribuíram e incentivaram para a conclusão deste trabalho, o meu muito obrigado!

Resumo da Tese ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Doutor em Engenharia de Alimentos.

PRODUÇÃO, PROPRIEDADES BIOLÓGICAS, ANTIOXIDANTES E TOXICIDADE DO BIOAROMATIZANTE OBTIDO VIA ESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DE ÓLEO ESSENCIAL DO CRAVO-DA-ÍNDIA (*Caryophyllus aromaticus*)

Adriana Biasi Vanin

Dezembro/2014

Orientadores: Natalia Paroul

Débora de Oliveira

Produção de aromatizantes via esterificação enzimática é uma pesquisa de grande interesse científico e tecnológico devido às inúmeras inconveniências relacionadas com a catálise ácida, principalmente por estes sistemas não se adequarem mais ao atual termo “tecnologias limpas”, além disso, produtos naturais como o óleo de cravo, apresentam compostos com excelentes potenciais biológicos. Neste sentido, este trabalho faz uso de uma tecnologia alternativa que descreve a maximização da produção de acetato de eugenila por esterificação de óleo essencial de cravo (*Caryophyllus aromaticus*) e anidrido acético em sistema isento de solvente orgânico, usando Novozym 435 como catalisador. As atividades antibacteriana, antifúngica, antioxidante e a toxicidade frente *Artemia salina* do óleo essencial de cravo e do acetato de eugenila produzido foram determinadas. As condições que maximizaram a produção de acetato de eugenila foram de 60°C, razão molar de óleo essencial de cravo para anidrido acético de 1:5, 150 rpm e 1% de enzima em relação à massa de substratos, com uma conversão de 99,87% . Um estudo cinético foi realizado para avaliar a influência da razão molar dos substratos,

concentração de enzima e da temperatura no rendimento em produto. Os resultados mostram que um excesso de anidrido, concentração de enzima de 5,5%, 50 °C e razão molar de óleo essencial de cravo para anidrido acético de 1:5 originou uma conversão quase completa após 2 horas de reação. Comparando-se a atividade antibacteriana do óleo essencial de cravo, antes e depois de esterificação, observou-se uma diminuição na atividade antimicrobiana do acetato de eugenila, particularmente no que diz respeito à concentração inibitória mínima (CIM). Ambos, acetato eugenila e óleo essencial de cravo, foram mais eficazes para bactérias do grupo gram-negativas que para o grupo de bactérias gram-positivas. Com relação à atividade antifúngica, o óleo essencial de cravo-da-índia apresentou maiores halos de inibição do que o éster acetato de eugenila. A atividade antioxidante demonstrou uma correlação linear com a concentração do óleo essencial. Os resultados demonstraram alto potencial antioxidante para óleo essencial antes ($IC_{50} = 367,5\mu\text{g/mL}$) e depois da reação de esterificação ($IC_{50}=283,5\mu\text{g/mL}$) constituindo-se em uma opção para a formulação de novos produtos alimentícios antioxidantes. Os resultados referentes à avaliação da toxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina* demonstraram que tanto o óleo ($DL_{50} = 0,5993 \mu\text{g.mL}^{-1}$) quanto o éster ($DL_{50} = 0,1178 \mu\text{g.mL}^{-1}$) apresentam altos potenciais tóxicos, sendo que o éster apresenta maior toxicidade em relação ao óleo, abrindo assim novos horizontes de pesquisa referente à utilização do éster no controle biológico de organismos transmissores de doenças.

Palavras-chave: Eugenil acetato, Novozym 435, atividade antimicrobiana, atividade antioxidante, óleo essencial de cravo, esterificação, toxicidade.

Abstract of Thesis to the Graduate Program in Food Engineering as part of the requirements for obtaining the degree of Doctor of Food Engineering.

PRODUCTION, BIOLOGICAL PROPERTIES, ANTIOXIDANT AND TOXICITY OF BIOAROMATIZANTE BY ENZYMATIC ESTERIFICATION OF ESSENTIAL OIL OF CLOVE (*Caryophyllus aromaticus*)

Adriana Biasi Vanin

Dezembro/2014

Orientadores: Natalia Paroul

Débora de Oliveira

Flavoring production by esterification is of great scientific research and technological interest due to several related inconveniências acid catalysis, especially by those not sistemas fit over the current term " clean technologies" , in addition, natural products such as oil carnation, compounds have excellent biological potential . In this sense, this work makes use of an alternative technology that reports the maximization of eugenyl acetate production by esterification of essential oil of clove (*Caryophyllus aromaticus*) and acetic anhydride in a solvent-free system using Novozym 435 as catalyst. The antibacterial, antifungal, antioxidant and toxicity front *Artemia salina* activities of clove essential oil and eugenyl acetate produced were determined. The conditions that maximized eugenyl acetate production were 60 °C, essential oil of clove to acetic anhydride ratio of 1:5, 150 rpm, and 10 wt% of enzyme, with a conversion of 99.87%. A kinetic study was performed to assess the influence of substrates' molar ratio, enzyme

concentration, and temperature on product yield. Results show that an excess of anhydride, enzyme concentration of 5.5 wt%, 50 °C, and essential oil of clove to acetic anhydride ratio of 1:5 afforded nearly a complete conversion after 2 h of reaction. Comparing the antibacterial activity of the essential oil of clove before and after esterification, we observed a decrease in the antimicrobial activity of eugenyl acetate, particularly with regard to minimum inhibitory concentration (MIC). Both eugenyl acetate and clove essential oil were most effective to the gram-negative than grampositive bacteria group. The same occurred for the antifungal activity, the essential oil of clove India showed greater inhibition zones than the acetate ester of eugenila. An antioxidant activity showed a linear correlation with the concentration of essential oil. The results showed high antioxidant potential for essential oil before ($IC_{50} = 367.5\mu\text{g/mL}$) and after the esterification reaction ($IC_{50} = 283.5\mu\text{g/mL}$) thus becoming an option for the formulation of new food products antioxidants. The results of the evaluation of toxicity against *Artemia salina* demonstrated that both oil ($DL_{50} = 0.5993\mu\text{g.mL}^{-1}$) and ester ($DL_{50} = 0.1178\mu\text{g.mL}^{-1}$) have high potential, and the ester has a higher toxicity relative to the oil, thus opening up new research horizons in use of the ester in the biological control of disease vectors bodies.

Keywords: Eugenyl acetate, Novozym 435, antimicrobial activity, antioxidant activity, essential oil of clove, esterification, toxicity.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	XVI
LISTA DE FIGURAS	XVII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XIX
CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....	1
1. INTRODUÇÃO.....	2
1.1 OBJETIVOS.....	4
1.1.1 Objetivo geral	4
1.1.2 Objetivos específicos.....	4
1.2 REFERÊNCIAS	5
CAPÍTULO II -PRODUÇÃO DE ACETATO DE EUGENILA VIA ESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA A PARTIR DE ÓLEO ESSENCIAL DE CRAVO-DA-ÍNDIA	6
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
2.1 AROMAS	7
2.1.1 Produção de aromatizantes	9
2.1.2 Extração de aromatizantes a partir de fontes naturais	11
2.1.3 Síntese de aromatizantes via catálise ácida	13
2.1.4 Síntese de aromatizantes via catálise enzimática.....	14
2.1.5 Produção de ésteres a partir de álcoois monoterpênicos e óleos essenciais.....	15
2.1.6 Óleo essencial do cravo-da-índia.....	16
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	20
2.2.1 Substratos para a reação enzimática	20
2.2.2 Enzima para a reação enzimática.....	20
2.2.3 Produção enzimática de acetato de eugenila	20
2.2.4 Determinação da conversão da reação.....	20

2.2.5 Otimização da produção enzimática de acetato de eugenila	21
2.2.6 Estudo cinético da produção enzimática de acetato de eugenila	21
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
2.3.1 Maximização da produção enzimática de acetato de eugenila	22
2.3.2 Cinética da produção enzimática de acetato de eugenila	27
2.3.2.1 Efeito da razão molar anidrido acético: eugenol na cinética de produção enzimática de acetato de eugenila	27
2.3.2.2 Efeito da concentração de enzima na cinética de produção enzimática de acetato de eugenila.....	29
2.3.2.3 Efeito da temperatura na cinética de produção enzimática de acetato de eugenila.....	30
2.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	31
2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
CAPÍTULO III - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	38
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	39
3.1 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS	39
3.1.1 Determinação da atividade antimicrobiana	48
3.2 MÉTODOS	49
3.2.1 Atividade antibacteriana	49
3.2.2 Concentração inibitória mínima (CIM)	50
3.2.3 Atividade antifúngica	51
3.2.4 Preparo das amostras	52
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
3.3.1 Avaliações do potencial antibacteriano	53
3.3.1.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM)	58
3.3.2 Avaliações do potencial antifúngico.....	60

3.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	65
3.5 REFERÊNCIAS	66
CAPÍTULO IV - ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO ÓLEO ESSENCIAL DO CRAVO-DA-ÍNDIA ANTES E APÓS A ESTERIFICAÇÃO	74
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	75
4.1 ANTIOXIDANTES NATURAIS	75
4.1.1 Defesas antioxidantes endógenas e fitoquímicos	78
4.1.2 Atividade antioxidante dos óleos essenciais.....	79
4.1.3 Testes de determinação da atividade antioxidante	81
4.2 MÉTODOS	83
4.2.1 Atividade antioxidante <i>in vitro</i>	83
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	84
4.3.1 Atividade antioxidante <i>in vitro</i> : atividade de captura de radicais livres com o teste de DPPH.....	84
4.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	88
4.5 REFERÊNCIAS	89
CAPÍTULO V - AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE FRENTE A <i>Artemia salina</i>	93
5. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	94
5.1.1 Toxicidade das plantas medicinais	94
5.1.2 Toxicidade do óleo essencial de cravo-da-índia.....	95
5.1.3 Determinação da toxicidade com <i>Artemia salina</i>	96
5.2 MATERIAIS E MÉTODOS	99
5.2.1 Toxicidade: bioensaio de letalidade para larvas de <i>Artemia salina</i>	99
5.2.2 Incubação.....	99
5.2.3 Preparo das diluições e incubação das larvas com o material	100
5.2.4 Contagem das larvas.....	101

5.2.5 Determinação da toxicidade	101
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	102
5.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	106
5.5 REFERÊNCIAS	106
CAPÍTULO VI - CONCLUSÕES.....	111
6. CONCLUSÕES	112
CAPÍTULO VII – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	114
7. SUGESTÕES	115
APENDICE A	116

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais aromatizantes utilizados no Brasil	8
Tabela 2. Variáveis e níveis estudados no delineamento composto central 2^3 para produção enzimática de acetato de eugenila.....	21
Tabela 3. Cinética da reação para avaliar a influencia da razão molar, da concentração da enzima e da temperatura entre os substratos na produção enzimática de acetato de eugenila.....	22
Tabela 4. Resultados das análises no óleo essencial de cravo (<i>Caryophyllus aromaticus</i>)	22
Tabela 5. Delineamento composto central 2^3 (valores codificados e reais) com as respostas em termos de conversão em acetato de eugenila	24
Tabela 6. Atividade antibacteriana pelo método de difusão de placas do óleo de cravo-da-índia sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas usando-se 5, 10, 20 μ L de amostra por disco.	53
Tabela 7. Atividade antibacteriana pelo método de difusão de placas do acetato de eugenila sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas usando-se 5, 10, 20 μ L de amostra por disco.	56
Tabela 8. Comparação da atividade antibacteriana entre o óleo de cravo-da-índia e acetato de eugenila sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas usando-se 5, 10, 20 μ L de amostra por disco.	57
Tabela 9. Concentração Inibitória Mínima (CIM) do óleo de cravo-da-índia e do acetato de eugenila sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.	58
Tabela 10. Diametro médio de halo de diferentes concentrações do óleo essencial de cravo-da-índia (<i>Caryophyllus aromaticus</i>) e do acetato de eugenila sobre os fungos <i>Penicillium crustosum</i> , <i>Alternaria alternata</i> e <i>Aspergillus flavus</i>	60
Tabela 11. Porcentagem da neutralização do DPPH do óleo essencial do cravo da índia antes e depois da esterificação.....	85
Tabela 12. Mortalidade média de <i>Artemia salina</i> de acordo com as concentrações do óleo essencial do cravo-da-índia e do éster acetato de eugenila.....	102

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Exemplos de compostos de aroma de diferentes funções químicas e suas respectivas notas sensoriais	9
Figura 2. Estruturas químicas de monoterpenos, fenilpropanóides e sesquiterpenos. ..	12
Figura 3. Reação de esterificação de Fisher catalisada por ácido.	13
Figura 4. Botões do cravo da Índia (a) secos e (b) verdes.....	17
Figura 5. Estrutura química do eugenol.	18
Figura 6. Reação de esterificação de eugenol e anidrido acético.	19
Figura 7. Cromatogramas do óleo essencial do cravo-da-Índia antes (a) e depois da esterificação (b) e do padrão acetato de eugenila (c).....	23
Figura 8. Gráfico de Pareto para a produção enzimática de acetato de eugenila (6 horas de reação) em sistema livre de solvente.	25
Figura 9. Efeito da razão molar sobre o tempo e a porcentagem de conversão em acetato de eugenila à temperatura de 50°C, concentração de enzima de 5,5% (m/m substratos) e agitação de 150 rpm.....	28
Figura 10. Efeito da concentração de enzima sobre o tempo e a porcentagem de conversão em acetato de eugenila à temperatura de 50 °C, razão molar eugenol:anidrido acético 1:3 e agitação de 150 rpm	29
Figura 11. Efeito da temperatura sobre a conversão de acetato de eugenila à razão molar eugenol:anidrido acético 1:3, concentração de enzima de 5,5% (m/m) e agitação de 150 rpm.....	30
Figura 12. Origem dos terpenóides e fenilpropanóides.....	41
Figura 13. Ciclo biossintético geral dos metabólitos secundários.....	42
Figura 14. Conjunto destilação (a) e conjunto destilação/bomba de vácuo (b).....	52
Figura 15. Gráfico do comportamento do fungo <i>Penicillium crustosum</i> com o acréscimo na concentração dos produtos testados.....	61
Figura 16. Gráfico do comportamento do fungo <i>Alternaria alternata</i> com o acréscimo na concentração dos produtos testados.....	62
Figura 17. Gráfico do comportamento do fungo <i>Aspergillus flavus</i> com o acréscimo na concentração dos produtos testados.....	62
Figura 18. Principais causas e consequências da ação dos radicais livres.	77
Figura 19. Principais classes de fitoquímicos naturais.....	79
Figura 20. Representação esquemática do comportamento do radical DPPH utilizado na determinação da atividade antioxidante de OEs.....	82
Figura 21. Curva de calibração da atividade antioxidante do óleo essencial do cravo da Índia (<i>Eugenia caryophyllata</i>) antes da esterificação.....	86

Figura 22. Curva de calibração da atividade antioxidante do óleo essencial do cravo da índia depois da esterificação.....	87
Figura 23. Fases de desenvolvimento do microcrustáceo <i>Artemia salina</i> (A: ovos; B: eclosão do ovo; C: náuplio; D: metanáuplio).....	97
Figura 24. Recipiente plástico para a eclosão dos ovos.	100
Figura 25. Contagem de náuplios vivos e mortos.	101
Figura 26. Curva de calibração da toxicidade do óleo essencial do cravo-da-índia....	103
Figura 27. Curva de calibração da toxicidade do óleo essencial do cravo-da-índia após a esterificação.	104

LISTA DE ABREVIATURAS

OE_s – Óleos essenciais

GC - Cromatografia gasosa

FID – Detector de ionização de chama

RM – Razão molar

[E] – Concentração de enzima

CIM – Concentração inibitória mínima

DMSO - dimetilsulfóxido

DPPH - 2,2-difenil-1-picril hidrazil

UFC - Unidades formadoras de colônias

CLM - concentração letal mínima

ARS - Agricultural Research Service

PD – Meio de cultura de batata e dextrose

PDA – meio de cultura de batata e dextrose e ágar Mueller-Hinton

SPSS - Statistical Package for the Social Sciences

ATCC - American Type Culture Collection

IC₅₀ – Quantidade de antioxidante necessária para reduzir a quantidade de DPPH em 50%

DL₅₀ – Dose letal média

CL₅₀ – Concentração letal média

1. INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais é uma prática antiga e predominante em países em desenvolvimento, onde existe uma dependência na denominada medicina popular como solução alternativa para problemas de saúde. Inúmeras e importantes descobertas científicas têm sido evidenciadas nos últimos anos em função deste contexto (Sartoratto *et al.*, 2004).

Os ésteres são substâncias orgânicas, frequentemente encontradas na natureza e utilizadas como importantes intermediários em síntese orgânica. Tais substâncias desempenham um papel relevante na indústria farmacêutica, de perfumes, de polímeros, de cosméticos e estão presentes na composição de produtos alimentícios para realçar e imitar sabores e aromas (TAN *et al.*, 2006).

A preocupação com a produção de alimentos está cada vez mais voltada para a qualidade do produto final e suas implicações no meio ambiente, o que vem acontecendo, juntamente com a mudança de conceito da população, vem exigindo um produto final de melhor qualidade, ao encontro do conceito de sustentabilidade e respeito aos recursos naturais e que sejam benéficos à saúde (BNDES, 2014).

Neste contexto, a biotecnologia tem contribuído para o desenvolvimento de pesquisas sobre produção de aromas, estimulando as indústrias à utilização de enzimas ou microrganismos para a produção destes compostos. Os processos biotecnológicos são capazes de gerar sistemas complexos, com muitos dos compostos necessários para a caracterização dos aromas, o que muitas vezes, na produção por via sintética não é alcançado ou se mostra economicamente inviável (BERGER, 2009).

Os produtos gerados a partir de fontes naturais via catálise enzimática ou via biotransformação são considerados naturais, o que proporciona grande aceitação no mercado consumidor. A vantagem da síntese enzimática é que as reações podem ocorrer em condições amenas, além de suprir as exigências de pureza e estereoespecificidade, evitando a formação de misturas racêmicas. Em geral, não emitem alta carga de resíduos e estão menos sujeitos a variações sazonais (BERGER, 2009).

Os aromas não apresentam uma função química específica, podem ser hidrocarbonetos, álcoois, cetonas, aldeídos, ácidos ou ésteres. No entanto, a classe química dos terpenos e fenilpropanóides congregam os principais compostos de aromas

naturalmente presentes nos vegetais. A produção de compostos de aroma tem sido tradicionalmente realizada por síntese química ou pela extração do material natural, das quais as plantas são as maiores fontes (BICAS, 2009).

Por possuírem diferentes substâncias bioativas com ação antibacteriana, antifúngica, antioxidante, analgésica, antiinflamatória e antitumoral, entre outras, os óleos essenciais são substâncias muito estudadas em vários ramos da ciência, sendo a indústria de alimentos uma das mais beneficiadas (BURT, 2004).

Assim, o impacto deste trabalho na ciência é desenvolver uma tecnologia limpa de síntese de aromatizante natural com propriedades biológicas usando como substrato o óleo essencial da espécie *Eugenia caryophyllata* Thumb também conhecida como *Eugenia aromática* (L.) Baill, *Syzygium aromaticum* (L.) Merr & L.M. Perry, *Myrtus caryophyllus* Spreng, *Caryophyllus aromaticus* L., *Jambosa caryophyllus* (Sprengel) Nied.(ORNAMENTAIS, 2014).

O presente trabalho encontra-se organizado da seguinte forma: O presente capítulo (Capítulo 1) traz de maneira geral a relevância do trabalho e logo após apresenta os objetivos traçados durante a pesquisa. O Capítulo 2 apresenta o estudo da produção enzimática de acetato de eugenila a partir do óleo essencial de cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus* L.) em sistema livre de solvente orgânico. No Capítulo 3 é apresentado o estudo da avaliação da atividade antimicrobiana (antibacteriana e antifúngica) do óleo essencial de cravo-da-índia antes e após a esterificação. No Capítulo 4 é apresentado o estudo da avaliação da atividade antioxidante do óleo essencial de cravo-da-índia antes e após a esterificação. No Capítulo 5 é apresentado o estudo da toxicidade do óleo essencial de cravo-da-índia e do éster frente ao microcrustáceo *Artemia Salina*. Como forma de embasamento, será apresentada, no início de cada capítulo, uma revisão bibliográfica, procurando evidenciar os resultados disponíveis na literatura referentes ao tema do presente estudo, logo após, os equipamentos, materiais e métodos utilizados no decorrer dos estudos, seguidos pelos resultados que são apresentados e discutidos para todos os sistemas estudados. Também serão apresentadas no final de cada capítulo, as referências citadas durante o decorrer dos mesmos. Como forma de finalizar o trabalho, as Conclusões e Sugestões para trabalhos futuros são apresentadas nos Capítulos 6 e 7, respectivamente.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Este trabalho visa o estudo da maximização da produção enzimática de acetato de eugenila a partir do óleo essencial de cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus*) em sistema livre de solvente orgânico utilizando como catalizador a enzima Novozym 435 e a posterior avaliação das propriedades biológicas, antioxidantes e da toxicidade do óleo antes e após a esterificação.

1.1.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito das variáveis do processo (razão molar, concentração de enzima e temperatura) empregando técnica de planejamento experimental visando determinar as condições que maximizam a conversão;
- Avaliar a cinética reacional nas condições experimentais maximizadas;
- Avaliar a atividade antibacteriana do óleo essencial antes e após a esterificação;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) para o óleo e para o éster;
- Avaliar a atividade antifúngica do óleo essencial antes e após a esterificação;
- Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* do óleo essencial antes e após a esterificação;
- Avaliar a toxicidade frente à *Artemia salina* do óleo essencial antes e após a esterificação.

1.2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BERGER, R.G. Biotechnology of flavours – the next generation. **Biotechnology letters**, v.31, p.1751-1659, 2009.

BICAS, J.L. Estudos de Obtenção de Bioaromas pela Biotransformação de Compostos Terpênicos, **Tese de Doutorado**. Universidade Estadual de Campinas, 2009.

BNDES, 2014.

http://www.bndes.gov.br/SiteBNDES/export/sites/default/bndes_pt/Galerias/Arquivos/produtos/download/chamada_publica_FEPprospec0311_Quimicos_Relat4_aromas.pdf. Acessado em: 15 de setembro de 2014.

BURT, S.A. Essential Oils: their antibacterial properties and applications in foods – A Review. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, p.223-253, 2004.

ORNAMENTAIS, 2014. (<http://plantas-ornamentais.blogspot.com.br/2011/03/cravo-da-india-syzygium-aromaticum-l.html>). Acessado em 01 de outubro de 2014.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A.L.M.; DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, G.M.; DUARTE, M.C.T.; REDHER, V.L.G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazil Journal Microbiology**, v.35, p. 275-280, 2004.

TAN, T.; CHEN, B-Q.; YE, H. Enzymatic synthesis of 2-ethylhexyl palmitate by lipase immobilized on fabric membranes in the batch reactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 29, p. 41-45, 2006.

CAPÍTULO II

**PRODUÇÃO DE ACETATO DE EUGENILA VIA ESTERIFICAÇÃO
ENZIMÁTICA A PARTIR DE ÓLEO ESSENCIAL DE CRAVO-DA-ÍNDIA**

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo será apresentada uma revisão sobre o estado da arte no que concerne à esterificação enzimática para produção de bioaromas na ausência de solventes orgânicos.

2.1 Aromas

Aromas e aromatizantes são compostos importantes para as indústrias de alimentos, bebidas, química, cosmética e farmacêutica. Estão intimamente relacionados à aceitação de alimentos por parte dos consumidores (TAN *et al.*, 1998; MARÓSTICA, 2006). No caso dos alimentos, apesar das ótimas características nutricionais, eles são consumidos devido às características organolépticas como aroma, sabor e textura (COSTELLI, 2005). Sua percepção é um processo dinâmico dependente de uma série de eventos, e leva o consumidor à aceitação ou à rejeição de um produto. Os aromatizantes são geralmente utilizados na indústria com a função de impedir alterações, caracterizar, melhorar, padronizar e/ou reconstituir o aroma/sabor dos produtos, além de serem utilizados também para mascarar os aromas e sabores indesejáveis que possam ocorrer durante o processamento de alimentos (FANI, 2011).

Inúmeros compostos aromáticos são encontrados em pequenas quantidades, originando complexidade e contribuindo para a qualidade do aroma total. A grande variedade de aromas pode ser explicada através de suas estruturas. Uma pequena mudança na estrutura química desses compostos geralmente resulta em alteração das propriedades organolépticas, em termos de intensidade, qualidade e limiar de detecção. Moléculas com a mesma funcionalidade química básica podem apresentar características organolépticas diferentes, como exemplo dos aldeídos e cetonas (MARIOTTO, 2007).

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, (Resolução nº 2 de 15 de janeiro de 2007) aromas ou aromatizantes são substâncias ou misturas de substâncias com propriedade odorífera e/ou sávida (com sabor), capazes de conferir ou intensificar sabor aos alimentos (ANVISA, 2007). Excluem-se da definição os produtos que conferem exclusivamente sabor doce, salgado ou ácido, bem como as substâncias alimentícias, ou produtos normalmente consumidos como tal, com ou sem

reconstituição. Na Tabela 1 abaixo estão apresentados os principais aromatizantes utilizados no Brasil, bem como suas respectivas aplicações.

Tabela 1. Principais aromatizantes utilizados no Brasil.

<i>Aroma</i>	<i>Aplicação</i>
Diacetila	Biscoitos e produtos de confeitaria.
Essências artificiais	Balas, biscoitos, geléias, etc.
Essências naturais	Bombons, balas, biscoitos, geléias, etc.
Extrato natural de fumaça	Carnes, conservas de pescado, queijos, sopas, molhos, etc.
Extrato vegetal aromático	Biscoitos, gelatina, licores, refrigerantes, etc.
Flavorizantes quimicamente definidos	Aguardentes compostas, açúcar, refrigerantes, etc.
Óleo fusel	Bebidas não alcoólicas.
Propenil guatenol	Isoladamente ou em misturas com outros flavorizantes.
Vanilina	Margarina.

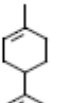
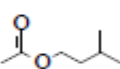
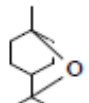
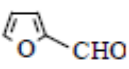
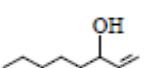
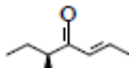
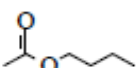
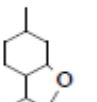
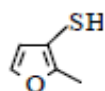
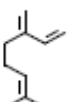
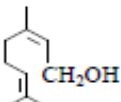
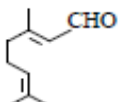
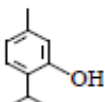
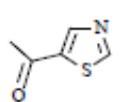
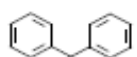
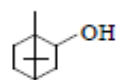
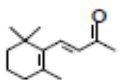
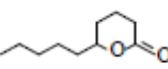
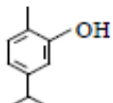
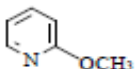
Fonte: EVANGELISTA (2003).

Com base na sua origem, classificam-se os aromas como naturais e sintéticos, mas há ainda outros tipos especiais, como os de reação ou transformação e os de fumaça (ANVISA, 2007).

Os aromas não apresentam nenhuma função nutritiva ou vitamínica a um alimento. No entanto, diversas bioatividades (antimicrobiana e anticarcinogênica, por exemplo) têm sido relatadas (BERGER, 1995).

Compostos de aroma podem ser obtidos de fontes vegetais e animais bem como sintetizados química ou biologicamente. Eles não apresentam uma função química específica: podem ser hidrocarbonetos, álcoois, cetonas, aldeídos, ácidos, ésteres ou lactonas (ésteres cíclicos), éteres, etc. (Figura 1). No entanto, como pode ser observado, a classe química dos terpenos congrega os principais compostos de aromas naturalmente presentes nos vegetais (BICAS, 2009).

Figura 1. Exemplos de compostos de aroma de diferentes funções químicas e suas respectivas notas sensoriais.

Hidrocarbonetos	Álcoois	Compostos Carbonílicos	Ésteres e Lactonas	Éteres e fenóis	Outros
 Limoneno (cítrico)	 3-hexen-1-ol (ervas)	 2,6-nonadien-1-al (pepino)	 Acetato de isoamila (banana)	 1,8-cineole (eucalipto)	 Furfural (caramelo)
 α -pineno (coníferas)	 1-octen-3-ol (cogumelo)	 5-metil-(E)-2-hepten-4-ona (avelã)	 Acetato de butila (maçã)	 3,9-oxi-1- <i>p</i> -menteno (anis)	 2-metil-3-furanotiol (rosbife)
 Mirceno (cítrico, fresco)	 Nerol (limão)	 Geranial (limão)	 γ -butirolactona (doce, amanteigado)	 Timol (tomilho)	 5-acetil-tiazol (carne grelhada)
 Difenil metano (gerânio)	 Borneol (canforado)	 β -ionona (frutal)	 δ -decalactona (pêsigo)	 Carvacrol (orégano)	 2-acetil-piridina (crosta de pão)

Fonte: BICAS, 2009.

Em geral, os compostos de aroma estão presentes em quantidades ínfimas na composição dos alimentos, usualmente em torno de 50 ppm, já que muitos possuem um limiar de detecção na ordem de partes por bilhão (ppb) (FONTANILLE *et al.*, 2002).

2.1.1 Produção de Aromatizantes

Há basicamente três métodos para se obter compostos de aroma: (i) extração diretamente da natureza, (ii) transformações químicas ou (iii) transformações por via biotecnológica, que incluem biotransformações microbianas e enzimáticas, síntese de novo e engenharia genética (FRANCO, 2004).

O setor de aromas e fragrâncias em suas diversas aplicações, tais como, perfumes finos, fragrâncias, alimentos e cosméticos, brindes de borracha, etc., representa não somente um mercado global multibilionário, mas também uma fonte de

desenvolvimento científico e de inovação constante. As grandes empresas de fragrâncias, conhecidas como *Flavor Houses*, se concentram principalmente na Europa, mas estendem suas ramificações por todo o resto do planeta (SPEZIALI, 2012).

O Brasil está ainda em um estágio embrionário nas tecnologias de produtos beneficiados, como as fragrâncias e perfumes, porém, é líder mundial na produção de matérias-primas. Os óleos essenciais são uma das matérias-primas mais importantes na produção de fragrâncias e o Brasil responde, atualmente, por cerca de 50% da produção mundial de óleo essencial de laranja, que é uma das matérias-primas fundamentais para os aromas e as fragrâncias. A balança comercial brasileira é superavitária em volume, porém é deficitária economicamente, ou seja, o Brasil exporta grandes volumes de óleos essenciais, produto de menor valor agregado, e importa óleos essenciais beneficiados de alto valor agregado (SPEZIALI, 2012).

Por outro lado, o subsegmento de Aromas Químicos em 2012 apresentou exportações oito vezes superiores às importações. Este subsegmento abrange itens produzidos em larga escala pelo Brasil, como terpenos cíclicos e terpenos de laranja, responsáveis por, respectivamente, 62 e 31 milhões de dólares em exportações durante 2012. Essas matérias-primas são produzidas em larga escala no Estado de São Paulo, que concentra 28,8% da produção mundial de laranja, uma vez que o clima é favorável e o custo de produção é baixo. O mesmo ocorre para Óleos Essenciais e Extratos Naturais, subsegmento onde o óleo essencial de laranja gerou exportações de 125 milhões de dólares em 2012 (BNDES, 2014).

Os mercados globais de “Aromas e Sabores” e de “Fragrâncias”, movimentaram, em 2012, 11,2 e 12,2 bilhões de dólares, respectivamente. Entre 2007 e 2012, o subsegmento de Fragrâncias apresentou maior crescimento real ativo e, até 2017, espera-se aceleração em ambos os subsegmentos (BNDES, 2014).

Os mercados nacionais de Aromas e Sabores e de Fragrâncias movimentaram, em 2012, 1,2 bilhão de dólares. O subsegmento de Fragrâncias se mostra mais expressivo, com faturamento de 700 milhões de dólares em 2012, e com perspectiva de crescimento anual médio de 5,2% até 2022. O de Aromas e Sabores, de porte um pouco menor, com faturamento de 500 milhões de dólares em 2012, deve crescer de uma maneira mais acelerada, com crescimento anual médio de 6,1% até 2022 (BNDES, 2014).

2.1.2 Extração de Aromatizantes a partir de fontes naturais

Os aromatizantes ou aromas são classificados, como já mencionado anteriormente, em naturais ou sintéticos. Os aromas naturais são obtidos exclusivamente mediante métodos físicos, microbiológicos ou enzimáticos, a partir de matérias-primas aromatizantes naturais. Entende-se por matérias-primas aromatizantes naturais os produtos de origem animal ou vegetal, normalmente utilizados na alimentação humana, que contenham substâncias odoríferas e/ou sápidas, seja em seu estado natural ou após um tratamento adequado (torrefação, cocção, fermentação, enriquecimento enzimático, etc.) (MIKHAYLOV, 2014). Os aromas naturais incluem óleos essenciais, extratos, bálsamos, oleoresinas e oleogomaresinas, e substâncias aromatizantes/aromas naturais isolados (MIKHAYLOV, 2014).

Os óleos essenciais são misturas de substâncias voláteis lipofílicas de origem terpênica, geralmente odoríferas e líquidas e uma mistura de complexa de hidrocarbonetos, alcoóis e compostos carbonílicos, são compostos por mais de 300 componentes químicos diferentes, o que faz deles um produto tão valorizado (WOLFFENBÜTTEL, 2007).

Também podem ser chamados de óleos voláteis, óleos etéreos ou essências. Essas denominações derivam de algumas de suas características físico-químicas, como, por exemplo, geralmente apresentar aparência líquida e oleosa denominando-se óleo. Sua principal característica, entretanto, é a volatilidade, diferindo dos óleos fixos, misturas de substâncias lipídicas. Outra característica importante é o aroma agradável e intenso, sendo chamados de essências (SIMÕES & SPITZER, 1999).

Existem diversos processos para a obtenção dos óleos essenciais (OEs) como destilação, pressão a frio, extração com dióxido de carbono supercrítico e fermentação, sendo a destilação a vapor o método comercialmente mais utilizado. Embora a destilação a vapor seja o procedimento mais empregado na extração de OEs, a utilização de dióxido de carbono líquido à baixa temperatura e alta pressão preserva de forma mais eficiente às características organolépticas desses compostos. Essas diferenças influenciam na composição dos OEs e nas propriedades antimicrobianas, porém, é um processo de custo elevado comparado aos demais processos (BURT, 2004).

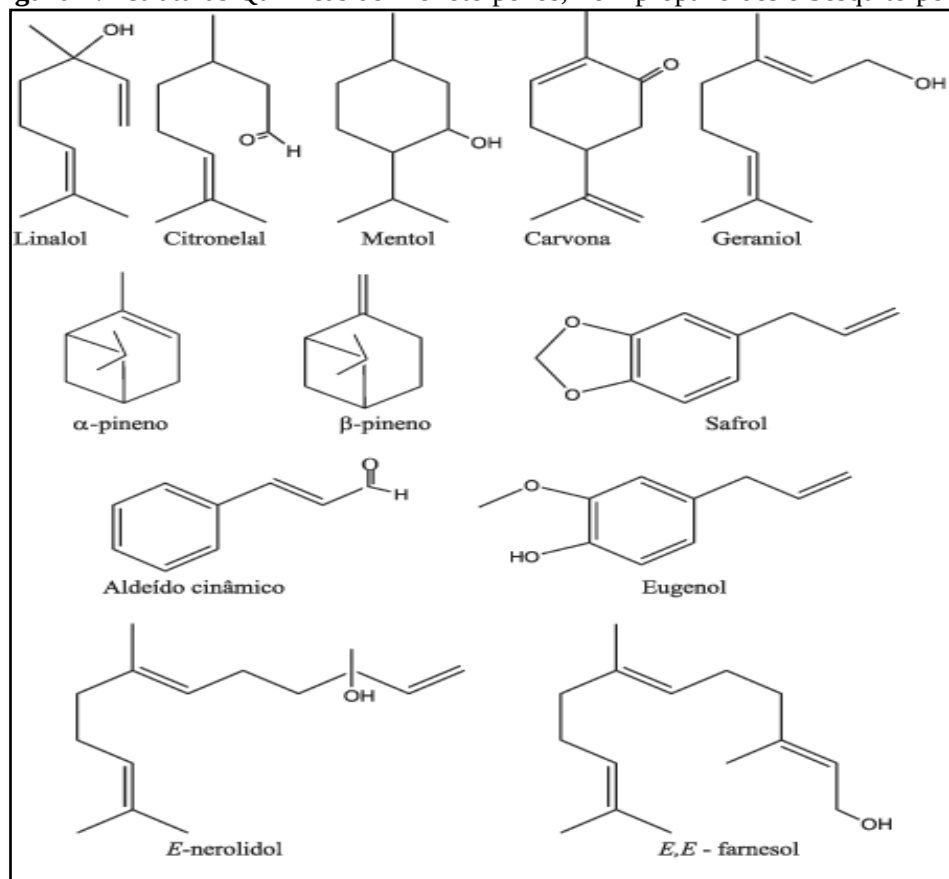
Atualmente são conhecidos aproximadamente 3.000 tipos de OEs, sendo que 300 possuem importância econômica, principalmente no mercado de flavorizantes e essências. Também se tem conhecimento que tais compostos apresentam propriedades

antimicrobianas, antivirais, antimicóticas, antioxidantes, antiparasíticas e inseticidas, possivelmente relacionadas com sua função nas plantas (BURT, 2004).

O campo de aplicação dos OEs é vasto, compreendendo a indústria alimentícia (como flavorizantes), e a indústria farmacêutica (por suas propriedades funcionais) como fragrâncias, fixadores de fragrâncias, em composições farmacêuticas e orais e comercializados na sua forma bruta ou beneficiada, fornecendo substâncias purificadas como o limoneno, citral, citronelal, eugenol, mentol e safrol (SILVA-SANTOS *et al.*, 2006). Além dos OEs em sua constituição completa, os componentes individuais dos OEs também são utilizados como flavorizantes e podem ser extraídos das plantas ou fabricados sinteticamente (BURT, 2004).

Os principais constituintes dos óleos essenciais que conferem suas características sensoriais são os monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides (Figura 2) (BIZZO *et al.*, 2009).

Figura 2. Estruturas Químicas de Monoterpenos, Fenilpropanóides e Sesquiterpenos.

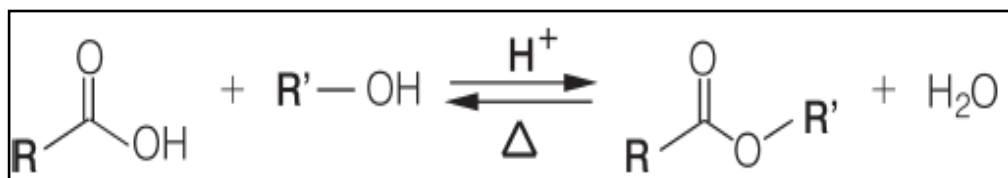


Fonte: BIZZO *et al.*, 2009.

2.1.3 Síntese de aromatizantes via catálise ácida

Em 1895, Fischer e Speier constataram que era possível a obtenção de ésteres através do aquecimento de um ácido carboxílico e um álcool na presença de catalisador ácido (McMURRY, 2011). Esta reação ficou conhecida como esterificação de Fischer (Figura 3), sendo um dos principais métodos utilizados na produção de ésteres, sendo até hoje o método mais comum e mais utilizado em processos industriais e em escala de laboratório para obtenção de ésteres.

Figura 3. Reação de esterificação de Fischer catalisada por ácido.



Fonte: OLIVEIRA *et al.*, 2013.

Essas reações geram água e são facilitadas através do aumento da temperatura do meio de reação e na presença de um catalisador ácido de Brønsted-Lowry. Sem catalisador, em condições normais de temperatura e pressão, essa reação ocorre lentamente, devido a sua reversibilidade (CLAYDEN *et al.*, 2007).

Devido à reversibilidade da reação, a utilização de alguns artifícios é necessária para deslocar o equilíbrio para formação dos produtos, entre os quais a adição de excesso de um dos reagentes, remoção do éster por destilação ou remoção da água com agente desidratante para evitar a hidrólise do éster formado.

Entre os parâmetros que interferem na reação de esterificação também se encontra o tipo de catalisador utilizado. A esterificação de ácidos carboxílicos com álcoois é realizada comercialmente com o uso de catalisadores ácidos homogêneos, tais como ácido sulfúrico, ácido iodídrico e ácido clorídrico (LIU *et al.*, 2006).

O processo catalítico convencional consiste na catálise homogênea com ácido sulfúrico, o qual permanece dissolvido no meio de reação. Neste processo, o catalisador deve ser removido ao final da reação por lavagem aquosa alcalina. Algumas das desvantagens deste método são as dificuldades de reutilização do catalisador, corrosão de reatores industriais, além do impacto ambiental decorrente dos resíduos inorgânicos e da formação de subprodutos tóxicos. A maior parte dos resíduos é gerada durante a fase de separação por neutralização (McMURRY, 2011).

A esterificação pode ocorrer na ausência de catalisador, entretanto devido aos ácidos carboxílicos serem ácidos fracos, a reação é extremamente lenta, sendo necessários dias para que se alcance uma situação de equilíbrio (BRITO, 2010). Portanto, a utilização de catalisador na reação de esterificação é essencial para a ativação do grupo carbonila do ácido envolvido, devido a função doadora de próton que o catalisador exerce (PATTANAIK & MANDALIA, 2011).

A fim de minimizar os impactos causados pelos processos químicos, inúmeras alternativas baseadas na Química Verde visam o desenvolvimento de técnicas, equipamentos e processos de produção capazes de reduzir ou eliminar a geração de substâncias agressivas ao meio ambiente e à saúde humana. Uma das rotas é a utilização da catálise enzimática (BRITO, 2010).

2.1.4 Síntese de aromatizantes via catálise enzimática

Para a síntese de aromas naturais geralmente estão sendo empregadas técnicas de biotransformação. São tecnologias relativamente recentes e aparecem como uma alternativa para os casos onde as reações químicas são de difícil realização. Em muitos casos é muito trabalhoso funcionalizar certas posições de moléculas via rota sintética. Em certas posições da molécula, a funcionalização requer várias etapas, resultando em baixos rendimentos, inviabilizando economicamente o processo. Em outros casos, as transformações químicas geram muitos subprodutos. A biotransformação é uma reação mais específica, o que traz muitas vantagens para síntese de compostos orgânicos. Pode-se dizer que a biotransformação é um processo onde um composto orgânico é modificado em um produto estruturalmente similar através de reações específicas catalisadas por um pequeno número de enzimas (SCHRADER *et al.*, 2004; GIRI *et al.*, 2001). Simplificando, define-se biotransformação como uma reação química realizada por células de plantas ou animais, enzimas isoladas ou microrganismos íntegros (GIRI *et al.*, 2001). Como diferencial das reações químicas, a biotransformação apresenta grande poder catalítico (sub-estequiométrico) e excepcional estereo e regioespecificidade (ou seletividade), características típicas das enzimas, reais responsáveis por este tipo de transformação (SERRA *et al.*, 2005; BERGER, 2009). Ainda podem ser citados como diferenciais as condições reacionais brandas de pH, temperatura e pressão nas quais a biotransformação é realizada, o que pode resultar em

uma redução no custo energético e de equipamentos em relação às transformações por via unicamente química.

A sua utilização faz com que surja uma química biotecnológica de interface com oportunidade para a melhoria e inovação em alguns problemas existentes como o uso atual de grupos de proteção para superação da não seletividade e reatividades incompatíveis na síntese de biomiméticos (YOUNG & BARAN, 2009).

Com o desenvolvimento de metodologias mais limpas, as enzimas tornaram-se indispensáveis para a produção de muitos compostos. A exploração da biodiversidade na busca de novos catalisadores por técnicas de seleção de microrganismos, de plantas ou de células animais representa um método tradicional de descoberta de novas enzimas para o desenvolvimento da biocatálise em escala industrial (STROHMEIER *et al.*, 2011).

A produção de aromatizantes por via enzimática, utilizando lipases como biocatalisadores, é descrita em diversos sistemas reacionais, entre eles, a síntese de ésteres como o butirato de citronelila (MELO *et al.*, 2005) e o butirato de etila (PIRES-CABRAL *et al.*, 2010).

2.1.5 Produção de ésteres a partir de alcoóis monoterpênicos e óleos essenciais

Os alcoóis terpênicos de origem natural podem ser usados como substratos nas reações visando à obtenção de aromas naturais. Uma fonte que poderia atender essa demanda são os óleos essenciais. Os óleos essenciais são constituídos por uma mistura complexa de hidrocarbonetos (terpenos, sesquiterpenos, etc.), compostos oxigenados (álcoois, ésteres, éteres, aldeídos, cetonas, lactonas, fenóis, ésteres fenólicos, etc.), e uma pequena quantidade de resíduos viscosos ou sólidos não voláteis (parafinas, ceras, etc.). Entre eles destacam-se álcoois mono e sesquiterpênicos tais como geraniol, citronelol, elemol, eugenol, entre outros (TACHIYARA *et al.*, 2006; LEAK *et al.*, 2009; SINGH *et al.*, 2008). Estes álcoois são utilizados como material de partida em sínteses de outras fragrâncias. Ésteres obtidos a partir de álcoois terpênicos via biotransformação podem ser amplamente utilizados nas indústrias de alimentos, cosméticos e em formulações farmacêuticas.

Vários trabalhos encontrados na literatura relatam a síntese de ésteres a partir de ácidos carboxílicos e alcoóis monoterpênicos via catálise enzimática em meio orgânico e em sistemas livres de solventes.

A síntese de geranil acetato em n-hexano catalisado pela lipase comercial preparada a partir de *Candida antarctica* foi realizado por Bartling *et al.* (2001). A conversão de equilíbrio foi de 94%, razão molar dos substratos 1:1 e temperatura de 30°C. Para a remoção seletiva da água formada durante o processo de esterificação foram testadas membranas com compósito cerâmico/acetato de celulose que permitiu deslocamento de reação para os produtos atingindo 100% de conversão.

Paroul *et al.* (2010; 2011) estudaram a produção enzimática de geranil propionato e geranil oleato em sistema livre de solvente. Utilizando a lipase comercial Novozym 435, em 1 hora de reação, razão molar ácido/álcool de 1:5, 50°C, 150rpm, com adição de 5% de enzima (m/m substratos), obtiveram 97% de conversão. Os efeitos da razão molar, da temperatura, e da concentração de enzima na produção de geranil e cetronelil ésteres presentes no óleo essencial da Citronela foram investigados pelo mesmo grupo de pesquisadores (PAROUL *et al.*, 2011). Através de aplicação da técnica de planejamentos experimentais sequenciais foi possível otimizar a produção de ésteres derivados do óleo essencial bruto alcançando conversões acima de 90%.

Chiaradia *et al.* (2012) otimizaram a conversão de eugenol por meio da catálise enzimática utilizando lipase comercial imobilizada de *Candida antartida* como catalisador e anidrido acético como agente acilante. A melhor conversão foi de 99% usando razão molar anidrido/eugenol 3:1, concentração de enzima 5,5% (m/m substratos) e 50°C após de 6 horas de reação.

Compostos obtidos por catálise enzimática ou por ação microbiana podem ser considerados “naturais”, fato que promove grande aceitação por parte do consumidor, agregando, dessa forma, maior valor aos produtos que utilizam esses aromatizantes produzidos biotecnologicamente.

2.1.6 Óleo essencial do cravo-da-índia

A espécie *Caryophyllus aromaticus* L., pertence à família *Myrtaceae*, popularmente conhecida como cravo. É uma árvore aromática, nativa da Indonésia, ocorrendo naturalmente em Moluku das ilhas da Indonésia e cultivada em muitas partes do mundo como Tanzânia, Madagascar, Sri Lanka, Índia, China, Indonésia, Malásia, Brasil, República de Malgaxe, Jamaica e Guinéa (ÖZTÜRK & ÖZBEK, 2005; TRAJANO *et al.*, 2010; SINGH *et al.*, 2012). No Brasil, praticamente apenas a Bahia, na região do Baixo Sul (Valença, Ituberá, Taperoá, Camamu e Nilo Peçanha), produz

esta especiaria na forma comercial (FRAIFE-FILHO *et al.*, 2005). Essa região destaca-se como produtora de uma das especiarias mais comercializadas no mundo, o botão floral do craveiro-da-índia na forma desidratada (SACRAMENTO *et al.*, 2001). Há mais de 2000 anos, o cravo é uma especiaria muito apreciada devido ao seu marcante aroma e sabor, conferido por um composto fenólico volátil, o eugenol. Além de ser utilizado como uma planta medicinal, o cravo-da-índia também é usado como aromatizante de molhos ou para confecção de cigarros perfumados (“kretek” ou “gudan”) muito difundidos na Indonésia e Brasil (OLIVEIRA *et al.*, 2007a; AGRA *et al.*, 2008). Nas Figuras 4(a) e (b) estão demonstrados os botões secos do cravo da índia e os botões verdes do cravo da índia, respectivamente.

Figura 4. Botões do cravo da índia (a) secos e (b) verdes.



Fonte: FRAIFE-FILHO *et al.*, 2005.

O óleo de cravo é um fluido amarelado obtido por destilação a vapor dos botões secos do cravo, apresentando forte odor e gosto acentuado (ÖZTÜRK & ÖZBEK, 2005; MOUCHREK, 2000). Esses são coletados duas vezes por ano, nos meses de outubro e fevereiro, quando mudam sua coloração do verde para vermelho. São secos com cuidado e separados de seus pedúnculos (SINGH *et al.*, 2012).

A composição dos óleos essenciais das espécies vegetais é muito diversificada, sendo a principal responsável por conferir propriedades funcionais às mesmas. Entretanto, há múltiplos fatores que podem ser responsáveis pela variabilidade química, como as características edafoclimáticas, que são extrínsecos à biologia vegetal, e outros dependentes da fisiologia das plantas ou do seu genoma, como a ontogenia, o tipo de

órgão e os quimiotipos, além do manejo cultural, à forma de extração e o armazenamento (ZAGO *et al.*, 2009; SANTURIO, 2011).

Machado (2009) identificou que a densidade do óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzgium aromaticum*) é de 0,988 mg/mL e os componentes químicos são: eugenol (83,63%), β -cariofileno (12,39%), alfa-humuleno (3,05%) e eugenil acetato (0,93%).

No óleo de *E. caryophyllata* vários constituintes são identificados mas o eugenol, acetato de eugenil e o β -cariofileno representam os principais componentes (SINGH *et al.*, 2012).

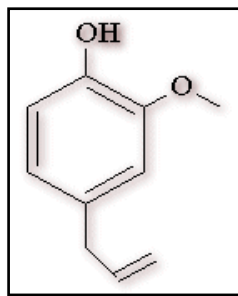
Trajano *et al.* (2010) identificaram os compostos químicos do óleo essencial extraído das folhas de *E. caryophyllata* obtendo em sua pesquisa 18 compostos do óleo. Dentre eles o eugenol (74%) foi o composto majoritário, seguido pelos α -humuleno (9,62%), d-cadineno (4,64%), trans- β -cariofileno (4,69%) e óxido de cariofileno (1,63%). Outros compostos, como eucaliptol (0,96%), γ -cadineno (0,86%), humuleno (0,83%), e torreiol (0,62%) foram encontrados em percentual menor.

Dzamic *et al.* (2009) identificaram dezesseis componentes no óleo essencial de *E. caryophyllata*, que representam 98,89% do conteúdo total. Eugenol (78,57%), β -cariofileno (15,56%) e α -humuleno (1,88%) foram os principais componentes.

Silvestri *et al.* (2010), ao analisarem o perfil da composição do óleo, mostraram o eugenol como composto majoritário (90,3%), além de β -cariofileno (4,83%) e acetato de eugenol (1,87%).

O eugenol (4-alil-2-metoxifenol) (Figura 5) é um fenilpropeno dissustituído, com grupamento OH fenólico na posição *para* e OCH₃ em *meta* em relação ao radical propenila. É constituinte majoritário do óleo essencial da *Pimenta dioica* Lindl e *Eugenia caryophyllata* (cravo-da-índia) (OLIVEIRA *et al.*, 2007b).

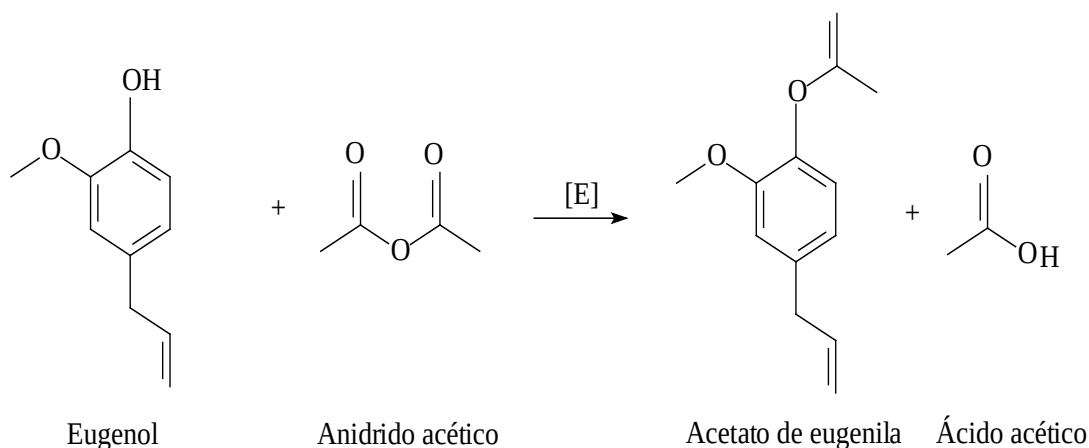
Figura 5. Estrutura química do eugenol.



Os óleos essenciais vêm apresentando um valor comercial relativamente estável há muitos anos. Os países desenvolvidos importam esses óleos como matéria-prima bruta e lhe agregam valor através da purificação, preparação de derivados, isolamento de constituintes e modificação química. Neste último aspecto, os óleos essenciais apresentam uma particularidade importante e pouco explorada no Brasil, desta forma estudos no sentido de agregar valor a essa matéria-prima estão sendo realizados por diferentes pesquisadores.

Dentro deste contexto, o presente capítulo teve como objetivo geral o desenvolvimento de um processo biotecnológico para produção de acetato de eugenila a partir óleo essencial de cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus*). Para isto, foi realizado o estudo do efeito das variáveis do processo (razão molar anidrido acético:óleo, concentração de enzima e temperatura) empregando técnicas de planejamento experimental. Neste sentido, a presente proposta reflete o estudo de viabilidade técnica de produção de ésteres através de aplicação de tecnologias limpas, sistemas enzimáticos livres de solvente.

O grupo acetato é obtido a partir da esterificação no sítio do grupo hidroxila da molécula original, resultando na formação da molécula de acetato de eugenila (Figura 6).



2.2 MATERIAL E MÉTODOS

Neste momento serão descritos os materiais, procedimentos experimentais e a metodologia analítica utilizada para o desenvolvimento do estudo da produção de acetato de eugenila, via reação de transformação enzimática, em solventes orgânicos e em sistema livre de solvente, utilizando óleo essencial de cravo (*Caryophyllus aromaticus*) como substrato e lipase imobilizada comercial como catalisador.

2.2.1 Substratos para a reação enzimática

Foram utilizados neste trabalho: óleo essencial de cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus*) da Viafarma, anidrido acético (97% de pureza) da VETEC[®], peneiras moleculares 4Å SIGMA-ALDRICH[®], padrão de eugenol SIGMA-ALDRICH[®], padrão de eugenil acetato SIGMA-ALDRICH[®].

2.2.2 Enzima para a reação enzimática

A lipase imobilizada comercial Novozym 435 utilizada para o desenvolvimento deste trabalho foi adquirida da Novozymes/Araucária-PR. Esta lipase (*Candida antarctica*) é produzida por fermentação submersa e imobilizada em resina acrílica macroporosa. Apresenta tamanho de partícula entre 0,3-0,9 mm, densidade de aproximadamente 430 Kg/m³ e conteúdo de água entre 1-2%. É uma lipase termoestável com uma atividade ótima na faixa de temperatura entre 40-80 °C.

2.2.3 Produção enzimática de acetato de eugenila

A mistura reacional foi formada por óleo essencial do cravo-da-índia, anidrido acético, enzima e as peneiras moleculares em quantidades pré-estabelecidas no planejamento experimental. Todos os experimentos foram realizados em *shaker* com agitação constante de 150rpm e tempo da reação fixado em 6 horas (CHIARDIA *et al.*; 2012). Após o término de reação o biocatalisador foi separado dos substratos por meio de filtração com papel filtro.

2.2.4 Determinação da conversão da reação

A quantificação do acetato de eugenila foi realizada por cromatografia gasosa em equipamento Shimadzu GC-2010 equipado com processador de dados. As análises foram realizadas utilizando coluna capilar de sílica fundida modelo WAX (30m x

250µm d.i.), 0,25µm de espessura de filme, detector FID, com a seguinte programação de temperatura: 40-180°C (3°C/min), 180-230°C (20°C/min), 230°C (20min), temperatura do injetor 250°C, detector a 275°C, modo de injeção split, razão de split 1:100, gás de arraste H₂ (56KPa), volume injetado 0,4µL de amostra diluída em n-hexano (1:10). A determinação da conversão das reações de esterificação de óleo de cravo para a produção de acetato de eugenila foi realizada acompanhando a redução da área do sinal do agente limitante (eugenol) sendo que, posteriormente, os cromatogramas obtidos foram comparados ao cromatograma do padrão acetato de eugenila adquirido para fins comparativos.

2.2.5 Otimização da produção enzimática de acetato de eugenila

Para determinação das condições experimentais que maximizassem a síntese de ésteres, resultantes da reação de esterificação, foi realizado um delineamento composto central 2³ com triplicata do ponto central, totalizando 11 experimentos. As faixas de temperatura (T), razão molar (RM) e concentração de enzima [E] (m/m substratos) estudadas são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Variáveis e níveis estudados no delineamento composto central 2³ para produção enzimática de acetato de eugenila.

Variáveis/Níveis	Temperatura (°C)	Razão Molar (mol/mol) (anidrido acético/eugenol)	[E] (% m/m substratos)
-1	40	1:1	1
0	50	3:1	5,5
1	60	5:1	10

2.2.6 Estudo cinético da produção enzimática de acetato de eugenila

Após determinar as condições experimentais que maximizam a produção de éster foi realizado um estudo cinético no ponto central com a finalidade de definir qual a melhor condição para a produção do éster. Os efeitos da razão molar (RM), da concentração da enzima [E] e da temperatura (T) foram avaliados. Alíquotas de 500µL foram retiradas do meio reacional nos tempos inicial, 1, 2, 3, 4, 5 e 6 horas. As razões

molares, concentrações da enzima [E] (%) (m/m substratos) e temperaturas utilizadas no estudo são apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 – Cinética da reação para avaliar a influência da razão molar, da concentração da enzima e da temperatura entre os substratos na produção enzimática de acetato de eugenila.

Temperatura (°C)	[E] (% m/m substratos)	Razão Molar (anidrido acético/eugenol)
50	5,5	1:1; 3:1; 5:1
50	1; 5,5; 10	3:1
40; 50; 60	5,5	3:1

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste momento serão apresentados e discutidos os resultados obtidos ao longo do estudo do processo de produção enzimática de acetato de eugenila utilizando a lipase imobilizada comercial *C. Antarctica* (Novozym 435) como catalisador em sistema livre de solvente.

Na Tabela 4 encontra-se o resultado das análises realizadas pelo laboratório Viafarma no óleo essencial de cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus*) obtido (lote) do fabricante Aromax.

Tabela 4 - Resultados análises no óleo essencial de cravo (*Caryophyllus aromaticus*).

Testes	Especificações	Resultados
Cor	Amarelo claro e amarelo escuro	Amarelo
Densidade	0,953 a 0,965 g/m ³ (20°C)	0,957 g/m ³ (20°C)
Índice de refração	1,486 a 1,498 (20°C)	1,489(20°C)
Teor de Eugenol	85,0 a 88,0%	85,43%

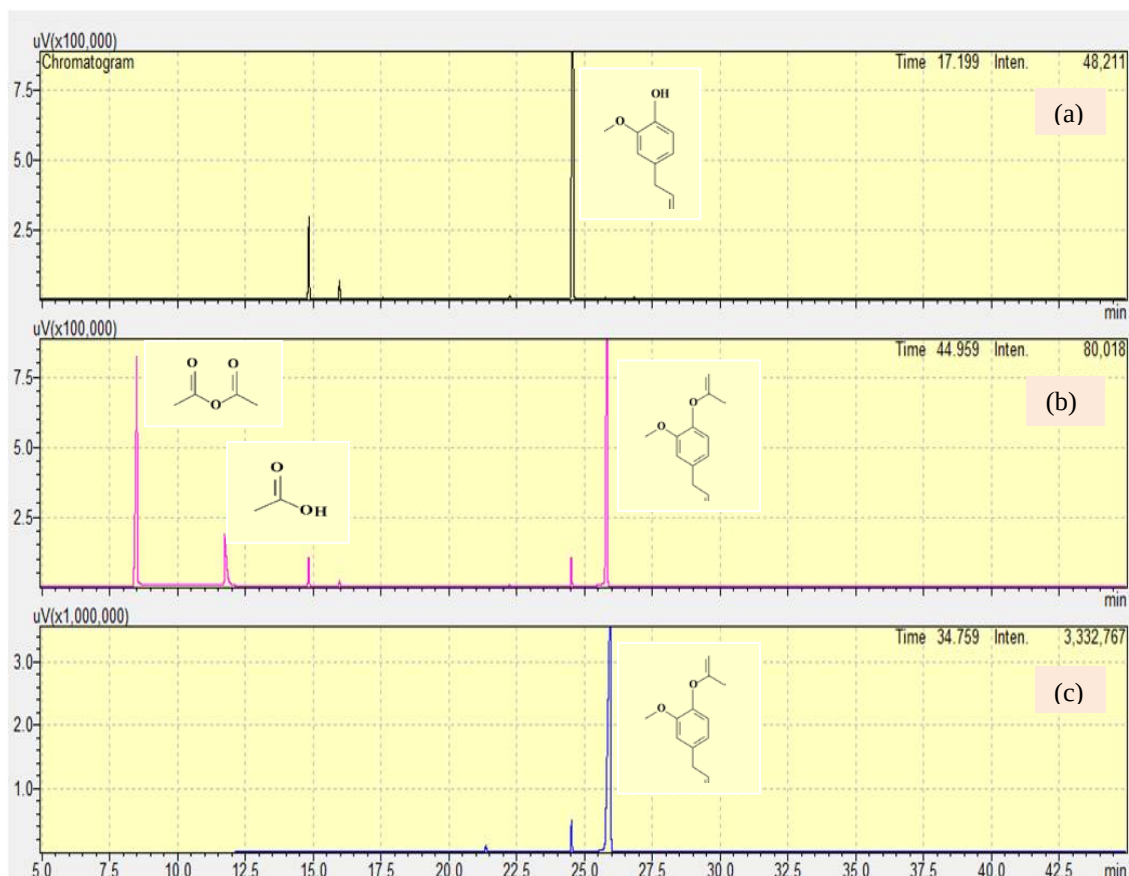
Fonte: Viafarma.

2.3.1 Maximização da produção enzimática de acetato de eugenila

A Figura 7 apresenta o perfil cromatográfico do óleo essencial da cravo-da-índia antes (a) e após a reação de esterificação (b) e do padrão (c) acetato de eugenila. Como pode ser observado, a banda do eugenol (Tempo de Retenção-TR = 25 min) desaparece

completamente e um novo composto é formado (TR=26min), o que corrobora com o tempo de retenção do padrão (TR=26min) confirmando o sucesso da síntese realizada.

Figura 7. Cromatogramas do óleo essencial do cravo-da-índia antes (a), e depois da esterificação (b) do padrão acetato de eugenila (c).



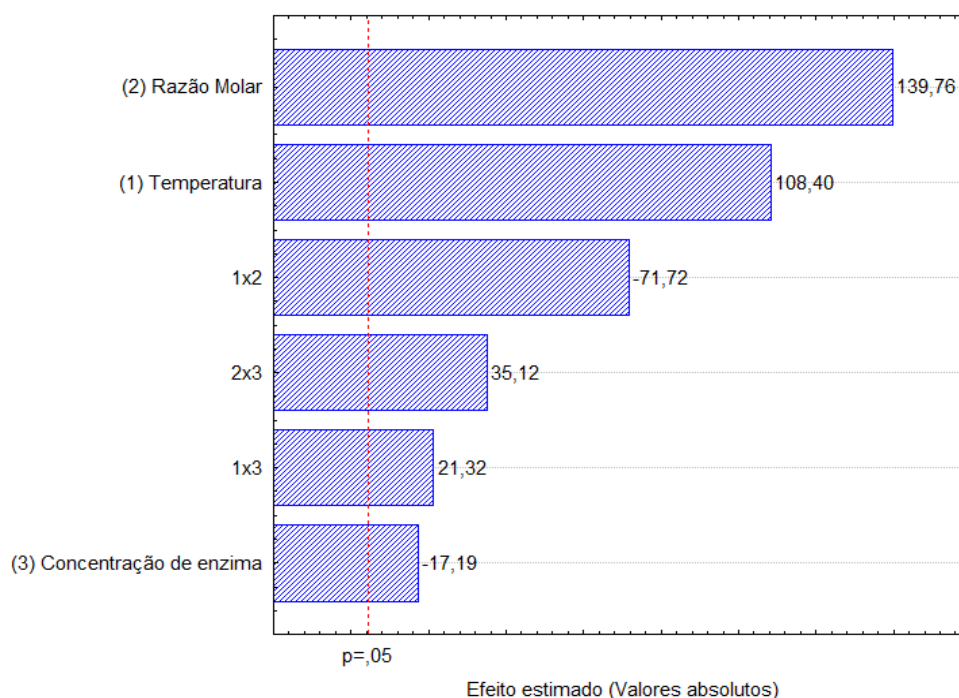
A Tabela 5 apresenta a matriz do planejamento experimental com os valores reais e codificados das variáveis independentes e as conversões em acetato de eugenila em seis horas de reação, tempo este no qual Chiardia *et al.* (2012) encontraram conversões de aproximadamente 100%.

Tabela 5 - Delineamento composto central 2^3 (valores codificados e reais) com as respostas em termos de conversão em acetato de eugenila.

Ensaio	Temperatura (°C)	Razão molar anidrido/eugenol (mol/mol)	Concentração de Enzima (%m/m)	Conversão (%)
1	-1 (40°C)	-1 (1:1)	-1 (1%)	59,16
2	1 (60°C)	-1 (1:1)	-1 (1%)	86,81
3	-1 (40°C)	1 (5:1)	-1 (1%)	89,99
4	1 (60°C)	1 (5:1)	-1 (1%)	93,87
5	-1 (40°C)	-1 (1:1)	1 (10%)	44,73
6	1 (60°C)	-1 (1:1)	1 (10%)	82,30
7	-1 (40°C)	1 (5:1)	1 (10%)	90,47
8	1 (60°C)	1 (5:1)	1 (10%)	99,87
9	0 (50°C)	0 (3:1)	0 (5,5%)	96,98
10	0 (50°C)	0 (3:1)	0 (5,5%)	96,96
11	0 (50°C)	0 (3:1)	0 (5,5%)	97,41

A partir dos resultados apresentados nesta tabela pode ser observado que altas conversões foram obtidas na maioria dos níveis estudados, em diferentes concentrações de enzima, razão molar e temperatura. Analisando as respostas de conversão no ponto central (ensaios 9,10 e 11), verificou-se a boa reprodutibilidade dos experimentos e também altas conversões. A maior conversão (~100%) foi obtida na temperatura de 60°C, com excesso de anidrido acético e concentração de enzima 10% (% m/m) (ensaio 8). Observe-se também que não existem diferenças significativas nos resultados encontrados no ponto central e no ensaio de maior conversão. Os resultados de conversão em acetato de eugenila, apresentados na Tabela 5, foram tratados estatisticamente e não foi possível a validação de um modelo empírico que descrevesse a conversão de acetato de eugenila em função das variáveis estudadas. Construiu-se então o Gráfico de Pareto, apresentado na Figura 8, onde os efeitos absolutos estão apresentados.

Figura 8 - Gráfico de Pareto para a produção enzimática de acetato de eugenila (6 horas de reação) em sistema livre de solvente.



Observou-se que em 6 horas de reação todas as variáveis apresentaram efeitos significativos ($p < 0,05$) na conversão em acetato de eugenila. Através da Figura 8 verifica-se que a concentração de enzima apresentou efeito significativo negativo ($p < 0,05$), mostrando que a redução da quantidade do biocatalisador não afetaria para os níveis investigados, o rendimento da reação. Este fato indica que para manter altas conversões, a síntese de acetato de eugenila pode ser conduzida com menores concentrações da enzima, significando economia durante o processo de esterificação. A razão molar entre os substratos, e a temperatura apresentaram efeitos positivos reforçando a hipótese que o excesso de anidrido acético resulta em aumento de produção.

Alguns estudos relatam a esterificação enzimática em sistema livre de solvente com diferentes ácidos graxos e alcoóis. Güvenç *et al.* (2002) estudaram a produção enzimática de isoamil acetato em sistema livre de solvente e obtiveram 80% de conversão utilizando 5% (m/m substratos) com Novozym 435, em 6 horas de reação, razão molar ácido/álcool de 1:2 na temperatura de 30°C e agitação de 150 rpm. Também utilizando a enzima comercial Novozym 435. Santos *et al.* (2007) avaliaram a síntese de butil ésteres em sistema livre de solvente, onde a mais alta proporção obtida

correspondeu a 49% utilizando ácido butírico como doador do grupo acila. Kumar *et al.* (2004) investigaram a síntese de etil palmitato em sistema livre de solvente e obtiveram 97% de conversão.

Chaibakhsh *et al.* (2012) sintetizaram eugenil caprilato utilizando como biocatalisador a enzima Lipozyme TL IM também em sistema livre de solvente, e obtiveram um rendimento máximo de 72,2% na condição ótima de 65°C, 250 rpm, 100mg de enzima, razão molar de 2:1 de eugenol/ácido caprílico em livre de solvente em 4,5 horas de reação.

A síntese de geranil acetato em n-hexano catalisado pela lipase comercial preparada a partir de *Candida antarctica* foi estudada por Bartling *et al.* (2001). A conversão de equilíbrio foi de 94%, razão molar dos substratos 1:1 e temperatura de 30 °C. Para remoção seletiva da água formada durante o processo de esterificação foram testadas membranas com compósito cerâmico/acetato de celulose que permitiu deslocamento de reação para os produtos atingindo 100% de conversão.

No estudo realizado por Paroul *et al.* (2010, 2011) na produção enzimática de geranil propionato e geranil oleato em sistema livre de solvente, os autores alcançaram altas conversões (97%) utilizando a lipase comercial Novozym 435 em razão molar ácido:álcool de 1:5. Sendo que, como em nossa pesquisa, a temperatura também foi um parâmetro significativo positivo.

No trabalho realizado por Chiaradia *et al.* (2012) onde a conversão de eugenol através da catálise enzimática utilizando lipase comercial imobilizada de *Candida antarctica* como catalisador e anidrido acético como agente acilante foi investigada, a melhor conversão foi de 99% usando razão molar anidrido/eugenol de 3:1, concentração de enzima 5,5% (m/m substratos) e temperatura de 50 °C em 6 horas de reação.

Biasi *et al.* (2008) investigaram a influência da temperatura, concentração de enzima, razão molar de substratos, em presença e ausência de solvente orgânico, para a produção enzimática de ésteres de linalol utilizando a lipase imobilizada comercial Novozym 435 como catalisador, diferentes ácidos e linalol e óleo essencial de Ho-Sho como substratos. A melhor conversão da reação foi obtida a uma temperatura mais elevada (70 °C), tanto para o sistema livre de solvente (3,81%) quanto para sistema com adição de solvente (2,25%), com razão molar solvente:substratos de 2:1, concentração de enzima 5% em peso e razão molar ácido:álcool 1:1. O estudo cinético da reação revelou que o óleo essencial de Ho-Sho proporcionou maiores conversões quando

comparado com o linalol puro (5,58%). Tal conversão foi atingida após 10 h de reação (5,58%), em razão molar solvente:substrato de 2:1 com a concentração de enzima de 5% em peso, a 70°C e razão molar anidrido:álcool de 1:1.

Horchani *et al.* (2010) avaliaram a capacidade de uma lipase imobilizada não-comercial de *Staphylococcus aureus* de catalisar a esterificação de eugenol com ácido benzóico. Quatro variáveis: temperatura de reação, quantidade de lipase, razão molar de ácido benzóico/eugenol e volume de solvente foram avaliadas na síntese de eugenil benzoato. O rendimento máximo de conversão (75%) foi obtido usando 240 UI de lipase imobilizada, uma razão molar ácido/eugenol benzóico de 1,22 dissolvido em 4,6 mL de clorofórmio em 41 °C.

2.3.2 Cinética da produção enzimática de acetato de eugenila

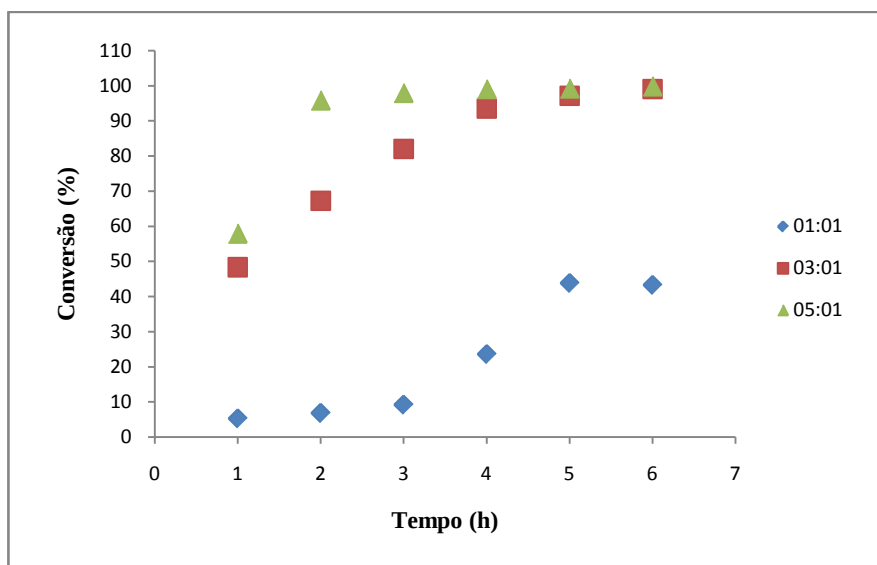
Levando em consideração que não existe grandes diferenças nas conversões encontradas entre o ensaio 8 onde a razão molar utilizada foi de 5:1 (anidrido acético:eugenol) e os ensaios no ponto central onde a razão molar utilizada foi de 3:1(anidrido acético:eugenol) a cinética da produção enzimática de acetato de eugenila foi realizada a partir dos resultados obtidos no ponto central do planejamento experimental. O estudo cinético foi realizado utilizando-se réplicas da amostra de partida (“cinética destrutiva”).

2.3.2.1 Efeito da razão molar anidrido acético:eugenol na cinética de produção enzimática de acetato de eugenila

Os experimentos para o estudo do efeito da razão molar óleo de cravo-da-índia: anidrido acético foram realizados fixando a temperatura em 50 °C e concentração de enzima em 5,5% (m/m substratos). A Figura 9 apresenta as curvas de conversão obtidas em função do tempo, variando a razão molar anidrido acético:eugenol em 1:1, 3:1 e 5:1.

A partir da Figura 9 pode ser observado que usando razão molar 5:1 em 2 horas de reação a conversão foi praticamente completa (~95%). O rendimento máximo de produção de acetato de eugenila (~100%) foi alcançado em 5 horas de reação para razões molares 5:1 e 3:1.

Figura 9 - Efeito da razão molar sobre o tempo e a porcentagem de conversão em acetato de eugenila à temperatura de 50°C, concentração de enzima de 5,5% (m/m substratos) e agitação de 150 rpm.



Observa-se a partir da Figura 9 que o excesso de anidrido afeta positivamente a conversão do processo. O mesmo aconteceu na pesquisa realizada por Chaar (2000) na produção de acetato de linalila utilizando anidrido acético e linalol na razão molar 9:1.

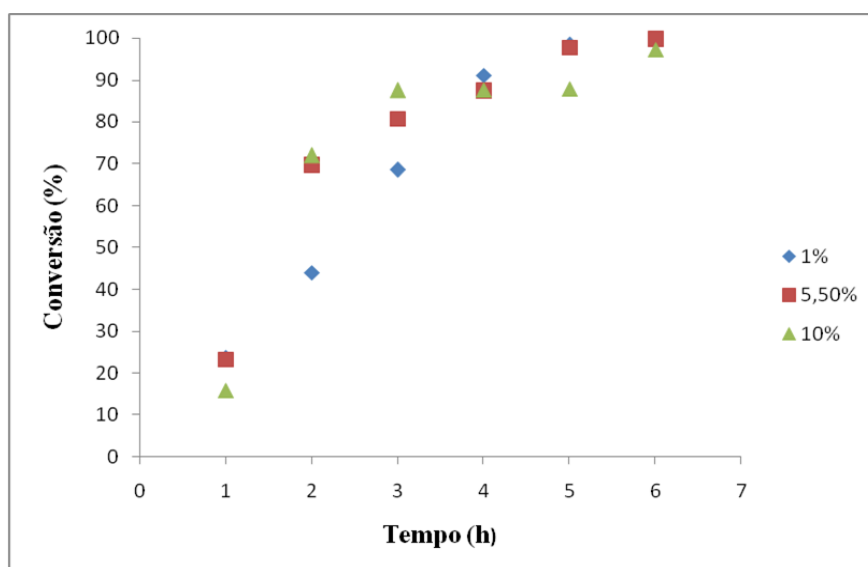
O princípio da reação realizada pelo autor é o mesmo que ocorre no presente sistema de produção de acetato de eugenila, pois segundo o autor, o linalol presente no óleo essencial reage com o anidrido acético formando o acetato de linalila (conversão de 61,8%) e ácido acético, o qual eleva a acidez do meio reacional reduzindo, assim, a velocidade da reação. Para evitar que isto ocorra, o autor adicionou ao meio reacional o acetato de sódio que atuou como agente tamponante, controlando desta forma a acidez gerada que, segundo o autor pode diminuir a velocidade da reação, fato que não aconteceu na presente pesquisa, pois em 2 horas de reação obteve-se aproximadamente 100% de conversão.

Como o ponto de equilíbrio controla a quantidade de éster formado, o uso de um excesso do ácido carboxílico ou do álcool aumenta o rendimento baseado no reagente limitante. O rendimento de uma reação de esterificação também pode ser incrementado pela remoção de água da mistura reacional assim que é formada na maioria das reações, mas não na nossa. Sendo assim, como aponta a literatura, o excesso de anidrido poderia afetar positivamente a conversão do processo (CHAAR, 2000).

2.3.2.2 Efeito da concentração de enzima na cinética de produção enzimática de acetato de eugenila

Com o objetivo de avaliar o efeito da concentração de enzima no sistema foi avaliado mantendo-se fixas as condições do sistema na temperatura de 50 °C, razão molar anidrido acético:eugenol de 3:1 e agitação de 150 rpm, possibilitando a obtenção das curvas cinéticas em função da concentração de enzima (1; 5,5 e 10% (m/m substratos)) (Figura 10).

Figura 10 - Efeito da concentração de enzima sobre o tempo e a porcentagem de conversão em acetato de eugenila à temperatura de 50 °C, razão molar anidrido acético:eugenol 3:1 e agitação de 150 rpm.



Como pode ser observado na Figura 10, a concentração da enzima não apresentou o efeito significativo na produção de acetato de eugenila. Após de 4 horas de reação os rendimentos foram os mesmos para concentrações de enzima 1, 5,5 e 10%, atingindo o máximo de conversão depois de 6 horas de síntese.

Resultados semelhantes foram obtidos por Chiaradia *et al.* (2012). Os autores demonstraram que depois de 30 minutos da reação altas conversões (20, 46 e 51%) podem ser obtidos para concentrações de enzima 1, 5,5 e 10%, respectivamente. Após 1 hora da reação, a concentração de enzima também não apresentou o efeito significativo.

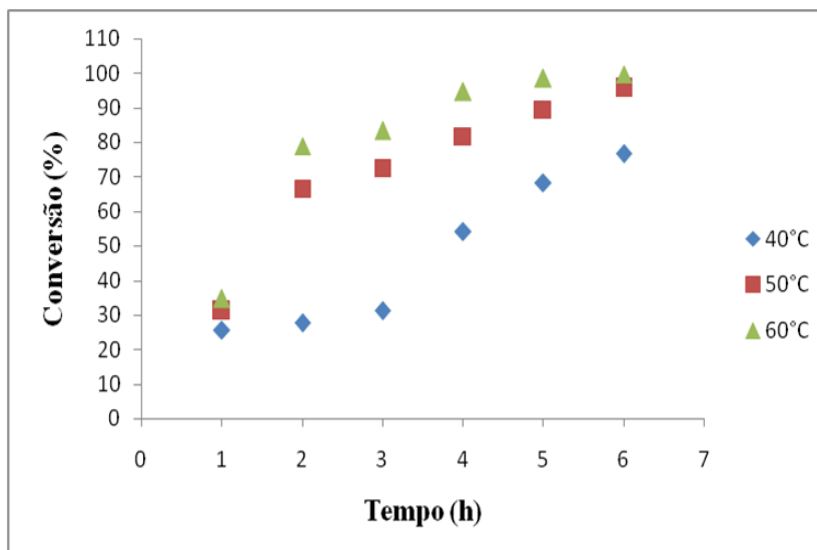
Uma possível explicação pode ser relacionada com o fato que excesso da enzima em meio reacional leva à formação de agregados que conduzem à uma distribuição não

homogênea da enzima. As moléculas de enzima na superfície externa de tais partículas são expostas a altas concentrações de substratos, mas o tempo de transporte de massa dentro da partícula do biocatalisador pode drasticamente limitar a concentração de substrato no interior da partícula. Menores atividades de uma fração de biocatalisador reduzem a eficiência por unidade de massa e não aumentam a conversão (KARRACHÂABOUNI *et al.*, 2006).

2.3.2.3 Efeito da temperatura na cinética de produção enzimática de acetato de eugenila

A fim de avaliar o efeito da temperatura sobre a conversão de acetato de eugenila, manteve-se fixa a razão molar anidrido acético:óleo (3:1) e concentração da enzima em 5,5% (m/m substratos), o que possibilitou a obtenção das curvas de conversão em função do tempo, variando a temperatura em 40, 50 e 60°C, conforme apresentado na Figura 11.

Figura 11 - Efeito da temperatura sobre o tempo e a porcentagem de conversão de acetato de eugenila à razão molar eugenol: anidrido acético 1:3, concentração de enzima de 5,5% (m/m) e agitação de 150 rpm.



Conforme a Figura 11, altas conversões foram obtidas já nas primeiras 2 horas de reação em maiores temperaturas (50 e 60 °C), correspondendo a 70 e 85%, respectivamente. Após este período, a conversão da reação aumenta com o tempo e atinge o máximo (~100%) depois de 6 horas da reação, para as mesmas temperaturas.

A temperatura apresenta dois importantes papéis no sistema reacional. Primeiramente, altas temperaturas podem melhorar a difusão dos substratos ou sua solubilidade. Em segundo lugar, as enzimas possuem uma temperatura ótima de atuação, que no caso da Novozym 435 está em torno de 50 a 70°C, como já mencionado anteriormente.

Güvenç *et al.* (2002) estudaram a esterificação de isoamil acetato catalisada pelas enzimas Novozym 435 e Lipozyme RM IM sem a adição de solvente, agitação de 150rpm e concentração de enzima de 5% (p/p substratos). Na razão molar de ácido/álcool 1:2, com a Novozym 435, obtiveram o equilíbrio da reação em 6 horas nas três temperaturas estudadas (30, 40 e 50°C) com 81% de conversão. Com a Lipozyme RM IM na razão molar de ácido/álcool 1:1, em 48 horas de reação obtiveram conversão de 20% à 50°C e 13% à 30°C.

A partir da Figura 11 é possível observar que o rendimento da reação aumenta com o tempo, fato este não observado apenas na temperatura de 60°C, onde se verifica a ocorrência de um ponto máximo em 6 horas de reação.

2.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A reação de esterificação enzimática do óleo essencial de cravo da Índia para a produção do éster eugenil acetato utilizando como catalisador a enzima *Novozym 435* se mostrou uma técnica promissora na obtenção de ésteres, levando-se em consideração as condições mais brandas de reação e a baixa quantidade de catalisador necessário para se obter altos rendimentos de produto.

2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRA, M.F.; SILVA, K.N.; BASÍLIO, I.J.L.D.; FRANÇA, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, p.472-508, 2008.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Regulamento Técnico sobre Aditivos Aromatizantes/ Aromas**. Brasília, Poder Executivo, RDC nº 2 de 15 de janeiro de 2007.

BARTLING, K.; THOMPSON, J.U.S.; PFROMM, P.H.; CZERMAK, P.; REZAC, M.E. Lipase-catalyzed synthesis of geranyl acetate in n-hexane with membrane-mediated water removal. **Biotechnology and Bioengineering**, v.75, n.6, p.676-681, 2001.

BAUER, K.; GARBE, D.; SURBURG, H. **Common Fragrance and Flavor Materials: Preparation, Properties and Uses**. 4th ed. Weinheim: Wiley - VCH, p. 293, 2001.

BERGER, R. G. *Aroma Biotechnology*. **Berlin: Springer-Verlag**, p.240, 1995.

BERGER, R.G. *Biotechnology of flavours – the next generation*. **Biotechnology letters**, v.31, p.1751-1659, 2009.

BIASI, A. Produção enzimática de ésteres de linalol em meio orgânico e em sistema livre de solvente. **Dissertação de Mestrado**. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Regional Integrada de Alto Uruguai e das Missões. Erechim, RS, 2008.

BICAS, J.L. Estudos de Obtenção de Bioaromas pela Biotransformação de Compostos Terpênicos, **Tese de Doutorado**. Universidade Estadual de Campinas, 2009.

BIZZO, H.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009.

BNDES,2014.

http://www.bndes.gov.br/SiteBNDES/export/sites/default/bndes_pt/Galerias/Arquivos/produtos/download/chamada_publica_FEPprospec0311_Quimicos_Relat4_aromas.pdf. Acessado em: 15 de setembro de 14.

BRITO, Y. C. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal de Alagoas, Brasil, 2010.

BURT, S.A. Essential Oils: their antibacterial properties and applications in foods – A Review. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, p.223-253, 2004.

CHAIBAKHSH, N.; BASRI, M.; MOHAMED ANUAR, S. H.; ABDUL RAHMAN, M. B.; REZAYEE, M. Optimization of enzymatic synthesis of eugenol ester using statistical approaches. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 1, n. 3, p. 226-231, 2012.

CHAAR, J. DA S. Estudos analíticos e modificação química por acetilação do linalool contido no óleo essencial de espécie *Aniba duckei* Kostermans. **Tese de doutorado**. Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, 2000.

CHIARADIA, V.; PAROUL, N.; CANSIAN, R. L.; JÚNIOR, C. V.; DETOFOL, M. R.; LERIN, L. A.; OLIVEIRA, J. VLADIMIR.; OLIVEIRA, D. Synthesis of Eugenol Esters by Lipase-Catalyzed Reaction in Solvent-Free System. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 168, p. 742-751, 2012.

CLAYDEN, J.; GREEVES, N.; WARREN, S.; WOTHERS, P. **Organic Chemistry**, Estados Unidos: Oxford University Press, 2007.

- COSTELLI, M.C. Cultivo de *Bacillus polymixa* para a Produção de Acetoína: Influência do pH e do Tempo de Cultivo do Inóculo. **Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, p.90, 2005.
- DZAMIC, A.; SOKOVIC, M.; RISTIC, M. S.; GRIJIC-JOVANOVIC, S.; VUKOJEVIC, J; MARIN, P. D. Chemical composition and antifungal activity of illicium verum and *Eugenia caryophyllata* essential oils. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 45, n. 2, p. 259-260, 2009.
- EVANGELISTA, J. **Tecnologia de Alimentos**. Atheneu, 2ed, SP, p. 448-451, 2003.
- FANI, M. Aromas e Biotecnologia. **Aditivos & Ingredientes**, n.82, p. 44-50, 2011.
- FONTANILLE, P.; LE FLÈCHE, A.; LARROCHE, C. Pseudomonas rhodesiae PF1: A New and Efficient Biocatalyst for Production of Isonovalal from α -Pinene Oxide. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 20, p. 413-421, 2002.
- FRAIFE-FILHO, G.A.; CÉSAR, J.O.; RAMOS, J.V. Cravo-da-india. **Radar Técnico. CEPLAC**, 2005.
- FRANCO, M. R. B. **Aroma e Sabor dos Alimentos: Temas Atuais**. São Paulo: Livraria Varela, p.246, 2004.
- GIRI, A.; DHINGRA, V.; GIRI, C. C.; SINGH, A.; WARD, O. P.; NARASU, M. L. Biotransformation Using Plant Cells, Organ Cultures and Enzyme Systems: Current Trends and Future Prospects. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 175-199, 2001.
- GÜVENÇ, A.; KAPUCU, N.; MEHMETOGLU, Ü. The production of isoamyl acetate using immobilized lipases in a solvent-free system. **Process Biochemistry**, v.38, p.379-386, 2002.
- HORCHANI, H.; SALEM, N.B.; ZARAI, Z.; SAYARI, A.; GARGOURI, Y.; CHAÂBOUNI, M. Enzymatic synthesis of eugenol benzoate by immobilized Staphylococcus aureus lipase: Optimization using response surface methodology and determination of antioxidant activity. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 2809–2817, 2010.
- KARRA-CHÂABOUNI, M.; GHAMGHI, H.; BEZZINE, S.; REKIK, A.; GARGOURI, Y. Production of flavour esters by immobilized *Staphylococcus simulans* lipase in asolvent-free system. **Process Biochemistry**, v.41, p. 1692-1698, 2006.
- KUMAR, R.; MADRAS, G.; MODAK, J. Enzymatic synthesis of ethyl palmitate in supercritical carbon dioxide. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v.43, p. 1568-1573, 2004.
- LEAK, D.J.; SHELDON, R.A.; WOODLEY, J.M.; ADLERCREUTZ, P. Biocatalysts for selective introduction of oxygen. **Biocatalysis and Biotransformation**. 27: 1-26, 2009.

- LIU, Y.; LOTERO, E.; GOODWIN, J. G. A comparison of the esterification of acetic acid with methanol using heterogeneous versus homogeneous acid catalysis. **Journal of Catalysis**, p.242 - 278, 2006.
- MACHADO, B.F.M.T. Óleos Essenciais: Verificação da ação antimicrobiana *in vitro*, na água e sobre a microbiota da pele humana. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Estadual Paulista, 2009.
- MARIOTTO, J. R. Produção de acetoina e 2,3-butanodiol por *Bacillus polymixa*. **Dissertação de Mestrado em Engenharia Química**, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, p. 92, 2007.
- MARÓSTICA, J.M.R. Biotransformação de terpenos para produção de compostos de aroma funcionais. **Tese de doutorado**. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP, 2006.
- MCMURRY, J. **Química Orgânica**, 7ª.ed., Cengage Learning: São Paulo, 2011.
- MELO, L. L. M. M.; PASTORE, G. M.; MACEDO, G. A. Optimized synthesis of citronellyl flavour esters using free and immobilized lipase from *Rhizopus sp.* **Process Biochemistry**, v. 40, p. 3181-3185, 2005.
- MIKHAYLOV, I. Aromas naturais: importância, variações, estrutura e aceitação. **Aditivos & Ingredientes**, p. 28-37, 2014.
- MOUCHREK, V. Estudos analíticos e modificações químicas por metilação e acetilação do eugenol contido no óleo essencial extraído das folhas da espécie Pimenta dioica Lindl. 2000. **Tese de Doutorado em Química Analítica** - Instituto de Química de São Carlos. Universidade de São Paulo: São Carlos, p.124, 2000.
- OLIVEIRA, F.Q.; GOBIRA, B.; GUIMARÃES, C.; BATISTA, J.; BARRETO, M.; SOUZA, M. Espécies vegetais indicadas na odontologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, p.466-476, 2007 a.
- OLIVEIRA, S. M. M.; JOSE, V. L. Processos de extração de óleos essenciais. **Dossiê Técnico da Sociedade Brasileira de Respostas Técnicas**. Instituto de Tecnologia do Paraná, Setembro, 2007 b.
- OLIVEIRA, C. A.; SOUZA, A. C. J.; SANTOS, A. P. B.; SILVA, B. V.; LACHTER, E. R.; PINTO, A. C. Síntese de Ésteres de Aromas de Frutas: Um Experimento para Cursos de Graduação dentro de um dos Princípios da Química Verde, **Revista Virtual de Química**, v.6, n.1, p.152-167, 2013.

ÖZTÜRK, A.; ÖZBEK, H. The anti-inflammatory activity of *Eugenia Caryophyllata* essential oils: an animal model of anti-inflammatory activity. **European Journal of General Medicine**, v.2, p.159-63, 2005.

PAROUL, N.; GRZEGOZESKI, L.P.; CHIARADIA, V.; TREICHEL, H.; CANSIAN, R.L.; OLIVEIRA, J. V .; DE OLIVEIRA, D. Production of geranyl propionate by enzymatic esterification of geraniol and propionic acid in solvent-free system. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 85, p. 1636-1641, 2010.

PAROUL, N.; GRZEGOZESKI, L.P.; CANSIAN, R.L.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, J. V .; DE OLIVEIRA, D.; CHIARADIA, V. Erratum to: Solvent-free geranyl oleate production by enzymatic esterification. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 34, p. 331-337, 2011.

PATTANAIK, B. N.; MANDALIA, H. C. Acetato de etilo: propriedades, processos e aplicações de produção - uma revisão. **International Journal of Research Atual E Revisão**, v. 3, n.12, p. 23-40, 2011.

PIRES-CABRAL, P.; DA FONSECA, M.M.R.; FERREIRA-DIAS, S. Esterification activity and operational stability of *Candida rugosa* lipase immobilized in polyurethane foams in the production of ethyl butyrate. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, n.2, p. 246-252, 2010.

SACRAMENTO, C.K., CASALI, B.L., PEREIRA, E.C. Growing spices in Brazil. **Pepper News**, Jakarta 60-70, 2001.

SANTOS J.C.; BUENO, T.; ROS P.C.M.; CASTRO H.F. Lipase-catalyzed synthesis of butyl ésteres by direct esterification in solvent-free system. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.82, p.956-961, 2007.

SANTURIO, D. F. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos sobre *Escherichia coli* isoladas de suínos, aves e bovinos. **Dissertação de Mestrado**. Santa Maria, RS, p.54, 2011.

SCHRADER, J.; ETSCHMANN, M.M.W.; SELL, D.; HILMER, J.M.; RABENHORST, J. Applied biocatalysis for the synthesis of natural flavour compounds – current industrial processes and future prospects. **Biotechnology Letters**, v. 26, p. 463 – 472, 2004.

SERRA, S.; FUGANTI, C.; BRENNA, E. Biocatalytic preparation of natural flavours and fragrances. **Trends in Biotechnology**, v.23, n.4, p.193-198, 2005.

SILVA-SANTOS, A.; ANTUNES, A. M. S.; BIZZO, H. R.; D'AVILA, L. A. A participação da indústria óleo-citrícola na balança comercial brasileira. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.8, p. 8-13, 2006.

- SIMAS, N.K.; LIMA, E.C.; CONCEIÇÃO, S.R.; KUSTER, R.M.; MARTINS, R.O.F. Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue – atividade larvicida de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. **Química Nova**, v. 27, p.46-49, 2004.
- SIMÕES, C. M.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre, RS: Ed. da UFSC, 2004.
- SINGH, M.; SINGH, S.; SINGH, R.S.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U.C. Transesterification of primary and secondary alcohols using *Pseudomonas aeruginosa* lipase. **Bioresource Technology**, v.99, p. 2116-2120, 2008.
- SINGH, J.; BAGHOTIA, A.; GOEL, S. P. *Eugenia caryophyllata* Thunberg (Family Myrtaceae): A Review. **International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences**, v. 3, n. 4, p.1469-1475, 2012.
- SPEZIALI, M.G. De aromas e perfumes, o mercado da indústria do "cheiro". **Química Nova**, v.35, n.4, p. 861-864, 2012.
- STROHMEIER, G. A.; PICHLER, H.; MAY, O.; GRUBER-KHADJAWI, M. Application of designed enzymes in organic synthesis. **Chemical Reviews**, v.111, p. 4141–4164, 2011.
- TACHIHARA, T.; HASHIMOTA, H; ISHIZAKI, S.; KOMAI, T.; FUJITA, A.; ISHIKAWA, M.; KITAHARA, T. Microbial resolution of 2-metilbutyric acid and its application to several chiral flavor compounds. **Development in Food Science**, v.43, p. 97-100, 2006.
- TAN, Q.; DAY, D.F.; CADWALLADER, K.R. Bioconversion of (R) – (+)-limonene by *P. digitatum* (NRRL 1202). **Process biochemistry**, v. 33, p.29-37, 1998.
- TRAJANO, V. N.; LIMA, E. O.; SOUZA, E. L.; TRAVASSOS, A. E. R. Inhibitory effect of the essential oil from *Eugenia caryophyllata* Thumb leaves on coalho cheese contaminating microorganisms. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 4, p. 1001-1006, 2010.
- YOUNG, I. S.; BARAN P, S. Protecting-group-free synthesis as an opportunity for invention. **Nature Chemistry**, v.1, p. 193-205, 2009.
- WOLFFENBÜTTEL, A. N. Óleos essenciais. **Informativo CRQ-V**, ano XI, n.º105, p. 06-07, 2007.
- ZAGO, J. A. A.; USHIMARU, P. I.; BARBOSA, L. N.; JUNIOR, A. F. Sinergismo entre óleos essenciais e drogas antimicrobianas sobre linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 19, n.4, p. 828-833, 2009.

(<http://plantas-ornamentais.blogspot.com.br/2011/03/cravo-da-india-syzygium-aromaticum-l.html>) acesso em 01 de outubro de 2014.

CAPÍTULO III

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DO
CRAVO-DA-ÍNDIA ANTES E APÓS A ESTERIFICAÇÃO**

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo será apresentada uma revisão sobre o estado da arte no que concerne à atividade antimicrobiana dos óleos essenciais, bem como os testes de atividade antibacteriana e antifúngica para o óleo essencial do cravo-da-índia e seu éster acetato de eugenila e os resultados encontrados.

3.1 Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais

A atividade microbiana é uma das principais causas de deterioração em alimentos e é muitas vezes associada à perda de qualidade e segurança. Embora a indústria de alimentos utilize os óleos essenciais (OEs) principalmente como aromatizantes, os mesmos representam uma fonte antimicrobiana e antioxidante natural alternativa, podendo ser utilizados na conservação dos produtos, pois estes óleos apresentam diferentes propriedades bioativas, como atividade antioxidante (WANNES *et al.*, 2010), ação analgésica e anti-inflamatória (MENDES *et al.*, 2010), fungicida (CARMO *et al.*, 2008; NGUEFACK *et al.*, 2012) e antibacteriana (OKOH *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2009). No entanto, a aplicação dos OEs na conservação de alimentos requer conhecimentos detalhados sobre suas propriedades, ou seja, a Concentração Inibitória Mínima (CIM), os microrganismos envolvidos, modo de ação, além do efeito dos componentes da matriz do alimento sobre suas propriedades antimicrobianas e antioxidantes (HYLDGAARD *et al.*, 2012).

As propriedades farmacológicas atribuídas aos OEs são diversas e algumas são preconizadas por apresentarem vantagens importantes quando comparadas a outros medicamentos, como por exemplo, a sua volatilidade, que os torna ideal para uso em nebulizações, banhos de imersão ou simplesmente em inalações. A volatilidade e o baixo peso molecular de seus componentes possibilitam que eles sejam rapidamente eliminados do organismo através das vias metabólicas (BANDONI & CZEPAK, 2008).

Em geral, os óleos essenciais na presença de oxigênio, luz, calor, umidade e metais são muito instáveis, sofrendo inúmeras reações de degradação, o que dificulta a sua conservação, fazendo com que o seu processo de armazenamento seja fundamental para a manutenção de sua qualidade (GUIMARÃES *et al.*, 2008).

A atividade antimicrobiana dos OEs *in vitro* tem sido amplamente estudada sobre uma série de microrganismos (LÓPEZ *et al.*, 2005). Apesar disto, o surgimento de bactérias multirresistentes representa um desafio no tratamento de infecções, sendo

assim notória a necessidade de encontrar novas substâncias com propriedades antimicrobianas para uso no combate a esses microrganismos. Além disso, a preocupação com relação à bactérias e fungos patogênicos em alimentos também vem crescendo devido ao aumento de surtos de doenças transmitidas por alimentos. Os óleos essenciais e os extratos de plantas são agentes antimicrobianos naturais que podem ser aplicados nas indústrias de alimentos e farmacêutica, para o controle de bactérias e fungos patogênicos (VICTÓRIA, 2010; OKOH *et al.*, 2010).

Com o aumento do número de bactérias resistentes aos antibióticos existe um considerável interesse na investigação dos efeitos antimicrobianos de óleos essenciais e de diferentes extratos de plantas, contra uma gama de bactérias, que poderão ser utilizados como agentes antimicrobianos naturais, na preservação de alimentos e controle de infecções. Apesar da grande diversidade de antimicrobianos que agem sobre diversos microrganismos patogênicos, estudos buscam por um antimicrobiano ideal, ou seja, aquele que apresenta maior espectro de ação, menor toxicidade, menor custo e menor indício de resistência bacteriana, haja vista que já existe resistência bacteriana a alguns produtos antimicrobianos. Devido tal resistência bacteriana, cresce cada vez mais a procura de novas fontes que atuem como antimicrobiano (ALVARENGA, 2007).

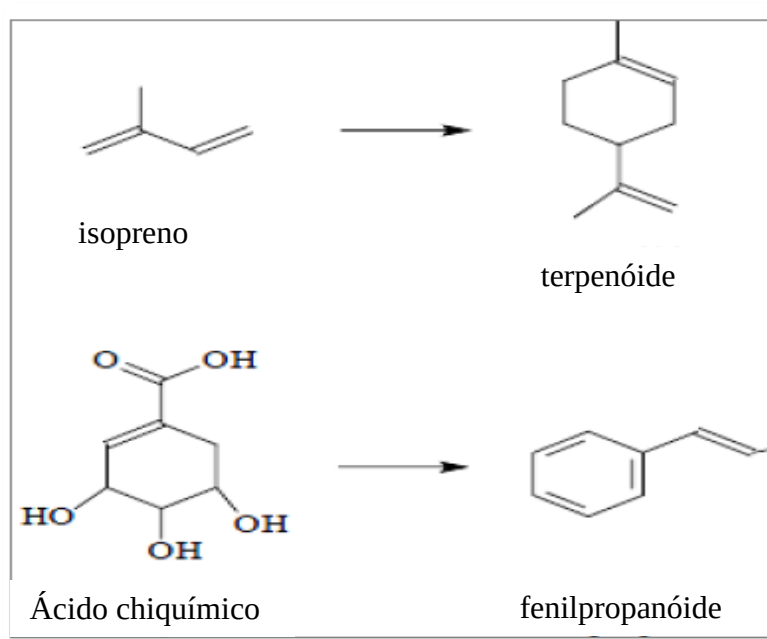
Historicamente, a maioria dos antibióticos provém de um pequeno conjunto de estruturas moleculares cujas vidas funcionais foram estendidas por gerações de reorganizações e arranjos sintéticos (FISCHBACH & WALSH, 2009). Além disto, a propriedade antimicrobiana dos óleos essenciais é considerada de grande interesse para as indústrias alimentícias, farmacêuticas e cosméticas desde que o uso de aditivos naturais ganhou importância como tendência na substituição dos conservantes sintéticos artificiais (OKOH *et al.*, 2010).

As plantas produzem uma grande variedade de compostos com atividade antimicrobiana. Destes, alguns estão sempre presentes, enquanto outros são produzidos em resposta ao ataque de microrganismos ou devido a danos físicos. A identificação dos compostos antimicrobianos mais ativos presentes nos OEs é complexa, tendo em vista a presença de muitos componentes diferentes, os quais sofrem variações percentuais de acordo com a época da colheita e o método utilizado para extrair o óleo, dentre outros fatores (ESPINA *et al.*, 2011).

A grande maioria dos óleos essenciais é constituída por diversos compostos orgânicos de baixo peso molecular, com atividades antimicrobianas distintas, podendo

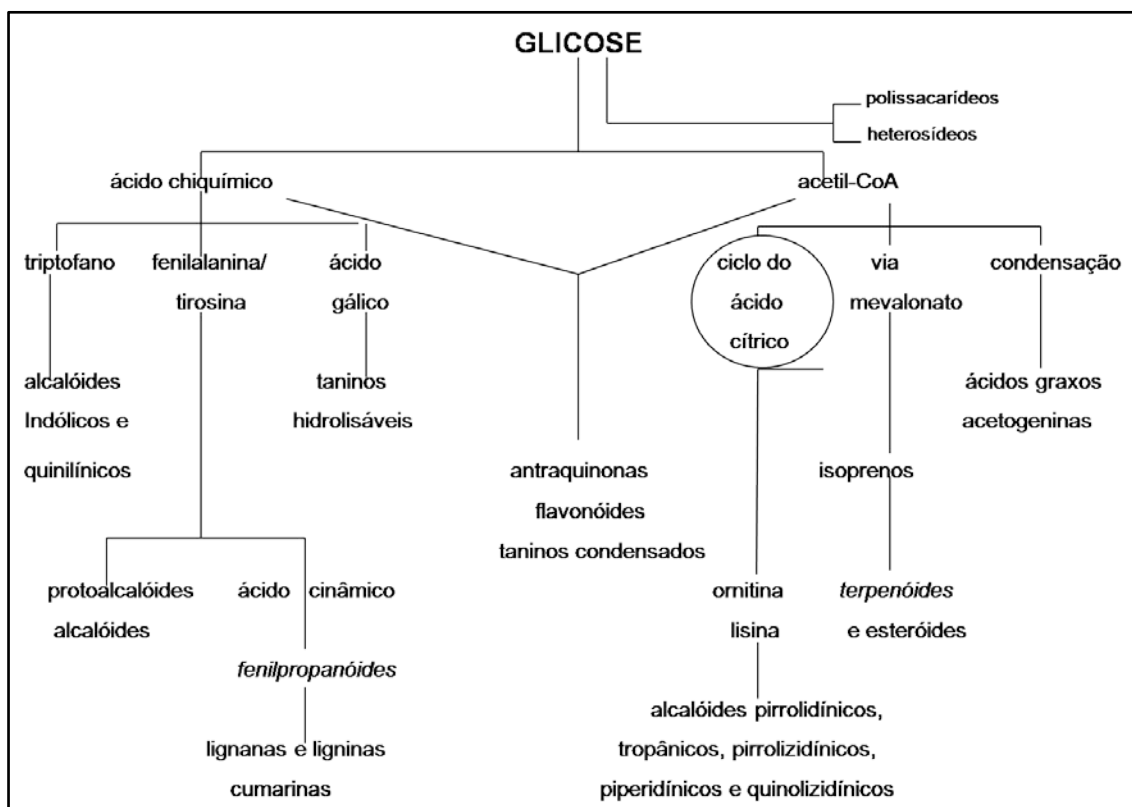
ser divididos em quatro grupos de acordo com a sua estrutura química: terpenos, terpenóides, fenilpropenos e outros. Os terpenóides são derivados de unidades do isopreno e os fenilpropanóides se formam a partir do ácido chiquímico (Figura 12), que forma as unidades básicas dos ácidos cinâmico e p-cumárico (LUPE, 2007).

Figura 12. Origem dos Terpenóides e Fenilpropanóides.



Fonte: LUPE, 2007.

Tais compostos são metabólitos secundários que têm a sua origem explicada a partir do metabolismo da glicose. Esse ciclo biossintético pode ser observado na Figura 13.

Figura 13. Ciclo biossintético geral dos metabólitos secundários.

Fonte: SIMÕES *et al.*, 2003.

Terpenos são hidrocarbonetos produzidos pela combinação de várias unidades de isoprenos (C_5H_8), sendo sintetizados no citoplasma das células vegetais. Os principais terpenos são monoterpenos ($C_{10}H_{16}$) e sesquiterpenos ($C_{15}H_{24}$), mas cadeias maiores tais como diterpenos ($C_{20}H_{32}$), triperpenos ($C_{30}H_{40}$), também existem. Exemplos de terpenos incluem *p*-cimoneno, limoneno, terpineno e pineno (CABALLERO *et al.*, 2003).

Os terpenos, substâncias presentes tanto em plantas como em animais, são descritos como possuidores de uma diversidade considerável de propriedades biológicas incluindo a ação antimicrobiana, fungicida, antiviral, anti-hiperglicêmica, antiinflamatória e atividade antiparasitária (PADUCH *et al.*, 2007).

Os monoterpenos, importantes constituintes dos óleos essenciais, são altamente voláteis, sendo arrastados pelo vapor de água livres de outros componentes, sendo utilizados por suas características organolépticas marcantes (BANDONI & CZEPAK, 2008).

Terpenóides são terpenos os quais foram submetidos a modificações bioquímicas, com adição de moléculas de oxigênio e alterações ou remoções de grupos metil. Os terpenóides podem ser subdivididos em alcoóis, ésteres, aldeídos, fenóis, etc. Como por exemplo: timol, carcravol, linalol, acetato de linalila, citronelal, piperitona, mentol e geraniol. A atividade antimicrobiana dos terpenóides está relacionada aos seus grupos funcionais, e tem sido demonstrado que o grupo hidroxil dos terpenóides fenólicos e a presença de elétrons deslocalizados são importantes para a atividade antimicrobiana. Seus compostos antimicrobianos são ativos frente a um amplo espectro de microrganismos, sendo carvacrol e o timol os monoterpenóides mais ativos identificados até o momento (HYLDGAARD *et al.*, 2012).

Fenilpropenos constituem uma subfamília entre os vários grupos de compostos orgânicos chamados fenilpropanóides, os quais são sintetizados a partir da fenilalanina nas plantas (Figura 13). Os fenilpropenos constituem uma fração relativamente pequena dos OEs, sendo os mais pesquisados o eugenol, isoeugenol, vanilina, safrol e o cinamaldeído. A atividade antimicrobiana dos fenilpropenos depende do número e tipo de substituintes no anel aromático, da cepa microbiana e dos parâmetros utilizados nos testes experimentais, como meio de crescimento, temperatura, etc. (PAULI & KUBECZKA, 2010).

Como já mencionado anteriormente, o eugenol é um metabólito produzido por diversas plantas, da classe dos fenilpropanóides, especialmente conhecido por sua presença abundante do óleo essencial do cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata*), sendo o principal responsável por seu aroma.

Nas folhas, o eugenol chega a representar aproximadamente 95% do óleo extraído (RAINA *et al.*, 2001) e no cravo também é o principal componente do óleo, variando de 70 a 85% (ORTIZ, 1992).

O eugenol possui diversas ações farmacológicas comprovadas, sendo utilizado em práticas odontológicas como antisséptico tópico, analgésico e anestésico local, além de conferir propriedades farmacológicas aos cimentos obturadores de canais, visto ter ação bactericida, portanto, eficaz no tratamento de algumas enfermidades infecciosas na cavidade bucal (ESCOBAR, 2002; GOBBO-NETO & LOPES, 2007). Exibe, também, comprovadas atividades como antimicótico, antiinflamatório, antioxidante, alelopático e repelente (GOBBO-NETO & LOPES, 2007).

Possui atividade antifúngica contra *Candida albicans* (RAKOTONIRAINY & LAVÉDRINE, 2005), antiviral contra HSV-2 (vírus da herpes simples tipo 2) (BOURNE *et al.*, 1999), apresenta também efeito anti-edematogênico local, antiinflamatório e antinociceptivo (WRIGHT *et al.*, 1995). Em tecido nervoso, apresenta ação anestésica geral, pois bloqueia tanto a condução do potencial de ação em nervos periféricos quanto na junção neuromuscular (CRUZ, 2001).

Derivados do eugenol como acetileugenol, isoeugenol, e metileugenol possuem atividade antifúngica contra os fungos de podridão branca da madeira (*Betulina* L.) e fungos da podridão marrom da madeira (*Sulphureus* L.) (SEN-SUNG *et al.*, 2008).

Pesquisas mostram que o óleo essencial do cravo-da-índia é um potente antisséptico, seus efeitos medicinais compreendem o tratamento de náuseas, flatulências, indigestão, diarreia e é também usado como anestésico para o alívio de dores de dente (PAOLI *et al.*, 2007). Tem sido usado como medicamento para o tratamento da asma, várias doenças alérgicas e também como vermífugo (SINGH *et al.*, 2012). É usado também como agente fungicida no combate de doenças no cultivo da banana e como alternativa em seu tratamento pós-colheita (RANASINGHE *et al.*, 2002). Em alta concentração, o eugenol é um potente antimicrobiano, capaz de degenerar proteínas, mas em baixa concentração ele tende a estabilizar as membranas celulares pelo mecanismo anteriormente sugerido. Assim, seus efeitos farmacológicos dependem da concentração de eugenol livre no tecido vivo (ANGELO & JORGE, 2007).

O mecanismo de ação do OE sobre os microrganismos é complexo e ainda não foi totalmente elucidado. Inúmeros relatos foram feitos sobre os mecanismos de ação antimicrobiana dos óleos, sendo que alguns casos foram parcialmente elucidados como, por exemplo, para o óleo essencial de árvore de chá (*Melaleuca alternifolia*) que causa lise e perda da integridade da membrana, devido à saída de íons e inibição da respiração celular (CARSON *et al.*, 2006). Como um típico composto lipofílico, os óleos essenciais atravessam a parede celular e a membrana citoplasmática, a atividade citotóxica parece estar ligada ao rompimento das estruturas das diferentes camadas de polissacarídeos, ácidos graxos e fosfolipídios, devido ao seu mecanismo de ação que atinge vários alvos ao mesmo tempo, nenhuma resistência ou adaptação particular aos óleos essenciais tem sido descrita (BAKKALI *et al.*, 2008).

Já é bem conhecido o caráter hidrofóbico dos OEs e seus componentes, que permite a sua ligação aos lipídeos da membrana celular modificando sua estrutura e aumentando sua permeabilidade. Devido a esta permeabilidade alterada, podem ocorrer a passagem de íons e outros constituintes celulares provocando a morte da célula, sendo este o principal mecanismo pelo qual os OEs têm ações letais (BURT, 2004).

Outras ações dos OEs seriam danos às proteínas da membrana, interrupção da força motriz de prótons (ULTEE & SMID, 2001), do fluxo de elétron, do transporte ativo e da coagulação dos conteúdos celulares (BURT, 2004). Por outro lado, os OEs em geral expressam baixa solubilidade aquosa, o que os impede de alcançar um nível tóxico em membranas (COX *et al.*, 2000).

Os OEs também contêm um número de diferentes produtos de degradação originários de ácidos graxos insaturados, lactonas, terpenos, glicosídeos e compostos que contêm nitrogênio e enxofre, como a alicina e o alil isotiocianato, os quais possuem atividade antimicrobiana conhecida (CABALLERO *et al.*, 2003).

Diversos estudos referentes à atividade antimicrobiana dos OEs têm sido realizados, entre eles Trajano *et al.* (2009), analisaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial de diversas especiarias, dentre elas, a *E. caryophyllata*, frente a algumas cepas bacterianas patogênicas e/ou deteriorantes de alimentos. Tais autores verificaram a eficácia do óleo de *E. caryophyllata* em inibir a microflora autóctone de queijo coalho durante o armazenamento refrigerado.

A atividade antifúngica do óleo essencial de cravo da índia foi relatada na literatura contra *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *Tricophyton rubrum*, *Tricophyton mentagrophytes* e *Geotrichum candidum* (GAYOSO *et al.*, 2005), *Aspegillus fumigatus* e *Aspergillus niger* (PAWAR & THAKER, 2006; BANSOD & RAI, 2008) e também foi utilizado com eficácia no tratamento de candidíase vaginal (AHMAD *et al.*, 2005).

Extrato da espécie *Syzygium aromaticum* também apresenta atividades biológicas. A atividade bactericida foi estudada por Dorman & Deans (2000) e Nascimento *et al.* (2000), sendo que Nascimento *et al.* (2000) relataram o alto potencial antimicrobiano e atividade bactericida frente a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* testados com o extrato de *S. aromaticum*. Dietas à base de cravo-da-índia podem ter efeitos benéficos para o tratamento da diabete (PRASAD *et al.*, 2005).

Machado (2009) estudou a ação antimicrobiana de 27 óleos essenciais de uso em aromaterapia, sobre linhagens de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia colie*

Pseudomonas aeruginosa, espécimes clínicos humanos, utilizando a metodologia dos discos (difusão) e determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) (diluição) em Ágar Mueller Hinton. Verificou-se que dentre os óleos testados, utilizando os valores de CIM para 90% das linhagens testadas, as linhagens de *S. aureus* foram mais susceptíveis que as Gram negativas, sendo que os valores de CIM 90% foi de 0,21mg/mL para os óleos de pimenta negra (*Piper nigrum*) e árvore de chá (*Melaleuca alternifolia*) e 26,52mg/mL para o óleo de copaíba (*Copaíba officinalis*). Para *E. coli*, o óleo de canela (*Cinnamomum cassia*) foi o mais efetivo, com 2,0 mg/mL para CIM 90% enquanto para *P. aeruginosa* o valor de CIM90% foi de 8,29 mg/mL com o óleo de cravo da índia (*Syzigium aromaticum*).

A ação antibacteriana de óleos essenciais tem sido demonstrada através da susceptibilidade de bactérias Gram positivas e negativas, conforme evidenciado pelos baixos valores de concentrações inibitórias mínimas, como o cravo da índia que apresentou 0,09% (v/v) frente a bactérias Gram positivas e 0,10% (v/v) frente a bactérias Gram negativas (BARBOSA *et al.*, 2009).

Vários estudos têm comprovado o efeito de compostos isolados extraídos de óleos essenciais de plantas que atuam como fungicidas naturais inibindo a atividade fúngica e um número significativo destes constituintes tem se mostrado eficaz (CHAO & YOUNG, 2000).

Estudos recentes demonstraram que orégano (*Origanum vulgare*) e tomilho (*Thymus vulgaris*) estão entre os OEs mais ativos contra leveduras que deterioram alimentos, enquanto que os OEs de melissa (*Melissa officinalis*) e manjerona (*Origanum majorana*) mostram uma interessante atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, respectivamente (GUTIERREZ *et al.*, 2009).

Em um trabalho de triagem de alguns óleos essenciais de plantas contra *Aspergillus flavus* foram testados 20 OEs quanto à capacidade de inibir este fungo. Dos 20 OEs testados, *Acorus calamus*, *Adenocalymma allicea*, *Aegle marmelos*, *Ageratum conyzoides* L *Amomum subulatum*, *Citrus sinensis*, *Curcuma longa*, *Cymbopogon martini*, *Eucalyptus citriodora*, *Eugenia jambolana*, *Helianthus annuus*, *Lantana camara*, *Melaleuca leucadendron*, *Murraya koenigii*, *Ocimum basilicum*, *Ocimum sanctum*, *Salvia officinalis*, *Tagetes erecta*, *Vetiveria zizanoides* e *Zingiber officinale*. O

OE de *Ocimum sanctum* (manjeriço) foi o que mostrou ser mais eficaz em controlar o crescimento de *Aspergillus flavus* e a produção da aflatoxina. O OE de *Ocimum sanctum* tem sido usado na cura de muitas doenças no sistema indiano de medicina, mas sua aplicação antimicrobiana na conservação de fungos que deterioram alimentos ainda é inexplorada. Enquanto os OEs de *Acorus calamo* e *Salvia officinalis* mostraram uma notável atividade antifúngica (> 90% de inibição), *Murraya koenigii* e *Vetiveria zizanoides* apresentaram pouca atividade (<50% de inibição) e os outros da EOs apresentaram atividade antifúngica moderada (50-90% de inibição) (KUMAR *et al.*, 2010).

Hitokoto *et al.* (1980) testaram 29 condimentos e observaram uma inibição completa de três espécies toxigênicas de *Aspergillus* por extratos de cravo, semente de anis e pimenta, enquanto que os outros condimentos foram eficientes somente na inibição da aflatoxina. O eugenol e o timol extraídos respectivamente do cravo e do tomilho causaram inibição completa no desenvolvimento de *Aspergillus flavus* e *A. versicolor* (Vuill) Tirab a 0,4mg/mL ou menos; na concentração de 2 mg/mL o anetol extraído das sementes de anis inibiu o desenvolvimento de todas as estirpes testadas. Benjlali *et al.* (1984) testaram o efeito de 6 óleos essenciais em 39 espécies de fungos do gênero *Penicillium*, *Aspergillus* e outros, o óleo de tomilho foi o mais eficiente, seguido de 3 tipos de estragão, alecrim e eucalipto. Farag *et al.* (1989) obtiveram a sequência decrescente de maior atividade fungicida de óleos essenciais para *A. parasiticus*: tomilho, cominho, cravo, alcaravia, alecrim e sálvia.

Chalfoun *et al.* (2004) avaliaram o efeito *in vitro* de óleos essenciais dos condimentos alho, canela, cravo e tomilho testados em concentrações de 500, 1000, 1500 e 2000 mg/mL, e do óleo de cravo nas concentrações de 200, 400, 600 e 800 mg/mL, sobre o desenvolvimento micelial dos fungos *Rhizopus* sp., *Penicillium* spp., *Eurotium repens* de Bary e *Aspergillus niger* e constataram uma inibição total do óleo de canela sobre fungos testados, os óleos de tomilho e alho tiveram o mesmo efeito nas concentrações mais altas, o cravo inibiu o desenvolvimento dos fungos a partir da concentração de 600 mg/mL, exceto o fungo *Penicillium* spp. que foi verificado na concentração de 800 mg/mL.

3.1.1 Determinação da atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana dos OEs pode ser estimada pela sua diluição em ágar ou caldo, podendo ser utilizados diferentes solventes para incorporar o óleo no meio e diferentes volumes de inóculo (BURT, 2004). O efeito inibidor do crescimento pode ser calculado por diferenças na turbidez do líquido, avaliada por densidade ótica, sendo os resultados expressos de duas maneiras:

a) Índice de inibição do crescimento, definido como a percentagem de inibição do crescimento em relação à cultura controle (sem adição de OE);

b) Concentração Inibitória Mínima (CIM), sendo definida como a menor concentração do OE no caldo, o qual resulta na ausência de alterações visíveis no crescimento microbiano. O ponto final pode ser visualizado através da densidade ótica (turbidez). Existe a possibilidade de utilização da resazurina como indicador visual da CIM (BURT, 2004).

Uma característica dos métodos, a qual varia consideravelmente, é a utilização ou não de um agente emulsionante ou solvente, objetivando dissolver o OE ou estabilizá-lo no meio de cultura utilizado. Várias substâncias têm sido utilizadas para esse propósito, como o etanol, metanol, Tween 20 (sinônimos: Polissorbato 20. Polioxietileno 20 monolaurato de sorbitano. Laurato de sorbimacrogol 300. E-432.), Tween 80 (Sinônimos: Polissorbato 80. Polioxietileno 20 mono-oleato de sorbitano. Oleato de sorbimacrogol 300. E-433.), propilenoglicol, dimetilsulfóxido (DMSO), n-hexano, etc., enquanto alguns pesquisadores concluíram ser desnecessário o uso de um aditivo (LAMBERT *et al.*, 2001; CIMANGA *et al.*, 2002).

Alguns pesquisadores aplicam pelo menos dois métodos diferentes para avaliar a atividade antimicrobiana do mesmo óleo, sendo os mais frequentes os métodos de difusão em ágar e o de diluição. Correlações boas têm sido relatadas entre os resultados produzidos pelos dois métodos (KALODERA *et al.*, 1995). As divergências observadas normalmente são principalmente relacionadas com a atividade dos componentes individuais do óleo (KALEMBA & KUNICKA, 2003).

Métodos de diluição oferecem resultados quantitativos, podendo-se determinar as concentrações inibitórias mínimas ainda que dependentes de muitos fatores como temperatura, dispersão em meios aquosos, tempo de incubação e a quantidade do inóculo utilizado no teste (BAGAMBOULA *et al.*, 2004).

Após a inoculação de concentrações iguais de bactérias e incubação em tempo e temperatura adequados, a menor concentração que inibir o crescimento bacteriano corresponde à CIM. As medidas de densidade ótica ou absorbância são feitas em espectrofotômetros. Este método é considerado eficiente sendo bastante utilizado devido a sua rapidez e facilidade de execução, porém, mede células vivas e mortas, sofrendo interferências de substâncias presentes que absorvem luz (KALEMBA & KUNICKA, 2003).

A concentração inibitória mínima pode ser determinada através de métodos de contagem diretos, tais como, microscopia e câmaras eletrônicas ou por métodos de contagem indiretos como plaqueamento e contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) e também em princípios baseados na turbidez ótica, pelas medidas de absorbância em meio líquido adequado ao crescimento do microrganismo selecionado, juntamente com o agente antimicrobiano em concentrações diferentes. Pesquisadores que utilizam o método de diluição estão normalmente interessados na determinação da CIM e somente em alguns casos utilizam CLM (Concentração Letal Mínima) (KALEMBA & KUNICKA, 2003).

Dentro deste contexto, o presente capítulo teve como objetivo geral a avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de óleo essencial de cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus*) antes e após a esterificação, bem como a determinação das CIMs (Concentrações Inibitórias Míminas). Para isso, foi utilizada a técnica de difusão em discos de papel e a técnica difusão em meio sólido utilizando cavidades em placa para a atividade antibacteriana e antifúngica respectivamente, avaliando durante os experimentos, o efeito das diferentes concentrações tanto do óleo quanto do éster para os microrganismos testados.

3.2 MÉTODOS

Nesta etapa do presente capítulo são descritas as metodologias utilizadas para a avaliação das atividades antimicrobianas (antibacteriana e antifúngica) do óleo essencial de cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus*) antes e após a esterificação.

3.2.1 Atividade antibacteriana

Foram selecionados dez microrganismos, sendo bactérias Gram-positivas (*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*,

Eterococcus faecalis) e Gram-negativas (*Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*) crescidas previamente em caldo Lúria Bertani (10 g/L de triptona, 5 g/L de extrato de levedura e 5g/L de NaCl) durante 24 horas a 36 ± 1 °C (ASCENSÃO *et al.*, 1998).

Os testes foram realizados pelo método de difusão em discos de papel Whatmann nº 3 com 10 mm de diâmetro, em placas de Petri com meio de cultura Ágar Mueller-Hinton (Merck). As culturas ativas das bactérias foram inoculadas por espalhamento com auxílio da alça de Drigalski estéril nas placas em um volume de 100 µL. Em cada placa foi depositado um disco de controle negativo (branco), na avaliação do potencial antimicrobiano do acetato de eugenila os discos continham volumes de 5, 10 e 20 µL. Após a incubação das placas a 36 ± 1 °C durante 48 horas, os resultados foram analisados medindo-se o diâmetro do halo de inibição de crescimento das bactérias, incluindo o diâmetro do disco de papel, com o auxílio de uma régua (ASCENSÃO *et al.*, 1998).

Os resultados foram expressos em milímetros pela média aritmética dos valores dos halos obtidos nas três repetições de cada bactéria, sendo as médias analisadas estatisticamente por análise de variância (ANOVA) e comparadas pelo teste de Tukey ($p>0,05$), utilizando o programa ASSISTAT®.

3.2.2 Concentração inibitória mínima (CIM)

Para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM), foi utilizado o método indireto de crescimento bacteriano, mediante a densidade ótica em meio de cultura líquido (PIEROZAN *et al.*, 2009). Após os resultados obtidos das análises do antibiograma em meio sólido, dez bactérias selecionadas foram cultivadas em meio de cultura caldo LB à temperatura de 37°C durante 24 horas. Após o período de crescimento das culturas, foram inoculados, em micro tubos 10 µL de pré-inóculo (10^8 UFC.mL⁻¹), 1 mL de caldo LB, acrescido de 1% do emulsificante dimetilsulfóxido (DMSO) (Nuclear®), contendo diferentes concentrações (0,2 a 1,2 µL.mL⁻¹) do óleo de cravo-da-índia antes e após a esterificação foram testadas e o controle, sem óleo/éster. Todas as concentrações de cada OE, com as diferentes bactérias, foram avaliadas em triplicata. Posteriormente ao processo de inoculação, os micro tubos foram incubados em agitador eletromagnético (60 Hz), por um período de 24 horas, à temperatura de

32°C. Antes e após o período de incubação, 0 e 24 horas respectivamente, foram transferidas alíquotas de 100 µL da cultura bacteriana para microplacas de fundo chato, realizando-se três leituras para cada repetição.

Realizou-se a leitura da microplaca, utilizando-se o leitor automático de microplacas (Bio-Tec Instruments Inc., modelo EL800), acoplado em computador com programa Kcjunior, com comprimento de onda pré-selecionado de 490 nm. A inibição do crescimento foi determinada pela diferença entre as leituras realizadas em 24 e 0 horas. Os valores médios de densidade ótica foram analisados estatisticamente por Análise de Variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey ($p < 0,05$), para determinar a CIM, usando o programa ASSISTAT[®].

3.2.3 Atividade antifúngica

Para os testes de atividade antifúngica foram selecionados três fungos potencialmente produtores de micotoxinas, *Penicillium crustosum*, *Alternaria alternata* e *Aspergillus flavus*. Os fungos foram obtidos junto ao Agricultural Research Service (ARS Culture Collection - NRRL), sendo posteriormente mantidos em meio PD (batata dextrose) e estocados em geladeira (± 4 °C).

Os ensaios de avaliação da atividade antifúngica do óleo essencial antes e depois da esterificação foram realizados pelo método de difusão em meio sólido utilizando cavidades em placa. Em um erlenmeyer com PDA fundido e resfriado a 45-50°C adicionou-se 1mL da suspensão fúngica (aproximadamente 10^6 UFC/mL), e imediatamente após, o mesmo foi vertido em placas de Petri. Após a solidificação do ágar, foram feitas quatro cavidades com cânulas de vidro estéreis (6mm de diâmetro) onde foram depositados 10 µL da solução ajustada na concentração desejada de cada extrato, 10µL de Tween 80 utilizado como controle negativo, e por fim, 10µL de antifúngico padrão Cetoconazol como controle positivo (ASCENSÃO *et al.*, 1998).

Após, o sistema foi incubado por 72 horas a 30 °C, sendo verificado a cada 24 horas (ASCENSÃO *et al.*, 1998). Na avaliação do potencial antifúngico do óleo de cravo e do éster acetato de eugenila foram preparadas diferentes diluições de cada extrato com 1% de Tween 80 e água destilada estéril (100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 e 10% óleo/produto) sendo agitado por 5 minutos usando o aparelho Vortex (Fanem) imediatamente antes da sua utilização. Após o término do período de incubação, mediu-

se o diâmetro do halo de inibição de crescimento do respectivo fungo inoculado. Os experimentos foram conduzidos em seis réplicas.

A análise estatística de comparação de médias para avaliar o efeito antifúngico dos dados foi realizada através do Teste de Tukey com a utilização do programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) que permite a comparação, sempre, entre duas médias de tratamentos, indicando a presença ou ausência de uma diferença significativa entre os valores analisados.

3.2.4 Preparo das amostras

Os testes de atividade antimicrobiana tiveram a finalidade de realizar um comparativo entre o potencial do óleo de cravo-da-índia, antes da esterificação, e após ser esterificado, originando o éster acetato de eugenila. Para tal, após a reação de esterificação enzimática, o produto obtido foi submetido a uma microdestilação a vácuo, para retirar qualquer resíduo de ácido acético e anidrido acético da amostra final, evitando, assim, a incorreta análise dos resultados. A Figura 14 (a) e (b) apresentam o aparato experimental utilizado no processo de microdestilação a vácuo.

Figura 14. Conjunto destilação (a) e conjunto destilação/bomba de vácuo (b).



3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste momento serão apresentados e discutidos os resultados obtidos ao longo do estudo das atividades antibacterianas e antifúngicas do óleo essencial de cravo-da-índia antes e após a esterificação.

3.3.1 Avaliações do potencial antibacteriano

A técnica da difusão em placas é a mais comum para avaliação de antibacterianos e antifúngicos de óleos essenciais porque é de fácil execução e requer pequenas quantidades de amostra (KALEMBA & KUNICKA, 2003).

Em ambos os testes realizados, tanto com acetato de eugenila quanto com óleo de cravo-da-índia, os volumes utilizados foram de 5, 10 e 20 µL. Foram testados dez microrganismos: cinco Gram-positivos e cinco Gram-negativos, tanto para o acetato de eugenila, como para o estudo do potencial antibacteriano óleo de cravo-da-índia (Tabela 6).

Tabela 6 - Atividade antibacteriana pelo método de difusão de placas do óleo de cravo-da-índia sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas usando-se 5, 10, 20 µL de amostra por disco.

Bactérias	ATCC	Óleo de cravo-da-índia		
		Halo de inibição 5µL (mm)*	Halo de inibição 10 µL (mm) *	Halo de inibição 20 µL (mm) *
Gram-positivas				
<i>Listeria monocytogenes</i>	7644	13,00 ^a ± 1,00	14,00 ^a ± 1,32	14,50 ^a ± 1,00
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	12,33 ^b ± 0,28	13,33 ^a ± 0,28	14,16 ^a ± 1,60
<i>Bacillus subtilis</i>	6633	11,50 ^a ± 0,86	12,00 ^a ± 0,72	12,08 ^a ± 1,32
<i>Enterococcus faecalis</i>	29212	13,16 ^b ± 0,76	17,16 ^a ± 0,28	17,66 ^a ± 0,76
<i>Bacillus cereus</i>	11778	10,66 ^b ± 1,15	10,67 ^b ± 1,12	10,68 ^b ± 1,16
Média		12,13	13,43	13,81
Bactérias Gram-negativas				
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853	12,16 ^c ± 0,28	13,50 ^b ± 0,50	15,00 ^a ± 0,08
<i>Serratia marcescens</i>	8100	12,33 ^b ± 0,44	13,83 ^a ± 0,76	14,33 ^a ± 0,28
<i>Citrobacter freundii</i>	8090	12,00 ^b ± 0,28	13,08 ^{ab} ± 0,76	14,00 ^a ± 0,29
<i>Escherichia coli</i>	25922	15,16 ^b ± 0,57	20,66 ^a ± 1,75	21,16 ^a ± 1,46
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10031	13,66 ^a ± 0,57	13,83 ^a ± 0,76	14,10 ^a ± 1,32
Média		13,06	14,98	15,72
t Student**		(p=0,26)	(p=0,41)	(p=0,32)

ATCC: American Type Culture Collection – (USA). *Médias seguidas da mesma letra nas linhas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. ** Diferença significativa entre as médias de bactérias Gram positivas e Gram negativas em cada dose com valor de p<0,05 pelo teste t de Student.

Foram verificadas diferenças entre os halos de inibição das diferentes bactérias em cada grupo, observando-se aumento significativo ($p < 0,05$) no halo de inibição com o aumento no volume por disco, principalmente sobre Gram-negativas pelo teste t de Student que avalia a diferença entre duas amostras independentes.

O mecanismo de ação pelo qual a maioria dos óleos essenciais exerce seu efeito antibacteriano envolve a membrana celular bacteriana, onde os óleos essenciais desnaturam e coagulam proteínas. Mais especificamente, eles atuam alterando a permeabilidade da membrana citoplasmática aos íons hidrogênio (H^+) e potássio (K^+). A alteração dos gradientes de íons conduz ao comprometimento dos processos vitais da célula como transporte de elétrons, translocação de proteínas, processo de fosforilação e outras reações dependentes de enzimas, resultando em perda do controle quimiosmótico da célula afetada e, conseqüentemente, na morte do microrganismo (DORMAN & DEANS, 2000).

Nas bactérias Gram-positivas, os óleos essenciais podem interagir diretamente com a membrana celular, enquanto que nas bactérias Gram-negativas em função do caráter hidrofílico da membrana celular externa, há um impedimento da entrada de substâncias hidrofóbicas, como os óleos essenciais (ARAÚJO, 2010).

Silvestri *et al.* (2010) também avaliaram a atividade antibacteriana do óleo essencial de cravo-da-índia e encontraram valores similares, onde as médias dos halos de inibição formados são maiores para bactérias Gram-positivas, ainda que sem diferenças significativas, corroborando com os resultados do presente trabalho.

De acordo com Silva *et al.* (2009), além da resistência evidenciada entre os microrganismos Gram-negativos, diferenças entre resultados podem ocorrer também quanto à sensibilidade de linhagens diferentes de um determinado microrganismo frente a um mesmo produto antimicrobiano vegetal, mesmo quando a metodologia utilizada é idêntica. Em seu estudo avaliando a atividade antibacteriana de óleos essenciais provenientes de seis espécies vegetais frente a linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, encontraram uma maior resistência da bactéria Gram-negativa, a qual necessitou de uma maior quantidade dos óleos essenciais testados. Esta conclusão também foi encontrada por Naik *et al.* (2010), quando avaliaram a atividade antibacteriana do óleo de *C. citratus* frente a bactérias patogênicas e constataram que os microrganismos Gram-positivos eram mais sensíveis do que os Gram-negativos.

Esta conclusão também foi obtida por Machado (2009) quando estudou a ação antimicrobiana de 27 óleos essenciais de uso em aromaterapia, sobre linhagens de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, e *Pseudomonas aeruginosa*, em todos os experimentos avaliou a concentração de 15 µL de óleo essencial utilizando a metodologia dos discos (difusão) e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) (diluição) em Mueller Hinton Ágar. A linhagem ATCC 25923 de *S. aureus* foi a que apresentou maior índice de susceptibilidade aos diferentes óleos essenciais, tendo apresentado halo de inibição para um total de 22 óleos, ou seja, a 95% dos óleos testados, sendo que o óleo de cravo apresentou o maior halo de inibição com um diâmetro médio de 18,36 mm.

O óleo essencial de cravo-da-índia apresentou acentuada atividade antimicrobiana quando testado para os microrganismos *S. aureus*, *E. coli*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enteritidis*, *L. monocytogenes* e *S. epidermidis* (SCHERER *et al.*, 2009).

Pereira *et al.* (2008) avaliaram, entre outros, o efeito inibitório do óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) frente às bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Os resultados mostraram que todos os OEs testados promoveram efeito inibitório sobre as bactérias *S. aureus* e *E. coli*, porém o *S. aromaticum* apresentou melhor formação de halo de inibição nas menores concentrações: 0,1, 0,5, 1 e 5%, que diferiram das concentrações de 10, 20, 30, 40 e 50%. Observaram também que o halo de inibição do *S. aureus* foi similar ao encontrado para *E. coli*, de 11 mm. O resultado encontrado para *Staphylococcus aureus* é próximo ao encontrado no presente trabalho (Tabela 5) para a concentração de 5 µL (12,33 mm), já para *Escherichia coli* o halo de inibição foi maior (15,16 mm) também na concentração de 5 µL.

Pereira *et al.* (2008) atribuíram as excelentes propriedades bactericidas do óleo ao eugenol, componente majoritário, encontrado em 80-90% no óleo essencial dessa planta. Segundo o autor, o eugenol provoca inibição na produção de amilase e proteases pela célula, bem como sua deterioração e lise, sendo que esse princípio ativo é muito usado na odontologia como componente de seladores e outros produtos antissépticos. Atualmente, o eugenol tem sido largamente estudado como conservante de alimentos.

Os resultados referentes à atividade antimicrobiana do óleo essencial do cravo-da-índia enriquecido com acetato de eugenila frente às bactérias testadas estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Atividade antibacteriana pelo método de difusão de placas do acetato de eugenila sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas usando-se 5, 10, 20 µL de amostra por disco.

Bactérias Gram-positivas	Óleo do cravo-da-índia enriquecido com acetato de eugenila			
	ATCC	Halo de inibição 5 µL (mm)*	Halo de inibição 10 µL (mm) *	Halo de inibição 20 µL (mm) *
<i>Listeria monocytogenes</i>	7644	10,5 ^b ± 0,2	12,1 ^a ± 0,3	12,1 ^a ± 0,4
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	10,5 ^c ± 0,3	11,1 ^b ± 0,4	12,6 ^a ± 0,3
<i>Bacillus subtilis</i>	6633	11,9 ^a ± 0,4	12,5 ^a ± 0,4	12,0 ^a ± 0,5
<i>Enterococcus faecalis</i>	29212	10,9 ^c ± 0,4	12,0 ^b ± 0,5	13,3 ^a ± 0,3
<i>Bacillus cereus</i>	11778	10,6 ^b ± 0,3	11,1 ^b ± 0,4	12,0 ^a ± 0,3
Média		10,9	11,7	12,4
Bactérias Gram-negativas				
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853	11,1 ^b ± 0,3	12,1 ^a ± 0,2	12,2 ^a ± 0,1
<i>Serratia marcescens</i>	8100	12,0 ^b ± 0,2	12,3 ^b ± 0,4	13,2 ^a ± 0,2
<i>Citrobacter freundii</i>	8090	11,0 ^b ± 0,8	11,4 ^b ± 0,6	13,0 ^a ± 0,5
<i>Escherichia coli</i>	25922	12,1 ^b ± 0,2	13,0 ^{ab} ± 0,4	14,3 ^a ± 0,4
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10031	10,5 ^b ± 0,4	11,0 ^b ± 0,4	12,9 ^a ± 0,2
Média		11,4	12,00	13,1
T Student**		(p=0,29)	(p=0,67)	(p=0,13)

ATCC: American Type Culture Collection – (USA), *Médias seguidas da mesma letra nas linhas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. ** Diferença significativa entre as médias com valor de $p < 0,05$ pelo teste t de Student.

Após o tratamento estatístico dos dados obtidos (Tabela 7), foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os halos de inibição das diferentes bactérias com as diferentes doses utilizadas, observando-se um aumento no halo de inibição com o aumento no volume de éster utilizado por disco, tanto para Gram-positivas como Gram-negativas, com exceção de *B. subtilis*. Comparando-se a média das Gram-positivas em relação à das Gram-negativas, os resultados demonstram não existir diferença significativa ($p > 0,05$) pelo teste t de Student nas mesmas concentrações testadas para cada grupo de bactérias.

A maior atividade antimicrobiana foi observada sobre *Escherichia coli* (14,26 mm) em 20 µL, as demais apresentaram diâmetros de halo semelhantes em cada uma das doses testadas.

Comparando a atividade antibacteriana do óleo essencial do cravo-da-índia antes e após a esterificação, apesar da diminuição efetiva dos valores devido à modificação química da molécula de eugenol, observou-se que o acetato de eugenila ainda apresenta considerável atividade bactericida. Aplicando-se o teste t de Student na comparação entre as médias dos halos formados antes e após a esterificação, nas três concentrações testadas, observou-se redução significativa na atividade antibacteriana ($p < 0,05$) somente em bactérias Gram-negativas usando-se 5µL, com maior atividade do óleo essencial de cravo da índia (Tabela 8).

Tabela 8 - Comparação da atividade antibacteriana entre o óleo de cravo-da-índia e acetato de eugenila sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas usando-se 5, 10, 20 µL de amostra por disco.

Médias dos halos de inibição (mm)	Gram-positivas			Gram-negativas		
	Óleo	Acetato de Eugenila	Valor p*	Óleo	Acetato de Eugenila	Valor p*
5 µL	12,1	10,9	0,06	13,1	11,4	0,03
10 µL	13,4	11,7	0,18	14,9	12,0	0,07
20 µL	13,8	12,4	0,28	15,7	13,1	0,10

* Diferença significativa entre as médias com valor de $p < 0,05$ pelo teste t de Student.

Portanto, de maneira a reduzir os problemas associados com a molécula de eugenol, dentre várias alternativas, há a possibilidade de adicionar grupos funcionais à sua estrutura. De forma geral, esses dados são importantes para a terapêutica das infecções causadas por essas bactérias, os *S. aureus* são descritos como um dos principais agentes responsáveis por infecções, sua virulência e capacidade de adquirir resistência aos antimicrobianos resulta em um problema sério em todo o mundo para os hospitais e profissionais de saúde (CARVALHO *et al.*, 2009).

Segundo Klančnik *et al.* (2010), a metodologia dos discos tem como importância maior fornecer dados iniciais da ação antimicrobiana de produtos naturais, pela facilidade e rapidez de execução, Porém, considera-se fundamental a continuidade dos

estudos para obtenção de valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM), etapa realizada e apresentada a seguir.

3.3.1.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A Tabela 9 apresenta os resultados da Concentração Inibitória Mínima (CIM) para o óleo essencial de cravo-da-índia e o éster acetato de eugenila.

O OE de cravo-da-índia foi eficiente na inibição de todos os microrganismos, com médias de 0,64µL/mL para bactérias Gram-positivas e 0,48µL/mL para Gram-negativas (Tabela 8). Silvestri *et al.* (2010) obtiveram valores de CIM semelhantes para o OE de cravo-da-índia, 0,5 mg/mL para bactérias Gram-positivas e 0,58 mg/mL para bactérias Gram-negativas.

Tabela 9 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) do óleo de cravo-da-índia e do acetato de eugenila sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

	CIM (µL/mL)		
	ATCC	Óleo Cravo	Acetato de eugenila
Bactérias Gram-positivas			
<i>Listeria monocytogenes</i>	7644	0,3	2,5
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	0,7	4,8
<i>Bacillus subtilis</i>	6633	0,5	4,2
<i>Enterococcus faecalis</i>	29212	0,5	4,3
<i>Bacillus cereus</i>	11778	1,2	5,4
Média*	p<0,001	0,6 ^b ± 0,3	4,2 ^a ± 1,1
Bactérias Gram-negativas			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853	0,7	4,7
<i>Serratia marcescens</i>	8100	0,5	4,0
<i>Citrobacter freundii</i>	8090	0,2	2,1
<i>Escherichia coli</i>	25922	0,8	4,9
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10031	0,2	2,0
Média*	p<0,002	0,5 ^b ± 0,3	3,5 ^a ± 1,4

ATCC: American Type Culture Collection – (USA).

* Diferença significativa entre as médias com valor de p<0,05 pelo teste t de Student.

Aplicando-se o teste t de Student na comparação entre as médias da concentração inibitória mínima (CIM) antes e após a esterificação, observou-se uma diminuição

efetiva dos valores de atividade antimicrobiana após a esterificação atingindo uma média de 4,2µL/mL para bactérias Gram-positivas e 3,5µL/mL para Gram-negativas.

Na avaliação dos resultados da concentração inibitória mínima (CIM) (Tabela 9), observou-se que o óleo essencial de cravo apresentou um melhor desempenho do que o éster acetato de eugenila para ambos os grupos de bactérias, Gram-positivas e Gram-negativas. Depois de esterificação, observou-se uma diminuição da atividade antimicrobiana de cerca de sete vezes. Diferentemente do nosso estudo onde ocorreu a substituição do grupamento hidroxila na molécula de eugenol pelo grupamento acetato, Dorman & Deans (2000) observaram que a adição do radical etil na molécula parece aumentar a atividade antibacteriana, observando que o acetato de geraniol foi mais ativo contra uma variedade de espécies de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas que o geraniol.

Ugaldi (2013) fez um paralelo entre os resultados obtidos na difusão em placas e na CIM, de alguns óleos e observou que os melhores desempenhos foram encontrados para os OEs de cravo-da-índia e orégano, embora com algumas particularidades. Na difusão em placas, o OE de orégano foi ineficaz frente à bactéria *K. pneumoniae*, enquanto que na determinação da CIM, obteve-se um valor de 0,025 mg/mL.

Silvestre *et al.* (2010) relatam que existem fatores que podem interferir nos valores da CIM, obtidos por meio de métodos de difusão e diluição: condições de cultivo (tempo de incubação, temperatura, taxa de oxigênio), meio de cultura, concentração das substâncias testadas, dispersão e emulsificação dos agentes utilizados na emulsão óleo-água.

Segundo Hyldgaard *et al.* (2012), a atividade antimicrobiana de um óleo essencial pode depender de apenas um ou dois dos componentes majoritários que o formam. Pei *et al.* (2009) avaliaram os efeitos antibacterianos em isolado e por combinações dos compostos eugenol, cinamaldeído, timol e carvacrol frente a *Escherichia coli* e relataram a existência de sinergismo em todas as combinações testadas, nos dois parâmetros avaliados. Assim, o efeito sinérgico pode ser uma das causas da maior atividade do óleo de cravo em relação ao acetato de eugenila.

Por outro lado, Ultee *et al.* (2002) concluíram que, para ser eficaz contra as células vegetativas de *Bacillus cereus*, os antimicrobianos devem ser compostos tanto por um grupo hidroxila no anel fenólico como um sistema de elétrons deslocalizados (isto é, a presença de ligações duplas β - α) para provocar uma forte atividade

antimicrobiana. Assim, a alteração da estrutura de eugenol por esterificação pode explicar parcialmente a redução da atividade antimicrobiana observada para o acetato de eugenila.

3.3.2 Avaliação do potencial antifúngico

Em todos os testes realizados, as concentrações utilizadas variaram de 10 a 100%. Foram testados três fungos, *Penicillium crustosum*, *Alternaria alternata* e *Aspergillus flavus*.

A partir da Tabela 10 pode ser observada uma maior atividade antifúngica do óleo em relação ao éster. Para *Penicillium crustosum*, a formação de halo de inibição iniciou a partir de concentrações de 20 e 30% para o óleo e para o éster, respectivamente. Para *Alternaria alternata* a partir de concentrações de 10 e 30% e para *Aspergillus flavus* a partir de concentrações de 20 e 40% para o óleo e para o éster, respectivamente.

Tabela 10 - Diâmetro médio de halo de diferentes concentrações do óleo essencial de cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus*) e do acetato de eugenila sobre os fungos *Penicillium crustosum*, *Alternaria alternata* e *Aspergillus flavus*.

Halos de inibição (mm)						
% Óleo / Éster	<i>Penicillium crustosum</i>		<i>Alternaria alternata</i>		<i>Aspergillus flavus</i>	
	Óleo	Éster	Óleo	Éster	Óleo	Éster
10	-	-	10,7 ^e ±1,2	-	-	-
20	7,3 ^e ±0,6	6,0 ^{ed} ±0,1	11,0 ^{ef} ±0,1	6,0 ^d ±0,1	6,7 ^b ±0,1	6,0 ^d ±0,1
30	10,7 ^d ±1,2	7,0 ^{de} ±0,1	14,0 ^{def} ±0,1	7,0 ^{cd} ±0,1	8,7 ^b ±0,1	6,0 ^d ±0,1
40	12,0 ^d ±2,6	7,3 ^{de} ±0,6	16,0 ^{cd} ±0,1	7,7 ^{cd} ±0,5	9,7 ^b ±0,5	7,0 ^{cd} ±0,1
50	16,0 ^c ±0,1	8,0 ^{bd} ±0,1	16,3 ^{cd} ±0,5	8,7 ^{bc} ±0,5	9,7 ^b ±0,5	10,3 ^{bc} ±1,1
60	16,3 ^c ±0,6	8,7 ^{bd} ±0,5	17,0 ^{bcd} ±3,6	10,3 ^b ±0,5	12,0 ^a ±0,5	10,3 ^{bc} ±0,5
70	17,0 ^c ±1,0	9,0 ^{ab} ±0,1	20,3 ^{abc} ±3,8	12,7 ^a ±0,5	10,3 ^a ±0,5	9,7 ^{bcd} ±1,5
80	16,7 ^c ±1,2	9,0 ^{ab} ±1,7	22,0 ^a ±1,0	12,3 ^a ±0,5	13,7 ^a ±7,2	11,0 ^{ab} ±1,0
90	21,7 ^b ±1,2	9,3 ^{ab} ±0,6	21,0 ^{abc} ±0,1	12,3 ^a ±1,1	13,3 ^a ±4,0	13,3 ^{ab} ±2,3
100	26,0 ^a ±0,1	10,7 ^a ±0,6	25,0 ^a ±1,0	13,7 ^a ±0,5	15,0 ^a ±6,1	14,3 ^a ±2,8
CIM	200 mg/mL	300 mg/mL	100 mg/mL	300 mg/mL	300 mg/mL	400 mg/mL

**Médias seguidas da mesma letra nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. CIM: concentração inibitória mínima.

Avaliando os resultados obtidos para a CIM (Tabela 10), entre os três fungos testados nota-se a maior sensibilidade do fungo *Alternaria alternata* sob o óleo essencial de cravo-da-índia e a menor sensibilidade do fungo *Aspergillus flavus* sob o éster acetato de eugenila.

Observamos através dos resultados que o óleo essencial de cravo-da-índia apresenta um promissor potencial no combate ao fungo *Alternaria alternata*, já que apresentou resultados positivos mesmo em menores concentrações (10%).

Para melhor visualização da influência do acréscimo da concentração dos produtos testados no diâmetro do halo formado, construiu-se três gráficos, os quais estão representados nas figuras 15, 16 e 17. Através da análise da Tabela 10 e das figuras 15, 16 e 17, verifica-se que, para todos os fungos testados frente a todos os produtos, o aumento gradativo da concentração do produto, leva a um aumento no tamanho de halo formado. Também pode ser observado que o óleo essencial apresentou maiores halos e médias do que o éster.

Figura 15 – Halo de inibição do fungo *Penicillium crustosum* com o acréscimo na concentração dos produtos testados.

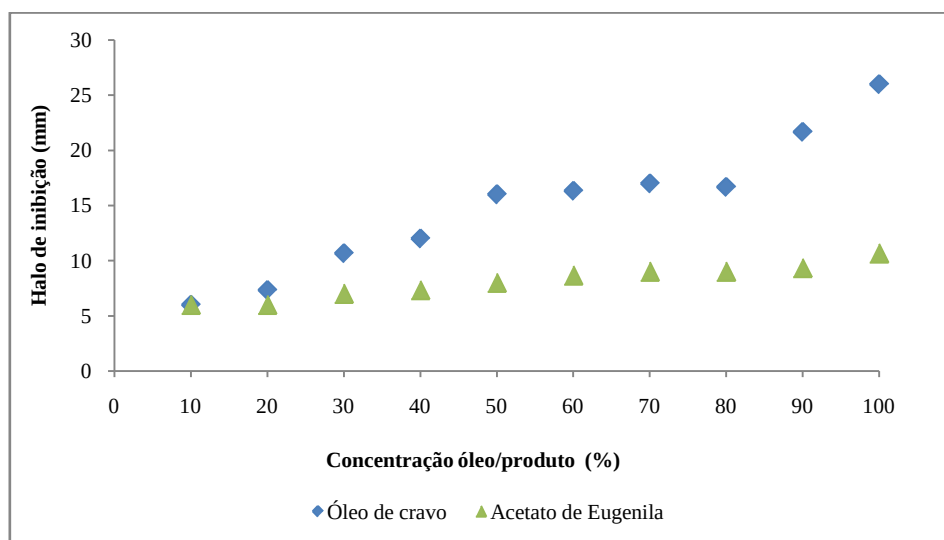


Figura 16 - Halo de inibição do fungo *Alternaria alternata* com o acréscimo na concentração dos produtos testados.

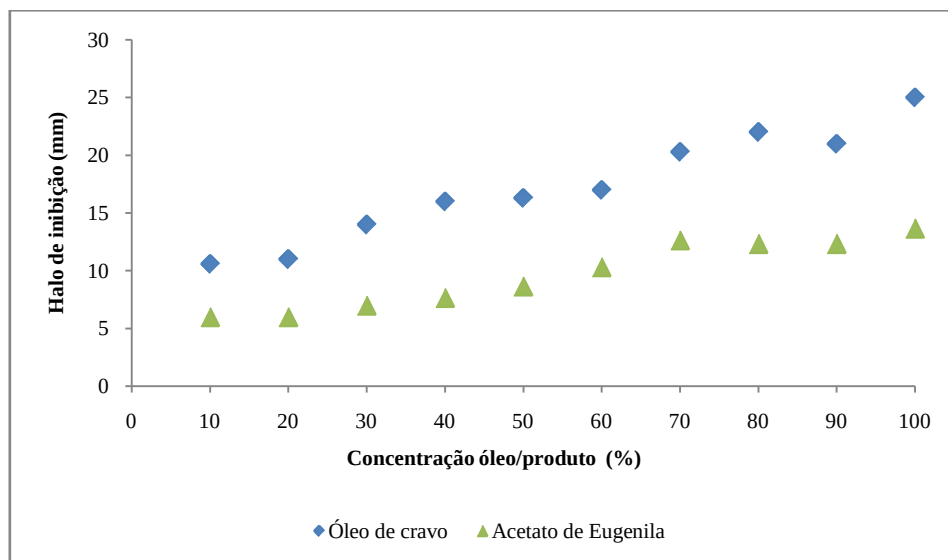
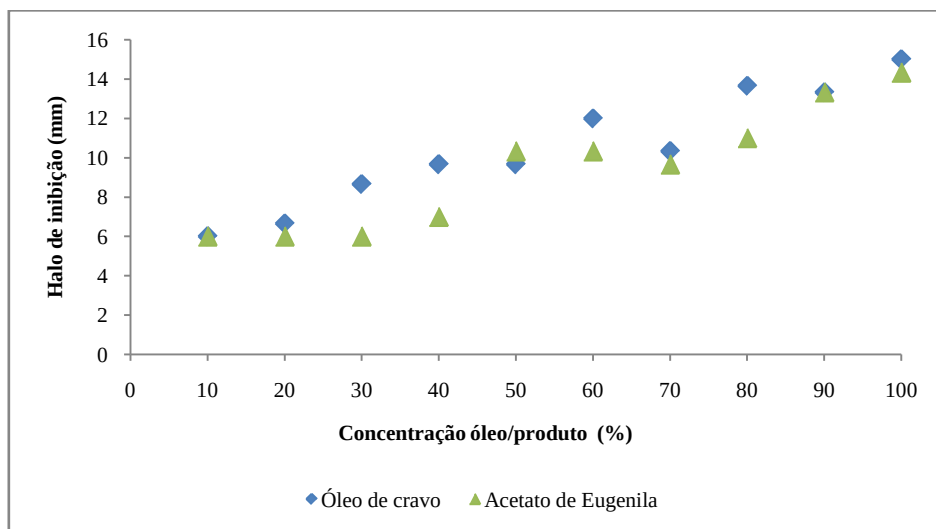


Figura 17- Halo de inibição do fungo *Aspergillus flavus* com o acréscimo na concentração dos produtos testados.



A falta de padronização dos testes de susceptibilidade microbiana com produtos naturais tem sido um dos empecilhos encontrados para a realização deste tipo de estudo, o que dificulta a comparação dos resultados obtidos (HOOD *et al.*, 2003).

A ação dos OEs contra bactérias Gram-positivas e fungos parece ser a mesma. Os componentes dos óleos destróem a membrana citoplasmática e parede celular de

bactérias e fungos, resultando em extravasamento do citoplasma e sua coagulação, e também inibem a respiração celular (COX *et al.*, 2000).

Sinais visíveis da ação dos OEs contra fungos podem ser observados por meio das alterações morfológicas, tanto em nível macroscópico como microscópico (KALEMBA & KUNICKA, 2003).

Viegas *et al.* (2005) avaliaram a toxicidade de óleos essenciais de alho e casca de canela contra 37 isolados do grupo *Aspergillus, flavus*, durante 12 meses. Foi constatada maior toxicidade do óleo essencial de casca de canela do que do de bulbilhos de alho, expressa pelos maiores halos de inibição promovidos pelo primeiro em relação ao segundo para a maioria dos isolados testados. O óleo essencial de alho promoveu halos de inibição que variaram entre 7,0 e 15,0 mm, valores estes que corroboram com os encontrados em nossa pesquisa.

Faria *et al.* (2006) realizaram uma investigação da atividade antifúngica do óleo essencial resultante da destilação por arraste a vapor das partes aéreas de *Ocimum gratissimum* e do extrato etanólico obtido do resíduo da destilação utilizando o método de difusão em ágar. O óleo essencial inibiu o crescimento de todos os fungos testados, incluindo os fitopatogênicos *Botryosphaeria rhodina* e *Rhizoctonia* sp., e duas espécies de *Alternaria* sp., enquanto que o extrato do resíduo da destilação não apresentou atividade. Análises realizadas pelos autores mostraram que o eugenol foi o principal constituinte do óleo estudado, e também o composto responsável pela atividade antifúngica. Posteriormente, a atividade antifúngica do eugenol foi avaliada contra uma espécie de *Alternaria* isolada de tomate e contra *Penicillium chrysogenum*. As CIM do eugenol foram 0,16 e 0,31 mg/disco para *Alternaria* sp., e para *Penicillium chrysogenum*, respectivamente, sendo para *Alternaria* sp. apresentou um halo de inibição de 9 mm na mais baixa concentração testada, (0,01 mg/disco), o que equivale a uma concentração de 10% do óleo essencial testado pelos autores. Valor similar foi encontrado em nossa pesquisa para o fungo *Alternaria alternata* no qual se observou formação de halo ($\pm 10,7$ mm) com 10% de óleo essencial de cravo-da-índia (100mg/mL).

Pereira *et al.* (2006) avaliaram os efeitos inibitórios *in vitro* de óleos essenciais dos condimentos, alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), cebola (*Allium cepa* L.), manjerição (*Ocimum basilicum* L.), menta (*Mentha piperita* L.) e orégano (*Origanum vulgare* L.), sobre o desenvolvimento de fungos. Os óleos foram extraídos pela técnica de arraste a vapor e testados nas concentrações de 500; 1000; 1500 e 2000 µg/mL.

Como culturas de teste foram utilizados os fungos *Fusarium* sp., *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus niger*. O óleo essencial do orégano inibiu o desenvolvimento dos fungos testados em todas as concentrações exceto o fungo *A. niger* que teve o seu desenvolvimento micelial inibido a partir da concentração de 1000 mg/mL. Os óleos de alecrim, menta, cebolae manjerição tiveram um efeito pronunciado a partir da concentração de 1500 µg/mL.

Bullerman *et al.* (1977), no estudo para a determinação dos componentes específicos da canela e do cravo-da-índia eficazes contra o crescimento de fungos e produção de toxinas, observaram que os óleos essenciais de canela a 200 mg/mL e de cravo a 250 mg/mL foram inibidores do desenvolvimento dos fungos e também da produção da toxina de *Aspergillus parasiticus*, enquanto que o aldeído cinâmico e o eugenol, principais constituintes dos seus óleos essenciais de canela e cravo, respectivamente, apresentaram efeito inibidor a 150 e 125 µg/mL (15 e 12,5%), respectivamente, e concluíram que estes são os compostos de maior atividade antifúngica, valores próximos aos encontrados em nossa pesquisa.

Souza *et al.* (2005) determinaram o perfil de sensibilidade das cepas de fungos filamentosos isolados de alimentos para alguns óleos essenciais e fitoconstituintes. As cepas fúngicas utilizadas nos ensaios antimicrobianos foram: *Fusarium* spp., *Rhizopus* spp., *Aspergillus flavus*, *A. niger* e *Penicillium* spp. De acordo com os resultados obtidos, os óleos essenciais de *Lipia alba*, *Peumus boldus*, *Lipia microphylla*, *Citrus limon* e *C. citratus* e os fitoconstituintes citral, eugenol e mirceno mostraram destacada atividade antifúngica. Dentre os produtos que apresentaram atividade antifúngica, o citral e eugenol mostraram as menores CIM's, as quais foram 1 e 4%, respectivamente, para a maioria das cepas fúngicas testadas, o que equivale a concentrações de 10 e 40mg/mL, inferiores às encontradas no presente trabalho.

Custódio *et al.* (2010) descreveram a análise da composição química e a avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais obtidos por hidrodestilação das folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus* e de *Tynanthus micranthus*. Análises demonstraram que o óleo essencial de *P. pseudocaryophyllus* apresenta o eugenol como componente principal (92,6%). O óleo de *T. micranthus* contém o eugenol como único constituinte (99,9%). Ambos os óleos apresentaram atividade contra bactérias, leveduras e fungos filamentosos. Testes revelaram o eugenol como a substância responsável pela atividade contra o *Cladosporium herbarum* dos óleos das duas espécies.

A inibição de fungos pelo óleo essencial de *S. aromaticum* pode ser justificada pela grande porcentagem de eugenol, composto fenólico antisséptico de ação já conhecida (RANASINGHE *et al.*, 2002; DAFERERA *et al.*, 2003; AMARAL & BARA, 2005; GAYOSO *et al.*, 2005).

A atividade antifúngica do óleo essencial está relacionada com sua hidrofobicidade, a qual os permite interagir com os lipídeos da parede, membrana celular e da mitocôndria, alterando a permeabilidade, causando distúrbios nestas estruturas. Os componentes do óleo podem se ligar a íons e moléculas (hormônios) de outras células. É relatado também por Silva *et al.* (2003) que os antifúngicos naturais provocam danos à membrana celular das células expostas a eles, deixando-as extremamente solúveis e com fraturas grosseiras que acabam por expor o conteúdo celular, inclusive o núcleo.

Deve-se ressaltar que não se pode descartar a possível atividade antifúngica das substâncias minoritárias presentes no óleo essencial da espécie estudada. Avaliações complementares devem ser realizadas a fim de que se possa determinar se o acetato de eugenila e o cariofileno também exercem efeito antifúngico e se esses compostos atuam sinergicamente.

Assim, de acordo com os resultados alcançados nesse trabalho, existe a indicação de boas perspectivas para uso experimental do óleo essencial de *Caryophyllus aromaticus*. Estudos posteriores deverão investigar também o comportamento *in vivo* desse óleo, a fim de que produtos derivados de *C. aromaticus* possam ser utilizados como uma alternativa aos fungicidas sintéticos, uma vez que a exposição à radiação solar direta e umidade relativa possibilite a redução da atividade antifúngica, conforme descrito por Diniz *et al.* (2006) em experimentos realizados a campo utilizando extratos combinados de cravo e outras espécies, atomizados sobre a cultura, para controle de *Phytophthora infestans* (de Bary) causador da “requeima do tomateiro”.

3.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diversas investigações científicas, com vistas à confirmação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais têm sido realizadas, bem como tem-se desenvolvido métodos de investigação *in vitro* que produzam resultados confiáveis e possam ser reproduzidos e validados. Contudo, essa tarefa tem sido dificultada pelas peculiaridades que os óleos apresentam, quais sejam: insolubilidade em água e complexidade,

características que interferem significativamente nos resultados. Por isso, em testes de susceptibilidade microbiana, deve-se levar em consideração a técnica usada, o meio de cultura, o(s) microrganismo(s) e o óleo essencial testado.

Os resultados obtidos confirmaram o potencial de óleo essencial do cravo-da-índia bem como o potencial do acetato de eugenila para uso como agentes antimicrobianos na agricultura e na preparação de produtos alimentícios e farmacêuticos, pois, mesmo com a diminuição efetiva dos valores nos testes apresentados, o éster ainda assim mantém considerada atividade antimicrobiana.

3.5 REFERÊNCIAS

AHMAD, N.; ALAM, M. K.; SHEHBAZ, A.; KHAN, A.; MANNAN, A.; RASHID, H. S.; BISHT, D.; OWAIS, M. Antimicrobial activity of clove oil and its potential in the treatment of vaginal candidiasis. **Journal of Drug Targeting**, v.13, n.10, p.555-61, 2005.

ALVARENGA, A.L.; SCHWAN, R.F.; DIAS, D.R.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; BRAVOMARTINS, C.E.C. Atividade antimicrobiana de extratos vegetais sobre bactérias patogênicas humanas. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v.9, n.4, p.86-91, 2007.

AMARAL, M.F.Z.J.; BARA, M.T.F. Avaliação da atividade antifúngica de extratos de plantas sobre o crescimento de fitopatógenos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.2, n.2, p.5-8, 2005.

ANGELO, P.M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos: Uma breve revisão. **Revista Instituto Adolf Lutz**, v. 66, p. 232-240, 2007.

ARAÚJO, R.C. Óleos essenciais de plantas brasileiras como manipuladores da fermentação ruminal *in vitro*. **Tese de Doutorado em Ciências** - Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura, Piracicaba, p.181, 2010.

ASCENSÃO, L.; FIGUEIREDO, C.A.; BAROSSO, J.G.; PEDRO, L.G.; SCHRIPEMA, J.; DEANS, S.G.; SCHEFFER, J.J.C. *Plectranthus madagascariensis*: morphology of the glandular trichomes, essential oil composition, and its biological activity. **International Journal of Plant Science**, vol. 159, p. 31-38, 1998.

BAGAMBOULA, C.F.; UYTENDAELE, M.; DEVEBERE, J. Inibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacol, thimol, estragol, linalool, and *p*-Cymene towards *Shigella sonnei* and *S.flexneri*. **Food Microbiology**,v.21, p.33-42, 2004.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and chemical toxicology**. v. 46, p.446–475, 2008.

BANDONI, A. L.; CZEPACK, M. P. Os recursos vegetais aromáticos no Brasil. Vitória: **Edufes**, p.624, 2008.

BANSOAD, S.; RAI, M. Antifungal Activity of Essential Oils from Indian Medicinal Plants against Human Pathogenic *Aspergillus fumigatus* and *A. Niger*. **World Journal of Medical Sciences**, v.3, p.81-88, 2008.

BARBOSA, L. N. ; RALL, V. L. M.; FERNANDES, A. A. H.; USHIMARU, P. I.; PROBSTI, S.; FERNANDES JÚNIOR, A. Essential oils against foodborne pathogens and spoilage bacteria in minced meat. **Food borne Pathogens and Disease**, v. 6, n. 6, p. 725-28, 2009.

BENJILALI, B.; TANTAQUI-ELARAKI, A.; AYADI, A.; IHLAL, M. Method to study antimicrobial e effects of essential oils: application to the antifungal activity of six moroccan essences. **Journal of Food Protection, Des Moines**, v. 47, n. 10, p. 748-752, 1984.

BOURNE, K. Z.; BOURNE, N.; REISING, S.F.; STANBERRY, L.R. Plant products as topical microbicide candidates: assessment of *in vitro* and *in vivo* activity against herpes simple virus type 2. **Antiviral Research**, v. 42, p.219-236, 1999.

BULLERMAN, L. B.; LIEW, F. Y.; SEIER, S. A. Inhibition of growth and aflatoxin production by cinamon and clove oils, cinnamic aldehyde and eugenol. **Journal of Food Science**, n. 42, p. 1107-1109, 1977.

BURT, S.A. Essential Oils: their antibacterial properties and applications in foods – A Review. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, p.223-253, 2004.

CABALLERO, B.; TRUGO, L. C.; FINGLAS, P. M. **Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition. Amsterdam: Academic Press**, 2003.

CARMO, E. S.; LIMA, E. O.; SOUZA, E. L. The potential of *Origanum vulgare* L. (lamiaceae) essential oil in inhibitingthe growth of some food-related aspergillus species. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n.2, p. 362-367, 2008.

CARSON, C. F.; HAMMER, K. A.; RILEY, T. V. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil: a Review of antimicrobial and on the medicinal properties. **Clinical Microbiology Reviews**, v.19, n.1, p.50-62, 2006.

CARVALHO, M.J.; PIMENTA, F.C.; HAYASHIDA, M.; GIR, E.; SILVA, A.M.; BARBOSA, C.P.; CANINI, S.R.M.S.; SANTIAGO, S. Prevalence of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *S. aureus* in the saliva of health professionals. **Clinics**, v.64, n.4, p. 295-302, 2009.

CIMANGA, K.; KAMBU, K.; TONA, L.; APERS, S.; DE BRUYNE, T.; HERMANS, N.; TOTTE´, J.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A.J. Correlation between chemical composition and

antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 79, p. 213– 220, 2002.

CHALFOUN, S. M.; PEREIRA, M. C.; RESENDE, M. L. V.; ANGÉLICO, C. L.; SILVA, R. A. Effect of powdered spice treatments growth, sporulation and production of aflatoxin by toxigenic fungi. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 4, p. 856-862, 2004.

CHAO, S. C.; YOUNG, D. G. Screening for inhibitory activity of essential oils ou selected bacteria, fungi and viruses. **Journal Essentials Oil Research**, v. 12, p. 630-649, 2000.

COX, S.D.; MANN, J.L.; BELL, H.C.; GUSTAFSON, J.E.; WARMINGTN, J.R.; WYLLIC, S.G. The mode of antimicrobial action of the essential oils of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **Journal Applied microbiology**, v.88, p.170–175, 2000.

CRUZ, G.M.P. Efeito do eugenol e do metil-eugenol sobre o potencial composto do nervo ciático do rato, **Dissertação de mestrado**. Universidade Estadual do Ceará, 2001.

CUSTÓDIO, D.L.; BURGO, R.P.; MORIEL, B.; BARBOSA, A.M.; REZENDE, M.I.; DE SOUZA, J.F.; PINTO, D.J.P.; BIANCHINI, E.; DE JESUS F.T. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de *Pimenta pseudocaryophyllus* e *Tynanthus micranthus*. **Brazilian archives of biology and technology**, v. 53, n. 6, p. 1363-1369, 2010.

DAFERERA, D.J.; ZIOGAS, B.N.; POLISSIOU, M.G. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium sp.*, and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. **Journal of Crop Protetion**, v.22, p.39-44, 2003.

DINIZ, L.P.; MAFFIA, L. A.; DHINGRA, O. D.; CASALI, V. W.; SANTOS, R. H.; MIZUBUTI, E. S. Avaliação de produtos alternativas para controle da requeima do tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.31, n.2, p.171-9, 2006.

DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: anti-bacterial activity of plant volatile oil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 83, p. 308-316, 2000.

ESCOBAR, R. G. Eugenol: propriedades farmacológicas y toxicológicas, Ventajas y desventajas de su uso. **Review Cubana Estomatology**, v. 39, 2002.

ESPINA, L.; SOMOLINOS, M.; LORÁN, S.; CONCHELLO, P.; GARCÍA, D.R. Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes. **Food Control**, v. 22, p. 896-902, 2011.

FARAG, R. S.; DAW, Z. Y.; ABO-RAYA, S. H. Influence of some spice essencial oils on *Aspergillus parasiticus* growth and production of aflatoxinas in a synthetic medium. **Journal of Food Science**, v. 54, n. 1, p. 54-74, 1989.

- FARIA, T.D.J.; FERREIRA, R.S.; YASSUMOTO, L.; SOUZA, J.R.P.D.; ISHIKAWA, N.K.; BARBOSA, A.D.M. Antifungal Activity of Essential Oil Isolated from *Ocimum gratissimum* L. (eugenol chemotype) against Phytopathogenic Fungi. **Arquivos Brasileiros de biologia e tecnologia**, v.49, n.6, p. 867-871, 2006.
- FISCHBACH, M.A.; WALSH, C.T. Antibiotics for emerging pathogens. **Science**, v. 325, p. 1089-1093, 2009.
- GAYOSO, C.W.; LIMA, E.O.; OLIVEIRA, V.T.; PEREIRA, F.O.; SOUZA, E.L.; LIMA, I.O.; NAVARRO, D.F. Sensitivity of fungi isolated from onychomycosis to *Eugenia caryophyllata* essential oil and eugenol. **Fitoterapia**, v.76, p.247-9, 2005.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v.30, p.374-381, 2007.
- GUIMARÃES, L. G. L.; CARDOSO, M. G; ZACARONI, L. M.; LIMA, R. K. Influência da luz e da temperatura sobre a oxidação do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (D.C.) STAPF). **Química Nova**, v. 31, n. 6, p. 1476-1480, 2008.
- GUTIERREZ, J.; BARRY-RYAN, C.; BOURKE, P. Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: Efficacy, synergistic potential and interactions with food components. **Food Microbiology**, v.26, p.142–150, 2009.
- HITOKOTO, H.; MOROZUMI, S.; WAUKE, T.; SAKAI, S.; KURATA, H. Inhibitory effects of spices on growth and toxin production of toxigenic fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, n. 39, p. 818-822, 1980.
- HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R.L. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Frontiers in Microbiology**, vol. 3 (article 12), 2012.
- HOOD, J.R.; WILKINSON, J.M.; CAVANAGH, H.M.A. Evaluation of common antibacterial screening methods utilized in oil research. **Journal of Essential Oil Research**, v.15, p. 428-433, 2003.
- KALEMBA, D.; KUNICKA, A. Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils. **Current Medicinal Chemistry**, v.10, p. 813-829, 2003.
- KALODERA, Z.; PEPELJNAK, S.; BLAZEVIĆ, N.; PETRAK, T. Chemical composition and microbial activity of *Tanacetum parthenium* essential oil. **Pharmazie**, vol. 52, p. 885-886, 1995.
- KLANČNIK, A.; PISKERNIK, S.; JERŠEK, B.; MOŽINA, S.S. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. **Journal Microbiol Methods**, v. 81, p.121–126, 2010.

- KUMAR, A.; SHUKLA, R.; SINGH, P.; DUBEY, N.K. Chemical composition, antifungal and antiaflatoxic activities of *Ocimum sanctum* L. essential oil and its safety assessment as plant based antimicrobial. **Food and Chemical Toxicology**, v.6, p. 539–543, 2010.
- LAMBERT, R.J.W.; SKANDAMIS, P.N.; COOTE, P.; NYCHAS, G.-J.E. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, vol.91, p. 453–462, 2001.
- LÓPEZ, P.; SÁNCHEZ, C.; BATLLE, R.; NERÍN, C. Solid- and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, p.6939-6946, 2005.
- LUPE, F. A. Estudo da composição química de óleos essenciais de plantas aromáticas da Amazônia. **Dissertação (Mestrado)**, Campinas, p. 103, 2007.
- MACHADO, B.F.M.T. Óleos Essenciais: Verificação da ação antimicrobiana in vitro, na água e sobre a microbiota da pele humana. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Estadual Paulista, 2009.
- MENDES, S. S.; BOMFIM, R. R.; JESUS, H. C.; ALVES, P. B.; BLANK, A. F.; ESTEVAM, C. S.; ANTONIOLLI, A.; THOMAZZI, S. M. – Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Lippia gracilis* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 129, n. 3, p. 391-397, 2010.
- NAIK, M. I.; FOMDA, B. A.; JAYKUMAR, E. BHAT, J. A. Antibacterial activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil against some selected pathogenic bacterias. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 3, n. 7, p. 535-538, 2010.
- NASCIMENTO, G.G.F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P.C.; SILVA, G.L. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.31, p. 247-256, 2000.
- NGUEFACK, A. J.; TAMGUEA, O.; LEKAGNE DONGMOA, J. B.; DAKOLEA, C. D.; LETHB, V.; VISMERC, H. F.; AMVAM ZOLLOA, P. H.; NKENGFACKD, A. E. – Synergistic action between fractions of essential oils from *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Thymus vulgaris* against *Penicillium expansum*. **Food Control**, v. 23, n. 2, p. 377-383, 2012.
- OKOH, O. O.; SADIMENKO, A. P.; AFOLAYAN, A. J. Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods. **Food Chemistry**, v. 120, n. 1, p. 308-312, 2010.

- ORTIZ, E.L. **The Encyclopedia of Herbs, Spices, and Flavourings**. Dorling Kindersley Publishers, London, 1992.
- PADUCH, R.; SZERSZEN, M. K.; TRYTEK, M.; FIEDUREK, J. Terpenes: substances useful in human healthcare. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 55, n.5, p. 315-327, 2007.
- PAOLI, S.; GIANI, T.S.; PRESTA, G.A.; PEREIRA, M.P.; FONSECA, A.S.; BRANDÃO NETO, J.; MEDEIROS, A.C.; SANTOS-FILHO, S.D.; BERNARDO-FILHO, M. Effects of clove (*Caryophyllus aromaticus* L.) on the labeling of blood constituents with technetium-99m and on the morphology of red blood cells. **Brazilian archives of biology and Technology**, v.50, p. 175-182, 2007.
- PAULI, A.; KUBECZKA, K. H. Antimicrobial properties of volatile phenylpropanes. **Journal of Natural Products**, v. 5, p. 1387–1394, 2010.
- PAWAR, V.C.; THAKER, V.S. *In vitro* efficacy of 75 essential oils against *Aspergillus Níger*. **Mycosis**, v.49, p. 316-323, 2006.
- PEI, R.-S.; ZHOU, F.; JI, B.-P.; XU, J. Evaluation of combined antibacterial effects of eugenol, cinnamaldehyde, thymol, and carvacrol against *E. coli* with an improved method. **Journal of Food Science**, vol. 74, n. 7, p. 379-383, 2009.
- PEREIRA, M.C.; VILELA, G.R.; COSTA, L.M.A.S.; SILVA, R.F.; ANDERSON, F. F.; ELLEN, W. N.F.; ROBERTA, H.P. Inibição do desenvolvimento fúngico através da utilização de óleos essenciais de alimentos. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 4, p. 731-738, 2006.
- PEREIRA, A.A.D.E.; CARDOSO, M.G DAS; ABREU, L. R DE; MORAIS, A.R DE; GUIMARÃES, L. G. L DE; SALGADO, A.P. S. P. Caracterização química e efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Ciência e Agrotecnologia**, v.32, n.3, p. 887-893, 2008.
- PIEROZAN, M.K.; PAULETTI, G.F.; ROTA, L.; SANTOS, A.C.A dos; LERIN, L.A.; DI LUCCIO, M.; MOSSI, A.J.; ATTI-SERAFINI, L.; CANSIAN, R.L.; OLIVEIRA, V. J. Chemical characterization and antimicrobial activity of essential oils of *salvia* L. species. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.29, n.4, p.764-770, 2009.
- PRASAD, R.C.; HERZOG, B.; BOONE, B.; SIMS, L.; WALTNER-LAW, M. An extract of *Syzygium aromaticum* represses genes encoding hepatic gluconeogenic enzymes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, p. 295-301, 2005.

- RAINA, V.K.; SRIVASTAVA, S.K.; AGGARWAL, K.K.; SYAMASUNDAR, K.V.; KUMAR, S. Essential oil composition of *Syzygium aromaticum* leaf from Little Andaman, India. **Flavour Fragrance Journal**, v. 16, p. 334-336, 2001.
- RAKOTONIRAINY, M. S.; LAVEDRINE, B. Screening for antifungal activity of essential oils and related compounds to control the biocontamination in libraries and archives storage areas. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 55, p. 141-147, 2005.
- RANASINGHE, L.; JAYAWARDENA, B.; ABEYWICKRAMA, K. Fungicidal activity of essential oils of *Cinnamomum zeylanicum* (L.) and *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. pathogens isolated from banana. **Letters in Applied Microbiology**, v.35, p. 208-211, 2002.
- SCHERER, R.; WAGNER, R.; DUARTE, M.C.T.; GODOY, H.T. Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.11, n.4, p.442-449, 2009.
- SEN-SUNG, C.; JU-YUN, L.; ED-HAUN, C.; SHANG-TZEN, C. Antifungal activity of cinnamaldehyde and eugenol congeners against wood-rot fungi. **Bioresource Technology**, v.99, p.5145-5149, 2008.
- SILVA, S. R. S.; DEMUNER, A. J.; BARBOSA, L. C. A.; ANDRADE, N. J.; NASCIMENTO, E. A.; PINHEIRO, A. J. Análise de constituintes químicos e da atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.6, p.63-70, 2003.
- SILVA, M. T. N.; USHIMARU, P. I.; BARBOSA, L. N.; CUNHA, M. L. R. S.; FERNANDES JUNIOR, A. Atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas frente a linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 3, p. 257-262, 2009.
- SILVESTRI, J. D. F.; PAROUL, N.; CZYIEWSKI, E.; LERIN, L.; ROTAVA, I.; CANSIAN, R. L.; MOSSI, A.; TONIAZZO, G.; OLIVEIRA, D. de; TREICHEL, H. Perfil da composição química e atividades antibacteriana e antioxidante do óleo essencial do cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata* Thunb.). **Revista Ceres**, v. 57, n. 5, p. 589-594, 2010.
- SINGH, J.; BAGHOTIA, A.; GOEL, S. P. *Eugenia caryophyllata* Thunberg (Family Myrtaceae): A Review. **International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences**, v. 3, n. 4, p.1469-1475, 2012.
- SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento. 5ª edição. Editora da UFSC**, 2003.

SOUZA, E.L.D.; LIMA, E.D.O.; FREIRE, K.R.D.L.; SOUSA, C.P.D. Ação inibitória de alguns óleos essenciais e fitoquímicos sobre o crescimento de vários fungos isolados de alimentos. **Arquivos Brasileiros de Biologia e Tecnologia**, v.48, n. 2, p. 245-250, 2005.

TRAJANO, V. N.; LIMA, E. O.; SOUZA, E. L.; TRAVASSOS, A. E. R. Propriedade antibacteriana de óleos essenciais de especiarias sobre bactérias contaminantes de alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 3, p. 542-545, 2009.

UGALDI, L.M. Biofilmes Ativos com Incorporação de Óleos Essenciais, **Exame de Qualificação de Doutorado**. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, 2013.

ULTEE, A.; SMID, E. J. Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. **Journal of Food Microbiology**, vol. 64, n. 3, p. 373-378, 2001.

ULTEE, A.; BENNIK, M.H.J.; MOEZELAAR, R. O grupo hidroxila fenólico do carvacrol é essencial para a ação contra o agente patogênico *Bacillus cereus* de origem alimentar. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n.4, p. 1561-1568, 2002.

VICTÓRIA, F. N. Novos Compostos Organosselênio Bioativos: Estudo da Ação Antimicrobiana Frente à Patógenos de Importância em Alimentos. **Tese de Doutorado**, Universidade Federal de Pelotas, 2010.

VIEGAS, E.C.; SOARES, A.; CARMO, M.G.F.; ROSSETTO, C.A.V. Toxicidade de óleos essenciais de alho e casca de canela contra fungos do grupo *Aspergillus flavus*. **Horticultura Brasileira**, v.23, n.4, p.915-919, 2005.

WANNES, W. A.; MHAMDI, B.; SRITI, J.; JEMIA, M. B.; OUCHIKH, O.; HAMDAOUI, G.; KCHOUK, M. E.; ARZOUK, B. – Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n.5, p. 1362-1370, 2010.

WRIGHT, D.E.; WHITE, F.A.; GERFEN, R.W.; SILOS-SANTIAGO, I.; SNIDER, W.D. The guidance molecule semaphoring III is expressed in regions of spinal cord and periphery avoided by growing sensory axons. **Journal of Comportamental Neurology**, v. 361, p. 321-333, 1995.

CAPÍTULO IV

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO ÓLEO ESSENCIAL DO
CRAVO-DA-ÍNDIA ANTES E APÓS A ESTERIFICAÇÃO**

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo será apresentada uma revisão sobre o estado da arte no que concerne à atividade antioxidante de óleos essenciais, bem como os testes de atividade antioxidante *in vitro* do óleo essencial do cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus*) antes e após a esterificação e os resultados encontrados neste trabalho.

4.1 Antioxidantes naturais

Oxidação lipídica é o termo geral utilizado para descrever uma sequência complexa de alterações químicas resultantes da interação de lipídios com o oxigênio. Durante as reações de oxidação de lipídios, os ácidos graxos esterificados em triacilgliceróis e fosfolipídios decompõem-se, formando moléculas pequenas e voláteis que produzem os aromas indesejáveis conhecidos como rancidez oxidativa. Em geral, esses compostos voláteis são prejudiciais a qualidade dos alimentos (FENNEMA *et al.*, 2010), além de causar perdas nutricionais, gerar compostos indesejáveis e até mesmo potencialmente prejudiciais à saúde humana (MARIUTTI & BRAGAGNOLO, 2007).

Estruturalmente, os antioxidantes são compostos aromáticos que possuem pelo menos uma hidroxila, podendo ser sintéticos, largamente utilizados pela indústria de alimentos, ou naturais, como organosulfurados, fenólicos e terpenos, que fazem parte da constituição de diversos alimentos (RAMALHO & JORGE, 2006).

Os antioxidantes retardam a velocidade da oxidação de substratos oxidáveis, podendo estes ser enzimáticos ou não enzimáticos, tais como α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno, ácido ascórbico (vitamina C) e compostos fenólicos (flavonóides) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2000).

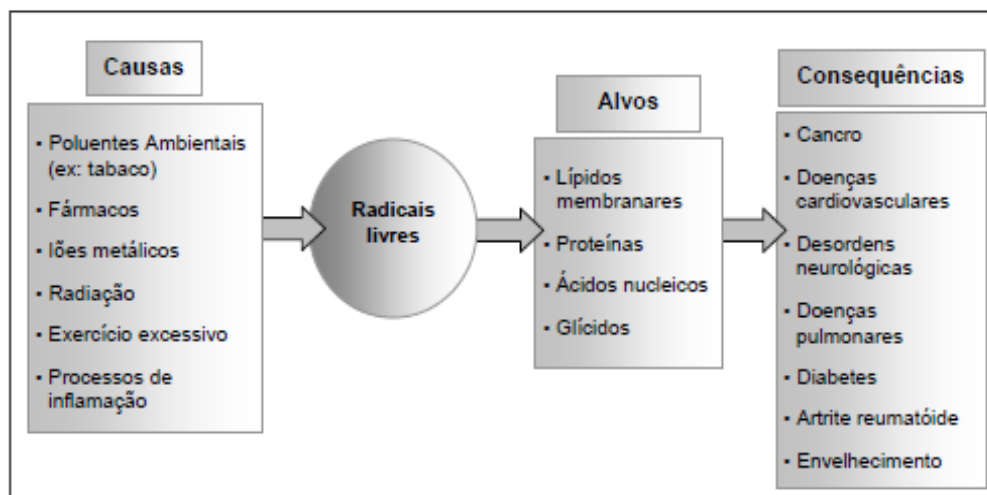
O consumo de antioxidantes naturais, como os compostos fenólicos presentes na maioria das plantas que inibem a formação de radicais livres, também chamados de substâncias reativas, é muito importante, pois representa um papel fundamental não somente na redução lipídica em tecidos vegetais, mas também em animais, pois quando incorporado na alimentação humana reduz o risco de desenvolvimento de patologias, como arteriosclerose e câncer (RAMARATHNAM *et al.*, 1995).

A atividade anticarcinogênica dos fenólicos tem sido relacionada à inibição dos cânceres de cólon, esôfago, pulmão, fígado, mama e pele. Os compostos fenólicos que possuem este potencial são resveratrol, quercetina, ácido caféico e flavonóis (PIMENTEL *et al.*, 2005).

A manutenção do equilíbrio entre a produção de radicais livres e as defesas antioxidantes (enzimas e moléculas não enzimáticas) é uma condição essencial para o funcionamento normal do organismo. Quando este equilíbrio tende para a produção de radicais livres dizemos que o organismo está em stress oxidativo, e nestas situações os radicais livres em excesso podem oxidar e danificar lipídios celulares, proteínas e DNA, inibindo a sua função normal e conduzindo a várias doenças. Em organismos aeróbios, os radicais livres são constantemente produzidos durante o funcionamento normal da célula, na maior parte sob a forma de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS) (VALKO *et al.*, 2007).

A exposição dos organismos a radicais livres conduziu ao desenvolvimento de mecanismos de defesa endógenos para eliminá-los. Estas defesas são a resposta da evolução à inevitabilidade da existência de ROS em condições aeróbias. Alguns produtos naturais com atividade antioxidante podem auxiliar o sistema protetor endógeno. Nesta perspectiva, os antioxidantes presentes na dieta assumem grande importância como possíveis agentes protetores, reduzindo os danos oxidativos (VALKO *et al.*, 2007).

Também existem causas naturais para o stress oxidativo, como o que ocorre em situações de exercício físico extremo, ou em processos de inflamação; mas pode também ter causas não naturais como a presença de xenobióticos no organismo ou em situações relacionadas com várias doenças (Figura 18) (VALKO *et al.*, 2007). A produção não controlada de radicais livres foi já associada como causa, ou como estando relacionada com mais de uma centena de doenças, incluindo: vários tipos de cancro, diabetes, cirrose, doenças cardiovasculares e desordens do foro neurológico, entre outras (VALKO *et al.*, 2007). A sobreprodução de ROS tem sido relacionada com o processo de envelhecimento (LACHANCE *et al.*, 2001).

Figura 18. Principais causas e consequências da ação dos radicais livres.

Fonte: FERREIRA & ABREU, 2007.

A peroxidação lipídica é a principal consequência do estresse oxidativo resultando na danificação das membranas, causada pela oxidação, acarretando em aumento da fluidez da membrana, comprometimento da sua integridade e inativação da interação entre membrana/receptor e membrana/enzima (VICENTINO & MENEZES, 2006).

Os mecanismos antioxidantes dos compostos que são usados para aumentar a estabilidade oxidativa de alimentos incluem o controle de radicais livres, pró-oxidantes e intermediários da oxidação, sendo o BHT (butil hidroxitolueno) e o BHA (butil hidroxianisol) antioxidantes sintéticos amplamente utilizados na indústria de alimentos (MARIUTTI & BRAGAGNOLO, 2007), embora atualmente sua inocuidade venha sendo questionada, o que impulsiona a busca por compostos com esta função a partir de fontes naturais, particularmente aquelas de origem vegetal como os OEs (SÁNCHEZ *et al.*, 2010).

Os antioxidantes apresentam-se como uma alternativa para prevenir a deterioração oxidativa dos alimentos e minimizar os danos oxidativos nos seres vivos. Como o emprego de antioxidantes sintéticos na indústria de alimentos tem sido alvo de questionamentos quanto à inocuidade, demonstrando a possibilidade desses antioxidantes apresentarem alguma toxidez (BAUER *et al.*, 2001), pesquisas encontram-se voltadas para a busca de compostos naturais que exibam esta propriedade funcional (MELO & GUERRA, 2002).

A própria exigência do consumidor reforça o mercado potencial dos antioxidantes naturais, uma vez que existe grande desconforto de uma parcela da população em manter a aquisição e consumo de alimentos industrializados, cuja produção reconhecidamente envolva o emprego de substanciais quantidades de aditivos sintéticos (VALENTÃO *et al.*, 2002; AMAROWICZ *et al.*, 2004).

O início do novo milênio, com o aumento da expectativa de vida e as crescentes informações divulgadas sobre saúde, levam o consumidor a procurar cada vez mais uma alimentação saudável para a prevenção das doenças. Paralelamente, os avanços da ciência permitem um melhor conhecimento sobre as propriedades dos alimentos.

Diversas ervas e especiarias culinárias já foram relatadas por possuírem atividades antioxidantes, sugerindo, inclusive, potencial benéfico à saúde humana (YANISHLIEVA *et al.*, 2006; VIUDA-MARTOS *et al.*, 2011).

4.1.1 Defesas antioxidantes endógenas e fitoquímicos

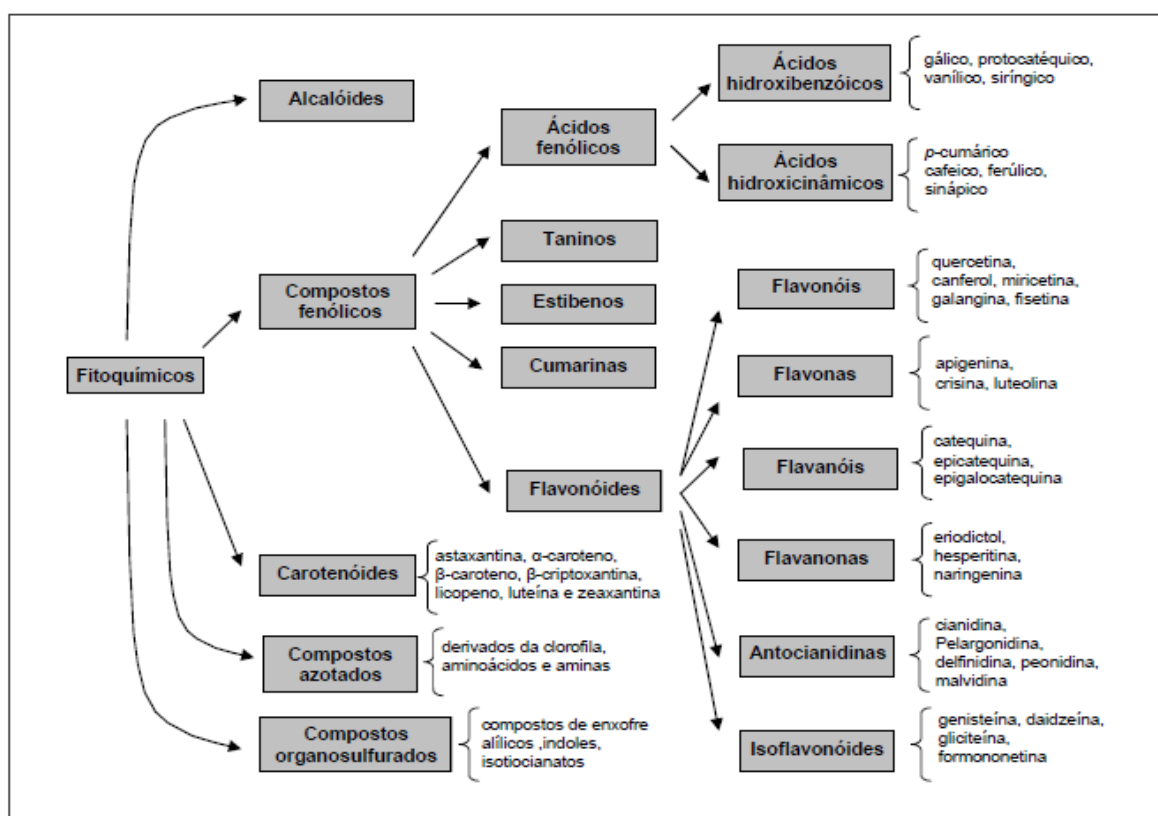
A exposição do organismo a radicais livres, provenientes de diversas fontes, levou o organismo a desenvolver uma série de mecanismos de defesa para eliminar estes radicais livres (CADENAS, 1997). Estas defesas foram resposta da evolução à inevitabilidade da existência de radicais de oxigênio em condições de vida aeróbia.

Para além das defesas endógenas, existe uma variedade de moléculas naturais ou sintéticas com propriedades antioxidantes e que podem constituir um sistema exógeno de defesa. Alguns produtos naturais com atividade antioxidante podem ser úteis no auxílio do sistema protetor endógeno, podendo ser utilizados como nutracêuticos (KANTER, 1998). Nessa perspectiva, os antioxidantes presentes na nossa dieta assumem uma grande importância como possíveis agentes protetores que ajudem a corpo humano na redução dos danos ocorrência de várias doenças crônicas, nomeadamente vários tipos de cancro.

Sendo o *stress* oxidativo induzido por radicais livres, responsável por várias dessas doenças crônicas, os fitoquímicos presentes em frutos e vegetais assumem cada vez mais uma enorme importância. Já foram identificados mais de 5000 fitoquímicos, no entanto, uma grande percentagem destes compostos é ainda desconhecida, sendo importante a sua identificação para melhor compreender a sua contribuição para a saúde ao serem incluídos na nossa dieta (LIU, 2003).

Os fitoquímicos englobam carotenoides (α -caroteno, β -caroteno, β -criptoxantina, luteína, zeaxantina, astaxantina e licopeno); compostos fenólicos: ácidos fenólicos (ácidos hidroxibenzóicos e ácidos hidroxicinâmicos), flavonoides (flavonóis, flavonas, flavanóis, flavanonas, antocianidinas e isoflavonóides), estibenos, cumarinas e taninos; alcaloides; compostos azotados (derivados da clorofila, aminoácidos e aminas) e compostos organossulfurados: (isotiocianatos, indoles, compostos de enxofre alílicos) (LIU, 2003) (Figura 19).

Figura 19. Principais classes de fitoquímicos naturais.



Fonte: LIU, 2003.

4.1.2 Atividade antioxidante dos óleos essenciais

A oxidação lipídica que ocorre nos produtos alimentares é uma das principais preocupações. É responsável por odores e sabores desagradáveis nos produtos, com consequente diminuição da segurança e qualidade nutricional, causados pela formação de compostos potencialmente tóxicos. A prevenção é economicamente importante e fundamental para a proteção da saúde humana (TSAI *et al.*, 2005).

A formação dos radicais livres no organismo animal é controlada por mecanismos naturais ligados a diversas substâncias com ação antioxidante, provenientes de alimentos presentes na dieta. A procura por antioxidantes naturais, em geral contidos em óleos e ou extratos de plantas, tem caracterizado a pesquisa de alternativas aos antioxidantes sintéticos.

A atividade antioxidante dos óleos essenciais está relacionada, principalmente, com a presença de fenilpropanoides e terpenoides (DEL RÉ & JORGE, 2012).

De acordo com Carvalho (2004), a presença de compostos contendo um ou mais grupos hidroxila (OH^-), ou metoxila (CH_3O^-) ligados ao anel aromático, insaturações e elétrons disponíveis para serem doados, nos óleos essenciais, conferem a eles atividade antioxidante.

Ruberto & Baratta (2000), avaliando a atividade antioxidante de aproximadamente 100 compostos que compõem os óleos essenciais, verificaram que, de um modo geral, os compostos fenólicos apresentam a maior atividade antioxidante, seguido dos componentes oxigenados e dos alcoóis alilícos. Alguns hidrocarbonetos monoterpênicos, como terpinoleno, α - e γ -terpineno mostraram uma significativa ação protetora e hidrocarbonetos sesquiterpênicos e não-isoprenoides submetidos a este estudo demonstraram um baixo, ou nenhum, efeito antioxidante.

A atividade antioxidante dos óleos essenciais de capim-citronela, cravo-da-índia e palmarosa foi evidenciada por Scherer *et al.* (2009) pelo método de DPPH. Eles observaram que o óleo de cravo-da-índia apresentou uma forte atividade antioxidante, provavelmente por este apresentar como composto majoritário o eugenol (83,7%). Nas amostras de citronela tendo como componentes majoritários o citronelal (45%), geraniol (20,71%) e citronelol (14,49%), não foi observada atividade antioxidante significativa.

Os primeiros estudos sobre a capacidade antioxidante de especiarias datam dos anos 50, quando mais de 30 delas foram avaliadas quanto ao potencial de inibição da oxidação de óleos vegetais ou gordura animal (CHIPAULT *et al.*, 1952). Os resultados demonstravam a alta capacidade antioxidante das especiarias, em especial as da família *Labiatae*. Estudos posteriores indicaram o alecrim, a sálvia e o orégano entre os mais efetivos em retardar a lipoperoxidação em óleos vegetais (MANCINI & MANCINI-FILHO, 2001).

O alecrim tem demonstrado um ótimo potencial antioxidante em diversos estudos que visam à aplicação desta especiaria em diversos produtos que são

susceptíveis à oxidação, tais como maioneses, salsichas e diferentes tipos de carnes (LEE *et al.*, 2005a; ESTÉVEZ & CAVA, 2006).

Compostos presentes nos óleos essenciais de manjerição e tomilho, em particular eugenol, timol e carvacrol, são capazes de inibir a oxidação, comparável aos antioxidantes conhecidos, BHT e α -tocoferol. Além disso, a ingestão desses compostos aromáticos pode ajudar a prevenir danos oxidativos *in vivo*, como a peroxidação lipídica, que é associada ao câncer, envelhecimento precoce, aterosclerose e diabetes (LEE *et al.*, 2005b).

Óleo essencial de *Caryophyllus aromaticus* é conhecido por sua capacidade antioxidante, devido à presença do eugenol conhecido como antioxidante natural. Segundo Ponce *et al.* (2003), este fenilpropanoide reduz a atividade da peroxidase inibindo o processo de peroxidação lipídica induzida por espécies reativas de oxigênio, capazes de agredir os tecidos celulares.

Gülçin *et al.* (2012), a partir de diferentes testes *in vitro*, avaliaram a atividade antioxidante do OE de cravo-da-índia e verificaram que o mesmo foi eficiente em diferentes ensaios, incluindo redução dos radicais DPPH(1,1-difenil-2-picrilhidrazil) e ABTS (2,2-azinobis-[3-etil-benzotiazolin-6-ácidosulfônico]), índice de peróxidos, capacidade quelante de metais, comparado com os compostos antioxidantes convencionais como BHA (butil hidroxianisol), BHT (butil hidroxitolueno), α -tocoferol, podendo ser usado para minimizar ou evitar a oxidação lipídica em produtos alimentares.

É importante considerar que os dados a partir de estudos *in vitro* podem variar segundo as condições experimentais, como sugere Frankel (1996), o que implica em resultados imprecisos quanto à proteção *in vivo*.

4.1.3 Testes de determinação da atividade antioxidante

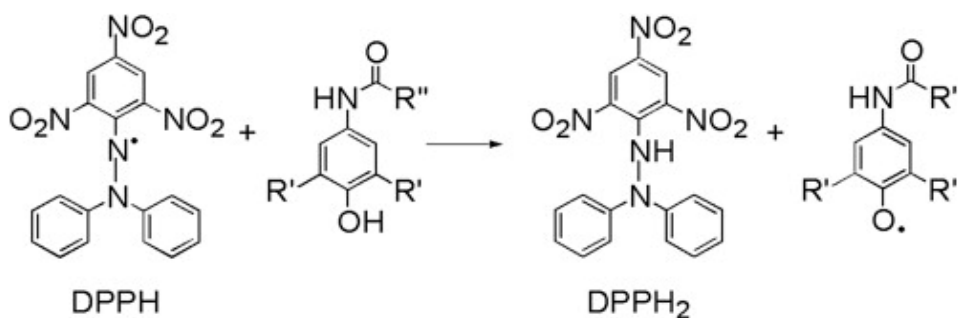
O efeito de compostos de origem natural contra o estresse oxidativo tem sido avaliado por meio de estudos *in vitro* e *in vivo*. O emprego de sistemas *in vitro* propõe estimar um efeito antioxidante no organismo, combatendo a ação deletéria do estresse oxidativo e suas consequências. A proteção *in vivo* tem sido constatada experimentalmente e em estudos epidemiológicos, nos quais, a presença de compostos antioxidantes na alimentação e maiores concentrações plasmáticas apresentam

correlação inversa com a incidência de doenças relacionadas ao estresse oxidativo (WANG & LIN, 2000; ESPIN *et al.*, 2000; HOLLIDAY & PHILLIPS, 2001).

Os métodos mais frequentemente utilizados para medir os danos oxidativos são (1) ação oxidativa total do DNA (2) níveis antioxidantes enzimáticos e de vitaminas (3) ação oxidativa em lipídios e (4) ação nas proteínas (ARAUNA, 1997). A maioria dos métodos químicos é baseada na capacidade de captura dos radicais livres, mas também na absorção UV e capacidade de quelação que são responsáveis pela atividade antioxidante dos óleos (ARAUNA, 1997). Testes que avaliam a captura dos radicais livres podem ser feitos com diferentes compostos, como peróxido (O_2), hidroxila ($OH^\cdot$), óxido nítrico (NO), radical 2,2-difenil-1-picril hidrazil (DPPH), entre outros.

A molécula de 2,2-difenil-1-picril hidrazil é caracterizada por ser um radical livre estável em virtude da deslocalização de pares de elétrons através da sua estrutura. A deslocalização também confere intensidade para a coloração violeta, característica por absorver em solução de etanol no comprimento de onda aproximado de 500 nm. Por ação de um antioxidante ou uma espécie radicalar ($R^\cdot$), o DPPH é reduzido formando 2,2-difenilpicril-hidrazina (DPPH-H) (Figura 20), de coloração amarela com consequente desaparecimento da banda de absorção, sendo a mesma monitorada pelo decréscimo da absorbância (OLIVEIRA *et al.*, 2009; BLOIS, 1958).

Figura 20. Representação esquemática do comportamento do radical DPPH utilizado na determinação da atividade antioxidante de OEs.



Fonte: BLOIS, 1958.

Várias séries de compostos químicos têm apresentado estreita correlação entre as atividades sequestradoras do DPPH e a atividade antioxidante determinada em modelos biológicos e nãobiológicos. Logo, o ensaio de atividade sequestradora do radical livre DPPH se apresenta adequado para *screening* de compostos químicos sintéticos ou produtos naturais (MIRANDA & FRAGA, 2006).

Comparado com outros métodos, o ensaio DPPH tem muitas vantagens tais como uma boa estabilidade, sensibilidade, simplicidade e viabilidade (JIN *et al.*, 2006).

Os resultados do ensaio DPPH têm sido apresentados de diferentes maneiras. A maioria dos estudos expressa os resultados como o valor IC₅₀, definido como a quantidade de antioxidante necessária para reduzir a concentração inicial de DPPH em 50%, sendo utilizado para comparação da atividade antioxidante de diferentes compostos. Este valor é calculado através da representação gráfica da percentagem de inibição contra a concentração da substância utilizada (DENG *et al.*, 2011).

O cálculo do valor IC₅₀ requer a determinação da cinética da reação entre o DPPH e diferentes concentrações do antioxidante, sendo que a reação deve ser monitorada até que a concentração do DPPH atinja um valor estacionário (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995). A atividade antioxidante dos compostos é verificada medindo-se a concentração do DPPH no início da reação entre o composto/DPPH, e após um período de incubação o qual, de acordo com a literatura, pode variar de um a sessenta minutos. Deve-se salientar, no entanto, que um tempo de incubação curto frequentemente não é suficiente para atingir o estado de equilíbrio da reação (DAWIDOWICZ *et al.*, 2012).

A influência do tipo de solvente na estimativa das propriedades antioxidantes dos compostos geralmente é omitida. No entanto, a cinética da reação antioxidante/DPPH depende do solvente utilizado (GÜLÇİN *et al.*, 2012).

Assim, o presente capítulo teve como objetivo avaliar e comparar as atividades antioxidantes do óleo essencial de cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus*) antes e após a esterificação. Para que este objetivo fosse alcançado aplicou-se a metodologia (DPPH).

4.2 MÉTODOS

Nesta etapa do presente capítulo será descrita a metodologia utilizada para a avaliação da atividade antioxidante *in vitro* do óleo essencial de cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus*) antes e após a esterificação.

4.2.1 Atividade antioxidante *in vitro*

A metodologia aplicada está baseada na medida da extinção da absorção do radical 2,2-difenil-1-picril hidrazil (DPPH) em 515 nm. A determinação da atividade

antioxidante foi realizada em triplicata, por método espectrofotométrico. A técnica consistiu na incubação por 10 minutos, de 500 µL de uma solução etanólica de DPPH 0,1 mM com 500 µL de soluções contendo concentrações crescentes de óleo essencial do cravo-da-índia (10; 25; 50; 75; 100; 250; 500 µg/mL) em etanol. Procedeu-se da mesma forma para a preparação da solução denominada “controle”, porém substituindo 500 µL da amostra em 500 µL de solvente etanol. As soluções denominadas “branco” foram preparadas usando diferentes concentrações do óleo essencial em etanol, sem DPPH.

O percentual de captação do radical DPPH foi calculado em termos da porcentagem de atividade antioxidante (AA%), conforme a Equação 1:

$$AA\% = 100 - \{[(Abs. amostra - Abs. branco) \times 100] \div Abs. controle\} \quad \text{Equação (1)}$$

Onde *Abs. amostra* é a absorbância da amostra, *Abs. branco* é a absorbância do branco e, *Abs. controle* é a absorbância do controle.

A determinação foi feita em espectrofotômetro UV-Visível marca Agilent Technologies, modelo 8453E. Após a avaliação da faixa de concentração ideal, calculou-se a concentração de óleo essencial necessária para capturar 50 % do radical livre DPPH (IC₅₀) por análise de regressão linear (CARBONARI, 2005).

Os resultados foram expressos pela média aritmética dos valores obtidos nas três repetições, sendo as médias analisadas estatisticamente por análise de variância (ANOVA) e comparadas pelo teste de Tukey (p<0,05), utilizando-se o programa ASSISTAT®.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste momento serão apresentados e discutidos os resultados obtidos ao longo do estudo das atividades antioxidantes *in vitro* do óleo essencial de cravo-da-índia antes e após a esterificação.

4.3.1 Atividade antioxidante *in vitro*: atividade de captura de radicais livres com o teste de DPPH

Os resultados obtidos após a determinação da atividade antioxidante do óleo essencial antes e após a esterificação em diferentes concentrações estão representados na Tabela 11.

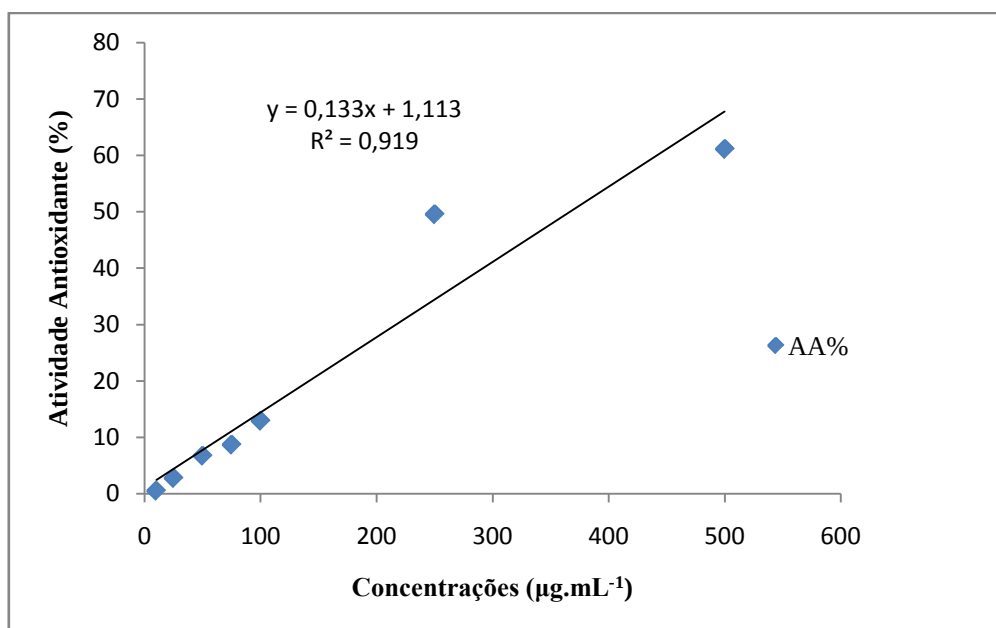
Os resultados demonstram que o percentual antioxidante aumenta proporcionalmente à concentração de óleo e acetato de eugenila adicionado, atingindo os valores máximos de 61,12 e 81,59%, respectivamente, de atividade antioxidante para a concentração de 500 µg/mL. Na pesquisa realizada por Ugaldi (2013), o óleo essencial de cravo-da-índia foi o que apresentou a maior AA, de 89,38%.

Tabela 11. Porcentagem da neutralização do DPPH do óleo essencial do cravo-da-índia antes e depois da esterificação.

Concentrações (µg/mL)	Atividade antioxidante (%)	
	Óleo de cravo	Óleo de cravo após a esterificação
10	0,56	1,12
25	2,81	4,26
50	6,76	9,21
75	8,73	15,64
100	12,95	21,78
250	49,55	53,99
500	61,12	81,59

Após a identificação da faixa de concentração com aumento linear em relação à atividade antioxidante, traçou-se a equação da reta e determinou-se o IC₅₀ do óleo essencial de *Caryophyllus aromaticus*, antes e após a reação, como mostram as Figuras 21e 22, respectivamente.

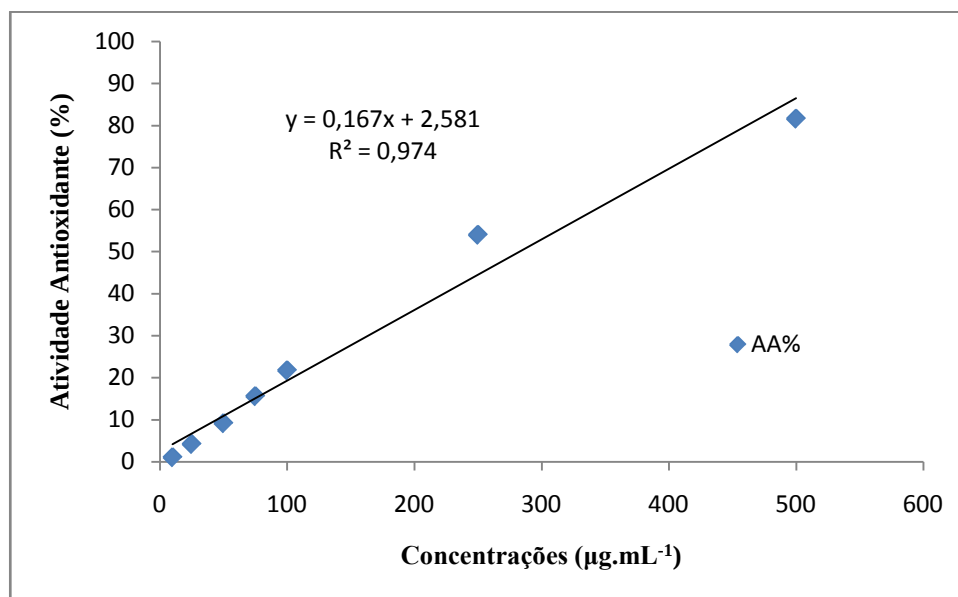
Figura 21- Atividade antioxidante do óleo essencial do cravo da índia (*Eugenia caryophyllata*) antes da esterificação.



A correlação entre a atividade antioxidante (%) e a concentração de óleo utilizado ($Y = 133,3x + 1,113$) com $R^2 = 0,919$ forneceu um IC_{50} de 367,5 µg/mL para o óleo antes da reação de esterificação.

Para o óleo essencial após a esterificação, a correlação entre a atividade antioxidante (%) e a concentração de óleo utilizado ($Y = 0,167x + 2,581$) com $R^2 = 0,974$ forneceu um IC_{50} de 283,5 µg/mL.

Analisando os valores de IC_{50} antes e após a reação, pode-se observar um aumento no potencial antioxidante após a reação. Ambas as concentrações encontradas, tanto para o óleo antes como depois da esterificação, indicam o alto potencial antioxidante do óleo e de seu éster indicando um potencial uso em produtos alimentícios.

Figura 22- Atividade antioxidante do óleo essencial do cravo da índia depois da esterificação.

Diversos autores avaliaram a atividade antioxidante de óleos essenciais de plantas e encontraram os seguintes resultados: *Hippomarathrum microcarpum* com IC_{50} de 10.690 µg/mL, *Chaerophyllum libanoticum* com IC_{50} superior a 30.000 µg/mL, *Rosmarinus officinalis* com IC_{50} de 20.000 µg/mL, *Artemisia fragrans* com IC_{50} de 7.860 µg/mL e *Artemisia austriaca* com IC_{50} de 8.060 µg/mL, *Petroselinum crispum* L. com IC_{50} de 80.210 µg/mL (OZER *et al.*, 2007; DEMIRCI *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2007; DELAZAR *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2006).

Silvestri *et al.* (2010), avaliando OE de cravo-da-índia em diferentes concentrações, obtiveram uma AA (%) máxima de 95,6% na concentração de 10.000 µg/mL, e IC_{50} de 1.118,77 µg/mL.

Scherer *et al.* (2009) avaliaram as ações antioxidante e antimicrobiana e a composição dos óleos essenciais de cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus* L.), citronela (*Cymbopogon winterianus*) e palmarosa (*Cymbopogon martinii*) e encontraram uma forte atividade antioxidante (IC_{50} $7,8 \pm 0,65$ µg/mL) e ação antimicrobiana moderada a forte para o óleo essencial de cravo-da-índia. O óleo essencial de cravo-da-índia apresentou ação antioxidante muito forte provavelmente devido ao elevado teor de eugenol na composição, pois, segundo Scherer & Godoy (2009), o eugenol apresenta valor de IAA (índice de atividade antioxidante) entre 10 e 11, sendo considerada muito forte, pois é maior do que 2,0.

Segundo Morais *et al.* (2009), os condimentos analisados que obtiveram osmelhores IC₅₀, canela (*Cinnamomum zeylanicum*), cravo (*Eugenia aromatica* Baill), e louro (*Laurus nobilis*), têm em sua constituição um forte antioxidante como o eugenol, um composto fenólico cuja eficácia já foi comprovada tanto *invitro* como *in vivo* (ITO *et al.*, 2005).

O eugenol possui capacidade inibitória da peroxidação lipídica na fase de iniciação e propagação através da interferência nas reações em cadeia, sequestrando o O₂ ativo e, ao ser metabolizado em um dímero (dieugenol), inibe a peroxidação propriamente dita em nível de propagação da reação em cadeia de radicais livres com o α -tocoferol (AFFONSO *et al.*, 2012), demonstrando potente ação antioxidante e aplicabilidade estratégica na indústria.

O aumento da atividade antioxidante do óleo essencial após a substituição do grupo hidroxilado eugenol pelo acetato pode ser explicado pelo efeito indutivo exercido pelo conjunto sob o anel aromático, o qual pode facilitar a libertação de átomos de hidrogênio do anel. Além disso, o grupo metóxi é um forte grupo doador de elétron, o que aumenta a estabilidade do anel benzênico, resultando no aumento da atividade sequestradora de radicais livres (ZHANG, *et al.*, 2006). No entanto, mais estudos com o objetivo de elucidar o mecanismo de ação antioxidante de éster são necessários para confirmar esta hipótese.

4.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A oxidação lipídica é a grande responsável pela formação de compostos de aroma e sabor indesejáveis. O controle de fatores como temperatura, tempo de armazenamento, luz, presença de metais, presença de oxigênio, e a utilização de substâncias antioxidantes são necessários a fim de retardar o processo oxidativo e garantir a qualidade sensorial e nutricional de alimentos lipídicos.

Com o objetivo de substituir os aditivos alimentares sintéticos ou reduzir seu uso, os antioxidantes naturais têm sido muito pesquisados quanto a sua fonte, composição nos alimentos e a avaliação da capacidade de sequestro dos radicais livres.

Os ensaios demonstraram que o óleo essencial do *Caryophyllus aromaticus* após esterificação apresentou atividade antioxidante superior ao óleo essencial antes da esterificação com potencial promissor para aplicação em produtos químicos, cosméticos e indústrias de alimentos finos.

4.5 REFERÊNCIAS

- AFFONSO, R. S.; RENNO, M. N.; SLANA, G. B. C. A.; FRANÇA, T. C. C. Aspectos Químicos e Biológicos do Óleo Essencial de Cravo da Índia. **Revista Virtual Química**, v. 4, n. 2, 146-161, 2012.
- AMAROWICZ, R.A.; PEGGB, R.B.; RAHIMI-MOGHADDAM, P.; BARLD, B.; WEIL, C. J.A. Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. **Food Chemistry**, v.84, n.4, p.551- 62, 2004.
- ARAUNA, O.I. Extracts as antioxidant prophylactic agents. **Information**, v.8, p.1236-1241, 1997.
- BAUER, A.K.; DWYER-NIELD, D.L.; HANKIN, J.A.; MURPHY, R.C.; MALKINSON, A.M. The lung tumor promoter, butylated hydroxytoluene (BHT), causes chronic inflammation in promotion-sensitive BALB/cByJ mice but not in promotion-resistant C57BL/6 mice. **Toxicology**, v.169, n.1, p.1-15, 2001.
- BLOIS, M. S.; Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, v. 181, n. 26, p. 1199-1200, 1958.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, vol. 28, p. 25–30, 1995.
- CADENAS, E. Basic mechanisms of antioxidant activity. **Biofactors**, v.6, p.391-397, 1997.
- CARBONARI, K.A. Avaliação do potencial antioxidante (in vitro e in vivo) e anti-inflamatório de *Ouratea parviflora*, *Polymnia sonchifoliae* *Marlierea obscura*. **Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)** – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.
- CARVALHO, J. C. T. Fitoterápicos anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. Ribeirão Preto: **Tecmedd**, p. 267-273, 2004.
- CHIPAULT, J.R.; MIZUNI, G.R.; HA WKINS, J.M.; LUNDBERG, W.O. The antioxidant properties of natural spices. **Food & Nutrition Research Briefs**, v.17, p.46-55, 1952.
- DAWIDOWICZ, A.L.; WIANOWSKA, D.; OLSZOWY, M. On practical problems in estimation of antioxidant activity of compounds by DPPH method (Problems in estimation of antioxidant activity). **Food Chemistry**, v. 13, p. 1037–1043, 2012.
- DEL RÉ, P.V.; JORGE, N. Especiarias como antioxidantes naturais: aplicações em alimentos e implicações na saúde. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 14, n. 2, p. 389-399, 2012.
- DELAZAR, A.; NASERI, M.; NAHAR, L.; MOGHADAM, S.B.; ESNAASHARI, S.; NAZEMIYEH, H.; SARKER, S.D. GC-MS Analysis and antioxidant activities of essential oils

- of two cultivated *Artemisia* species. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 43, n. 1, p. 112-114, 2007.
- DEMIRCI, B.; KOSAR, M.; DEMIRCI, F.; DINÇ, M.; BASER, K.H.C. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of *Chaerophyllum libanoticum* Boiss. et Kotschy. **Food Chemistry**, v. 105, p. 1512-1517, 2007.
- DENG, X.; DZAMKO, N.; PRESCOTT, A.; DAVIES, P.; LIU, Q.; YANG, Q. Characterization of a selective inhibitor of the Parkinson's disease kinase LRRK2. **Nature Chemical Biology**, v.7, p. 203–205, 2011.
- ESPIN, J.C.; SOLER-RIVAS, C.; WICHES, H.J.; GARCIA-VIGUERA, C. Anthocyanin-based natural a new source of antiradical activity for foodstuff. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington DC., v.48, n.6, p.1588-1592, 2000.
- ESTÉVEZ, M.; CAVA, R. Effectiveness of Rosemary essential oil as an inhibitor of lipid and protein oxidation: contradictory effects in different types of frankfurters. **Meat Science**, v.72, n.2, p.348-55, 2006.
- FENNEMA, O.R.; DAMODARAN, S.; PARKIN, K.L. **Química de alimentos de Fennema**.4ª. ed., Porto Alegre: Artmed, p.900, 2010.
- FERREIRA, I.C.F.R.; ABREU, R.M.V. Stress oxidativo, antioxidantes e fitoquímicos. **Bioanálise**, v.2, p. 32-39, 2007.
- FRANKEL, E. N. Antioxidants in lipid foods and their impact on food quality. **Food Chemistry**, v. 57, n. 1, p. 51-55, 1996.
- GÜLÇİN, I.; ELMASTAS, M.; ABOUL-ENEIN, H.Y. Antioxidant activity of clove oil – A powerful antioxidant source. **Arabian Journal of Chemistry**, vol. 5, p. 489–499, 2012.
- HALL, C.A.; CUPPETT, S.L. Structure-activities of natural antioxidants. In: Aruoma OI, Cuppett SL, editors. Antioxidant Methodology In Vivo and In Vitro Concepts. **AOCS Press**, p.2-29, 1997.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals in biology and medicine. **Clarendon**, Oxford, v.3, p.936, 2000.
- HOLLIDAY, R.; PHILLIPS, R. Health benefits of sunflower kernel. **Cereal Food World**, v.46, n.1, p.205-08, 2001.
- ITO, M.; MURAKAMI, K.; YOSHINO, M. Antioxidant action of eugenol compounds: role of metal ion in the inhibition of lipid peroxidation. **Food and Chemical Toxicology**, v.43, p.461-466, 2005.

- JIN, J.; LI, Z.; ZHANG, F. Scavenging function of mulberry vinegar extractives for 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). **Journal of Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry**, vol. 34, n. 3, p. 135–137, 2006.
- KANTER, M. Free radicals, exercise and antioxidant supplementation. **Proceedings of the Nutrition Society of Australia**, v.57, p.9-13, 1998.
- LACHANCE, P.A.; NAKAT, Z.; JEONG, W.S. Antioxidants: an integrative approach. **Nutrition**, v.17, n.10, p. 835- 838, 2001.
- LEE, J.W.; PARK, K.S.; KIM, J.G.; OH, S.H.; LEE, Y.S.; KIM, J.H.; BYUN, M.W. Combined effects of gamma irradiation and rosemary extract on the shelf-life of a ready-to-eat hamburger steak. **Radiation Physics and Chemistry**, v.72, n.1, p.49-56, 2005a.
- LEE, S.J.; UMANO, K.; SHIBAMOTO, T.; LEE, K.G. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. **Food Chemistry**, v.91, n.1, p.131-7, 2005b.
- LIU, R.H. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. **The American Journal of Clinical Nutrition**, 2003; v.78, p.517-520, 2003.
- MANCINI, D.A.P.; MANCINI-FILHO, J. Prevenção de reações oxidativas: antioxidantes nos vegetais de consumo humano. In: D'Angelis, R. **Importância de alimentos vegetais na proteção da saúde**. São Paulo: Atheneu, p. 320, 2001.
- MARIUTTI, L.R.B.; BRAGAGNOLO, N. Revisão: Antioxidantes Naturais da Família *Lamiaceae*. Aplicação em Produtos Alimentícios. **Brazilian Journal of Food Technology**, vol. 10, n. 2, p. 96-103, 2007.
- MELO, E.A.; GUERRA, N.B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciências e Tecnologias de Alimentos**, v.36, n.1, p.1-11, 2002.
- MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; SANTOS, T. C.; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. G. Screening of brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 2, p. 127-130, 2001.
- MIRANDA, A. L. P.; FRAGA, C. A. M. Atividade Seqüestradora de Radical Livre Determinação do Potencial Antioxidante de Substâncias Bioativas. In: MONGE A.; GANELLIN, C. R. (Ed.). **Practical Studies for Medicinal Chemistry**. Genebra: IUPAC, 2006.

- MORAIS, S. M.; CAVALCANTI, E. S. B.; COSTA, S. M. O.; AGUIAR, L. A. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 1B, p. 315-320, 2009.
- OLIVEIRA, R. A.; REIS, T. V.; SACRAMENTO, C. K.; DUARTE, L. P.; OLIVEIRA, F. F. Constituintes químicos voláteis de especiarias ricas em eugenol. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, vol. 19, n. 3, p. 771-775, 2009.
- ÖZER, H.; SÖKMEN, M.; GÜLLÜCE, M.; ADIGÜZEL, A. Chemical composition and antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of *Hippomarathrum microcarpum* (Bieb.) from Turkey. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p.937-942, 2007.
- PIMENTEL, C.V.M.B.; FRANCKI, V.M.; GOLLÜCKE, A.P.B. **Alimentos funcionais: introdução às principais substâncias bioativas em alimentos**. São Paulo: Varela; 2005.
- PONCE, A.G.; VALLE, C.E.; ROURA, S.I. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss Chard. **Lebensm Wiss Technol**, v.37, p. 679-784, 2003.
- RAMALHO, V.C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v.29, n.4, p.755-60, 2006.
- RAMARATHNAM, N.; OSAWA, T.; OCHI, H.; KAWAKISHI, S. The contribution of plant food antioxidants to humans health. **Trends Food Science and Nutrition**, v.6, n.3, p.75-82, 1995.
- RUBERTO, G.; BARATTA, M.T. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. **Food Chemistry**, v. 69, n. 02, p. 167-174, 2000.
- SÁNCHEZ, A.A.; ESPINOSA, M.E.; VÁSQUEZ, E.N.O.; CAMBEROS, E.P.; VÁSQUEZ, R.S.; CARVANTES, E.L. Antimicrobial and antioxidant activities of Mexican oregano essential oils (*Lippia graveolens* H. B. K.) with different composition when microencapsulated in β -cyclodextrin. **Letters in Applied Microbiology**, vol. 50, p. 585-590, 2010.
- SCHERER, R.; WAGNER, R.; DUARTE, M.C.T.; GODOY, H.T. Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.11, n.4, p.442-449, 2009.
- SILVESTRI, J. D. F.; PAROUL, N.; CZYEWski, E.; LERIN, L.; ROTAVA, I.; CANSIAN, R. L.; MOSSI, A.; TONIAZZO, G.; OLIVEIRA, D. de; TREICHEL, H. Perfil da composição química e atividades antibacteriana e antioxidante do óleo essencial do cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata* Thunb.). **Revista Ceres**, v. 57, n. 5, p. 589-594, 2010.

- TSAI, T.H.; TSAI, P.J.; SU, S.C. Antioxidant and antiinflammatory activities of several commonly used spices. **Journal of Food Science**, v.70, n.1, p.93-97, 2005.
- UGALDI, L.M. Biofilmes Ativos com Incorporação de Óleos Essenciais, **Exame de Qualificação de Doutorado**. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, 2013.
- VALENTÃO, P.; FERNANDES, E., CARVALHO, F.; ANDRADE, P. B.; SEABRA, R. M.; BASTOS, M. L. Antioxidative properties of cardoon (*Cynara cardunculus* L.) infusion against superoxide radical, hydroxyl radical, and hypochlorous acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, n.17, p.4989- 93, 2002.
- VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, MT.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.39, p.44-84, 2007.
- VICENTINO, A.R. R.; MENEZES, F.S. Atividade antioxidante de tinturas vegetais, vendidas em farmácias com manipulação e indicadas para diversos tipos de doenças pela metodologia do DPPH. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n.3, p. 384-387, 2006.
- VIUDA-MARTOS, M.; RUIZ-NAVAJAS, Y.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; & PÉREZ-ALVAREZ, J. A. Spices as functional foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.51, n.1, p.13-28, 2011.
- WANG, S.Y.; LIN, H.S. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry and strawberry varieties from different cultivar and development stage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington DC., v.48, n.1, p.140-146, 2000.
- WANG, W.; WU, N.; ZU, Y.G.; FU, Y.J. Antioxidative activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to its main components. **Food Chemistry**, v. 108, p. 1019-1022, 2007.
- YANISHLIEVA, N.V.; MARINOVA, E.M.; POKORNY, J. Natural antioxidants from herbs and spices. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.108, n.9, p.776-93, 2006.
- ZHANG, H.; CHEN, F.; WANG, X.; YAO, H-Y. Evaluation of antioxidant activity of parsley (*Petroselinum crispum*) essential oils and identification of its antioxidants constituents. **Food Research International**, v. 39, p. 833-839, 2006.

CAPÍTULO V

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO ÓLEO DE CRAVO-DA-ÍNDIA FRENTE À
*Artemia salina***

5. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo será apresentada uma revisão sobre o estado da arte no que concerne à toxicidade das plantas medicinais e dos óleos essenciais.

5.1.1 Toxicidade das plantas medicinais

Sabe-se que a medicina, ao longo dos tempos, sempre lançou mão das plantas medicinais como recurso natural. O uso popular dessas plantas comprova que há uma gama quase infinita de aplicações curativas e preventivas e que o conhecimento popular e científico é imprescindível para se obterem os resultados desejados (LIMA *et al.*, 2007).

Apesar de serem denominadas plantas medicinais, podem apresentar toxicidade de acordo com a utilização, com o tempo de tratamento, com a forma de preparo, entre outros fatores. Sendo assim, o cuidado com a utilização é imprescindível e de suma importância no controle dos possíveis efeitos adversos e colaterais que o uso crônico e/ou agudo pode acarretar no organismo (AMARAL & SILVA, 2008).

Assim, a investigação do potencial tóxico de plantas medicinais pode elucidar importantes aspectos farmacológicos de seus princípios naturais, permitindo uma utilização segura, respeitando seus possíveis riscos toxicológicos (AMARAL & SILVA, 2008).

Para tanto, os testes de toxicidade aguda são elaborados com o objetivo de prever os efeitos tóxicos ou de averiguar a toxicidade relativa das substâncias (FORBES & FORBES, 1994).

Os efeitos tóxicos podem ser classificados relativamente ao período que se verificam os efeitos, isto é, toxicidade aguda ou crônica. A toxicidade aguda provoca uma resposta rápida num curto período de tempo (por convenção de poucas horas ou poucos dias), provocando geralmente uma elevada mortalidade. Na toxicidade crônica, os efeitos se manifestam num longo período de tempo (de semanas a meses) (DIAS *et al.*, 2002).

Os testes agudo-letais são usados para avaliar efeitos em organismos aquáticos selecionados numa exposição curta, de 24 a 96 horas, a várias concentrações do composto a testar. Os resultados de toxicidade aguda letal são normalmente representados por Concentração Média Letal, ou seja, CL₅₀ (BAROSA *et al.*, 2003).

5.1.2 Toxicidade do óleo essencial de cravo-da-índia

O cravo-da-índia, amplamente consumido pela espécie humana por via oral, através da culinária, pode apresentar graves efeitos tóxicos pela ingestão em doses inadequadas, como descrito por Lane *et al.* (1991), Brown *et al.* (1992) e Hartnoll *et al.* (1993), incluindo depressão do sistema nervoso central e coma, anormalidades urinárias, lesões hepáticas e distúrbios de coagulação.

O eugenol e o óleo de cravo-da-índia quando adicionados à composição de produtos de higiene pessoal e perfumes, demonstram boa tolerabilidade em contato com a pele, com baixa alergenicidade. Segundo Rothenstein *et al.* (1983), estes aspectos facilitam o desenvolvimento de um fitomedicamento para uso tópico para a pele. No caso de uso na odontologia, ou seja, na cavidade bucal, deve-se levar em consideração a possibilidade de reações adversas uma vez que se trata de contato do produto com mucosas (ROTHENSTEIN *et al.*, 1983).

O uso de produtos restauradores a base de eugenol merece cuidados por parte da odontopediatria já que o risco de ingestão é maior e o baixo peso do indivíduo aumenta o risco. Hartnoll *et al.* (1993) descrevem a ingestão acidental de óleo de cravo-da-índia por uma criança, resultando em coma, coagulopatias e lesão hepática aguda, observando que em estágios tardios a intoxicação produziu um quadro similar à overdose de paracetamol. Brown *et al.* (1992) descrevem caso de coagulação intravascular disseminada e necrose hepato celular provocado pela ingestão de óleo de cravo-da-índia em uma criança de dois anos.

O eugenol quando manipulado com o óxido de zinco resulta em material restaurador para vedação de cavidades dentárias abertas (OLIVEIRA & JOSÉ, 2007; AGRA *et al.*, 2008). Apesar do uso frequente na odontologia, o eugenol é neurotóxico e irritante das mucosas, especialmente quando administrado em doses inadequadas (ALONSO, 1998). A CL₅₀ do óleo essencial de cravo-da-índia em ratos, por via oral, foi estabelecida em 2.650 mg/kg, e, em humanos, a estimativa de dose diária máxima permitida de eugenol é de 2,5 mg/kg (ALONSO, 1998). Do ponto de vista toxicológico, toda substância pode ser considerada um agente tóxico, dependendo das condições de exposição: dose administrada ou absorvida, tempo e frequência de exposição e vias de administração (BARROS & DAVINO, 1996).

Wright *et al.* (1995) estudaram o efeito da injeção intravenosa de eugenol em ratos como causa de edema pulmonar não-cardiogênico, de fisiopatologia pulmonar

desconhecida. A injeção em doses de 4 e 8 µL (6,52 mol/L) causaram dificuldade respiratória aguda por edema pulmonar hemorrágico.

A hipersensibilidade cutânea do eugenol e do óleo de cravo-da-índia foi testada por Rothenstein *et al.* (1983) observando-se a reação local da pele. A amostra foi obtida entre 11.632 emplastos com eugenol, utilizados em consumidores de produtos que contêm eugenol ou óleo de cravo-da-índia. A hipersensibilidade induzida e a sensibilização pré-existente foram testadas nas concentrações de 0,05 e 0,09%, respectivamente. O resultado indicou que o eugenol puro ou como parte do óleo de cravo-da-índia, mesmo na concentração encontrada nos produtos de consumo, tem baixo potencial de desencadear reações alérgicas por sensibilização prévia ou de induzir hipersensibilidade.

Daniel *et al.* (2009) avaliaram as atividades antiinflamatória e antinociceptiva do eugenol, administrado oralmente, em modelos experimentais *in vivo*. Os dados obtidos indicaram que o eugenol apresenta atividade antiinflamatória e antinociceptiva periférica.

5.1.3 Determinação da toxicidade com *Artemia salina*

Compostos bioativos são quase sempre tóxicos em altas doses. Desta maneira, a avaliação da letalidade em um organismo animal menos complexo pode ser usada para um monitoramento simples e rápido.

Os organismos-teste selecionados para os ensaios de toxicidade são escolhidos de acordo com a sua abundância, com a facilidade de se manter ou de se cultivar em laboratório, com a sua representatividade no ecossistema, com a sua sensibilidade, e com a disponibilidade de informação suficiente (FERREIRA, 2001).

A utilização de bioensaios para o monitoramento da bioatividade de extratos, frações e compostos isolados de plantas tem sido frequentemente incorporada à pesquisa fitoquímica. Dentre estes ensaios biológicos, encontra-se o ensaio de toxicidade com *Artemia salina* (BST-Brine Shrimp Test) que foi desenvolvido para detectar compostos bioativos em extratos vegetais (MEYER *et al.*, 1982; NOLDIN *et al.*, 2003).

O ensaio de letalidade para larvas de *Artemia salina* tem sido introduzido na rotina de muitos grupos de pesquisa envolvidos com isolamento, purificação e elucidação estrutural, já que muitos laboratórios de fitoquímica não estão preparados

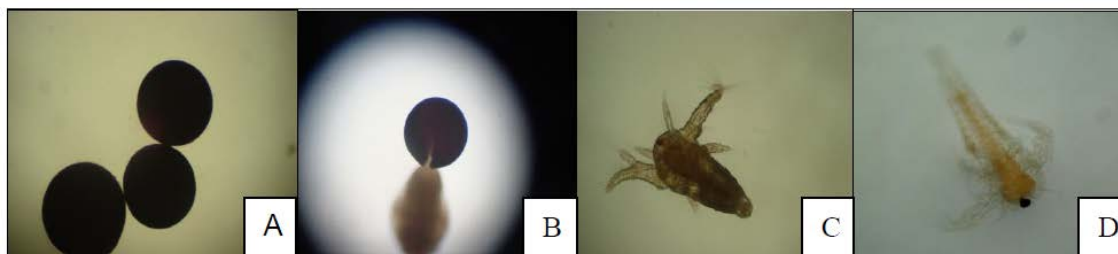
para a realização de ensaios biológicos (McLAUGHLIN, 1991; FALKENBERG *et al.*, 1999; MACIEL *et al.*, 2002; RUIZ *et al.*, 2005).

A *Artemia salina* é um invertebrado que, quando na forma de larva, possui de 8 a 10 mm de comprimento, pertence ao filo *Artrophoda*, classe *Crustacea*, subclasse *Brachiopoda*, ordem *Anostraca* e família *Artemiidae*. É conhecida popularmente como “camarão de salmoura” e internacionalmente como *brine shrimp* e é amplamente usado como alimento para peixes (RABÊLO, 2010).

Os cistos de *Artemia salina* são de baixo custo e facilmente encontrados no comércio, além de permanecerem viáveis por anos no estado seco (MEYER *et al.*, 1982).

Outro importante fator que contribui para a utilização desta metodologia em testes de toxicidade é o fato de este crustáceo ser de fácil cultivo e poder viver por mais de quatro meses, possuindo quatro estágios de desenvolvimento: náuplio, metanáuplio, pré-adulto e adulto (Figura 23) (BARBIERE-JUNIOR & NETO, 2001; RABÊLO, 2010).

Figura 23. Fases de desenvolvimento do microcrustáceo *Artemia salina* (A: ovos; B: eclosão do ovo; C: náuplio; D: metanáuplio).



Fonte: RABÊLO, 2010.

O teste de letalidade com *Artemia salina* L. é um método simples na pesquisa de produtos naturais (MEYER *et al.*, 1982), que possui uma boa correlação com testes de toxicidade aguda oral *in vivo* (PARRA *et al.*, 2001). O procedimento determina valores de concentração letal média (CL₅₀), em µg/mL, de compostos e extratos, sendo que inúmeras substâncias ativas conhecidas apresentam toxicidade por este teste (MEYER *et al.*, 1982). Essas vantagens contribuíram para a popularização do bioensaio, sobretudo a partir da década de 90.

O ensaio foi proposto inicialmente por Michael *et al.* (1956), Thompson e posteriormente desenvolvido por Vanhaecke *et al.* (1981), bem como por Sleet &

Brendel (1983), baseando-se na possibilidade de imobilizar náuplios de *Artemia salina* em culturas laboratoriais (CARBALLO *et al.*, 2002). A metodologia admite variações. Solis *et al.* (1993) propõem a realização deste ensaio em microplacas ao invés de tubos e sugerem a utilização do ensaio também na triagem de novos fármacos antiespasmódicos e antimaláricos. Esta metodologia tem sido empregada ainda para detectar toxicidade preliminar de algas marinhas (ARA *et al.*, 1999), realizar triagem de toxinas fúngicas (HARWIG & SCOTT, 1971), avaliar efeitos de exposição a metais pesados (MARTINEZ *et al.*, 1999), pesticidas (BARAHONA & SÁNCHEZ-FORTÚN, 1999) e para testes de toxicidade em materiais dentários (PELKA *et al.*, 2000). Carballo *et al.* (2002) compararam extratos de produtos marinhos com o ensaio de letalidade com larvas de *A. salina* e quanto à citotoxicidade em 2 linhagens de células humanas. Segundo os autores, os resultados apresentam uma boa correlação, tal como já estabelecido para extratos de plantas (McLAUGHLIN, 1991), sugerindo que este bioensaio seja utilizado para testar produtos naturais marinhos com potencial atividade farmacológica.

Os grupos de defesa dos direitos dos animais têm realizado manifestações contra o uso destes em ensaios pré-clínicos, tanto para a avaliação farmacológica como de toxicidade. Estes grupos têm estimulado o desenvolvimento de técnicas *in vitro*, que não envolvam o sacrifício de animais. Estes ensaios alternativos vêm contribuindo não só pela questão ética, mas também minimizando os custos de ensaios *in vivo*.

Rabêlo (2010) avaliou a toxicidade do óleo essencial de cravo-da-índia e do seu componente majoritário eugenol utilizando a metodologia baseada em Meyer *et al.* (1982) e em Nascimento & Araújo (1999) e encontrou valores de 1µg/mL e 18,53µg/mL para o óleo essencial de cravo-da-índia e para o eugenol, respectivamente.

Costa *et al.* (2008) avaliaram a atividade antibacteriana, a toxicidade e identificou os componentes químicos do óleo essencial de *Croton zehntneri* (variedade estragol), planta utilizada na medicina popular como calmante e estimulante do apetite. A avaliação da toxicidade foi realizada frente à *Artemia salina* e apresentou um valor de ($CL_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$), resultado considerado ativo.

Os testes de toxicidade animal, como o bioensaio com *Artemia salina*, são válidos, pois os efeitos produzidos por um composto nos animais de laboratório são aplicáveis ao homem. Com base na dose por unidade de superfície corporal, os efeitos tóxicos no homem estão consideravelmente nos mesmos limites que os observados nos

animais de laboratório, sendo possível descobrir possíveis riscos nos humanos (KLASSEN *et al.*, 2001).

A avaliação da bioatividade de extratos de plantas, medida pela toxicidade frente *Artemia salina*, pode fornecer informações valiosas ao trabalho de químicos de produtos naturais e farmacólogos, indicando fontes vegetais com importantes atividades biológicas. Neste contexto, a utilização de bioensaios para o monitoramento da bioatividade de óleos essenciais, extratos, frações e compostos isolados de plantas vem crescendo consideravelmente nos laboratórios de pesquisa em nível mundial como método alternativo para o uso de animais de laboratório.

A avaliação da toxicidade, seja ela aguda ou crônica, é fundamental para determinação da segurança na utilização de qualquer produto para uso humano ou veterinário, independente do produto ser natural ou sintético. A ideia de que produtos naturais não causam efeitos indesejáveis já foi, há muito tempo, abolida no meio científico e necessita também ser no meio popular (MACIEL, 2005).

Diante dessa realidade, este capítulo teve por objetivo avaliar a toxicidade aguda do óleo essencial de cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus*) antes e após a esterificação. Para tanto, foi utilizado o ensaio de letalidade com o microcrustáceo *Artemia salina*.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1 Toxicidade: bioensaio de letalidade para larvas de *Artemia salina*

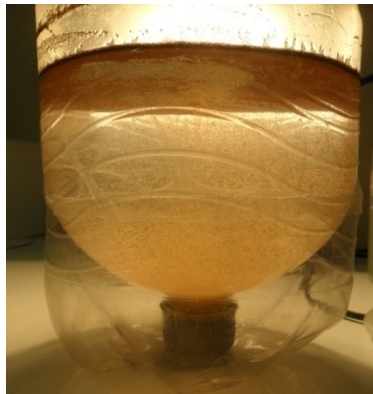
Foi utilizada a metodologia descrita por Meyer *et al.* (1982) com algumas modificações. Meyer *et al.* (1982) avaliou a citotoxicidade de quarenta e um compostos naturais nas concentrações de 10, 100 e 1000µg/mL utilizando para o teste uma solução de água destilada e uma mistura comercial de sais na dosagem apropriada para o desenvolvimento do microcrustáceo.

5.2.2 Incubação

Os cistos de *Artemia salina* foram colocados em um recipiente plástico com solução salina artificial (23g de sal marinho/1 litro de água destilada/0,7g de bicarbonato de sódio) com iluminação artificial, sob aeração e controle da temperatura

(20-30°C) para a eclosão dos ovos (Figura 24) e após 24 h de incubação, as larvas foram retiradas para o ensaio por sucção com o auxílio de uma pipeta.

Figura 24. Recipiente plástico para a eclosão dos ovos



5.2.3 Preparo das diluições e incubação das larvas com o material

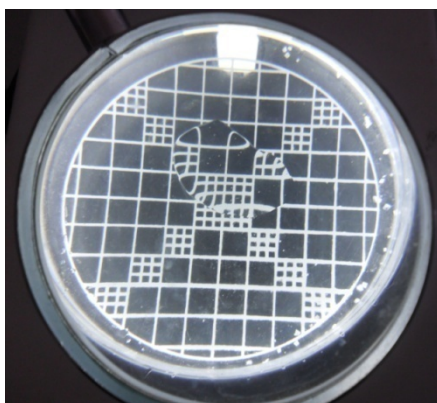
Após o período de incubação, os organismos-testes (náuplios de *Artemia salina*) foram expostos a diferentes concentrações dos dois produtos a serem testados (óleo de cravo-da-índia, e acetato de eugenila) por 24 horas, utilizando-se tubos de ensaio, cada um contendo cerca de 10 náuplios de *Artemia salina*, nas 10 diferentes concentrações, cada uma em triplicata constituindo um ensaio.

Determinou-se a faixa de concentração a ser testada (correspondente à concentração de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 µg/mL), buscando sempre a maior concentração em que se observasse 0 % de mortalidade e a menor concentração em que se deflagrasse 100 % de mortalidade, de modo a obter a DL₅₀; 24 h (dosagem letal para 50 % da população em 24 h) dos compostos testados. As soluções dos compostos a serem testadas foram preparadas em 2 % de DMSO (dimetilsulfóxido) e avolumadas com solução salina artificial (preparada anteriormente). Os testes para o controle também foram realizados em triplicata, utilizando-se uma solução de DMSO 2% diluído em solução salina. Os controles foram utilizados também para se ter certeza de que a mortalidade observada dos náuplios de *Artemia salina* fosse resultante da toxicidade aos compostos e não devido à falta de alimentação (CARBALLO *et al.*, 2002).

5.2.4 Contagem das larvas

Após 24 h de exposição, foi realizada a contagem de náuplios vivos e mortos, sendo considerados vivos todos aqueles que apresentassem qualquer tipo de movimento quando observados próximos a uma fonte luminosa por 10 segundos (Figura 25). Só foram considerados válidos os testes nos quais o controle apresentou uma mortalidade igual ou inferior a 10 % da população. Os resultados foram submetidos a tratamento estatístico utilizando a regressão linear, o qual forneceu os valores de DL₅₀; 24 h.

Figura 25. Contagem de náuplios vivos e mortos.



5.2.5 Determinação da toxicidade

A avaliação do efeito das variadas concentrações de óleo essencial de cravo-da-índia e do éster acetato de eugenila adicionadas ao meio foi determinada.

Após o tempo de exposição das larvas nas amostras, que foi de 24 horas, foram realizadas as contagens dos elementos vivos. A toxicidade à *Artemia salina* foi determinada através da concentração letal 50 % (DL₅₀), que corresponde à dose em que 50% dos microcrustáceos morrem. A DL₅₀ foi calculada a partir do gráfico do percentual de animais mortos (Equação 2) contra o logaritmo das doses ensaiadas. Esse valor foi verificado através do método de regressão linear.

$$\% \text{ mortalidade} = 100 - (IVm \times 100) / CNm \quad (2)$$

Onde:

CNm: média do controle negativo;

IVm : média de indivíduos vivos por concentração após 24h.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como teste de triagem, os ensaios com *Artemia salina* estão se destacando na indicação de atividade antitumoral. A literatura vem trazendo correlações entre a toxicidade geral com esse microcrustáceo e a citotoxicidade diante de linhagens de células humanas de tumores sólidos (McLAUGHLIN, 1991). Segundo McLaughlin, (1991), o fato de se trabalhar com organismos relativamente simples torna mais fácil a indução de um retardo ou paralisação do ciclo celular normal por provocar alteração do processo mitótico.

McLaughlin (1991) observou uma ótima correlação entre o teste de toxicidade frente *Artemia salina* e o teste de citotoxicidade, usando células 9K (carcinoma humano de nasofaringe) e a partir desses resultados, utilizou o teste de *Artemia salina* como pré-screening para testes de citotoxicidade com seis linhagens de células tumorais sólidas humanas. Este autor observou que a ED₅₀ (dose eficiente 50%) nos testes de citotoxicidade é geralmente em torno de um décimo da DL₅₀ encontrada no teste com esse microcrustáceo.

Os resultados referentes à toxicidade do óleo essencial do cravo-da-índia antes e após a esterificação estão apresentados na Tabela 12.

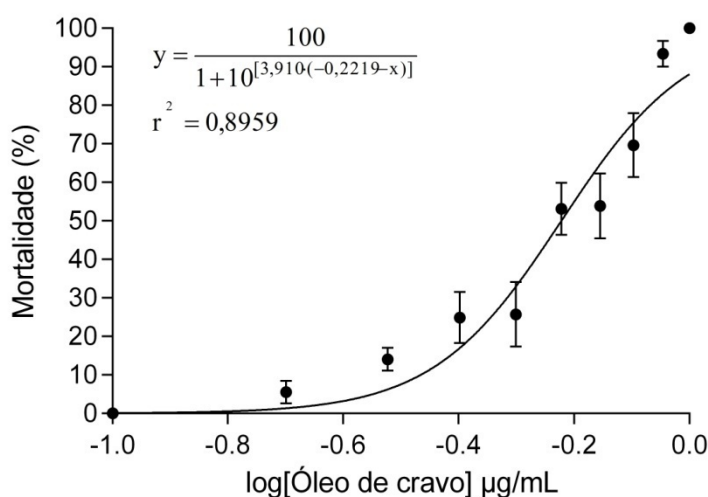
Tabela 12 - Mortalidade média de *Artemia salina* de acordo com as concentrações do óleo essencial do cravo-da-índia e do éster acetato de eugenila.

Concentração (µL/mL)	Média de náuplios mortos (%)	
	Óleo	Éster
0,1	0,0±0,0	37,8±3,8
0,2	15,0±3,1	80,2±9,5
0,3	14,1±6,3	100±0,0
0,4	24,9±16,3	100±0,0
0,5	25,7±13,7	100±0,0
0,6	53,2±14,1	100±0,0
0,7	45,6±20,0	100±0,0
0,8	69,7±19,8	100±0,0
0,9	93,3±7,1	100±0,0
1,0	100±0,0	100±0,0

Os resultados demonstram que o percentual de mortalidade aumenta proporcionalmente à concentração de óleo e acetato de eugenila adicionado, atingindo os valores máximos de 100%, de mortalidade para a concentração de 1,0 µg/mL.

Após a identificação da faixa de concentração, a CL₅₀ do óleo essencial de *Caryophyllus aromaticus*, antes e após a reação, foram determinados como mostram as Figura 26 e 27, respectivamente.

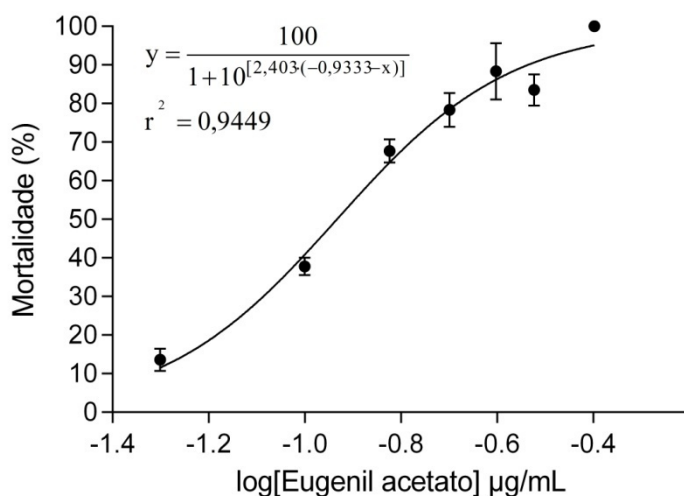
Figura 26 - Curva de calibração da toxicidade do óleo essencial do cravo-da-índia antes da esterificação.



Para o óleo essencial de cravo-da-índia, a correlação entre a mortalidade (%) e o logaritmo da concentração de óleo utilizado ($Y = 100 / 1 + 10^{[3,910.(-0,2219-x)]}$) com $R^2 = 0,8959$ forneceu um DL₅₀ de 0,5993 µg/mL, valor próximo ao encontrado por Rabêlo (2010), de 1µg/mL na avaliação da toxicidade do óleo essencial de cravo-da-índia frente *Artemia salina* utilizando a mesma metodologia.

No mesmo trabalho, Rabêlo (2010) avaliou a toxicidade do eugenol e encontrou o valor de DL₅₀ de 18,53µg/mL, e associou a maior toxicidade do óleo em relação ao eugenol ao possível efeito sinérgico entre os outros componentes do óleo essencial.

Figura 27 - Curva de calibração da toxicidade do óleo essencial do cravo-da-índia após a esterificação.



Para o óleo essencial após a esterificação, a correlação entre a mortalidade (%) e o logaritmo da concentração de óleo utilizado ($Y = 100 / (1 + 10^{[2,403 \cdot (-0,9333 - x)])}$) com $R^2 = 0,9449$ forneceu um DL_{50} de 0,1178 µg/mL.

Analisando os valores de DL_{50} antes e após a reação, pode-se observar um aumento na toxicidade após a reação. Ambas as concentrações encontradas, tanto para o óleo antes como depois da esterificação, indicam toxicidade do óleo e de seu éster.

O critério de classificação do óleo do cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus*) frente *Artemia salina* com base nos valores das DL_{50} foi estabelecido por Donabela (1997), sendo definido como $DL_{50} \leq 80$ µg/mL, o produto é altamente tóxico; DL_{50} entre 80 a 250 µg/mL, o produto é moderadamente tóxico e $DL_{50} \geq 250$ µg/mL, o produto é levemente tóxico ou atóxico (MEYER *et al.*, 1982) utilizam o critério de avaliação em que considera a amostra tóxica ou ativa as que apresentarem $DL_{50} < 1000$ µg/mL e amostras atóxicas ou inativas as que apresentarem $DL_{50} > 1000$ µg/mL.

A dose letal a 50 % (DL_{50}) do óleo essencial do cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus*) antes e após a esterificação a partir do teste de toxicidade frente à *Artemia salina*, foi igual a 0,5993 µg/mL para o óleo e 0,1178 µg/mL para o éster, avaliando os graus de letalidade dos produtos considera-se ambos altamente tóxicos de acordo com Dolabella (1997).

Em todo o mundo, a utilização doméstica de plantas com fins medicinais, são hábitos comuns na cultura popular. Porém, seu uso no combate aos mosquitos transmissores de doenças parece ser a grande novidade em vigilância entomológica. As plantas, como organismos que co-evoluem com insetos e outros microorganismos e que, portanto, desenvolvem mecanismos de defesa contra predadores, são fontes naturais de substâncias inseticidas e antimicrobianas. Estas também sintetizam inúmeros compostos voláteis para atrair polinizadores e se defenderem de herbívoros (Simas *et al.*, 2004).

A dengue é hoje a arbovirose mais importante no mundo e o seu controle está restrito, basicamente, ao combate do principal vetor, o *Aedes aegypti*. As ações têm sido por inseticidas químicos sintéticos. Estes possuem ação rápida e eficaz no combate, porém são altamente tóxicos aos mamíferos e ao meio ambiente. Seu uso tem induzido ao desenvolvimento de resistência do mosquito. Produtos naturais provenientes de plantas e os bioinseticidas poderão ser candidatos alternativos às medidas de controle pela baixa toxicidade aos mamíferos e sem impacto ambiental (BARRETO, 2005).

Os valores de CL₅₀ encontrados tanto para o óleo quanto para o éster oferecem uma alternativa para o controle químico contra *Aedes aegypti* L., pois o valor de CL₅₀ de 0,5993 µg/mL para o óleo e 0,1178 µg/mL para o éster encontrados em nosso trabalho são superiores ao encontrado para o óleo essencial de *Vanillosmopsis arborea* Baker (DL₅₀ de 15,9 mg/mL) considerado o óleo com maior potencial larvicida na pesquisa realizada por Furtado *et al.* (2005), e superior também ao do óleo essencial de *O. gratissimum* L. (DL₅₀ de 95,80 mg/mL).

Uma questão ainda mais séria se refere ao impacto ambiental. Devido à existência de populações do mosquito resistentes aos produtos sintéticos, um número maior de aplicações são utilizadas de forma irracional, de modo que, cada vez mais quantidades desses produtos são colocados na natureza causando grandes estragos. Um bom exemplo disto foi o uso do DDT (diclorodifeniltricloroetano), um inseticida do grupo dos organoclorados, que foi utilizado com grande sucesso a partir dos anos 40, no combate ao mosquito vetor da malária e em pragas agrícolas. Durante décadas, o produto foi largamente usado no país até ser comprovado seu potencial cancerígeno e seu extenso tempo de degradação (4 a 30 anos). O principal problema do DDT é sua ação indiscriminada, que atinge tanto os insetos quanto o resto da fauna e flora da área afetada (D'AMATO *et al.*, 2002). Deste modo, os altos potenciais tóxicos frente ao microcrustáceo *Artemia salina* tanto do óleo essencial quanto do éster nos levam a

acreditar num possível e eficaz efeito bioinseticida de ambos os produtos com menores potenciais de agressão ao meio ambiente.

5.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Tendo em vista a grande cultura no que se refere à utilização de plantas no tratamento de doenças, estudos referentes à toxicidade de compostos naturais são certamente muito importantes, pois além da informação sobre a toxicidade nos permite correlacionar com outros estudos como, por exemplo, com atividade antifúngica e antimicrobiana. Segundo os resultados encontrados neste trabalho, à primeira vista, o óleo essencial de cravo-da-índia continua sendo a melhor opção para a aplicação em alimentos. No entanto, esta pesquisa abre novas possibilidades, como por exemplo, a descoberta de um produto de origem natural com alta toxicidade que pode ser utilizado no controle biológico de organismos como *Aedes aegypti*.

5.5 REFERÊNCIAS

- AGRA, M.F.; SILVA, K.N.; BASÍLIO, I.J.L.D.; FRANÇA, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, p.472-508, 2008.
- ALONSO, J.R. Tratado de fitomedicina - bases clínicas y farmacológicas. **Buenos Aires: ISIS Ediciones**, p.990-991, 1998.
- AMARAL, E.A.; SILVA, R. M. G. Avaliação da Toxidade Aguda de Angico (*Anadenanthera falcata*), pau-santo (*Kilmeyera coreacea*), aroeira (*Myracrodruon urundeuva*) e cipó-de-são-joão (*Pyrostegia venusta*), por meio do bioensaio com *Artemia salina*. **Perquirere**, n. 5. 2008.
- ARA, J.; SULTANA, V.; EHTESHAMUL-HAQUE, S.; QASIM, R.; AHMAD, V.U. Cytotoxic activity of marine macro-algae on *Artemia salina* (brine shrimp). **Phytotherapy Research**, v.13, p. 304-307, 1999.
- BARAHONA, M.V.; SÁNCHEZ-FORTÚN, S. Toxicity of carbamates to the brine shrimp *Artemia salina* and the effect of atropine, BW284c51, iso-OMPA and 2-PAM on carbaryl toxicity. **Environ Pollut**, v.104, p. 469-476, 1999.
- BARBIERE-JUNIOR, R. C.; NETO, A. O. Camarões marinhos: reprodução, maturação e larvicultura. Viçosa, MG: Ed. **Aprenda fácil**, v. 1, 2001.

BARRETO, C.F. "Aedes aegypti resistência aos inseticidas químicos e as novas alternativas de controle." **Revista Eletrônica Faculdade Montes Belos**, v.1, p. 62-73, 2005.

BAROSA, J.; FERREIRA, A.; FONSECA, B.; SOUSA, I. Teste de toxicidade do ião cobre para *Artemia salina*. **Manual de Biologia Marinha e Pescas da Faculdade de Ciências do Mar e de Ambiente**, novembro de 2003.

BARROS, S.B.M.; DAVINO, S.C. Avaliação da toxicidade. In: Oga, S. **Fundamentos de Toxicologia**. 1.ed. São Paulo: Atheneu, 1996.

BROWN, S.A.; BIGGERSTAFF, J.; SAVIDGE, G.F. Disseminated intravascular coagulation and hepatocellular necrosis due to clove oil. **Blood Coagulation & Fibrinolysis**, v.3, p. 665-668, 1992.

CARBALLO, J.L.; HERNÁNDEZ-INDA, Z.L.; PÉREZ, P.; GARCÍA-GRÁVALOS, M.D. A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. **BMC Biotechnology**, v. 2, n. 17, p. 1-5, 2002.

COSTA, J.G.M da; RODRIGUES, F.F.G.; ANGÉLICO, E.C.; PEREIRA, C.K.B.; SOUZA, E.O.de; CALDAS, G.F.R.; GERMANA, F.R.; SILVA, M.R.; NARA, K.A.; MOTA, M.L.; SANTOS, P.F.dos. Composição química e Avaliação da atividade antibacteriana e toxicidade do Óleo essencial de *Croton zehntneri* (variedade estragol). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.4, p. 583-586, 2008.

DANIEL, A.N.; SARTORETTO, S.M.; SCHMIDT, G.; CAPARROZ-ASSEF, S.M.; BERSANI-AMADO, C.A.; CUMAN, R.K.N. Antiinflammatory and antinociceptive activities of eugenol essential oil in experimental animal models. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, p.212-217, 2009.

D'AMATO, C.; TORRES, J.P.M.; MALM, O. DDT (Dicloro Difenil Tricloroetano): Toxicidade e contaminação ambiental – uma revisão. **Química Nova**, v. 25, p. 995-1002, 2002.

DIAS, A.; AIRES, C.; SILVA, M.; CATARINO, R. Testes de Toxicidade em *Artemia salina*: contaminantes (K₂CrO₇) e efluentes químicos (tratados e não tratados). **Universidade do Algarve**, 2002.

DOLABELLA, M.E. Triagem in vitro para a atividade antitumoral e anti-*T. cruzi* de extratos vegetais, produtos naturais e sintéticos. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, p. 128, 1997.

FALKENBERG, M.; BAUMGARTEN, D.; SIMIONATO, C. Screening of some Brazilian medicinal plants with the brine shrimp assay. **Acta Horticulturae**, v.502, p. 401-404, 1999.

FERREIRA, C. (2001). Material de apoio às aulas de Ecotoxicologia da licenciatura de Engenharia do Ambiente. **FCMA, Universidade de Algarve, Faro**, 2001.

FORBES, V.E.; FORBES, T.L. Ecotoxicology in Theory and Practice. **Chapman and Hall**, Londres, p.247, 1994.

FURTADO, R.F.; LIMA, M.G.A.; NETO, M.A.; BEZERRA, J.N.S.; SILVA, M.G.V. Atividade larvicida de óleos essenciais contra *Aedes aegypti* L.(Diptera: Culicidae). **Neotropical Entomology**, v.34, n.5, p. 843-847, 2005.

HARTNOLL, G.; MOORE, D.; DOUEK, D. Near fatal ingestion of oil of cloves. **Archives of disease in childhood**, v.69, p. 392-393, 1993.

HARWIG, J.; SCOTT, P. Brine shrimp (*Artemia salina*) larvae as a screening system for fungal toxins. **Applied and Environmental Microbiology**, v.21, p. 1011-1016, 1971.

KLASSEN, C.O.; WATKINS, J.B. **Toxicologia, a ciência básica dos tóxicos de Casarett e Doull's**. 5º ed. Editora McGraw-Hill de Portugal, 2001.

LANE, B.W.; ELLENHORN, M.J.; HULBERT, T.V.; MC CARRON, M. Clove oil ingestion in an infant. **Human & experimental toxicology**, v. 10, p. 291-294, 1991.

LIMA, S. M. G.; LIMA, A.F.; DONAZZOLO, J. Resgate do conhecimento popular e uso de plantas medicinais na promoção da saúde em Sananduva – RS. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v.2, n.1, fev. 2007.

MACIEL, A.A.B. Atividade antimicrobiana da própolis e geoprópolis contra periodontopatógenos. **Dissertação de Mestrado em Ciências da Saúde**. Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2005.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA JR, V.F. Plantas Medicinais: a necessidade de estudos interdisciplinares. **Química Nova**, v. 25, p. 429-438, 2002.

MARTINEZ, M.; DEL RAMO, J.; TORREBLANCA, A.; D'IAZ-MAYANS, J. Effect of cadmium exposure on zinc levels in the brine shrimp *Artemia partenogenetics*. **Aquaculture**, v.172, p.315-325, 1999.

MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M. de; CASTELLANI, D.C.; DIAS, J.E. **Plantas Medicinais**. Universidade Federal de Viçosa – Minas Gerais, 1995.

McLAUGHLIN, J.L. Crown gall tumours on potato discs and brine shrimp lethality: two simple bioassays for higher plant screening and fractions. In: Dey PM, Harbone JB (ed.) **Methods in Plant Biochemistry**, p.1-32, 1991.

MEYER, B.N.; FRERRIGNI, N.R.; PUTNAM, J.E.; JACOBSEN, L.B.; NICHOLS, D.E.; McLAUGHLIN, J.L. Brine Shrimp: A Convenient GERAL Biosay for Active Plant Constituents. **Journal of Medicinal Plant Research**, v.45, p. 31-34, 1982.

MICHAEL, A.S.; THOMPSON, C.G.; ABRAMOVITZ, M. *Artemia salina* as a test organism for a bioassay. **Science**, v.123, p.464-468, 1956.

NASCIMENTO, I.A.; ARAÚJO, M.M.S. Testes ecotoxicológicos marinhos: análise de sensibilidade. **Ecotoxicology and Enviromental Restoration**, v.2, n.1, p. 41-47, 1999.

NOLDIN, V.F.; CECHINEL, F.; VALDIR, M.; FRANCO, D. Chemical composition and biological activities of the leaves of *Cynara scolymus* L. (artichoke) cultivated in Brazil. **Química Nova**, São Paulo, v.26, n.3, p.331-334, 2003.

OLIVEIRA, S. M. M.; JOSE, V. L. Processos de extração de óleos essenciais. Dossiê Técnico da Sociedade Brasileira de Respostas Técnicas. **Instituto de Tecnologia do Paraná**, Setembro, 2007.

PARRA, A.L.; YHEBRA, R.S.; SANDIÑAS, I.G.; BUELA, L.I. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium letal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. **Phytomedicine**, v.8, p. 395-400, 2001.

PELKA, M.; DANZL, C.; DISTLER, W.; PETSCHLT, A. A new screening test for toxicity testing of dental materials. **Journal of Dental Research**, v. 28, p.341-345, 2000.

RABÊLO, W.F. Caracterização química, Toxicidade e avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial do cravo da índia (*Syzygium aromaticum*). **Dissertação de Mestrado em Química Analítica**. Universidade Federal do Maranhão, 2010.

ROTHENSTEIN, A.S.; BOOMAN, K.A.; DORSKY, J.; KOHRMAN, K.A.; SCHWOEPPE, E.A.; SEDLAK, R.I.; STELTENKAMP, R.J. Eugenol and clove leaf oil. A survey of consumer patchtest sensitization. **Food and Chemical Toxicology**, v.21, p.727-733, 1983.

RUIZ, A.L.T.G.; MAGALHÃES, E.G.; MAGALHÃES, A.F.; FARIA, A.D.; AMARAL, M.C.E.; SERRANO, D.R.; ZANOTTI-MAGALHÃES, E.M.; MAGALHÃES, L.A. Avaliação da atividade tóxica em *Artemia salina* e *Biomphalaria glabrata* de extratos de quatro espécies do gênero *Eleocharis* (Cyperaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, p. 98-102, 2005.

SIMAS, N.K.; LIMA, E.C.; CONCEIÇÃO, S.R.; KUSTER, R.M.; FILHO, A.M.O. Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue – atividade larvicida de *Myrozylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. **Química Nova**, v. 27, p. 46-49, 2004.

SLEET, R.B.; BRENDDEL, K. Improved methods for harvesting and counting synchronous

populations of *Artemia nauplii* for use in developmental toxicology. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 7, p. 435-446, 1983.

SOLIS, P.N.; WRIGHT, C.W.; ANDERSON, M.M.; GUPTA, M.P.; PHILLIPSON, J.D. A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina*. **Planta Médica**, v.59, p. 250-252, 1993.

VANHAECKE, P.; PERSOONE, G.; CLAUS, C.; SORGELOOS, P. Proposal for a short-term toxicity test with *Artemia nauplii*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.5, p. 382-387, 1981.

WRIGHT, S.E.; BARON, D.A.; HEFFNER, J.E. Intravenous eugenol causes hemorrhagic lung edema in rats: proposed oxidant mechanisms. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v.125, p. 257-264, 1995.

6. CONCLUSÕES

A proposta inicial desta pesquisa foi a produção enzimática do Ester acetato de eugenila e a avaliação de algumas propriedades biológicas do éster produzido, bem como do óleo essencial de cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus*), precursor do produto formado. A proposta central da pesquisa foi alcançada com êxito, sendo que altas conversões foram encontradas com a metodologia proposta no trabalho. No que se refere às propriedades biológicas, as técnicas utilizadas permitiram-nos encontrar resultados coerentes com os apresentados na literatura. O aumento da atividade antioxidante nos trouxe interessantes perspectivas para uma possível aplicação do éster em alimentos. Os ensaios da avaliação da toxicidade frente à *Artemia Salina* permitiram descobrir um produto produzido através de uma tecnologia limpa e de uma metodologia simples, que possui alto nível de toxicidade frente a este microcrustáceo, fator importante no que diz respeito a uma futura aplicação do éster no controle biológico de insetos.

Dentre estas conclusões também pode-se citar outras mais específicas:

- A metodologia analítica se mostrou eficaz na quantificação dos ésteres produzidos pela reação de esterificação utilizando a enzima Novozym 435 como catalisador.
- O presente trabalho permitiu avaliar a influência da razão molar ácido: álcool, concentração de enzima e temperatura na conversão do processo.
- Sobre as reações enzimáticas, pôde-se concluir que as condições maximizadas para produção do éster com ácido anidrido acético (99,87%) são: temperatura, 60°C; concentração de enzima, 10% (m/m); razão molar álcool: ácido 5:1.
- Na avaliação do efeito da razão molar pode ser observado que usando razão molar 5:1 em 2 horas de reação à conversão é praticamente completa (~95%). O rendimento máximo de produção de eugenil acetato (~100%) foi alcançado em 5 horas de reação para razões molares 5:1 e 3:1.
- A concentração de enzima não apresentou efeito significativo na produção de eugenil acetato. Altos valores de conversão foram alcançados em menores concentrações de enzima, tendo em vista que na primeira hora de reação, a maior conversão foi obtida em menor concentração de enzima de 1% (24 horas).

- A temperatura apresentou efeito significativo, maiores conversões foram obtidas em maiores temperaturas.
- O mais alto valor encontrado para a atividade antimicrobiana de eugenil foi observada contra *Enterococcus faecalis* (13,33mm) na concentração de 20µL/mL.
- Na avaliação dos resultados da Concentração Inibitória Mínima (CIM), observou-se que o óleo essencial de cravo-da-índia apresentou melhor desempenho que o éster eugenil acetato, atingindo uma média de 3,25 µL/mL para bactérias Gram-positivas e 3,5 µL/mL para Gram-negativas.
- Após a esterificação, observou-se uma diminuição efetiva dos valores de atividade antimicrobiana atingindo uma média de 26 µL/mL para bactérias Gram-positivas e 39 µL/mL para Gram-negativas, a Concentração Inibitória Mínima (CIM) aumentou após a esterificação.
- Após a esterificação, observou-se uma diminuição efetiva dos valores de atividade antifúngica, a Concentração Inibitória Mínima (CIM) aumentou após a esterificação para os três fungos testados.
- O percentual antioxidante aumenta proporcionalmente a concentração de óleo adicionado atingindo o valor máximo de 81,59% de atividade antioxidante para a concentração de 500 µg/mL.
- A atividade antioxidante aumentou após a esterificação, resultando numa alteração do IC₅₀ de 367,5 µg/mL para 283,5 µg/mL após a esterificação.
- O percentual de mortalidade aumenta proporcionalmente à concentração de óleo e acetato de eugenila adicionado, atingindo os valores máximos de 93,3 e 100%, respectivamente, de mortalidade para a concentração de 1,0 µg/mL.
- Analisando os valores de DL₅₀ antes (DL₅₀ = 0,5993 µg/mL) e após a reação (DL₅₀ = 0,1178 µg/mL), pode-se observar um aumento na toxicidade após as mesmas. Ambas as concentrações encontradas, tanto para o óleo antes como depois da esterificação, indicaram toxicidade do óleo e de seu éster.

CAPÍTULO VII

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

7. SUGESTÕES

- Avaliar a atividade antioxidante do óleo e do éster *in vivo* utilizando *Artemia salina*.
- Avaliar o potencial antifúngico em grãos armazenados.
- Avaliar o efeito larvívoro frente a larvas de mosquitos transmissores de doenças.
- Avaliar a estabilidade do éster.
- Avaliar as propriedades sensoriais do éster.
- Avaliar a atividade da enzima após ciclos consecutivos de utilização.

APENDICE A