



**UNIVERSIDADE DA INTEGRAÇÃO INTERNACIONAL DA LUSOFONIA
AFRO-BRASILEIRA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE ENGENHARIA E DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL
MESTRADO ACADÊMICO EM SOCIOBIODIVERSIDADE E TECNOLOGIAS
SUSTENTÁVEIS (MASTS)**

BRUNNA ANGELICA EVARISTA DA SILVA

**BIOSINTESE DE DERIVADOS DO ÓLEO ESSENCIAL CRAVO-DA-INDIO
Syzygium aromaticum POR PROCESSO BIOCATALITICO REALIZADO COM
Saccharomyces cerevisiae.**

REDENÇÃO – 2019

BRUNNA ANGELICA EVARISTA DA SILVA

Dissertação de mestrado submetida à coordenação do Programa de Pós-Graduação em Sociobiodiversidade e Tecnologias Sustentáveis da Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Sociobiodiversidade e Tecnologias Sustentáveis.

Área de concentração: Tecnologias e Desenvolvimento Sustentável. **Linha de pesquisa:** Tecnologias Sustentáveis

Orientadora: Prof. Dr. Aluísio Marques da Fonseca

Co-orientadora: Profa. Dra. Regilany Paulo Colares

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira
Sistema de Bibliotecas da UNILAB
Catalogação de Publicação na Fonte.

Silva, Brunna Angelica Evarista da.

S696b

Biosíntese de derivados do óleo essencial cravo-da-índia *Syzygium aromaticum* por processo biocatalítico realizado com *Saccharomyces cerevisiae* / Brunna Angelica Evarista da Silva. - Redenção, 2020.

67f: il.

Dissertação - Curso de Sociobiodiversidade e Tecnologias Sustentáveis, Mestrado Acadêmico em Sociobiodiversidade e Tecnologias Sustentáveis, Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Redenção, 2020.

Orientador: Prof. Dr. Aluisio Marques da Fonseca.

Coorientador: Profa. Dra. Regilany Paulo Colares.

1. *Aedes aegypti*. 2. Cravo-da-india. 3. Biosíntese. 4. Antioxidante. I. Título

CE/UF/BSP

CDD 547

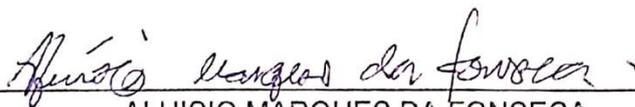
BRUNNA ANGELICA EVARISTA DA SILVA

BIOSINTESE DE DERIVADOS DO ÓLEO ESSENCIAL CRAVO-DA-INDIO *Syzygium aromaticum* POR PROCESSO BIOCATALITICO REALIZADO COM *Saccharomyces cerevisiae*

Dissertação apresentada ao Mestrado Acadêmico em Sociobiodiversidade e Tecnologias Sustentáveis (MASTS) da Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (Unilab), como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre. Área de concentração: Sociobiodiversidade e Tecnologias Sustentáveis.

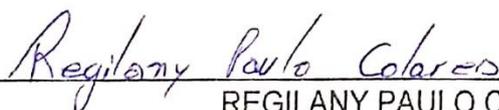
Aprovada em: 05/09/2019

BANCA EXAMINADORA



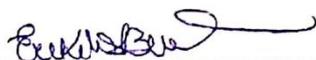
ALUISIO MARQUES DA FONSECA

Universidade da Integração internacional da Lusofonia Afro-brasileira
(UNILAB - Presidente) – ORIENTADOR



REGILANY PAULO COLARES,

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-brasileira
(UNILAB - Examinadora Externa ao Programa)



ERIKA HELENA SALLES DE BRITO

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-brasileira
(UNILAB - Examinadora Externa ao Programa)

AGRADECIMENTOS

Á Deus, por me fortalecer em meios as adversidades e por colocar pessoas incríveis no meu caminho e comigo compartilhar essa jornada.

A minha mãe, **Jacinta Rodrigues** por ser essa mulher guerreira e forte que me conduziu e me deu força para conquistar meus objetivos e sempre acreditar em mim.

Agradeço ao meu companheiro Hocélio Filho por todo amor, carinho e companheirismo durante todo esse processo, obrigada por me incentivar a buscar meus sonhos e nunca me deixar desistir.

Agradeço a Luiz Inácio Lula da Silva (#LulaLivre) pela criação da Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB) onde vivi momentos de grandes aprendizados.

Ao Mestrado Acadêmico em Sociobiodiversidade e Tecnologia Sustentável na pessoa do Professor Dr. Juan Carlos Alvarado pela oportunidade que, sem dúvida, transformou minha vida pessoal e profissional.

Agradeço imensamente ao meu orientador Professor Dr. Aluísio Marques pelo acolhimento, incentivo e por acreditar em meu trabalho. Sou imensamente grata por tudo que me ensinou nesta caminhada. Agradeço também a minha co-orientadora professora Dra. Regilany pelo incentivo e por me dar a chance de contribuir. Eu sou imensamente grata a Deus pela vida de vocês e por tudo que me repassaram nessa estadia pela UNILAB.

Agradeço a professora Erika Helena por me orientar nos trabalhos no laboratório de Microbiologia. Suas contribuições foram de grande valia e a Dra. Olienaide Ribeiro por participar da banca e me repassar contribuições valiosas.

Agradeço de forma especial à professora Dra. Oscarina Viana e Cristiane Teles do Laboratório de Microbiologia do Mar e do Pescado (LAMAP) pela gentileza de ceder as cepas utilizadas neste trabalho, como também ao Laboratório de Entomologia Médica do Departamento de Medicina Legal por ceder as larvas dos mosquitos da dengue na pessoa do Glautemberg. Ambos da Universidade Federal do Ceará – UFC.

Aos técnicos do laboratório da Unilab pelos auxílios neste trabalho, como também ao Grupo Interdisciplinar em Química (GIQ) nas pessoas de Ícaro, Luthierre, Lutuíma, Iesa, Raimundo e Aurecio e todos os outros membros por toda ajuda e apoio nos processos deste trabalho.

Agradeço de forma bastante especial ao meu amigo Rubson Mateus por toda ajuda e companheirismo durante esse processo, saiba que você foi uma peça chave para a concretização desse sonho. Sou imensamente grata a Deus por sua vida.

Não poderia deixar de prestar meus agradecimentos a todos os meus amigos do Projeto CONSAN – CPLP, projeto esse que me concedeu uma bolsa e me ajudou a permanecer na universidade desempenhando meus trabalhos, obrigada professora Jaqueline Sgarbi, Meyre Cruz e Amanda Leal por todo apoio.

Agradeço de forma bastante especial às minhas amigas que caminharam e compartilharam comigo esse sonho e acreditaram no meu potencial: Ana Isabel Pinheiro, Prycilla Oliveira, Rozangela Pedroza e Ariane Ferreira, a vocês, minha eterna gratidão.

Aos meus amigos Willame, Moisés e Rafael por estarem ao meu lado no momento mais difícil dessa caminhada.

Por fim, agradeço a todos os professores desse programa de mestrado como também aos meus colegas, que compartilharam momentos inesquecíveis durante esses dois anos.

Gratidão!

RESUMO

Há muito tempo os produtos de origem vegetal como os extratos e os óleos e essenciais têm sido empregados em diversas aplicações na medicina popular. O óleo essencial dos botões florais do cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), extraído por hidrodestilação, tem como constituinte mais abundante o eugenol ou 4-alil-2-metoxifenol que apresenta atividades biológicas como, anti-inflamatória, cicatrizante, analgésica, antioxidante, antitumoral, inseticida, antibacteriana, entre outros. Tendo em vista a necessidade de novas alternativas terapêuticas e as diversas atividades biológicas apresentadas pelo óleo essencial do *S. aromaticum*, o objetivo desta pesquisa, Realizar a síntese e identificação de derivados do óleo essencial *Syzygium aromaticum* obtido em processo biocatalítico com *Saccharomyces cerevisiae* com o intuito de desenvolver novos compostos e verificar sua capacidade antioxidante, atividade inibitória da enzima Acetilcolinesterase (AChE), verificar sua toxicidade frente à *Artemia salina*, bem como sua capacidade larvicida ante ao *Aedes aegypti*. Testar a atividade antimicrobiana perante as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Para a extração do óleo essencial do cravo-da-índia utilizou-se 130,3 gramas de botões florais do *S. aromaticum* e 1000mL de água destilada em sistema extrator de Clevenger acoplado a um balão de fundo redondo de 5000mL. Após extração do óleo foi tratado e armazenado para análise. A solubilidade do óleo em etanol foi de 1:2, o índice de refração foi de 1,5345. A aparência e o odor foram considerados típicos. Obteve-se 7,29g de óleo, fornecendo um rendimento de 3,63 %. A capacidade antioxidante foi realizada pelo método de DPPH e apresentou resultado inibitório satisfatório de 66,66%. O resultado sob a inibição da enzima Acetilcolinesterase foi positivo. Apresentou toxicidade frente a *A. salina* e capacidade larvicida sobre o mosquito da Dengue. A atividade antibacteriana do óleo essencial do cravo foi realizada pelo método de difusão de disco. Através do teste de antibiograma realizado constatou-se que o óleo apresentou atividade contra as bactérias *S. aureus* e *E. coli*, seguindo a classificação dos padrões de sensibilidade. Os produtos formados no processo biocatalítico realizado com *Saccharomyces cerevisiae* foram Acetato de chavicol (0,73%), N,N,N',N'-tetraetil-1,2-difenil-etano-1,2-diamina (31,24), Hexadecanoato de metila (1,15%), z-6-octadecenoato de metila (0,83%), Octadecanoato de metila (0,58), Z-9-octadecenoato de etila (0,47).

Palavras Chaves: Biocatalise. Antioxidante. *Aedes aegypti*. *Artemia salina*. Antibiograma.

ABSTRACT

Plant-based products such as extracts and oils and essentials have long been employed in various applications in folk medicine. The essential oil of the flower buds of the clove (*Syzygium aromaticum*), extracted by hydrodistillation, has as its most abundant constituent eugenol or 4-allyl-2-methoxyphenol which presents biological activities such as anti-inflammatory, healing, analgesic, antioxidant, antitumor, insecticide, antibacterial, among others. In view of the need for new therapeutic alternatives and the various biological activities presented by *S. aromaticum* essential oil, the aim of this research is to perform the synthesis and identification of *Syzygium aromaticum* essential oil derivatives obtained in a biocatalytic process with *Saccharomyces cerevisiae* and to verify their effectiveness. Antioxidant capacity, inhibitory activity of the enzyme Acetylcholinesterase (AChE), verify its toxicity against *Artemia salina*, as well as its larvicidal capacity against *Aedes aegypti*. Test antimicrobial activity against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* bacteria. To extract the essential oil of clove, 130.3 grams of *S. aromaticum* flower buds and 1000mL of distilled water were used in Clevenger extraction system coupled to a 5000mL round bottom flask. After extraction the oil was treated and stored for analysis. The oil solubility in ethanol was 1: 2, the refractive index was 1.5345. Appearance and odor were considered typical. 7.29g of oil was obtained, yielding a yield of 3.63%. The antioxidant capacity was performed by the DPPH method and presented satisfactory inhibitory result of 66.66%. The result under inhibition of the enzyme Acetylcholinesterase was positive. It presented toxicity against *A. salina* and larvicidal capacity on Dengue mosquito. The antibacterial activity of the clove essential oil was performed by the disc diffusion method. The antibiogram test showed that the oil showed activity against *S. aureus* and *E. coli* bacteria, following the classification of the sensitivity patterns. The products formed in the biocatalytic process performed with *Saccharomyces cerevisiae* were Chavicol acetate (0.73%), N, N, N', N'-tetraethyl-1,2-diphenyl-ethane-1,2-diamine (31,24), Methyl hexadecanoate (1.15%), methyl z-6-octadecenoate (0.83%), methyl octadecanoate (0.58), ethyl Z-9-octadecenoate (0.47).

Key words: Biocatalysis. Antioxidant. *Aedes aegypti*. *Artemia salina*. Antibiograma

LISTA DE FIGURAS

Figura 1– (A) Árvore (B) botões florais ainda não abertos (C) botões secos	21
Figura 2 - Formula estrutural do eugenol	22
Figura 3 – Botões Florais do Cravo-da-Índia	29
Figura 4 - Metodologia de extração de óleo essencial do <i>Syzygium aromaticum</i>	30
Figura 5 - Teste Antioxidante pelo método de captura de DPPH	32
Figura 6- Atividade Inibitória de AChE	34
Figura 7 – Bioensaio de Toxicidade com <i>Artemia Salina</i>	35
Figura 8 - Atividade larvicida do óleo essencial <i>Syzygium aromaticum</i> frente ao <i>Aedes aegypti</i>	37
Figura 9 - Preparo do Inoculo e sementeira	38
Figura 10 - Sementeira das culturas bacterianas.....	39
Figura 11 - Ensaio Biocatalítico com estirpe de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	40
Figura 12 - Curva de calibração da atividade antioxidante do óleo essencial do <i>Syzygium aromaticum</i>	43
Figura 13 - Reações envolvidas no método de Ellman	44
Figura 14- Regressão linear do percentual de larvas mortas e vivas após exposição do óleo essencial do cravo- da-índia 24h	48
Figura 15 - Padrão de Halo para <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 e <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 utilizando discos de Cloranfenicol.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Teor de óleo essencial e de eugenol do cravo-da-índia	23
Tabela 2 - Concentração das soluções do utilizado no teste de DPPH.....	32
Tabela 3 – Concentrações utilizadas para o teste de toxicidade.....	36
Tabela 4 – Concentrações utilizadas no teste larvicida com <i>Aedes aegypti</i>	37
Tabela 5 – Parâmetros físico-químicos do óleo essencial de <i>Syzygium aromaticum</i>	41
Tabela 6 – Porcentagem de inibição do DPPH (%) em diferentes concentrações	42
Tabela 7 – Atividade Inibitória da AChE frente ao óleo essencial do <i>Syzygium aromaticum</i>	44
Tabela 8 – Porcentagem de mortalidade por concentração do óleo essencial <i>Syzygium aromaticum</i>	45
Tabela 9 – Concentrações testadas frente ao <i>Aedes aegypti</i> Erro! Indicador não definido.	
Tabela 10 – Mortalidade das larvas de 3 e 4 estágios de <i>Aedes aegypti</i> após 24h.....	47
Tabela 11 – Classificação dos padrões de sensibilidade de diferentes óleos essenciais	49
Tabela 12 – Resultado da Concentração Mínima Inibitória do óleo essencial do cravo-da-índia ($\mu\text{L}/\text{mL}$).	50

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Teores e estruturas dos constituintes do óleo de <i>Syzygium aromaticum</i> identificados e quantificados por Cromatografia Gasosa antes do processo biocatalítico	52
Quadro 2 - Porcentagem dos compostos identificados na composição do óleo essencial de <i>Syzygium aromaticum</i> descrito na literatura	53
Quadro 3 - Teores e estruturas dos constituintes do óleo de <i>Syzygium aromaticum</i> identificados e quantificados por Cromatografia Gasosa após a biocatálise.....	54

LISTA DE SIGLAS

ACh – Acetilcolina

AChE – Acetilcolinesterase

ATCI – Iodeto de acetilcolina

BD – Caldo batata

CCD – Cromatografia de Camada Delgada

CEPLAC – Comissão Executiva do Plano de Lavoura Cacaueira

CG-EM – Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectro de Massa

CL₅₀ – Concentração Letal

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute

C₁₀H₁₂O₂ - Eugenol

CO₂ – Dióxido de Carbono

DL₅₀ – Dose Letal

DMSO – Dimetil Sulfóxido

DPPH - 2,2-difenil-1-picrilhidrazila

DTNB - Ácido 5,5' – Ditiobis - 2 - nitrobenzóico

IC₅₀ – Concentração Inibitória Mínima

ISO - International Organization for Standardization

LAMAP - Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado

pH – Potencial Hidrogeniônico

PPM – Partes por Milhão

Na₂SO₄ - Sulfato de sódio anidro

NI – Não Inibiu

SNC - Sistema Nervoso Central

SNP - Sistema Nervoso Periférico

UFC – Universidade Federal do Ceará

UNILAB - Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-brasileira

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1 Óleos Essenciais	17
2.2 Processos de Extração	20
2.3 Cravo-da-Índia (<i>Syzygium aromaticum</i>)	20
2.4 Eugenol.....	21
2.5 Bioatividade do Eugenol	23
2.6 Bicatálise	26
3 OBJETIVO GERAL	28
3.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS	28
4 METODOLOGIA	28
4.1 Obtenção dos botões florais do cravo-da-índia extração, tratamento e armazenamento do óleo essencial.	29
4.2 Caracterização físico-química do óleo essencial do <i>Syzygium aromaticum</i>	31
4.3 Teste Antioxidante	31
4.4 Atividade inibitória da AChE frente ao óleo essencial <i>Syzygium aromaticum</i>	33
4.5 Bioensaio de Toxicidade com <i>Artemia salina</i>	34
4.6 Teste larvicida frente as larvas de mosquito da dengue (<i>Aedes Aegypti</i>).....	36
4.7 Testes da Atividade Antibacteriana pelo Método da Difusão em Discos	38
4.8 Ensaio Biocatalítico.....	39
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
6 CONCLUSÃO	55
REFERÊNCIAS.....	57

1 INTRODUÇÃO

A progressiva busca por produtos seguros e ambientalmente corretos tem ampliado o interesse entre os pesquisadores nos produtos naturais, pois estes possuem propriedades que podem ser aplicadas na medicina, indústria farmacêutica, petroquímica, cosméticos, defensivos, inseticidas e entre outras. O uso de produtos naturais é tão antigo quanto a humanidade. O homem em busca da cura de enfermidades passou a utilizar produtos vegetais em forma de infusão ou como condimentos. Através deste uso informal de produtos naturais, os primórdios realizaram grandes descobertas que hoje se tornaram o centro dos estudos da química e da medicina moderna. (PEREIRA; CARDOSO, 2012)

Devido à grande importância dos produtos vegetais para o tratamento de diversas doenças, a química e a medicina desenvolveram rapidamente os seus campos específicos para identificar e potencializar as substâncias bioativas, a partir de seus derivados e consequentemente introduzi-las em tratamentos terapêuticos. (PEREIRA; CARDOSO, 2012)

A obtenção de derivados de produtos naturais através de reações químicas com a finalidade de ampliar determinado efeito terapêutico e/ou minimizar algum efeito colateral de substâncias medicamentosas no organismo é um dos meios mais utilizadas na obtenção de novos compostos com potencial farmacológicos, industriais e entre outros (SILVA, 2017).

Nos últimos anos os microrganismos, principalmente bactérias, fungos e leveduras, receberam atenção especial por parte da indústria e dos pesquisadores em produtos naturais. Os avanços obtidos no campo da biotecnologia, aliado ao emprego de técnicas modernas na busca por novos protótipos bioativos, têm revelado seu enorme potencial em fornecerem compostos com atividade biológica ou com alguma característica estrutural que leve a isso (VIEGAS-JR; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

Além do seu uso na indústria farmacêutica, esses microrganismos vêm sendo bastante utilizados em indústrias de enzimas, vitaminas, pigmentos, lipídeos e glicolipídeos dentre outras aplicações biotecnológicas (ADRIO et. al., 2003).

Entre os microrganismos (fungos e bactérias) os fungos são os mais usados, pois apresentam as seguintes vantagens: ciclo de vida curto; possuem um sistema enzimático rico e de fácil manipulação, reciclagem de cofatores necessários nas reações enzimáticas, disponibilidade de enzimas e cofatores do próprio sistema biológico do microrganismo,

atividade enzimática estável e são completamente biodegradados. Esta técnica traz inúmeras vantagens por estar em consonância com os princípios da química verde e contribuir para o avanço da sustentabilidade.

Além das reações químicas convencionais empregadas para produção das mais diversas substâncias com as mais diversas finalidades, outra técnica, também seguida há muito tempo, tem demonstrado enorme potencial para obtenção de produtos químicos de interesse, principalmente fármacos, tendo sua utilização ampliada nas últimas décadas. Trata-se da tecnologia enzimática ou Bicatálise, que utiliza catalisadores biológicos de fontes naturais variadas (animal, vegetal, microbiana), na síntese de substâncias opticamente puras e ativas (DICOSIMO, MCAULIFFE, et al., 2013) (YOUSEFIA, MOHAMMADI e HABIBIC, 2014) (MEZTLER, FAIT, et al., 2014).

Bicatálise, também conhecida como biotransformação, é um objeto de estudo da biotecnologia que utiliza o potencial catalítico de organismos vivos (microrganismos, vegetais, etc), células de plantas ou enzimas isoladas, para obtenção de produtos de interesse comercial. O uso de microrganismos nesses processos tem sido amplamente utilizado na indústria farmacêutica, agrícola, petroquímica e outras. Um biocatalizador bastante interessante para esse campo da ciência é a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, um dos biocatalisadores mais versáteis e baratos. A facilidade de manuseio, que não requer nenhum cuidado especial, o faz alvo de escolha quando se deseja conduzir reações de oxidação-redução. É preferencialmente utilizado na forma de célula inteira, ao invés de enzimas isoladas, evitando dessa forma, o problema da dificuldade de reciclar o cofator, um passo necessário quando se usa a enzima pura (D'ARRIGO, 1997).

Um dos principais substratos utilizados nessas reações são os metabolitos secundários, mais precisamente os óleos essenciais, pois apresentam uma série de atividade de interesse farmacológico. Os óleos essenciais oferecem compostos de partida para sínteses de substâncias úteis nas indústrias química, farmacêutica e alimentícia (SIMÕES; SPITZER, 2000).

Devido às diversas propriedades apresentadas por esses óleos. O potencial antimicrobiano e antioxidante se destaca entre essas propriedades, o qual tem sido extensivamente estudado. Dentre os óleos essenciais, o de *Syzygium aromaticum* apresenta propriedades biológicas interessantes para aplicação na indústria de alimentos, farmacêutica, cosméticos e inseticidas. Popularmente conhecida por suas propriedades medicinais e muito usada como condimento na culinária, devido ao seu marcante aroma e sabor, conferidas, principalmente, por um composto fenólico volátil, o eugenol. Este composto chega a

representar 95% do óleo extraído das folhas e 85% nos botões florais. Outros componentes do óleo essencial são o acetato de eugenila e o β -cariofileno que, juntos com o eugenol, somam cerca de 99% do conteúdo total (RAINA, 2001; ATTOKARAN, 2011). Diversos estudos indicam que o cravo-da-índia apresenta atividades antimicrobiana, antioxidante, antimutagênica (MIYAZAWA, 2003), anti-inflamatória (KIM et al., 1998), antiulcerogênica (LI et al., 2005), anticarcinogênica (ZHENG; KENNEY; LAM, 1992) e antiparasitas (YANG et al., 2003). Alguns autores atribuem as atividades benéficas ao seu composto majoritário, o eugenol, caracterizado pela baixa solubilidade e estabilidade (HE et al., 2007; CAMPANIELLO; CORBO; SINIGAGLIA, 2010; DEVI et al., 2010).

O eugenol é uma substância presente em várias espécies vegetais que tem sido utilizado pela medicina tradicional para o combate à várias enfermidades e usado em odontologia para procedimentos cirúrgicos dental. Entre as várias atividades biológicas apresentadas por essa substância, a capacidade em capturar radicais livres e o potencial antimicrobiano.

Nesse contexto, o presente trabalho visa realizar a biosíntese de derivados do óleo essencial do cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) utilizando como biocatalizador estirpes de *Saccharomyces cerevisiae*, como também testar a capacidade antioxidante, antimicrobiano, DL_{50} com *Artemia salina* e o potencial de inibição da acetilcolinesterase (AChE) do óleo essencial do cravo-da-índia.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Óleos Essenciais

Durante muito tempo, a comunidade científica acreditou que os metabólitos secundários produzidos pelas plantas simplesmente não possuíam nenhuma utilidade para seus produtores. Muitos estudos, entretanto, demonstraram que essas substâncias não só têm uma função como sua presença é muitas vezes fundamental para o desenvolvimento do indivíduo (KUTCHAN, 2001).

As substâncias bioativas são provenientes do metabolismo secundário que se desenvolve somente em espécies naturais. O metabolismo secundário é resultante de várias reações anabólicas e catabólicas das estruturas celulares; este processo metabólico é derivado do metabolismo primário que origina os metabólicos primários indispensáveis a vida celular (carboidratos, proteínas, aminoácidos e ácidos nucléicos) e que são provenientes das vias fotossintéticas e respiratórias. (DELBONE; LANDO, 2010)

Um bom exemplo são os óleos essenciais, que são substâncias oriundas do metabolismo secundário das plantas. Estes óleos podem ser definidos como uma mistura de compostos voláteis originados do metabolismo secundário de plantas (BASER e DEMIRCI, 2007)

Eles ocorrem em várias espécies de plantas, em suas diferentes partes, como botões, pétalas de flores, cascas, folhas, caules, sementes, raízes e cascas de resina ou frutas (RATHORE, 2017). Estes compostos possuem aroma e/ou sabor característico, sendo constituídos majoritariamente por terpenos ou seus derivados, responsáveis por evitar injúrias ocasionadas por agentes externos, e apresentando atividade antimicrobiana reconhecida (FELIPE; BICAS, 2017).

A Organização Internacional de Padronização (*International Organization for Standardization* - ISO), na sua Reunião Plenária realizada em março de 1968, em Lisboa, definiu óleos essenciais como sendo óleos voláteis, geralmente odoríferos, que ocorrem em certas plantas ou partes especificadas de plantas e que são obtidos por destilação por arraste a vapor d'água ou por prensagem dos pericarpos de frutos cítricos (limão, laranja, etc). Por outro lado, o Ministério da Saúde, no seu Decreto nº 50040, de 24 de janeiro de 1961, estabeleceu como sendo óleo essencial o produto aromático, sávido, volátil, sob a forma oleosa, extraído de vegetais (MONTEIRO, 2004).

A investigação dos óleos essenciais levou ao descobrimento de hidrocarbonetos isoméricos denominados terpenos, porém os óleos essenciais são misturas muito complexas e muito variáveis em seus constituintes, sendo encontrados somente os terpenos mais voláteis,

dentre os quais se destacam aqueles de baixo peso molecular, como os monoterpenos com 10 átomos de carbonos em sua estrutura e os sesquiterpenos com 15 átomos de carbono (DORAN & BROPHY, 1990). Além de mono- e sesquiterpenos, fenilpropanóides são comumente encontrados em óleos essenciais. (GORDINHO, 2012; CRAVEIRO, QUEIROZ, 1993).

Os fenilpropanóides formam-se a partir do ácido chiquímico, que forma as unidades básicas dos ácidos cinâmico e p-cumárico. Esses últimos, por meio de reduções enzimáticas produzem propenilbenzenos e/ou alilbenzenos e, por meio de oxidações com degradação das cadeias laterais, geram aldeídos aromáticos. Ciclizações enzimáticas intramoleculares produzem cumarinas (SIMÕES E SPITZER, 2003).

São misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, odoríferas e líquidas. Também são chamados de óleos etéreos ou essências. Estes termos se referem à aparência oleosa a temperatura ambiente, daí a designação “óleo”.

Os componentes de óleos essenciais geralmente possuem ponto de ebulição relativamente alto (>150 °C), mas evaporam em temperatura ambiente. Devido a essa peculiaridade são caracterizados como compostos voláteis. O fenômeno pode ser explicado pela alta pressão de vapor desses compostos. Quanto maior a pressão de vapor de um composto, mais rapidamente ele passará para a fase de vapor. Devido à volatilidade, sua característica principal, os óleos essenciais diferenciam-se dos óleos fixos, misturas lipídicas obtidas geralmente de sementes (TELES, 2003).

Outras características dos óleos essenciais são: além da aparência oleosa à temperatura ambiente; possuem aroma agradável e intenso da maioria dos óleos; solubilidade em solventes orgânicos apolares. Em água apresentam solubilidade limitada, mas suficiente para aromatizar as soluções aquosas, que são denominadas hidrolatos, sabor geralmente ácido e picante, cor quando recentemente extraídos são geralmente incolores ou ligeiramente amarelados.

São poucos os óleos que apresentam cor, como o óleo volátil de camomila de coloração azulada pelo seu alto teor de azuleno; estabilidade: em geral não são muito estáveis, principalmente na presença de ar, calor, luz, umidade e metais; a maioria possui índice de refração e são opticamente ativos; seus constituintes variam desde hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas, e até compostos com enxofre. (LUPE, 2007).

Na mistura, tais compostos apresentam-se em diferentes concentrações, normalmente, um deles é o composto majoritário, existindo outros em menores teores e alguns em baixíssimas quantidades ou traços (LUPE, 2007).

É interessante notar que os óleos essenciais (óleos vegetais voláteis) se diferem quimicamente dos óleos vegetais fixos e dos minerais. Os primeiros são misturas de terpenos oxigenados, juntos com outros tipos de compostos orgânicos. Já os óleos vegetais fixos são ésteres da glicerina com ácidos graxos de longas cadeias. Enquanto que os últimos óleos citados são parafinas líquidas misturadas a outros hidrocarbonetos de peso molecular elevado (MONTEIRO, 2004).

Geralmente a composição química de um óleo essencial extraído de uma mesma espécie vegetal pode variar significativamente, de acordo com, por exemplo, a época de coleta, condições climáticas, tipo de solo, quimiotipos e ciclo vegetativo. (SIMÕES & SPITZER, 2003). No que diz respeito aos métodos de extração dos óleos essenciais, os mesmos variam de acordo com a região da planta em que ele se encontra, bem como com a proposta de utilização dos mesmos. Os mais comuns são: enfloração, arraste por vapor d'água, extração com solventes orgânicos, prensagem (ou expressão) e extração por CO₂ supercrítico. Sendo que fatores extrínsecos como a influência do clima e solo dos locais de cultivo podem ocasionar variações nos teores e nas composições químicas dos óleos essenciais (MOUCHREK FILHO, 2000).

Cerca de 3000 óleos essenciais são conhecidos, dos quais 300 possuem importância comercial, especialmente para as indústrias farmacêutica, de alimentos, agrônômica, sanitários, indústrias de cosméticos e perfumes (BAKKALI et al., 2008). O Brasil tem lugar de destaque na produção de óleos essenciais, ao lado da Índia, China e Indonésia, que são considerados os 4 grandes produtores mundiais (BIZZO et al., 2009).

Os estudos com plantas aromáticas já são bastante disseminados no mundo todo e tem sido utilizada com os mais variados fins pelo homem, como por exemplo, alguns estudos relacionando seus constituintes majoritários e minoritários, com efeitos combinados ou não, e sua ação sobre os mais variados patógenos (MOUCHREK FILHO, 2000; MATOS; SOUSA; OLIVEIRA, 2004).

Esses produtos naturais, além de apresentarem características físico-químicas significativas com alto valor agregado, promovem uma sustentabilidade ecológica importante, demonstrando ainda consideráveis atividades biológicas como ações antioxidantes, anticancerígenas (ADORJAN; BUCHBAUER, 2010), larvicidas (VORIS et al., 2017), acaricidas (SOUZA et al., 2016), bactericidas (SOUZA et al., 2016), inseticidas (TRIPATHI et al., 2009) e antifúngicas (BRITO et al., 2015).

2.2 Processo de Extração

Há diversos métodos de extração de óleos essenciais, os principais são a arraste a vapor, extração com solvente lipofílico e com fluído supercrítico com dióxido de carbono (CO₂). O método mais empregado por centros de pesquisa e pela indústria é a destilação por arraste a vapor (VAN DE BRAAK & LEIJTEN, 1999). O método de extração pode influenciar significativamente a composição química do óleo essencial, devendo ser selecionado de acordo com a finalidade da utilização do óleo. Por exemplo, para a utilização como perfumes, é preferível a extração com solventes lipofílicos e algumas vezes com dióxido de carbono supercrítico, que são metodologias mais brandas (BAKKALI et al., 2008). Para este trabalho, o método de extração utilizado foi o de hidrodestilação.

2.3 Cravo-da-Índia (*Syzygium aromaticum*)

A árvore *Syzygium aromaticum* (L.) comumente conhecida como cravo da Índia, tem origem nas Ilhas das Molucas, arquipélago situado na Indonésia, sendo uma das especiarias mais antigas e valiosas do oriente (DUARTE, 2014).

Pertence à família *Myrtaceae*, é uma árvore de grande porte, chegando a atingir de 12 a 15 m de altura e o seu ciclo vegetativo alcança mais de cem anos. As folhas são semelhantes às do louro, ovais, opostas e de coloração verde brilhante, com numerosas glândulas de óleo visíveis contra a luz. As flores são pequenas, branco-amareladas, agrupadas em cachos terminais. O fruto é do tipo baga e de formato alongado, suculentos, vermelhos e comestíveis, possui aroma forte e penetrante (POLUNIN; ROBBINS, 1993).

Sua árvore é nativa das Ilhas Molucas, arquipélago situado na Indonésia, sendo disseminada pelos britânicos durante a colonização (AFFONSO et al., 2012; SILVESTRI et al., 2010). Muitos estudos apontam que o cravo-da-Índia apresenta atividades antimicrobiana, antioxidante, antimutagênica (MIYAZAWA; HISAMA, 2003), anti-inflamatória (KIM et al., 1998), antiulcerogênica (LI et al., 2005), antitrombótica (SRIVASTAVA; MALHOTRA, 1991), anticarcinogênica (ZHENG; KENNEY; LAM, 1992) e antiparasitas (YANG et al., 2003).

O cravo-da-Índia (Figura 1) tem sido utilizado popularmente no tratamento de várias doenças, apesar de ainda subestimado pelas suas propriedades terapêuticas. Contudo, alguns destes usos têm sido comprovados cientificamente, com revisões de literatura abordando suas propriedades terapêuticas. Seu emprego mais recente é uma formulação caseira, baseada na extração dos botões florais secos de *S. aromaticum* com etanol, a qual se mostrou eficiente como repelente contra mosquitos (AFFONSO et al., 2012; AFFONSO et al., 2014).

Figura 1– (A) Árvore (B) botões florais ainda não abertos (C) botões secos



Fonte: CEPLAC, 2009

O cravo-da-índia usado na culinária e nas análises são na realidade, os botões florais (ainda não abertos) e secos, é bastante procurado devido ao seu marcante aroma e sabor, conferido, principalmente, por um composto fenólico volátil, o eugenol. Este composto chega a representar 95% do óleo extraído das folhas. Outros componentes do óleo essencial são o acetato de eugenila e o β -cariofileno que, juntos com o eugenol, somam cerca de 99% do conteúdo total. (RAINA, 2001; ATTOKARAN, 2011).

O óleo essencial de cravo-da-índia é amplamente utilizado e bem conhecido por suas propriedades medicinais. Estudos relatam propriedades antifúngicas (RANA et al., 2011), antibacterianas, anticarcinogênicas (COSTA et al., 2011), antioxidante, inseticida, anestésicas e anti-inflamatórias (AFFONSO et al., 2012).

O principal constituinte do óleo de cravo da índia é o eugenol ($C_{10}H_{14}O_2$) que compõem entre 70% e 90% do óleo, enquanto 5% a 15% é acetato de eugenol e β -cariofileno e concentrações de até 2,1% de α -humuleno, além óxido de cariofileno e acetato de eugenila em menores concentrações (RAZAFIMAMONJISON et al., 2013; CORTES-ROJAS et al., 2014).

O cravo da índia representa uma das principais fontes vegetais de compostos fenólicos como flavonóides, ácidos hidroxibenzóicos, ácidos hidroxicinâmicos e hidroxifenil propano (CORTES-ROJAS et al., 2014).

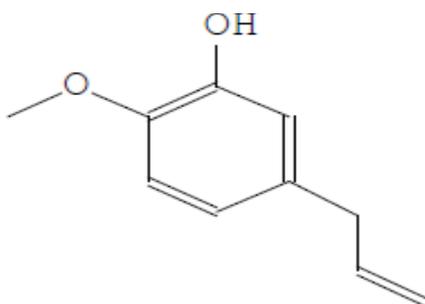
2.4 Eugenol

O óleo essencial dos botões florais do cravo-da-índia *S. aromaticum* extraído por hidrodestilação, tem como constituinte majoritário o eugenol ou 4-alil-2-metoxifenol (88,38%)

e acetato de eugenila (10,98%). Em geral, podem apresentar coloração levemente amarelada ou até incolor, porém quando recém extraído podem exibir baixa estabilidade na presença de luz, ar, calor e umidade (AFFONSO et al., 2012).

O eugenol (Figura 2) possui fórmula molecular $C_{10}H_{12}O_2$ e massa molar $164,2 \text{ g.mol}^{-1}$, apresenta baixa solubilidade em água, cheiro forte e aromático de cravo, sabor ardente e picante (RABÊLO, 2010). Foi isolado pela primeira vez em 1929 e sua produção comercial teve início nos Estados Unidos em 1940.

Figura 2 - Formula estrutural do eugenol



Fonte: Autora

Pode ser produzido sinteticamente, no entanto, é predominantemente extraído a partir de óleos essenciais de várias espécies vegetais, incluindo: *S. aromaticum*, *Ocimum sanctum*, *Ocimum gratissimum*, *Ocimum tenuiflorum*, *Cassia fistula*, *Zieria smitii* e *Pimenta racemosa*. Essa substância é classificada como um fenilpropanóide do tipo alilfenol. É uma substância com inúmeras aplicações nas indústrias farmacêutica, alimentícia, agrícola e cosmética (COSTA, 2011) (KAMATOU, VERMAAK e VILJOEN, 2012) (KAUFMAN, 2015).

Componentes como o eugenol e acetato de eugenila adquiriram um elevado valor comercial, devido às utilizações desses produtos como princípios ativos nas indústrias agroquímicas, substituindo os atuais. O Eugenol, por exemplo, tem sido extensivamente estudado nos últimos anos devido aos expressivos e diversificados efeitos biológicos, incluindo capacidade de inibição de proliferação de linhagens de células cancerígenas (PISANO, PAGNAN, et al., 2007).

Podem apresentar propriedades como: efeito alelopático na germinação e crescimento de plantas, efeito inibitório sobre crescimento de bactérias sendo utilizado como antisséptico, controle contra o barbeiro (*Rhodnius prolixus*), propriedade antioxidante, inibição da proliferação de células cancerosas, potencial leishmanicida, apresenta ainda efeito anti-inflamatório, cicatrizante, analgésico. Seus efeitos medicinais compreendem o tratamento de náuseas, flatulências, indigestão, diarreia (MAZZAFERA, 2003; KELECOM et al., 2002; MORAIS et al., 2009; YOO et al., 2005; GIL et al., 2008; SILVESTRI et al., 2010). Também

apresenta a capacidade em capturar radicais livres e o potencial antimicrobiano. Essas características têm levado ao interesse constante para obtenção de derivados do eugenol no sentido de aprimorar seu potencial biológico e farmacológico (KAMATOU, VERMAAK e VILJOEN, 2012) (PEREIRA, MENDES e LIMA, 2013) (MARTINS et al., 2016).

A Tabela 1 demonstra o teor de óleo essencial e o teor de eugenol (%) existente nas partes do cravo-da-índia.

Tabela 1 – Teor de óleo essencial e de eugenol do cravo-da-índia

<i>Parte da planta</i>	<i>Teor de óleo (%)</i>	<i>Teor de eugenol (%)</i>
<i>Botão floral</i>	15	85
<i>Folhas</i>	7	95

Fonte: Raina (2001) e Attokaran (2011).

2.5 Bioatividade do Eugenol

2.5.1 Atividade antioxidante

De acordo com SICHIERI (2013), a procura por antioxidantes naturais vem sendo intensificada durante as últimas décadas, objetivando a substituição dos antioxidantes sintéticos, já que estes causam efeitos negativos à saúde humana. O efeito antioxidante das plantas se dá aos compostos fenólicos presentes nelas.

O consumo desses compostos inibe a formação de radicais livres, também chamados de substâncias reativas (MORAIS et al., 2009) O excesso de radicais no organismo está associado a uma série de enfermidades (cardiovasculares, envelhecimento precoce, distúrbios mentais, etc.) (MIHAI e POPA, 2015) (SILVESTRI et al., 2010).

Segundo CHAIEB et al., (2007) a atividade antioxidante do *S. aromaticum* pode se dar também através da eliminação de radicais, ação quelante com íons de metais (Fe^{+3}) e reações fotoquímicas, demonstrando a potente ação antioxidante e sua aplicabilidade estratégica na indústria, por exemplo.

2.5.2 Atividade larvicida

A relação entre o efeito larvicida e a composição química dos óleos essenciais é difícil de ser determinada, uma vez que as interações entre os compostos podem influenciar diretamente na atividade, bem como, os resultados dos testes dependem de muitos fatores;

condições laboratoriais como temperatura e exposição à luz, material biológico, solvente utilizado, entre outros (DIAS; MORAES, 2014)

SANTOS et al. (2010) realizaram teste com larvas de *A. aegypti* e verificaram que moléculas aromáticas eram mais tóxicas do que moléculas alifáticas, devido a densidade eletrônica do anel aromático influenciar positivamente na eficiência dos óleos essenciais. Também, quanto maior o número de ligações duplas conjugadas no anel aromático, maior será o potencial larvicida. Já, um elevado número de grupos hidroxila diminui a atividade larvicida, porque estes grupos evitam a penetração de moléculas através da cutícula, o que impede o composto de atingir seu alvo (SCOTTI et al., 2014; GIL, 2008).

Compostos com propriedades larvicidas podem agir por absorção através da cutícula, sistema respiratório ou por ingestão através do sistema gastrointestinal. Com as substâncias no interior da larva, estas podem atingir o local de ação ou podem causar efeitos sistêmicos por difusão em diferentes tecidos (CANTRELL et al., 2010; SOUZA et al., 2012).

Segundo ENAN (2001) e ISMAN (2005) o rápido efeito de alguns larvicidas naturais é indicativo de seu modo de ação neurotóxico e neuromuscular.

O eugenol além de apresentar atividades larvicida sob o mosquito da Dengue ele também pode apresentar contra vários mosquitos, tais como, *Cosmopolites sordidus* Germar, *Pediculus capitis*, *Culex pipiens*, *Tribolium castaneum*, *Sitophilus zeamais*, *Dermatophagoides farinae*, *D. Pteronyssinus*, *Psoroptes Cuniculi* e cupins japoneses (AFFONSO et al., 2012).

2.5.3 Atividade Antibacteriana

O óleo apresenta acentuada atividade antimicrobiana, quando testado para os micro-organismos tanto Gram-positivos como Gram negativos tais como, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* (SCHERER et. al 2009), *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus epidermidis* (AFFONSO et al., 2012; LIMA, 2009).

A atividade antibacteriana do cravo tem sido atribuída à estrutura fenólica do eugenol que em concentrações elevadas degrada as proteínas das membranas celulares das bactérias, resultando no dano da membrana celular, o que causa a morte da bactéria. O eugenol também apresenta eficácia no tratamento de enfermidades causadas por micro-organismos patogênicos (LINARD, 2008; ESCOBAR, 2002).

2.5.4 Atividade Antifúngica

Os óleos essenciais são constituídos por substâncias lipofílicas e de baixo peso molecular, o que facilita sua penetração eficiente na membrana celular. (AFFONSO, 2012).

Estudos já mostraram que os óleos essenciais penetram 100 vezes mais rápido que a água o que lhe confere a atividade antifúngica. O óleo essencial de cravo tem atividade comprovada contra os fungos dos gêneros: *Penicillium*, *Alternaria* e *Aspergillus* (VANIN, 2014), *Fusarium*, *Tracheiphilum*, *Vasinfestum*, *Lycopersici* (ASCENÇÃO; FILHO, 2013).

2.5.5 Atividade de Inibição da AChE

A acetilcolinesterase (AChE) é a enzima responsável por hidrolisar o neurotransmissor acetilcolina (ACh) nas sinapses colinérgicas. Nestas sinapses, a ACh atua transmitindo a mensagem de um neurônio a outro. As sinapses colinérgicas estão amplamente distribuídas no sistema nervoso central (SNC) e periférico (SNP), sendo importante para a manutenção de inúmeras funções fisiológicas humanas. (WESTFALL, 2006). Caso o inibidor da AChE (IAChE) apresente ação no SNC, este tem utilidade no tratamento da demência associada às doenças de Alzheimer e Parkinson (INOUE et al., 2004).

De acordo com MUKHERJEE et al. (2007) diversas plantas têm sido descritas como tendo atividade inibitória sobre a AChE. Tradicionalmente, quatro plantas, *Salvia tiliifolia* Vahl. (Lamiaceae), *Chamaecrista mimosoides* L. Greene (Caesalpinaceae), *Buddleja salviifolia* (L.) Lam. (Buddlejaceae) e *Schotia brachypetala* Sond. (Fabaceae), são usadas no tratamento de doenças neurodegenerativas (ADEWUSI et al, 2011).

Numerosos óleos essenciais têm demonstrado atividade de inibição contra a AChE, incluindo *Narcissus poeticus* L. (Okello et al., 2008), espécies de *Melaleuca* (Mills et al., 2004), *Acorus calamus* L. (Mukherjee et al., 2007), *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. (Siramon et al., 2009), *Marlierea racemosa* Kiaersk. (Souza et al., 2009) *Cymbopogon schoenanthus* Spreng. (Khadri et al., 2008) e diversos óleos da família Lamiaceae (Dohi et al., 2009; Loizzo et al., 2008).

Muitos dos constituintes destes óleos têm sido identificados como inibidores AChE incluindo monoterpenos como neral, geranial e linalol (DOHI et al., 2009; PICOLLO et al., 2008; PERRY et al., 2000) sesquiterpenos como oxido de cariofileno, tumerona (FUJIWARA et al., 2010) alguns fenilpropanóides como eugenol (DOHI et al., 2009). O estudo dessas mesmas plantas assim como dos seus constituintes possibilitou descobrir que alguns dos seus fitoconstituintes apresentam atividade inibitória sobre a AChE.

2.6 Bicatálise

As reações de Bicatálise ou biotransformação, uma das ferramentas da química verde, são amplamente usadas em síntese orgânica. Este tipo de processo emprega enzimas purificadas ou células íntegras, em especial, células microbianas livres ou imobilizadas para converter o substrato em um produto definido e apresenta notável destaque como uma tecnologia suplementar útil para a indústria química, fornecendo em alguns casos, reações que não são facilmente conduzidas pela química orgânica clássica ou, em outros casos, promovendo reações que podem substituir etapas químicas severas (HERNÁIZ et al., 2010; VASIC-RACKI, 2006).

O progresso no uso de enzimas e células integrais na Química Orgânica Sintética foi relativamente lento até os anos 50, quando o uso de microrganismos para modificar núcleos esteroidais foi estudado em laboratórios industriais e acadêmicos (HOLLAND, 1992).

Essa técnica é hoje um dos campos mais proeminentes dentro das novas tecnologias para síntese de compostos de alto valor agregado. A exploração da biodiversidade na busca de novos catalisadores por técnicas de seleção de microrganismos, de plantas ou células animais representam os métodos tradicionais de descoberta de novas enzimas para o desenvolvimento da Bicatálise em escala industrial (DEMIRJIAN, 1999).

Os microrganismos neste caso são de particular interesse devido ao curto período de geração, à grande diversidade de processos metabólicos e enzimas envolvidas e, a grande diversidade de microrganismos na natureza que possam ser testados, os quais são bastante diferentes entre si.

Microrganismos isolados em território brasileiro têm demonstrado excelente potencial biocatalisador frente a diferentes substratos orgânicos de interesse, como por exemplo, na hidrólise de óleos marinhos (CAMPOS, et al., 2002; MACEDO, et al., 2002) na síntese de ésteres de ácidos graxos poli-insaturados (CARVALHO, 1998) e de ésteres de aroma (MACEDO, 2004).

Do ponto de vista industrial, os fungos são especialmente valorizados porque as enzimas por eles produzidas normalmente são extracelulares, o que facilita sua recuperação do meio de fermentação (VULFSON, 1994).

Os trabalhos relatados em literatura sobre lipases fúngicas são numerosos, sendo que os mais extensivamente estudados são os fungos *Geotrichum candidum*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Rhizopus delemar* e *Penicillium cyclopium* (IWAI et al., 1984).

As lipases têm sido utilizadas em uma variedade de segmentos biotecnológicos, como em indústrias de alimentos (desenvolvimento de aromas e maturação de queijos), de detergentes, óleo químico (hidrólise de óleos e gorduras, síntese de biosurfactantes) e para tratamento de resíduos oleosos provindos da indústria do couro e de papel. Uma aplicação que tem merecido destaque é sua utilização na obtenção de fármacos ou insumos farmacêuticos em suas formas enantioméricas ativas com elevada pureza ótica, pois estas enzimas são capazes de reconhecer moléculas quirais e atuam, preferencialmente, em um dos isômeros de uma mistura racêmica (FABER, 2000).

É conhecido que alguns fármacos são produzidos e comercializados na sua forma racêmica e que a atividade biológica depende, em muitos casos, de sua configuração absoluta. Normalmente um dos isômeros (R ou S) apresenta atividade biológica, enquanto o outro é menos ativo ou até mesmo tóxico. Na grande maioria dos casos, os fármacos administrados sob a forma racêmica possuem características biológicas muito inferiores aos seus enantiômeros puros. (MAIER, 2001)

2.6.1 Uso de *Saccharomyces cerevisiae* em processo biocatalítico

Saccharomyces cerevisiae é um microrganismo aeróbio facultativo, isto é, se ajusta metabolicamente, tanto em condições de aerobiose como de anaerobiose. Utilizam açúcares como a sacarose, glicose e frutose como fonte de carbono e, os produtos finais do metabolismo do açúcar irão depender das condições ambientais em que a levedura se encontra. Em aerobiose, o açúcar é transformado em biomassa, gás carbônico e água. Já em anaerobiose, a maior parte é convertida em etanol e gás carbônico, sendo processo denominado de fermentação alcoólica. Este microrganismo também é capaz de produzir etanol a partir dos açúcares de materiais lignocelulósicos (MARTIN et al., 2003; PALMQVIST E HAHN-HAGERDAL, 2000).

Esta levedura tem sido reportada há muito tempo como catalisador de transformações que geram mais de 19 produtos quirais e pode ser considerada como um biocatalisador ideal pelo fato de estar amplamente disponível e ser de fácil manuseio. (CHAKRABORTY et al., 2005; FABER, 1997; SEEBACH et al., 1999)

Célula de *S. cerevisiae*, utiliza glicose ou sacarose como fonte de energia, é um dos biocatalisadores mais versáteis e baratos. A facilidade de manuseio, que não requer nenhum cuidado especial, o faz alvo de escolha quando se deseja conduzir reações de oxidação-redução. É preferencialmente utilizado na forma de célula inteira, ao invés de enzimas isoladas, evitando dessa forma, o problema da dificuldade de reciclar o cofator, um passo necessário quando se

usa a enzima pura. As células inteiras apresentam uma grande variedade de atividades enzimáticas.

Por isso, o maior problema encontrado neste tipo de bicaatalise é a baixa seletividade, devido à ação simultânea das várias enzimas presentes, que geralmente apresentam diferentes cinéticas e velocidades de conversão para um mesmo substrato (FARDELONE *et al.*, 2004).

No entanto, quando o processo não é satisfatoriamente seletivo, modificações simples nas condições experimentais podem ser realizadas no sentido de influenciar tanto a estereoquímica como a enantioseletividade (WIMMER *et al.*, 2005).

Algumas das modificações mais comuns são o uso de solventes orgânicos, a adição de inibidores ou co-substratos e as técnicas de imobilização entre outras. (BUQUE-TABOADA *et al.*, 2005; RODRIGUES e MORAN, 2001)

A linhagem de *S. cerevisiae* utilizada neste trabalho apresenta maior aplicabilidade na produção industrial devido à sua boa capacidade fermentativa, por ser menos sensível a alguns fatores, tais como temperatura elevada, toxicidade ao etanol e outros inibidores, assim como a capacidade de crescer rapidamente sob as condições anaeróbicas que são características estabelecidas em fermentações em larga escala.

3 OBJETIVO GERAL

- ✓ Realizar a síntese e identificar de derivados do óleo essencial *Syzygium aromaticum* obtido em processo biocatalítico com *Saccharomyces cerevisiae*.

3.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- ✓ Extrair e caracterizar do Óleo Essencial do *Syzygium aromaticum*
- ✓ Determinar potencial antioxidante do Óleo Essencial extraído
- ✓ Determinar da atividade inibitória da AChE frente ao óleo essencial
- ✓ Calcular a concentração letal CL₅₀ do óleo a partir do teste de toxicidade frente a *Artemia salina* e testar a atividade CL₅₀ larvicida frente ao *Aedes aegypti*
- ✓ Verificar a atividade antibacteriana do óleo essencial do cravo-da-india
- ✓ Identificar os compostos oriundos do processo biocatalítico com levedura

4 METODOLOGIA

A pesquisa foi desenvolvida com a utilização de vários equipamentos e contou com a parceria dos seguintes laboratórios e instituições: Laboratório de Química Orgânica,

Laboratório de Microbiologia ambos da Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-brasileira – UNILAB. As larvas do mosquito da dengue foram cedidas pelo Laboratório de Entomologia médica do Departamento de Patologia e Medicina Legal e as cepas dos microrganismos (Fungo e Bactérias) foram adquiridos no laboratório de Microbiologia do ambiente e do Pescado (LAMAP) ambos da Universidade Federal do Ceará – UFC.

4.1 Obtenção dos botões florais do cravo-da-índia extração, tratamento e armazenamento do óleo essencial.

Os botões florais do Cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) (Figura 3) foram adquiridos no mercado central de Fortaleza-Ceará em lojas de temperos e especiarias.

Figura 3 – Botões Florais do Cravo-da-Índia

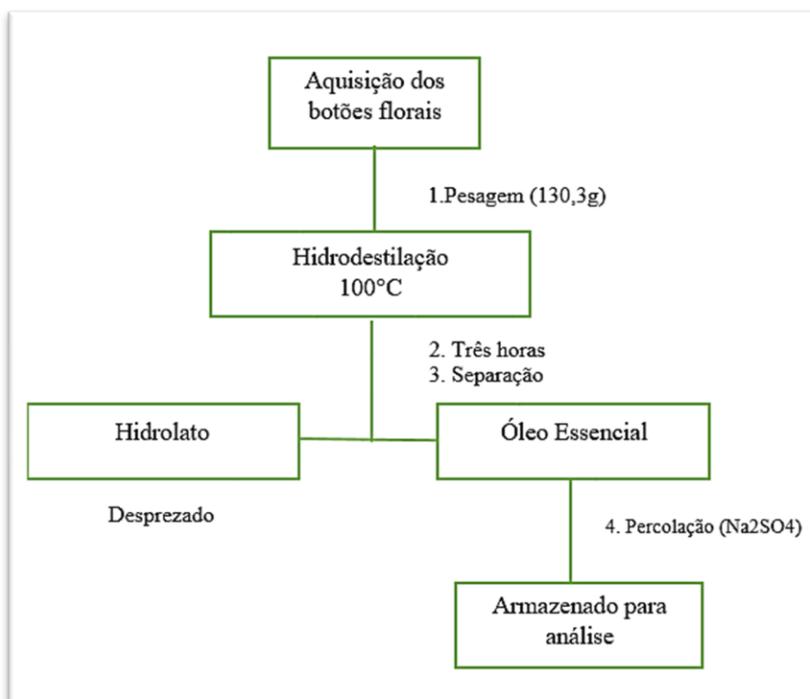


Fonte: Autora

As partes utilizadas do cravo-da-índia foram os botões florais, a extração foi realizada no laboratório de Química Orgânica da UNILAB e o método utilizado foi o de hidrodestilação. Para obtenção do óleo essencial, foram pesados (130,3 g) de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) no qual os mesmos foram e transferidos para um balão de fundo redondo de 5000mL onde foi adicionado 1000mL de água destilada em seguida o balão foi acoplado ao extrator de Clevenger a temperatura em 100°C.

Após 3 horas, encerrou-se a destilação recolheu-se o hidrolato da extração. O óleo foi seco por meio de percolação em sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) como pode ser observado na Figura 4.

Figura 4 - Metodologia de extração de óleo essencial do *Syzygium aromaticum*



Fonte: autora

As amostras armazenadas em ampolas de vidro âmbar sob refrigeração para evitar possíveis perdas de constituintes voláteis. Posteriormente esses óleos foram submetidos as análises. O rendimento do óleo essencial foi expresso em porcentagem na relação massa/volume pela medida da densidade, observando o volume (ml) de óleo essencial obtido após a extração do óleo por massa (g) de material vegetal, conforme descrita por (FABROWSKI, 2002).

O cálculo do rendimento foi realizado através da equação 1:

Onde:

$$R(\%) = \frac{M_{\text{óleo}}}{M_{\text{planta}}} \times 100 \quad (\text{equação 1})$$

R(%) = rendimento da produção de óleo essencial;

m_{óleo} = massa de óleo obtida (em g);

m_{planta} = massa das partes aéreas, flores e folhas (em g).

4.2 Caracterização físico-química do óleo essencial do *Syzygium aromaticum*

As propriedades físico-químicas do óleo essencial determinadas foram: densidade, solubilidade em etanol a 90% v/v, índice de refração, cor e aparência.

4.2.1 Densidade

Para o cálculo da densidade, utilizou-se um picnômetro de 1,0 ml, previamente seco, tarado e aferido, onde foi adicionado e pesado as amostras do óleo essencial (25°C).

4.2.2 Solubilidade em Etanol (90%)

Neste teste, utilizou-se um balão volumétrico de 10ml contendo um volume constante do óleo essencial, sobre o qual era adicionado proporcionalmente volume crescente da mistura de álcool destilada a 90% (v/v) até a sua completa solubilização.

4.2.3 Índice de Refração

Para a determinação do índice de refração, utilizou-se pipetas de Pasteur para adicionar as amostras dos óleos diretamente sobre o prisma de Flint do refratômetro, à temperatura de 25°C; fazendo-se então as leituras.

4.2.4 Cor e Aparência.

A técnica utilizada foi visual, onde, sob um fundo branco, se comparou a cor do óleo essencial com cores conhecidas e para a aparência se fez uma inspeção do óleo no que diz respeito a sua transparência ou limpidez.

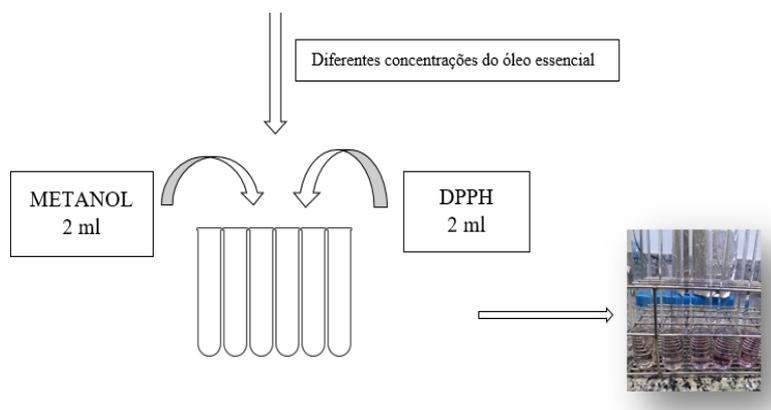
4.3 Teste Antioxidante

Há diversas metodologias para determinar a atividade antioxidante *in vitro*, de forma a permitir uma rápida seleção de substâncias e/ou misturas potencialmente interessante. Dentre estes métodos destaca-se o método de sequestro de radicais livres, tais como DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila).

A técnica foi adaptada de SOUSA et al. (2007). O método baseia-se na transferência de elétrons onde, por ação de um antioxidante ou uma espécie radicalar, o DPPH que possui cor púrpura é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorbância. Para realização deste procedimento foi utilizado como referências os estudos de (MENSOR, L. L, et al., 2001 e SOUSA, et al., 2007).

A metodologia para atividade antioxidante se baseia na medida de extinção da adsorção do radical. A Figura 5 representa o processo de captura de DPPH por antioxidante, produzindo um decréscimo de coloração nos tubos com o aumento da concentração.

Figura 5 - Teste Antioxidante pelo método de captura de DPPH



Fonte: Autora

Para a realização deste experimento óleo essencial do cravo-da-índia foi diluído em 2 ml de metanol, em várias concentrações diferentes, como representado na Tabela 2. Com exceção da amostra branco, onde foi colocada somente o DPPH e Metanol.

Tabela 2 - Concentração das soluções do utilizado no teste de DPPH

DILUIÇÕES	
Branco	0,000 ($\mu\text{g/mL}$)
AMOSTRA 1	1,5 ($\mu\text{g/mL}$)
AMOSTRA 2	1,0 ($\mu\text{g/mL}$)
AMOSTRA 3	500 ($\mu\text{g/mL}$)
AMOSTRA 4	250 ($\mu\text{g/mL}$)
AMOSTRA 5	125 ($\mu\text{g/mL}$)

Fonte: Autora

A adição do DPPH foi realizada na ausência de luz, esperou-se por 30 minutos para que a solução reagisse. Após isso, foi efetuada a leitura no espectrofotômetro PG Instruments Ltda a 520nm. Os valores medidos da absorbância das concentrações dos extratos foram convertidos em porcentagem inibitória através da equação 2.

$$\% \text{ de inibição} = \left(1 - \frac{A_{\text{amostra}} - A_{\text{branco}}}{A_{\text{controle}}}\right) \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

Onde:

A_{amostra} = Absorvância da solução com DPPH

A_{branco} = Absorvância da solução de DPPH sem a amostra.

A_{controle} = Absorbância do controle

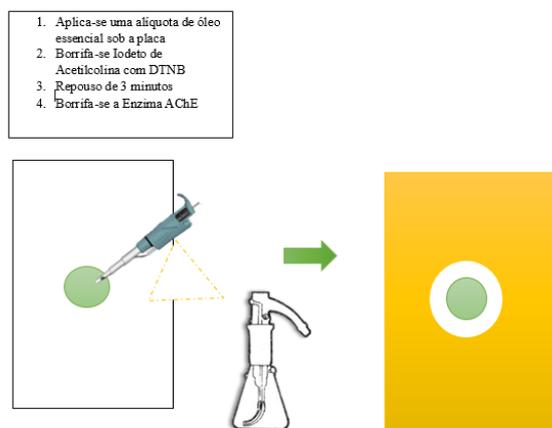
Após isso, determinou-se a concentração necessária do óleo para capturar 50% do radical livre DPPH (IC₅₀) por análise de regressão linear. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas.

4.4 Atividade inibitória da AChE frente ao óleo essencial *Syzygium aromaticum*

A metodologia utilizada para identificar esses inibidores, baseia-se no procedimento descrito por Ellman et al. (1961), adaptado para Cromatografia de Camada Delgada (CCD) por Rhee et al. (2001). É considerado um método colorimétrico e que pode ser utilizado de forma qualitativa e quantitativa, mas nesse trabalho foi utilizada somente a forma qualitativa. É um método rápido e sensível para a seleção de amostras com ação anticolinesterásica. A metodologia consiste em retirar uma alíquota de 5µl do óleo essencial na concentração 10 mg/mL e 1mg/mL para compostos puro e aplicar em uma cromatoplaça (DC-Alufolien, Silicagel 60 F254, 0,2 mm Merck).

Após a completa evaporação do solvente, foi borrifado uma mistura (1:1) de iodeto de acetilcolina (ATCI) 1mmol.L⁻¹ com o reagente de Ellman ácido 5,5' – Ditiobis- (2 – nitrobenzóico), DTNB, 1 mmol.L⁻¹, deixando em repouso por 3 minutos para a secagem da placa. Em seguida foi borrifado a enzima acetilcolinesterase (100U/ml). Após 10 minutos, ocorre o surgimento de uma coloração amarela, porém, onde há inibição da enzima, observa-se a formação de um halo branco em torno dos “spots” onde foram aplicadas as amostras. Entre 20-30 minutos a coloração desaparece. Como controle positivo, foi utilizada a solução do padrão de sal Eserina 1mg/ml como pode ser visualizado na Figura 6.

Figura 6 - Atividade Inibitória de AChE



Fonte: Autora

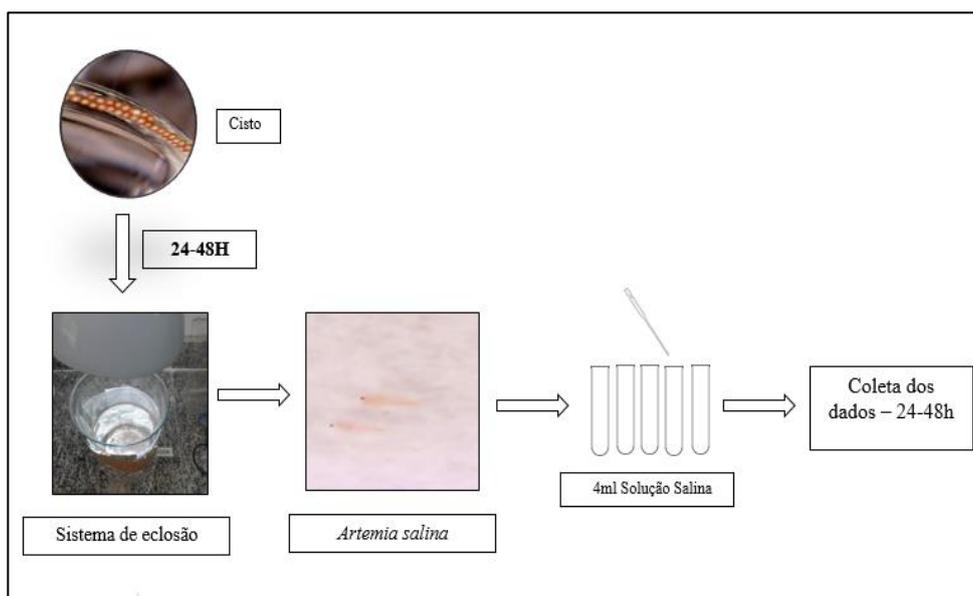
4.5 Bioensaio de Toxicidade com *Artemia salina*

A presença de componentes tóxicos em compostos animais e vegetais é bastante comum, podendo corroborar efeitos graves no organismo humano quando em contato em médio e longo prazo, o que faz necessário a realização de testes que vise identificar a presença destes elementos quando presentes, garantido a qualidade do extrato e produtos sem expor risco ao homem. A metodologia para os ensaios de toxicidade utilizando *Artemia salina* foi baseada em MEYER et al. (1982) e em NASCIMENTO e ARAÚJO (1999).

Para a realização deste experimento fez necessário o preparo de uma solução com água e cloreto de sódio, na proporção 30gL⁻¹, deixando o seu pH em 8,0 após o preparo da solução, pegamos um recipiente de vidro “béquer” de 1750ml sendo em seguida colocada a solução salina preparada cerca de 1500ml no béquer, em seguida adicionamos em cerca de 50 mg de cistos de *Artemia salina*. Sendo iluminado por uma lâmpada de led 5w que se encontrava posicionada na parte superior do béquer para atrair os organismos.

Ressalta-se que a temperatura se manteve controlada em torno dos 28 a 30°C por meio de um termômetro digital. Todo recipiente foi envolvido com papel alumínio para auxiliar na eclosão dos cistos (Figura 7), sendo escolhidos e utilizados para o estudo, aqueles que demonstraram maior resistência uniformidade do tamanho. No que trata o período de incubação foi em torno de 48 horas, porém evidenciamos a presença dos cistos já nas primeiras 24 horas.

Figura 7 – Bioensaio de Toxicidade com *Artemia Salina*



Fonte: Autora

4.5.1 Preparação das amostras com *Artemia salina*

Após a eclosão dos nauplios, 10 *Artemias* foram capturadas com uma pipeta de Pasteur e transferidos para tubos de ensaio onde continha em seu interior 4 ml da mesma solução salina preparada para sua eclosão. Os testes foram realizados em triplicata para cada concentração de óleo essencial desta análise.

Bem como, o desenvolvimento de vários ensaios com intuito de comprovar tal resultado e adaptações realizadas no mesmo no que trata o teste de toxicidade. Tendo em vista os produtos diluentes do extrato bem como preparação da solução de cultivo e manutenção das lavas não influenciasse no resultado falso positivo ou negativo deste teste. O parâmetro de classificação do óleo *Syzygium aromaticum* frente *Artemia salina* tem base nos valores das DL_{50} estabelecidos nos estudos de (DOLABELA, 1997) (MEYER et al., 1982).

Sendo definido como $DL_{50} \leq 80 \mu\text{g/mL}$, o produto é altamente tóxico; DL_{50} entre 80 a $250 \mu\text{g/mL}$, o produto é moderadamente tóxico e $DL_{50} \geq 250 \mu\text{g/mL}$, o produto é levemente tóxico ou atóxico. O critério de avaliação em que considera a amostra tóxica ou ativa as que apresentarem $DL_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$ e amostras atóxicas ou inativas as que apresentarem $DL_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$ (Cálculos de DL_{50})

As concentrações utilizadas para este ensaio foram descritas na Tabela 3 para cada amostra, sendo todas amostras dissolvidas na mesma solução salina de cultivo em concentração

decrecente, onde tais valores utilizados esta referenciados por outros estudos desenvolvidos com esta metodologia.

Tabela 3 – Concentrações utilizadas para o teste de toxicidade
CONCENTRAÇÕES

BRANCO	0,000 µg/ml
AMOSTRA 1	1000µg/ml
AMOSTRA 2	500 µg/ml
AMOSTRA 3	250 µg/ml
AMOSTRA 4	125 µg/ml
AMOSTRA 5	62,5 µg/ml
AMOSTRA 6	31,25 µg/ml

Fonte: autora

4.5.2 Contagem das *Artemias salinas*

A contagem deste ensaio biológico fez mediante as primeiras 24 e 48 horas após pipetagem das larvas nos tubos de ensaio com soluções/extrato nas respectivas concentrações, levando em conta os náuplios vivos todos aqueles que apresentavam movimentos no interior do tubo mediante atração pela luz, e mortas aquelas que se encontrava no fundo dos tubos sem qualquer movimento. Utilizamos uma lupa de aumento para melhor visualização e contagem. Sendo registrado tais valores em planilha do Origin 9.0 e trabalhado seus resultados estatísticos conforme registros dos dados nas 24-48 horas.

4.6 Teste larvicida frente as larvas de mosquito da Dengue (*Aedes Aegypti*)

Os bioensaios foram desenvolvidos usando metodologia descrita (Oliveira et al., 2002) feitos em triplicas e em diferentes concentrações utilizando larvas dos mosquitos *Aedes aegypti* no terceiro estágio de vida (Hamburger; Hostettmann,1991; McLaughlin; Anderson, 1988; Cepleanu, 1993)

Os ensaios foram realizados com larvas oriundas de criações massais mantidas no Laboratório de Entomologia médica do Departamento de Patologia e Medicina Legal. Os ovos do mosquito foram eclodidos em um recipiente retangular e separadas para a realização dos bioensaios. O óleo essencial do cravo-da-índia foi diluído em solução aquosa de dimetil sulfóxido 2% (DMSO, *Synth ACS*) nas concentrações descritas na Tabela 4:

Tabela 4 – Concentrações utilizadas no teste larvicida com *Aedes aegypti*

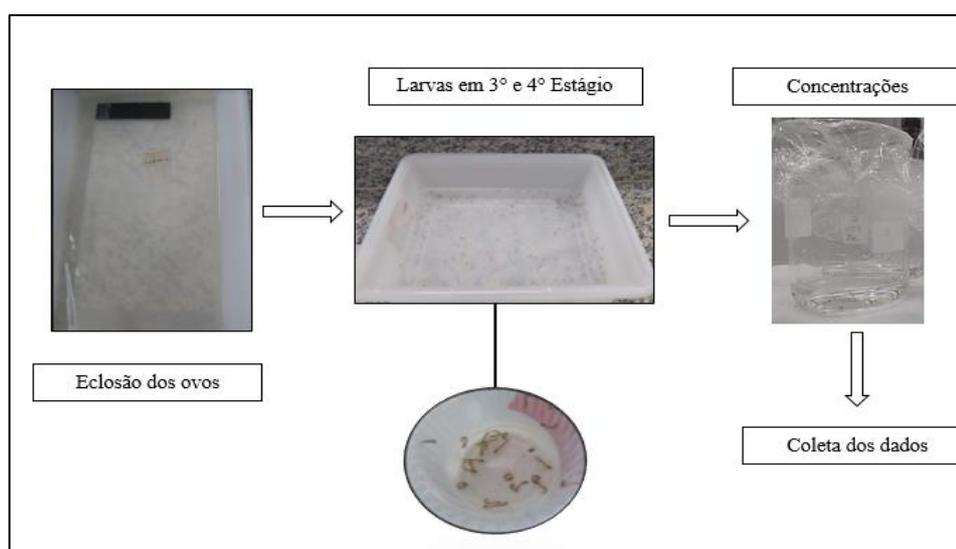
CONCENTRAÇÕES	
BRANCO	0 µg/ml
AMOSTRA 1	1000 µg/ml
AMOSTRA 2	500 µg/ml
AMOSTRA 3	250 µg/ml
AMOSTRA 4	125 µg/ml
AMOSTRA 5	62,5 µg/ml

Fonte: autora

As larvas foram separadas com o auxílio da pipeta de Pasteur e colocadas em papel de filtro para a remoção do excesso de água e posteriormente, distribuíram-se 20 larvas em 6 Becker (50 ml) contendo 30 ml das diluições. Como controle utilizou-se água e DMSO 2%. Após 24h de exposição das larvas aos tratamentos, o número de larvas mortas foi registrado sendo consideradas mortas aquelas que não apresentavam movimento ou não respondiam aos estímulos com a pipeta de Pasteur.

O teste foi realizado em triplicata. A temperatura ambiente variou entre 27°C e 30°C. Todos os valores foram organizados em planilha do Origin 9.0 e trabalhado seus resultados estatísticos conforme registros dos dados. A Figura 8 demonstra a metodologia utilizada no ensaio.

Figura 8 - Atividade larvicida do óleo essencial *Syzygium aromaticum* frente ao *Aedes aegypti*



Fonte: Autora

4.7 Testes da Atividade Antibacteriana pelo Método da Difusão em Discos

As cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Escherichia coli* (ATCC 25922) utilizadas neste trabalho foram cedidas pelo Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado (LAMAP) da Universidade Federal do Ceará (UFC).

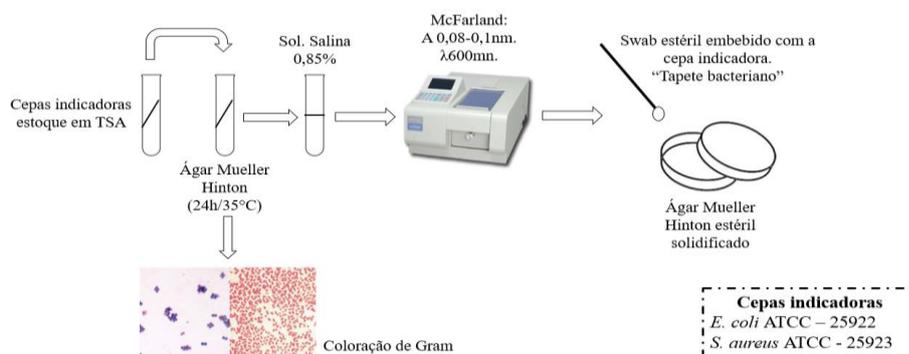
4.7.1 Antibiograma

A atividade antibacteriana do óleo essencial do cravo-da-índia foi avaliada pelo método de difusão em disco de acordo com a metodologia recomendada pela CLSI (2008). Todos os materiais utilizados neste teste foram previamente esterilizados.

4.7.2 Preparo do inoculo e sementeira

As culturas bacterianas foram inoculadas em tubos contendo Agar Mueller-Hinton, após 24 horas de incubação a 35°C procedeu-se a coloração de Gram, a título de padronização e como teste de pureza das células. Após a técnica, foram feitas diluições das cepas teste até a obtenção de uma suspensão padronizada pelo grau 0,5 da escala de McFarland (a 0.08-0.1nm) como descrito na Figura 9.

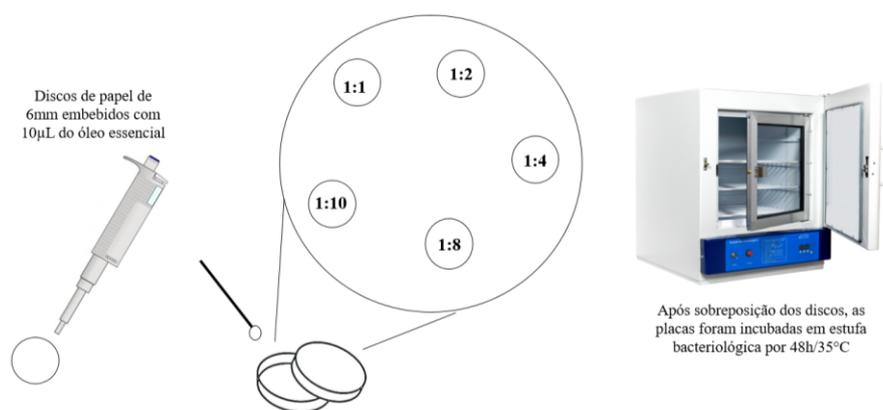
Figura 9 - Preparo do Inoculo e sementeira



Fonte: autora

Como exemplifica a Figura 10, realizou-se o inoculo em placa contendo Muller-Hinton com o auxílio de *swab* estéril de cada cultura bacteriana, e sobre a mesma foram aderidos, com auxílio de uma pinça previamente esterilizada discos brancos para antibiograma (6mm) impregnados nas concentrações de 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:10 do óleo essencial de cravo-da-índia, sendo pressionados levemente sobre a superfície do meio. As placas foram então incubadas a 35°C por 48 horas em uma estufa bacteriológica, e a leitura dos halos de inibição foram feitas com o auxílio de paquímetro.

Figura 10 - Semeadura das culturas bacterianas



Fonte: Autora

4.8 Ensaio Biocatalítico

O ensaio biocatalítico seguiu metodologia de (NUNES *et al.*, 2013; YANG, *et al.*, 2000) em triplicata com adaptações. A estirpe *Saccharomyces cerevisiae* foi empregada como agente biocatalisador.

4.8.1 Preparo do Meio de Cultura

O caldo batata (BD) utilizado na preparação do meio líquido é o resultado do cozimento de 40g de batata inglesa em 200 ml água destilada. Depois de cozida a batata, a água do cozimento foi separada por filtração e logo após adicionou-se 4g de glicose. O meio de cultura foi autoclavado a 121°C por 15 minutos. pH = 6,5

4.8.2 Reações de Biotransformação

Inicialmente a estirpe *Saccharomyces cerevisiae* foi cultivada em um tubo de ensaio contendo Ágar Sabouraud Dextrose onde foi realizado o ajuste da densidade microbiana a escala de McFarland (0,5nm) em seguida a estufa bacteriológica por 24h a 35°C. Após o crescimento foi transferida para um Erlenmeyer de 125mL contendo 50mL de Caldo Batata (BD) estéril, em seguida foi posta em um agitador tipo Shaker e mantida sob agitação 120rpm a 35°C por 24h.

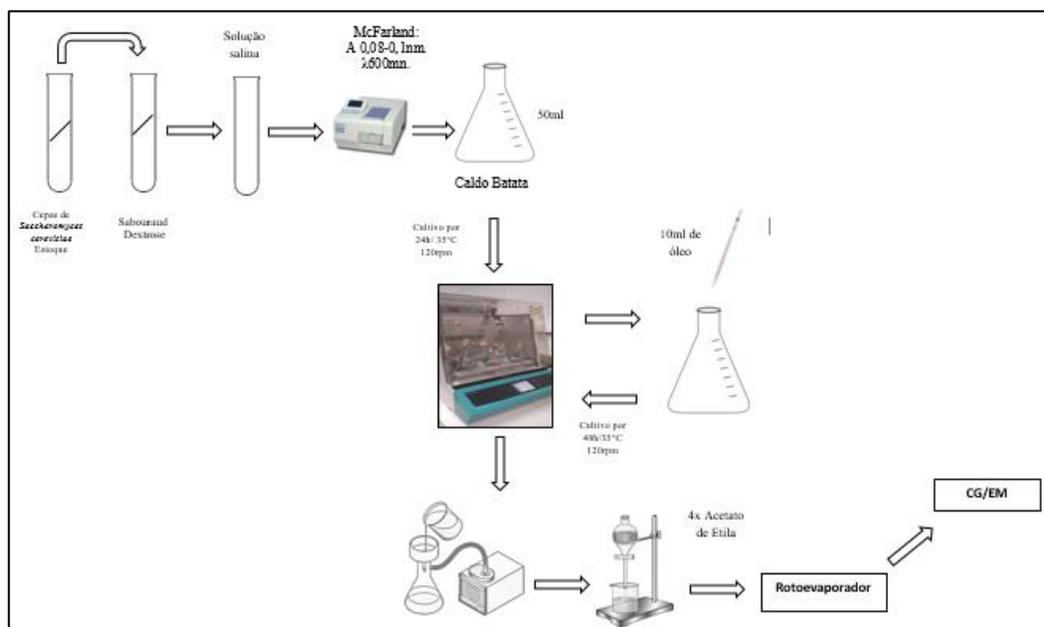
Após 24h de crescimento dos fungos em 50mL meio líquido BD contido em Erlenmeyer de 125mL, fez-se a adição dos substratos usados nas reações. Adicionou-se o óleo essencial do

cravo-da-índia nas concentrações de 10% e 5% do volume total. O caldo foi mantido sob agitação de 120rpm por 48h/35°C.

4.8.3 Extração do Material resultante

Após 48h o caldo foi submetido a uma filtração a vácuo para remoção colônias fúngicas do fungo em seguida realizou-se a extração dos produtos com Acetato de Etila (4 x 20 mL). A fase orgânica obtida foi seca com sulfato de sódio anidro e o solvente eliminado em um rotaevaporador a temperatura de 60°C a 80 rpm. A fase orgânica foi coletada/filtrada e injetada em um aparelho de cromatografia gasoso acoplado ao espectro de massa CG-EM como descrito na Figura 11.

Figura 11 - Ensaio Biocatalítico com estirpe de *Saccharomyces cerevisiae*



Fonte: autora

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os óleos essenciais possuem características físico-químicas específicas, porém podem sofrer alterações devido a vários fatores como por exemplo: o ar, a luz, o calor, a água e impurezas diversas de origem natural ou oriunda de falsificações. As alterações podem ser identificadas tanto por mudanças de suas características organolépticas (aroma, cor, sabor, transparência, fluidez), como também dos valores dos seus parâmetros químicos e físicos. Desta

maneira, diminuindo as suas qualidades, reduz-se de igual modo o seu aproveitamento nas indústrias de perfumaria, farmacêutica, cosmética, alimentos, químicas (TELES, 2003).

De acordo com os estudos de Mouchrek (2000) qualidade dos óleos essenciais depende de vários parâmetros tais como índice de refração, solubilidade em diferentes solventes orgânicos, densidade, dentre outros, os quais são utilizados para a avaliação da qualidade da matéria prima vegetal, além do controle da identidade e da pureza do óleo.

Tabela 5 – Parâmetros físico-químicos do óleo essencial de *Syzygium aromaticum*

PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICO	<i>Syzygium aromaticum</i>
RENDIMENTO (%)	3,63
DENSIDADE (G/ML ⁻¹)	0,973
SOLUBILIDADE EM ETANOL (90%)	1:2
ÍNDICE DE REFRAÇÃO (N _D 25°)	1,5345
COR	Transparente
APARÊNCIA	Límpido
ODOR	Característico

Fonte: autora

Diante do exposto na Tabela 5 o resultado para o rendimento da extração foi calculado a partir da quantidade de óleo que se obteve com uma determinada massa do vegetal. Como nesse experimento, partiu-se de uma massa de 130,3 g dos botões florais secos do cravo da índia e obteve-se em média 4,74 g de óleo essencial o que equivale a 6,7 ml em cada extração, o rendimento m/m foi de 3,63% onde o mesmo é considerado pela literatura um bom rendimento.

O óleo essencial extraído do cravo-da-índia apresentou um valor de densidade de 0,973 g.ml⁻¹. De acordo com NASCIMENTO (2012) a maioria dos óleos essenciais apresentam valores de densidade menores do que 1, sendo normalmente a fase superior quando em contato com água. Quanto à solubilidade, o óleo mostrou-se solúvel em uma solução de etanol a 90% na proporção de 1 parte de óleo para 2 de solução alcoólica.

Nos estudos propostos por REIS (2006) os óleos essenciais extraídos dos talos e frutos secos do cravo-da-índia, relataram um índice de refração 1,5230 e 1,5252 respectivamente, valores semelhantes ao encontrado nesta pesquisa que foi de 1,5345. Valores esses, próximos ao índice de refração descrito para o eugenol, que é de 1,5410 (ALDRICH, 2001).

A proximidade entre os valores do índice de refração descrito para o eugenol com os valores encontrados para os óleos essenciais dos talos, dos frutos e dos botões florais evidenciam que o óleo em estudo é realmente rico em eugenol.

Com relação aos aspectos de cor apresentou-se transparente após a extração, porém tornou-se um óleo levemente amarelado ao longo do tempo, aparência foi límpida não detectando nenhuma impureza e o odor analisados típicos de do eugenol puro. Todos os parâmetros descritos estão dentro do descrito na literatura.

A Tabela 6 expõe os resultados obtidos após a determinação da atividade antioxidante do óleo essencial do cravo-da-índia em diferentes concentrações, estão representados na e demonstraram que o percentual antioxidante aumentou proporcionalmente com a concentração de óleo adicionada. Os valores demonstraram que o percentual antioxidante aumentou proporcionalmente em relação a concentração de óleo adicionado conforme mostrado na tabela 6.

Tabela 6 – Porcentagem de inibição do DPPH (%) em diferentes concentrações

Concentração (µg/ml)	Com. (ppm %Inib.	Abs.		Abs.	
		x y	z	x,y,z	r
1,5	1500 66,667	0 0,236	0,238	0,236	0,0015
1	1000 50,494	0 0,376	0,371	0,351	0,0391
0,5	500 30,559	0 0,495	0,492	0,492	0,0025
0,25	250 17,160	0 0,588	0,589	0,587	0,0021
DPPH	0,709				

Fonte: Autora

A partir das absorbâncias obtidas das diferentes concentrações do óleo essencial, plotou-se a % de redução do DPPH no eixo Y e a concentração dos extratos (µg/mL) no eixo X, e determinou-se a equação da reta (Eq. 3)

$$Y = -ax + b \text{ (Equação 3)}$$

Onde:

y = % redução do DPPH

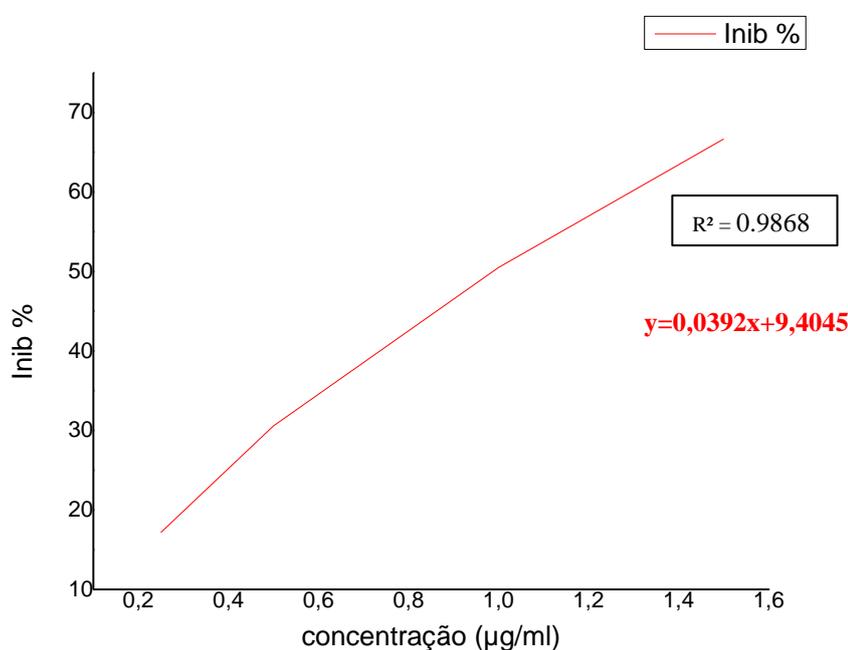
x = IC₅₀ (µg /mL)

Para calcular o IC₅₀ utilizou-se a equação da reta, substituindo o valor de y (Eq. 3) por 50 para obter a concentração da amostra com capacidade de reduzir 50% do DPPH. A

correlação entre a atividade antioxidante (%) e a concentração de óleo utilizado ($y=0,0392x+9,4045$), com $R^2 = 0.9868$, forneceu um IC_{50} de $0,81191 \mu\text{g.mL}^{-1}$, que é a concentração de óleo essencial necessária para causar 50% de atividade antioxidante.

A Figura 12 demonstra a curva de calibração da atividade antioxidante do óleo de *Syzygium aromaticum*. Das concentrações analisadas a de $1500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ apresentou maior inibição, atingindo o valor de 66,6% de atividade antioxidante tendo exibido o menor valor na absorbância.

Figura 12 - Curva de calibração da atividade antioxidante do óleo essencial do *Syzygium aromaticum*



Fonte: autora

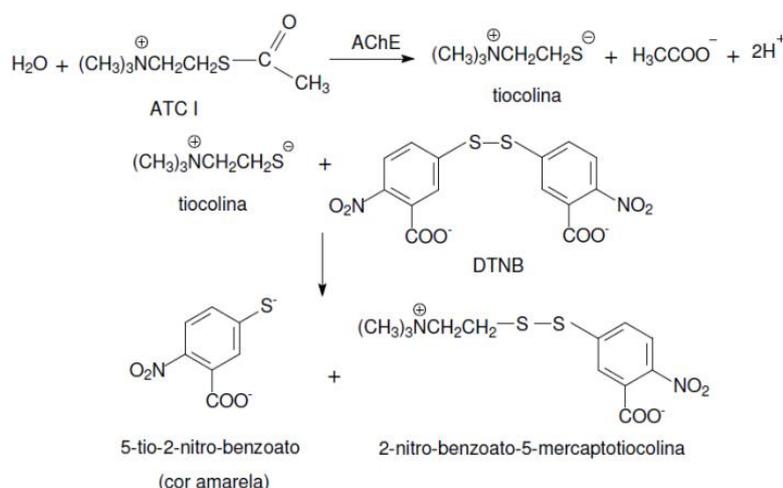
Estudos realizado por CHAIEB et al. (2007) mostram que óleo essencial de cravo-da-índia apresenta forte ação antioxidante devido à presença majoritária de eugenol, que atua como quelante de íon férrico, resultando na prevenção de formação dos radicais hidroxila, os compostos fenólicos também promovem atividade antioxidante ao cravo-da-índia, entretanto ainda não há um esclarecimento em relação ao seu mecanismo *in vivo* (AFFONSO et al., 2012).

Diante dos resultados expostos, observa-se o óleo essencial do cravo-da-índia apresenta propriedades medicinais que podem atuar como fonte alternativa de antioxidantes naturais. O óleo essencial pode ser utilizado como uma fonte acessível de antioxidantes naturais

e como um possível suplemento alimentício ou em aplicações farmacêuticas. Além disso, pode ser utilizado como um aditivo contra a deterioração oxidativa.

A verificação a capacidade da inibição da acetilcolinesterase foi realizada pelo método de Ellman et al. (1961), o método pode ser qualitativo e quantitativo. Este método é baseado na hidrólise da acetiltiocolina pela acetilcolinesterase, produzindo tiocolina que reage com o DTNB, originando o composto 5-tio-2-nitro-benzoato, que apresenta coloração amarela reação demonstrada na figura 13.

Figura 13 - Reações envolvidas no método de Ellman



Fonte: (Silva, 2009)

De acordo com os resultados expostos na Tabela 7 o óleo essencial do apresentou um halo de inibição igual ao do padrão Eserina que é um dos anticolinesterásicos bastante utilizado para o tratamento de pessoal diagnosticada com Doença de Alzheimer.

Tabela 7 – Atividade Inibitória da AChE frente ao óleo essencial do *Syzygium aromaticum*

<i>Amostras</i>	<i>Resultado</i>	<i>Tamanho do halo (mm)</i>
Padrão Eserina	Positivo	9
<i>Syzygium aromaticum</i>	Positivo	9

Fonte: autora

Os resultados dos estudos de inibição da acetilcolinesterase permitem concluir que o óleo essencial do cravo-da-índia se comportou como um anticolinesterásico, apresentando um resultado positivo de inibição da AChE. Compostos capazes de inibir ou reativar a enzima

AChE são potenciais fármacos para Doença de Alzheimer e o tratamento de doenças relacionadas.

Um dos ensaios de letalidade mais empregado para calcular a toxicidade geral tem sido o teste com larvas de *Artemia salina* e vem sendo reportado na literatura com frequência, não só para avaliar a toxicidade de substâncias, óleos, produtos e extratos vegetais, como também para determinar grau de contaminações ambientais (BAROSA, 2003).

Esta técnica é utilizada em testes de toxicidade aguda devido à sua capacidade para formar cistos dormentes, sua praticidade de manuseio e cultivo, por ser um método rápido e barato, aplicável como bioindicador em uma avaliação toxicológica pré-clínica (CARVALHO, C. A. de. *et al.* 2009).

O parâmetro de classificação do óleo do *Syzygium aromaticum* frente *Artemia salina* tem base nos valores das DL₅₀ estabelecidos nos estudos de (DOLABELA, 1997) (MEYER et al., 1982), sendo definido como DL₅₀ ≤ 80 µg/ml, o produto é altamente tóxico; DL₅₀ entre 80 a 250µg/mL, o produto é moderadamente tóxico e DL₅₀ ≥250 µg/ml, o produto é levemente tóxico ou atóxico. O critério de avaliação em que considera a amostra tóxica ou ativa as que apresentarem DL₅₀ <1000 µg/ml e amostras atóxicas ou inativas as que apresentarem DL₅₀ >1000 µg/ml.

A relevância deste ensaio relaciona-se ao fato de que vários autores tendem correlacionar a toxicidade frente a *Artemia salina* com atividades anticancerígena, antifúngica, antiviral, antimicrobiana, inseticida e tripanossomicida (MEYER *et al.*, 1982; MACRAE; HUDSON; TORRES, 1988; Mc LAUGHLIN, 1991; SAHPAZ, 1994). A Tabela 8 demonstra os dados coletados no teste de toxicidade com *Artemia salina* no qual apresenta a mortalidade dos animais de acordo com a concentração.

Tabela 8 – Porcentagem de mortalidade por concentração do óleo essencial *Syzygium aromaticum*

Concentração	LOG	N° de larvas vivas						CN*
		24h		48h				
1000 µg/ml	3,000	0	0	0	0	0	0	10
500 µg/ml	2,698	0	0	0	0	0	0	10
250 µg/ml	2,397	0	0	0	0	0	0	10
125 µg/ml	2,096	2	2	2	0	0	0	10
62,5 µg/ml	1,795	3	3	3	1	1	1	10
31,25 µg/ml	1,494	4	4	4	2	2	2	10

*Controle Negativo

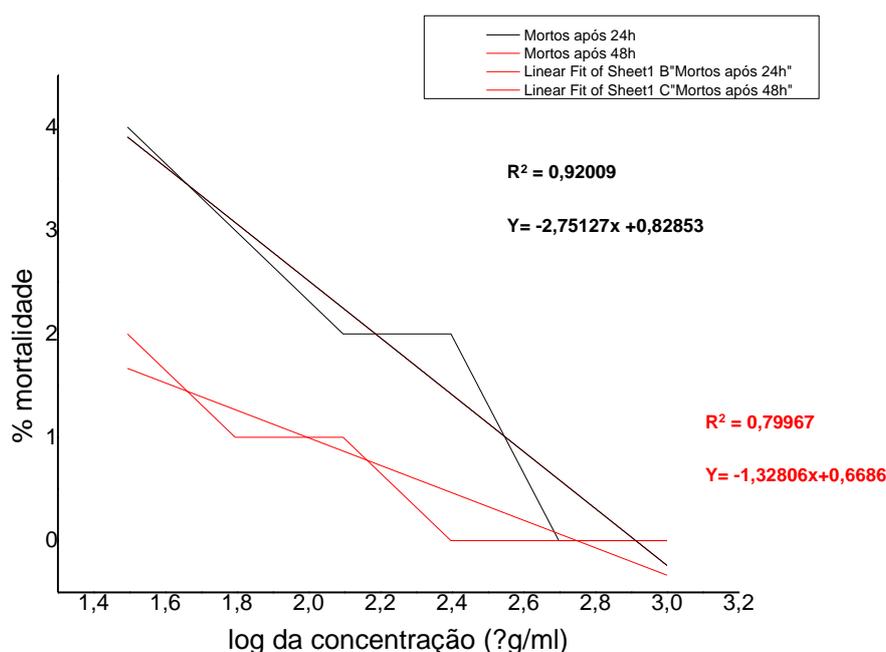
Fonte: autora

Os resultados dispostos na tabela acima demonstra que das concentrações 1µg/ml a 250µg/ml o óleo demonstrou ser altamente tóxico e de 125µg/ml a 31,25µg/ml levemente tóxico. Como descritos nos parâmetros de (DOLABELA, 1997).

A dose letal a 50 % (DL₅₀) foi encontrada próxima a log dose de 3,000 do óleo essencial do *Sygygium aromaticum* a partir do teste de toxicidade, avaliando o grau de letalidade pelo produto, foi igual a 1µg/mL, considerado altamente tóxico (DOLABELA, 1997).

A Figura 13 mostra o percentual de mortalidade na proporção que há um aumento de concentração do óleo. Alcançando um R² de 0,92009 desmontando um percentual de 92% de grau de confiança.

Figura 13 - Regressão linear do percentual de *Artemias salina* mortas após exposição do óleo essencial do cravo-da-índia 24-48h



Fonte: autora

(µg/mL⁻¹)

Segundo BARROS - GOMES et al. (2018) a toxicidade a amostra a *Artemia salina* pode ser apontada pela presença do eugenol, que é o composto majoritário do óleo essencial do cravo-da-índia. O mesmo apresenta grande capacidade bactericida, fungicida, antimicrobiano, antisséptico e antialérgico, mas também pela mistura de outros componentes presentes nesse

óleo, como por exemplo, o cariofileno e o copaeno que possuem um ótimo poder cicatrizante, diurético, anti-inflamatório, aumentando assim o poder de toxicidade do óleo essencial.

Ensaio de letalidade frente a *Artemia salina* é uma metodologia extensamente utilizada na linha de pesquisa de produtos naturais para avaliar o potencial tóxico de extratos e substâncias isoladas (HIROTA, 2012).

A capacidade larvicida do óleo essencial do *Syzygium aromaticum* foi testada em cinco diferentes concentrações. Utilizou-se 20 larvas do mosquito *Aedes aegypti* em cada concentração, os ensaios foram realizados em triplicata. O ensaio foi monitorado e os dados foram coletados e organizados em planilhas do Origen 9.0.

No que diz respeito à ação larvicida, o óleo essencial de cravo da Índia induziu 100% de mortalidade nas diluições de $1\mu\text{g/ml}^{-1}$ a $250\mu\text{g/ml}^{-1}$ demonstrando avaliadas uma alta capacidade larvicida. Nas concentrações como $125\mu\text{g/ml}^{-1}$ e $62,5\mu\text{g/ml}^{-1}$ a mortalidade foi de 90% e 80% respectivamente.

Tais resultados concordam com os apresentados por Costa et al. (2005) e por Feitosa (2017), os quais verificaram 100% de mortalidade de larvas desta espécie, quando submersas em soluções semelhantes as avaliadas no presente trabalho.

Na Tabela 10 pode ser observado os dados referentes a mortalidade em cada concentração. Após o ensaio, montou-se uma tabela com os valores das 5 concentrações, logaritmo das mesmas, o número de larvas mortas após 24 horas número de larvas vivas após 24 horas.

Tabela 10 – Mortalidade das larvas de 3 e 4 estágios de *Aedes aegypti* após 24h

DOSE ($\mu\text{G/ML}^{-1}$)	LOG	MORTOS	VIVOS	CN*
1000	3,000	20	0	20
500	2,698	20	0	20
250	2,397	20	0	20
125	2,096	19	1	20
62,5	1,795	18	2	20

*CN – Controle negativo

Fonte: autora

A análise estatística dos dados foi realizada de acordo com o método descrito por REED & MUENCH (1938 *apud* Colegate & Molyneux, 1993), o qual parte do princípio de que um animal que sobreviva a certa dose, também irá sobreviver em qualquer outra dose menor que

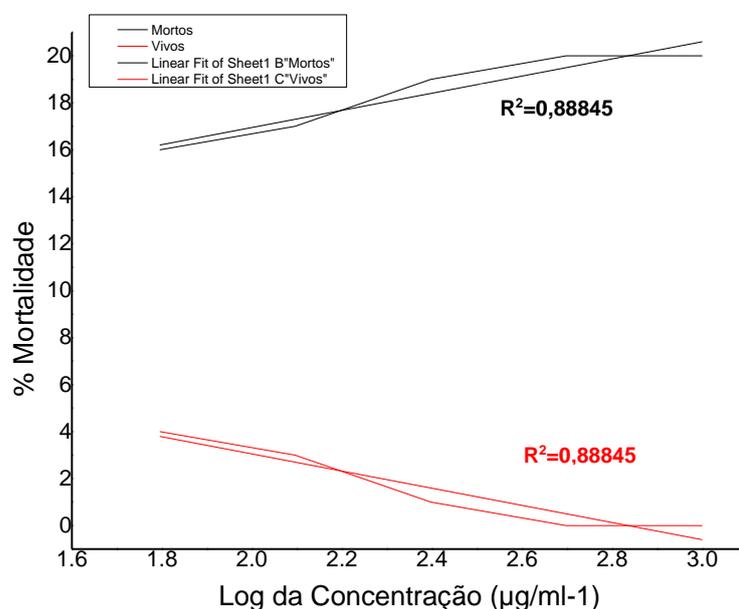
aquela e conseqüentemente o animal que morrer com certa dose, também irá morrer em doses maiores que aquela. Diante disso, observou-se onde teve menor taxa de mortalidade foi na concentração 62,5 com log 1,795. Animais que sobreviveram a essa dose podem sobreviver a menores que essa. A Concentração Letal 50% (CL₅₀), é a concentração na qual o número de larvas vivas e mortas se igualam. A CL₅₀ para o óleo foi encontrada próxima ao Log dose 1,795. Resulta bem próximo ao que foi reportado nos estudos feitos por (NASCIMENTO, 2012).

Cabe ressaltar, que a indução de morte das larvas observada foi obtida em um intervalo de tempo menor do que os apresentados na literatura. Nas concentrações de 1000µg/ml a morte era quase instantânea. Com isso, verificou-se que doses acima de 62,5 eram altamente tóxicas a espécie testada.

CHENG et. al. (2003) reporta que bons agentes larvicidas as substâncias com valor de CL₅₀ < 100µg mL⁻¹ são considerados ativos. Isso comprova que os valores acima disso provoca morte instantânea da larva, o que foi registrado no ensaio realizado neste trabalho.

Na Figura 14 mostra a regressão estabelecida pelos dados com grau de confiança de 88,8 % para este teste.

Figura 14- Regressão linear do percentual de larvas mortas e vivas após exposição do óleo essencial do cravo- da-índia 24h



Fonte: autora

Estudos demonstram que os componentes terpênicos, álcoois e aldeídos dos óleos essenciais são os principais responsáveis pela atividade inseticida ou larvicida em relação ao *Aedes aegypti* (Lucia et al., 2007; Lee, 2006;).

SIMAS et al. (2004) pesquisando produtos naturais no controle do dengue identificaram diversas classes de terpenos, como os compostos α - pineno, β -pineno, linalol e eugenol. Os autores indicam também que algumas características estruturais químicas são importantes para a atividade biológica como o número de ligações duplas conjugadas parecem contribuir para um aumento na potência, já que compostos aromáticos, tais como, timol, carvacrol, e eugenol apresentam potencial larvicida bem elevados (SANTOS et al., 2011). Geralmente se atribui o potencial biológico ao componente majoritário, no caso deste trabalho, o composto testado foi o óleo essencial do *Syzygium aromaticum* extraído dos botões florais.

RAINA (2001) e ATTOKARAN (2011) reportam que o teor de eugenol presente nos botões é de 85%, ou seja, produto majoritário do óleo essencial do cravo da Índia. Diante dos resultados aqui apresentados e da necessidade cada vez maior de novas substâncias capazes de combater o desenvolvimento de mosquitos causadores de patologias, e que ao mesmo tempo ofereçam maior segurança para os seres humanos e ao meio ambiente, seletividade, biodegradabilidade, viabilidade econômica e baixo impacto ambiental, o óleo essencial de *Syzygium aromaticum* apresenta-se como um promissor agente larvicida natural em locais de crescimento de larvas do *Aedes aegypti*.

A sensibilidade ao óleo foi classificada pelo diâmetro do halo das zonas de inibição descritos na tabela 11 referente aos parâmetros de sensibilidade para óleos essenciais descrito por (Ponce et al. 2003; Moreira et al. 2005). A atividade antibacteriana do óleo essencial do cravo-da-Índia (*Syzygium aromaticum*) pelo método da difusão em disco em relação às cepas de *para Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, estão apresentadas na tabela 12.

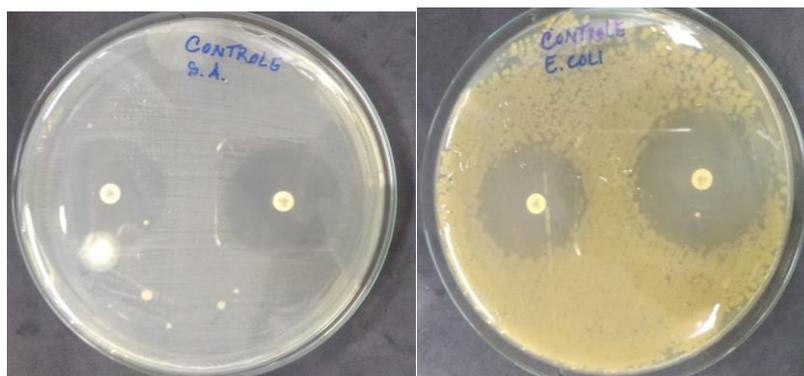
Tabela 11 – Classificação dos padrões de sensibilidade de diferentes óleos essenciais

<i>Sensibilidade</i>	<i>Halo (mm)</i>
<i>Não sensível (-)</i>	Menor que 8
<i>Sensível (+)</i>	Entre 9-14
<i>Muito sensível (++)</i>	Entre 15-19
<i>Extremamente sensível (+++)</i>	Maior que 20

Fonte: (MOREIRA et. al, 2005, p. 566).

A título de controle foram realizados ainda testes de suscetibilidade de tais bactérias ao seu padrão Cloranfenicol como demonstrado na Figura 15. Para a cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 o padrão do halo vai de 19 a 23mm e para a cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 o halo vai de 21 a 27mm.

Figura 15 - Padrão de Halo para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 25922 utilizando discos de Cloranfenicol



Fonte: autora

O antibiograma demonstrou que o óleo essencial apresentou, sensibilidade frente as estirpes bacterianas testadas. A Tabela 12 expõe o resultado do teste nas concentrações testadas. A identificação se dá pelo aparecimento de um alo ao redor dos discos embebido com o óleo.

Tabela 12 – Resultado da Concentração Mínima Inibitória do óleo essencial do *Syzygium aromaticum* ($\mu\text{L}/\text{ml}$).

Concentração	<i>Staphylococcus au</i> ATCC 25923	Sensibilidade	<i>Escherichia c</i> ATCC 25922	Sensibilidade
1:1	8 mm	Sensível	15 mm	Muito sensível
1:2	4 mm	Não sensível	10 mm	Sensível
1:4	2 mm	Não sensível	9 mm	Sensível
1:8	NI*	Não sensível	3 mm	Não sensível
1:10	NI*	Não sensível	NI*	Não sensível

*NI – não inibiu

Fonte: autora

Embora a susceptibilidade do óleo essencial do cravo-da-índia não tenha apresentado halos de tamanho igual ao do controle, é possível a partir dos dados apresentados concluir que houve a formação de halo ao redor do disco. Segundo os parâmetros apresentados na Tabela 12, a bactéria e a *S. aureus* na concentração de 1:1 apresentou um halo de inibição de 8 mm demonstrando sensibilidade (+) ao óleo essencial. Já nas concentrações 1:2 e 1:4 o halo observado é menor que 8 demonstrando não ser sensível ao óleo. Nas concentrações 1:8 e 1:10 não apresentaram halo de inibição, demonstrando não haver sensibilidade alguma ao óleo. Já a *E.coli* apresentou ser muito sensibilidade (++) na concentração 1:1 e sensível nas concentrações 1:2 e 1:4 já nas concentrações 1:8 e 1:10 não apresentaram sensibilidade ao óleo.

Um estudo feito por SILVESTRI et al. (2010) onde foi realizado a atividade antimicrobiana do óleo essencial do cravo-da-índia por dois métodos: o de difusão em placas e o método indireto de crescimento microbiano, ficou comprovado que as bactérias *E. coli* e *S. aureus* mostraram-se susceptíveis ao óleo essencial do cravo da índia nos dois métodos.

O teste realizado neste trabalho indica que na proporção que a concentração de óleo aumenta, maior é o halo de inibição frente as cepas bacterianas testadas. De acordo com os resultados obtidos nesse ensaio, as cepas bacterianas apresentaram sensibilidade nas concentrações mais altas assim como já relatado na literatura.

O uso do óleo essencial do *Syzygium aromaticum* como agente antimicrobiano natural podem ser aplicados em produtos alimentícios, surge como uma alternativa para aumentar a segurança e a vida de prateleira dos alimentos (SANTOS et al., 2010). Uma vez que, os microrganismos são os principais responsáveis por Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA). A ingestão de água e alimentos contaminados por patógenos vivos ou suas toxinas podem causar infecções, intoxicações e toxinfecções alimentares (OLIVEIRA et al., 2013). Os principais agentes etiológicos identificados nos surtos de DTA no Brasil são as bactérias: *Escherichia coli*, *Salmonella entérica*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* (NUNES et al., 2017)

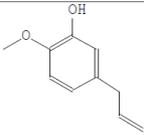
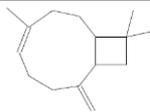
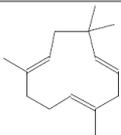
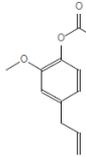
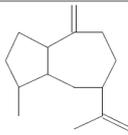
Segundo RABÊLO (2010) óleos ricos em eugenol e outros aldeídos possuem uma boa atividade antibactericida. Diversos autores atribuem ao composto majoritário do óleo de cravo-da-índia, o eugenol, não só o efeito bactericida, mas também outras propriedades biológicas. Entretanto, a ação conjunta dos vários compostos presentes nos óleos é denominada sinergismo, o que confere uma boa capacidade antibacteriana.

Antes e depois do processo biocatalítico o óleo essencial de *Syzygium aromaticum* foi submetido a análise para identificar sua composição em Cromatografia gasosa acoplado ao

espectro de massa (GC/EM) Shimadzu /QP2010 usando uma coluna capilar RTX-5 (30 m x 0,25mm, espessura de filme de 0,25 μm) e o gás de arraste é hélio. Para a análise de temperatura do forno de óleo essencial foi programado de 40-180°C a uma taxa de 4°C/ min, após 180-280°C a uma taxa de 20°C/min e mantida a 280°C por 10 min. Para a análise de temperatura fixa do forno de óleo foi programado de 80-280°C a uma taxa de 5° C/min, depois de 280-300°C a uma taxa de 20°C/min e mantido a 300 °C por 5 min. Os índices de retenção Kovat foram calculados usando uma série de N-alcano padrão (C7-C30). A identificação dos compostos foi realizada comparando seus espectros de massa com os da biblioteca NIST08, índices de retenção e publicações dados (ADAMS, 2007).

O Quadro 1 apresenta os dados coletados no CG/EM no qual foram identificados os constituintes e seus respectivos teores nos botões florais de *Syzygium aromaticum* antes do processo biocatalítico.

Quadro 1 - Teores e estruturas dos constituintes do óleo de *Syzygium aromaticum* identificados e quantificados por Cromatografia Gasosa antes do processo biocatalítico (tabela)

Pico	RT	Composto	%	Estrutura
1	10.626	<i>p</i> -eugenol	40,33	
2	10.976	isocariofileno	11,75	
3	11.144	α -humuleno	2,07	
4	11.444	Acetato de eugenol	39,65	
5	11.771	7-Isopropenil-1-metil-4-metilenedecahidroazuleno	6,20	

Fonte: Autora

Para efeitos de comparação, o Quadro 2 demonstra os constituintes e seus respectivos teores encontrados na literatura. A análise das amostras confirmou o eugenol como principal composto presente nos extratos, corroborando os resultados de vários autores que identificaram esta substância como o principal componente em extratos de *S. aromaticum*. Diante dos dados mostrados no Quadro 1 e 2 é prudente afirmar que o eugenol de fato se apresenta como constituinte majoritário variando apenas o teor. Geralmente a composição química de um óleo essencial extraído de uma mesma espécie vegetal pode variar significativamente, de acordo com, por exemplo, a época de coleta, condições climáticas, tipo de solo, quimiotipos e ciclo vegetativo. (SIMÕES & SPITZER, 2003).

Quadro 2 - Porcentagem dos compostos identificados na composição do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* descrito na literatura

Composto	Teor (%)	Parte da planta	Autores
Eugenol	90,3	Botão floral	SILVESTRI et al, 2010.
β -cariofileno	4,83		
Acetato de eugenol	1,87		
Eugenol	79,02	Folhas	NEVES et al, 2010.
β -cariofileno	12,58		
Acetato de eugenila	0,29		
Eugenol	82,47	Folhas	AFFONSO et al, 2012.
β -cariofileno	10,78		
α -humuleno	1,44		
Acetato de eugenila	1,89		
Óxido de cariofileno	0,47		
Eugenol	52,53	Frutos	RABELO, 2010.
β -cariofileno	37,25		
α -humuleno	4,11		
Acetato de eugenila	4,05		
Copaeno	2,05		

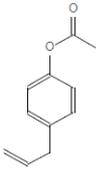
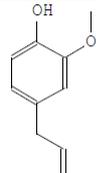
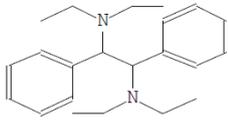
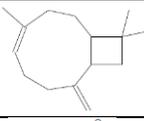
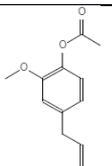
Eugenol	63,27	Botão Floral	SANTOS, 2014
Acetato de eugenol	33,00		
β -cariofileno	2,97		

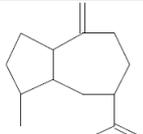
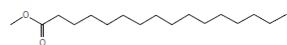
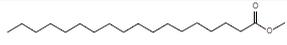
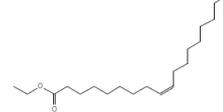
Fonte: Autora

Após o processo biocatalítico realizado com estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* a amostra de óleo essencial foi novamente submetida ao CG/EM onde foi identificado uma alteração na composição. É observável uma diminuição do produto majoritário, o eugenol como também de outros constituintes e a formação de novos.

O Quadro 3 apresenta os dados coletados e nota-se o surgimento do Acetato de Chavicol (0,73%), N,N,N',N'-tetraetil-1,2-difenil-etano-1,2-diamina (31,24%), 7-Isopropenil-1-metil-4-metilenedecahidroazuleno (2,11%), Hexadecanoato de metila(1,15%), z-6-octadecenoato de metila (0,83%), Octadecanoato de metila (0,58%), Z-9-octadecenoato de etila(0,47%).

Quadro 3 - Teores e estruturas dos constituintes do óleo de *Syzygium aromaticum* identificados e quantificados por CG/EM após a Bicatálise

Pico	TR	Composto	%	Estrutura
1	9.841	Acetato de chavicol	0,73	
2	10.625	<i>p</i> -eugenol	30,73	
3	10.663	N,N,N',N'-tetraetil-1,2-difenil-etano-1,2-diamina	31,24	
4	10.961	isocariofileno	5,10	
5	11.423	Acetato de eugenol	27,06	

6	11.763	7-Isopropenil-1-metil-4-metilenedecahidroazuleno	2,11	
7	12.885	Hexadecanoato de metila	1,15	
8	13.472	z-6-octadecenoato de metila	0,83	
9	13.540	Octadecanoato de metila	0,58	
10	13.673	Z-9-octadecenoato de etila	0,47	

RT = Tempo de Retenção

Fonte: Autora. Os resultados obtidos neste ensaio, é possível afirmar que o óleo essencial do *Syzygium aromaticum* e estirpe *Saccharomyces cerevisiae*, como biocatalizador, foram responsáveis pelas conversões obtidas. Esses estudos são preliminares e servem como ponto de partida para estudos posteriores como o isolamento, a purificação e a elucidação estrutural das substâncias que foram sintetizadas, além de ajudar a inferir sobre um possível mecanismo de ação dessas substâncias, finalizando por testar a viabilidade terapêutica, medicinal, farmacêutica e outras aplicações.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho levaram a concluir que os botões florais do cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) o forneceram um rendimento cujo percentual 3,63%, m/v, um valor consideravelmente bom para esse método de extração; os parâmetros físico-químicos do óleo essencial apresentaram resultados satisfatórios, no que se diz respeito à avaliação da qualidade do óleo extraído.

A avaliação da atividade antioxidante do óleo essencial do cravos-da-índia por métodos de captura de DPPH demonstrou um percentual de confiança de 98,68% e fornecendo um IC₅₀ de 0,81191µg/ml demonstrando ser um promissor agente antioxidante, podendo ser utilizado na indústria alimentícia e farmacêutica.

O óleo essencial do cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) se comportou como um anticolinesterásico obtendo um resultado positivo no que diz respeito ao potencial inibidor de AChE apresentando um halo de inibição de 9mm o mesmo obtido pela Eserina que é um anticolinesterásico comercialmente vendido sendo ele, utilizado no tratamento do Alzheimer, e

outras doenças relacionadas. Compostos capazes de inibir ou reativar a enzima AChE são potenciais fármacos e o óleo essencial do cravo-da-índia se mostrou bastante promissor.

O bioensaio de toxicidade utilizando microcrustáceo como *Artemia salina* demonstrou que o óleo essencial do cravo-da-índia e o seu componente majoritário o eugenol apresentaram alta toxicidade frente às larvas de *Artemia salina* demonstrando uma DL₅₀ de 1µg/ml. Estes dados toxicológicos, segundo Parra et al. (2001), podem ser correlacionados com testes de toxicidade aguda oral em animais.

O resultado do teste larvicida mostrado neste trabalho sugere que o óleo essencial do *Syzygium aromaticum* possui atividade larvicida frente ao *Aedes aegypti*. Dessa forma o óleo essencial apresenta-se como uma alternativa natural no combate às larvas do *Aedes aegypti* apresentando uma DL₅₀ de 62,5µg/ml. Os resultados foram considerados promissores, no entanto faz-se necessário um número maior de pesquisas com concentrações menores que a DL₅₀ aqui encontrada para utilizar o óleo de *Syzygium aromaticum* como larvicida.

O óleo essencial do cravo-da-índia, apresentou atividade antibacteriana frente as cepas de *E.coli* e *S. Aureus* testadas. Porém, a *E.coli* demonstrou ser mais sensível ao óleo essencial do que a *S. Aureus* apresentando halos de inibição máximos de 15mm e 8mm respectivamente, logo sugere-se que o óleo essencial inibiu com mais eficiência bactéria do tipo Gram positiva do que Gram negativa. Para atestar com mais evidencias, sugere-se que mais testes sejam realizados com mais bactérias Gram negativas e positivas.

O processo biocatalítico com resultou na formação do Acetato de Chavico (0,73%), N,N,N',N'-tetraetil-1,2-difenil-etano-1,2-diamina(31,24%), Hexadodecanoato de metila(1,15%), z-6-octadecenoato de metila (0,83%), Octadecanoato de metila (0,58%), Z-9-octadecenoato de etila(0,47%).

REFERÊNCIAS

ADEWUSI, E. A., Moodley, N., Steenkamp, V., **Antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activity of selected southern African medicinal plants**, South African Journal of Botany, 2011, 77, 638-644

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

AFFONSO, R.S.; LESSA, B.; SLANA, G. B. C. A.; BARBOZA, L.L.; ALMEIDA, F. V. de; LIMA, A. L. S.; SOUZA, F. R. de; FRANÇA, T. C. C. **Quantificação e Caracterização dos Principais Componentes do Extrato Etanólico de Cravo-da-Índia *Syzygium aromaticum*** [I] Merr. et Perry. **Revista Virtual de Química**, V. 6, nº. 5, 2014, p. 1316-1331

ALDRICH. HANDBOOK OF FINE CHEMICALS AND LABORATORY EQUIPMENT. BRASIL. P.804. 2001.

AMARANTE, C.B.; SILVA, J.C.F.; SOLANO, F.A.R.; NASCIMENTO, L.D.; MORAES, L.G.; SILVA, G.F.; UNO, W.S. 2009. **Spectrometric study of the leaves of Aninga (*Montrichardia linifera*) collected from the Guama River, Campus of UFPA, Belém-PA**. A contribution to the chemical study of the Araceae family. Revista Científica da UFPA, 7: 1-19. (In Portuguese, with abstract in English)

ASCENÇÃO, Vanessa Louzeiro; FILHO, Victor Elias Mouchrek. **Extração, caracterização química e atividade antifúngica de óleo essencial *Syzygium aromaticum* (CRAVO DA ÍNDIA)**. In XXIV Encontro do SEMIC, 2013, São Luís. Cad. Pesq., São Luís, v. 20, n. especial, julho 2013.

ASSUNÇÃO, J. C. C. et al. **Sugar cane juice for the bioreduction of carbonyl compounds**. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 52-53, 194–198. 2008.

ATTOKARAN, M. **Natural food flavors and colorants**. USA: Blackwell Publishing Ltd. and Institute of Food Technologists, p. 145, 2011.

ADORJAN, B.; BUCHBAUER, G. Biological properties of essential oils: An updated review. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 25, n. 6, p. 407–426, 2010.

BAROSA, J. **Teste de toxicidade do cobre para *Artemia salina***. **Disciplina: Poluição e Ecotoxicologia Marinha**. Faculdade de Ciências do Mar e do Ambiente, Universidade de Algarves, 2003. Disponível em: Acesso em: 30 jan. 2010

BASER, K. H. C.; DEMIRCI, F. **Chemistry of essential oils**. In: BERGER, R. G. **Flavours and Fragrances: Chemistry, Bioprocessing and Sustainability**. Hannover: Springer, 2007. Cap. 4, p. 43-86.

BRITO, D. I. V.; MORAIS-BRAGA, M. F. B.; CUNHA, F. A. B.; ALBUQUERQUE, R. S.; CARNEIRO, J. N. P.; LIMA, M. S. F.; LEITE, N. F.; SOUZA, C. E. S.; ANDRADE, J. C.; ALENCAR, L. B. B.; LAVOR, A. K. L. S.; FIGUEREDO, F. G.; LIMA, L. F.; COUTINHO

H. D. M. Análise fitoquímica e atividade antifúngica do óleo essencial de folhas de *Lippia sidoides* Cham. e do Timol contra cepas de *Candida* spp. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.17, n.4, supl. II, p.836-844, 2

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

BUQUE-TABOADA, E. M.; STRAATHOF, A. J. J.; HEIJNEN, J. J.; VAN DER WIELEN, L. A. M. **Substrate inhibition and product degradation during the reduction of 4-oxoisophorone by *Saccharomyces cerevisiae***. *Enz. Microb. Technol.* v. 37, p. 625-633, 2005.

CAMPANIELLO, D.; CORBO, M. R.; SINIGAGLIA, M. **Antifungal activity of eugenol against *Penicillium*, *Aspergillus*, and *Fusarium* species**. *Journal of Food Protection*, v. 73, p. 1124-1128, 2010.

CANTRELL, L.; PRIDGEON, J. W.; FRONCZEK, F. R.; BECNEL, J. J. **Structure – Activity Relationship Studies on Derivatives of Eudesmanolides from *Inula helenium* as Toxicants against *Aedes aegypti* Larvae and Adults Although there is a safe and effective vaccine for the yellow fever virus , epidemic transmission still occ.** *Chemistry and biodiversity*, v. 7, p. 1681–1697, 2010

CARVALHO, A. F. et al. **Larvicidal activity of the essential oil from *Lippia sidoides* against *Aedes aegypti***. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, n. 98, p. 569-71, 2003
CEPLEANU, F. 1993. **Validation and application of three benchtop bioassays for screening of crude plant extracts and subsequent activity-guided isolation**. Suíça, 259p. These de Doctorat, Faculté des Sciences de l'Université de Lausanne, Lausanne.

CHAIEB, K.; Hajlaoui, H.; Zmantar, T.; Kahla-Nakbi, A. B.; Rouabhia, M.; Mahdouani, K.; Bakhrouf, A. **Phytother. Res.** 2007, 21, 501.

CHENG, S.S. et al. **Bioactivity of selected plant essential oils against the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* larvae**. *Bioresource. Technology*, v. 89, p.99-102, 2003.

CLSI – CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Normas de desempenho para testes de sensibilidade antimicrobiana**. 15º suplemento informativo. ANVISA, 2008. Disponível em: Acesso em: 11 nov. 2009.

COSTA, A. R. T. **Ação do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M.Perry sobre as hifas de alguns fungos fitopatogênicos**. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, vol 13, nº2, 240–245. 2011.

COLEGATE, S. M. & MOLYNEUX, R. J. **Bioactive Natural Products: Detection, Isolation, and Structural Determination**. Boca Raton: CRC Press, 1993.544 p.

CORTES-ROJAS, D. F.; SOUZA, C. R. F.; OLIVEIRA, W. P. Clove (*Syzygium aromaticum*): A precious spice. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. v. 4, p. 90-96, 2014.

CRAVEIRO, Afrânio Aragão; DE QUEIROZ, Danilo Caldas. **Óleos essenciais e química fina**. *Revista Química Nova*, Vol. 16, n. 03, 1993, p.224-228

DELBONE, C. A.C.; LANDO, R. L. **Importância ecológica e evolutiva dos principais grupos de metabólitos secundários nas espécies vegetais.** Congresso de Educação do Norte Pioneiro. 10ª edição. UENP-CCNE-CLA- Campus Jacarezinho. 2010. ISSN-1808-3579

D'ARRIGO, P.; FANTONI, G.P.; SERVI, S.; STRINTI, A. **The effect of absorbing resins o substrate concentration and enantiomeric excess in yeast reduction.** Tetrahedron: Asymmetr, v. 8, n. 14, p. 2375-2379, 1997

DIAS, H.P; PAIVA, D.S; ROMÃO, W; ENDRINGERA, D.C. **Identificação de Polifenóis: Sequência Pedagógica para o Ensino Médio.** Revista Virtual de Química. V.6, nº. 2, Mar/Abr. 2014, p.467-477.

DIAS, C. N.; MORAES, D. F. C. **Essential oils and their compounds as *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvicides:** Review. Parasitology Research, v. 113, n. 2, p. 565–592, 2014.

DICOSIMO, R. et al. **Industrial use of immobilized enzymes.** Chem Soc Rev, 2013.

DOHI, S., Terasaki, M., Makino, M. 2009. **Acetylcholinesterase Inhibitory Activity and Chemical Composition of Commercial Essential Oils.** Journal of Agricultural and Food Chemistry. v, 57. p, 4313 – 4318.

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

DORMAN, H.; FIGUEIREDO, A.; BARROSO, J.; DEANS, S. **In vitro antioxidant activity of a number of plant essential oils and phytoconstituents.** Journal of Essential Oil Research, v. 12, p. 241- 248, 2000.

DUARTE, R. C. **Estudo dos compostos bioativos de especiarias (*Syzygium aromaticum* L, *Cinnamomum zeylanicum* Blume e *Myristica fragans* Houtt) processadas por radiação ionizante.** 2014. 145 f. Tese (Doutorado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Aplicações). São Paulo – SP, 2014.

ELLMAN, G.L., Courtney, K.D., Andres JR. V., Featherstone, R., **A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity,** Biochemical Pharmacology, 1961, 7, 88-95

ENAN E. **Insecticidal activity of essential oils: octopaminergic sites of action.** Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 130: 325-337, 2001

FEITOSA, Julianne Gomes; Bastos, Nayara da Silva; Siqueira, Priscila Kiwa Jorge de. **Aplicação e avaliação do óleo de cravo-da-índia como medida de combate e controle frente à *Aedes aegypti*.** /Pindamonhangaba-SP: FUNVIC Faculdade de Pindamonhangaba, 2017. 21f.: il.

ESCOBAR, Raimara Gonzalez. **Eugenol: propiedades farmacológicas y toxicológicas.** Ventajas y desventajas de su uso. Rev Cubana Estomatol. Ciudad de La Habana, V. 39 nº. 2, agosto 2002. Disponível em: <http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75072002000200005&lng=es&nrm=iso>. Acesso em: 10 jun. 2019.

FABER, K. **Biotransformations in Organic Chemistry.** 3.ed. Berlin: SpringerVerlag, 1997. 402p.

FARDELONE, L. C.; RODRIGUES, J. A. R.; MORAN, P. J. S. **Baker's yeast mediated asymmetric reduction of cinnamaldehyde derivatives.** J. Mol. Catal. B: Enzym., v. 29, p. 41-45, 2004.

F.J. FABROWSKI, “**Eucaliptus smithii R.T. Baker (Myrtaceae) como especie produtora de óleo essencial no sul do Brasil**”, tese de doutorado, Universidade Federal do Parana, Curitiba (PR), 2002.

FUJIWARA, M., Yagi, N., Miyazawa, M. 2010. **Acetyl- cholinesterase Inhibitory Activity of Volatile Oil from Peltophorum dasyrachis Kurz ex Bakar (Yellow Batai) and Bisabolane-Type Sesquiterpenoids.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 58, p. 2824–2829.

GIL, E. S.; PAULA, J. R.; NASCIMENTO, F. R. F.; BEZERRA, J. C. B. **Produtos naturais com potencial leishmanicida.** Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl, v. 29, No.3: 223-230, 2008.

GODINHO, Grazielle Cristina. **Atividade antibacteriana do óleo essencial do manjeriço.** 2012. 79p. Trabalho de conclusão de Curso (Química Industrial) – Fundação Educacional do Município de Assis – FEMA/Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis – IMESA.

HAMBURGER M, Hostettmann K 1991. **Bioactivity in plants: the links between phytochemistry and medicine.** Phytochemistry 12: 3864-3874.

HERNÁIZ, M. J.; Alcántara, A. R.; García, J. I.; Sinisterra, J. V.; Chem. - Eur. J. 2010, 16, 9422

HIROTA, B. C. K. et al. **Avaliação de toxicidade in vitro: aplicabilidade do ensaio de letalidade frente à Artemia salina.** Visão Acadêmica, Curitiba, v.13, n.2, Abr. – Jun./2012

HOLLAND, H. L. **Organic Synthesis With Oxidative Enzymes.** Weinheim: VCH, 1992

INOUYE, K.; Oliveira, G. H. **Avaliação crítica do tratamento farmacológico atual para Doença de Alzheimer.** Infarma 2004, 15, 80.

ISMAN, M. B. **Botanical Insecticides, Deterrents, and Repellents in Modern Agriculture and an Increasingly Regulated World.** Annu.rev.Entomol., v. 51, p. 45–66, 2005.

KAMATOU, G. P.; VERMAAK, I.; VILJOEN, A. M. **Eugenol—From the remote Maluku Islands to the international market place: a review of a remarkable and versatile molecule.** Molecules, vol 17, n 6, 6953–698. 2012.

- KAUFMAN, T. S. **The multiple faces of eugenol. A versatile starting material and building block for organic and bio-organic synthesis and a convenient precursor toward bio-based fine chemicals.** Journal of the Brazilian Chemical Society, v 26, n. 6, 1055-1085. 2015.
- KELECOM, A.; ROCHA, M. A.; MAJDALANI, E. C.; GONZALEZ, M. S.; MELLO, C. B. **Novas atividades biológicas em antigos metabólitos: ácido oleanólico e eugenol de *Eugenia caryophyllata*.** Revista Brasileira de Farmacognosia, Vol. 12: 70-71, 2002.
- KIM, H.M.; LEE, E.H.; HONG, S.H.; SONG, H.J.; SHIN, M.K.; KIM, S.H. **Effect of *Syzygium aromaticum* extract on immediate hypersensitivity in rats.** Journal of Ethnopharmacology, v. 60, p. 125, 1998.
- KUTCHAN, T. M. **Ecological arsenal and developmental dispatcher. The paradigm of secondary metabolism.** Plant Physiol., v. 125, p. 58-60, 2001.
- LEE, H. S. **Mosquito larvicidal activity of aromatic medicinal planta oils against *Aedes aegypti* and *Culex pipiens pallens*.** Journal of the American Mosquito Control Association, n. 22, p. 292-295, 2006.
- LIMA, Felipe Crescêncio. **Relaxamento do músculo liso traqueal de rato pelo eugenol.** 2009. 87p. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Ceará, Ceará, Fortaleza, 2009.
- LINARD, Cybelle Façanha Barreto Medeiros. **Estudo do efeito antinociceptivo do Eugenol.** 2008. 90p. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual do Ceará, Ceará, Fortaleza, 2008.
- LOIZZO, M.R., Tundis, R., Menichini, F., Menichini, F. 2008. **Natural products and their derivatives as cholinesterase inhibitors in the treatment of neurodegenerative disorders: An update.** Current Medicinal Chemistry, v. 15, p. 1209-1228.
- LUCIA, A. et al. **Larvicidal effect of *Eucalyptus grandis* essential oil and turpentine and their major components on *Ae. aegypti* larvae.** Journal of the American Mosquito Control Association, n. 23, p. 293-303, 2007.
- LUPE, F. A. **Estudo da composição química de óleos essenciais de plantas aromáticas da Amazônia.** Campinas, Instituto de Química, UNICAMP, 2007. Dissertação de mestrado, 120p.
- MACRAE, W. D.; HUDSON, J. B.; TORRES, G. H. **Studies on the pharmacological activity of Amazonian Euphorbiaceae.** J. of Ethnopharmacology, v. 22, p.143-172, 1988.
- MARTINS, R. M. et al. **Antimicrobial and cytotoxic evaluation of eugenol derivatives.** Medicinal Chemistry Research, 25, 2360-2367. 2016
- MATOS, F. J. A.; SOUSA, M. P.; OLIVEIRA, M. E. **Constituintes químicos ativos e propriedades biológicas de plantas medicinais brasileiras.** 2 ed. Fortaleza: Editora UFC, 2004.
- MAZZAFERA, Paulo. **Efeito alelopático do extrato alcoólico do cravo-da-índia e eugenol.** Revista Brasil. Bot., V. 26, nº. 2, jun. 2003, p. 231-238.

McLAUGHLIN, J. L. **Crown-gall tumours in potato discs and brine shrimp lethality: two simple bioassays for higher plant screening and fractionation.** In: HOSTETTMANNK (Ed). *Methods in plant biochemistry*. London: Academic Press, v. 6, p. 1-31, 1991.

McLAUGHLIN JL, Anderson JE 1988. **Brine shrimp lethality: A rapid general bioassay for bioactive compounds**, Workshop on simple bioassay. Washington

MEYER, B. N. et al. **Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents.** *Planta Médica*, v. 45, n. 1, p. 31-34, 1982.

MIHAI, A. L.; POPA, M. E. **In vitro Activity of Natural Antimicrobial Compounds against Aspergillus Strains.** *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 6, 585-592.2015.

MILLS, C., Cleary, B.J., Gilmer, J.F., Walsh, J.J. 2004. **Inhibition of etylcholinesterase by Tea Tree oil.** *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 56, p. 375-9.

MIYAZAWA, M.; HISAMA, M. **Antimutagenic activity of phenylpropanoides from clove (Syzygium aromaticum).** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, n.º.22, p. 6413, 2003.

MONTEIRO, O. S. **Estudo analítico do eugenol contido no óleo essencial extraído dos frutos da espécie Pimenta dioica Lindl e sua aplicação como agente bactericida.** São Luís: UFMA, 2004 Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Química Analítica, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2004

MOREIRA, M.R.; PONCE, A.G; VALLE, C.E. del; ROUR, S.I.; **Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen.** *LWT*. V. 38, 2005, p. 565-570.

MOUCHREK FILHO, V. E. **Estudos analíticos e modificações químicas por metilação e acetilação do eugenol contido no óleo essencial extraído das folhas da espécie Pimenta dioica Lindl.** São Carlos: USP, 2000. 124 p. Tese (Doutorado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2000.

MUKHERJEE, P. K., Kumar, V., Mal, M., Houghton, P. J., **Acetylcholinesterase inhibitors from plants**, *Phytomedicine*, 2007, 14, 289–300

MUKHERJEE, P. K., Kumar, V., Houghton, P. J., **Screening of Indian Medicinal Plants for Acetylcholinesterase Inhibitory Activity**, *Phytother. Res.*, 2007, 21, 1142–1145

NASCIMENTO, Alexandre Albuquerque do. **ESSENTIAL OIL OF FLORAL BUDS CARNATION-OF-INDIA (Syzygium aromaticum): EXTRACTION, CHARACTERIZATION AND LARVICIDAL ACTIVITY TOWARDS Aedes aegypti (Linnaeus, 1762).** 2012. 95 f. Dissertação (Mestrado em QUIMICA) - Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2012.

NUNES, Fátima Miranda. **Estudo químico do fungo fitopatogênico Lasiodiplodia theobromae (Sphaeropsidaceae)** / Fátima Miranda Nunes, 2008. 211 f. ;il. color. enc. Tese

(doutorado) - Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências. Depto. de Química Orgânica e Inorgânica, Fortaleza, 2008.

OKELLO, E.J., Dimaki, C., Howes, M.R., Houghton, P.J., Perry, E.K. 2008. **In vitro inhibition of human acetyl- and butyryl-cholinesterase by *Narcissus poeticus* (*Amaryllidaceae*)**. *Journal of Essential Oil Therapeutics*, v. 2, p. 105-110

PAQUES, F. W.; MACEDO, G. A. **LIPASES DE LÁTEX VEGETAIS: PROPRIEDADES E APLICAÇÕES INDUSTRIAIS**. *Química Nova*, 29, 93-99. 2006

PARRA, A.L.; YHEBRA, R. S.; SARDIÑAS, I. G.; BUELA, L. I. **Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts**. *Phytomedicine*, v.8, n.5, p.395-400, 2001.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. **Metabólitos ssecundários vegetais e benefícios antioxidantes**. *Journal of Biotechnology and Biodiversity*. Vol. 3, nº 4: p. 146-152. 2012. ISSN-2179-4804.

PEREIRA, F. D. O.; MENDES, J. M.; LIMA, E. D. O. **Investigation on mechanism of antifungal activity of eugenol against *Trichophyton rubrum***. *Medical Mycology*, 51, 507-513. 2013.

PERRY, N.S., Houghton, P.J., Theobald, A., Jenner, P., Perry, E.K. 2000. **In-vitro inhibition of human erythrocyte acetylcholinesterase by *salvia lavandulaefolia* essential oil and constituent terpenes**. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 52, p. 895–902.

PICOLLO, M.I., Toloza A.C., Mougabure C.G., Zygadlo, J., Zerba, E. 2008. **Anticholinesterase and pediculi- cidal activities of monoterpenoids**. *Fitoterapia*, v. 79, p. 271–278

PISANO, M. et al. **Antiproliferative and pro-apoptotic activity of eugenol-related biphenylson malignant melanoma cells**. *Molecular Cancer*, vol 6, 8. 2007.

POLUNIN, M.; ROBBINS, C. **A Farmácia Natural**. Londres, Civilização, 1993.

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.

P.R. Barros-Gomes, V.E. Mouchrek-Filho, W. Ferreira-Rabêlo, A. Albuquerque do Nascimento, H. Costa-Louzeiro, W. da Silva-Lyra, M. Alves-Fontenele, **Caracterização química e citotoxicidade do óleo essencial do cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*)**, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, 47(1), 37-52 (2018).

RABÊLO, Waléria Ferreira. **Caracterização química, toxicidade e avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial do cravo da índia (*Syzygium aromaticum*)**. 2010. 79p. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Maranhão, Maranhão, São Luís, 2010.

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 and Fragrance Journal*, v. 16, n^o. 5, p. 334-336, 2001.

RANA, I. S.; RANA, A. S.; RAJAK, R. C. Evaluation of antifungal activity in essential oil of the *Syzygium aromaticum* (L.) By extraction, purification and analysis of its main component eugenol. **Brazilian Journal of Microbiology**, India, v. 42, p. 1269-1277, 2011.

RATES, SM.K. **Plants as source of drugs.** *Toxicon*, v. 39, p. 603-613, 2001.

RATHORE, H. S. Green Pesticides for Organic Farming: Occurrence and Properties of Essential Oils for Use in Pest Control. In: NOLLET, L. M. L.; RATHORE, H. S. (Ed.) **Green Pesticides Handbook: Essential Oils for Pest Control.** Taylor & Francis, CRC Press, p. 554, 2017.

RAZAFIMAMONJISON, G.; JAHIEL, M.; DUCLOS, T.; RAMANOELINA, P.; FAWBUSH, F.; DANTHU, P. Bud, leaf and stem essential oil composition of clove (*Syzygium aromaticum* L.) from Indonesia, Madagascar and Zanzibar. **Nat Prod Commun.** v. 8, p. 1–7, 2013.

REED L.J. & MUENCH H. 1938. **A simple method of estimating fifty percent endpoints.** *American Journal of Hygiene*, v. 27, n. 3, p. 493-497, 1938

REIS, T. V. **Potencialidade das folhas do Craveiro-da-Índia cultivados no Sul da Bahia para extração de óleos essenciais.** In: XLVI Congresso Brasileiro De Química, Associação Br asileira De Química, Salvador, 25 a 29 de setembro de 2006.

RHEE, K.; Meent, M.; Ingkaninan, K.; Verpoorte, R. Screening for **Acetylcholinesterase Inhibitors from Amaryllidaceae Using Silica Gel Thin - Layer Chromatography in Combination with Bioactivity Staining.** *Journal of Chromatography A* 2001, 915, 217.

RODELLA, Fernanda Messias. **Extração e atividade antibacteriana do óleo essencial do cravo-da-índia/** Fernanda Messias Rodella. Fundação Educacional do Município de Assis-FEMA -Assis, 2015.

RODRIGUES, J. A. R.; MORAN, P. J. S. **Reduções enantiosseletivas de cetonas utilizando-se fermento de pão.** *Quím. Nova*, v. 24, n. 6, p. 893-897, 2001.

SAHPAZ, S. **Cytotoxic and antiparasitic activity from *Annona senegalensis* seeds.** *Planta médica*, v. 60, p. 538, 1994.

SANTOS, A. P. et al. **Composição química, atividade antimicrobiana do óleo essencial e ocorrência de esteróides nas folhas de *Pterodon emarginatus* Vogel; Fabaceae.** *Rev. Bras. Farmacogn.*, v. 20, n. 6, p. 891-896, 2010.

SANTOS, S. R. L.; SILVA, V. B.; BARBOSA, J. D. F. **Toxic Effects on and Structure-Toxicity Relationships of Phenylpropanoids , Terpenes , and Related Compounds.** *Vector-borne and zoonotic diseases*, v. 10, n. 10, p. 1049–1054, 2010.

SANTOS, S. R. L.; MELO, M. A.; CARDOSO, A. V.; Roseli L.C. SANTOS, R.L. C.; SOUSA, D. P.; CAVALCANTI, S. C. H. **Structure–activity relationships of larvicidal**

monoterpenes and derivatives against *Aedes aegypti* Linn. Chemosphere, Vol. 84: 150–153, 2011.

SCOTTI, L.; SCOTTI, M. T.; SILVA, V. B.; SANTOS, S. R. L.; CAVALCANTI, S. C. H.; MENDONÇA, F. J. B. J. **Chemometric studies on potential larvicidal compounds against *Aedes aegypti*. Medicinal chemistry** (Sharjah (United Arab Emirates)), v. 10, n. 2, p. 201–210, 2014

SEEBACH, D.; SUTTER, M. A.; WEBER, R. H. **Bakers' yeast reduction of ethyl acetoacetate.** In: ROBERTS, S. M. (Ed). Biocatalysts for Fine Chemicals Synthesis. Chichester: John Wiley & Sons, 1999.

SICHERI, Ana Paula Marques Pino. **Potencial antioxidante de extratos de especiarias em sistemas modelo e na estabilidade oxidativa do óleo de soja.** 2013. 126p. Dissertação (mestrado) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo, 2013.

SILVA, Maria do Socorro Sousa da. **Alcaloides de plantas da família Amaryllidaceae: isolamento, caracterização e testes de inibição de Acetilcolinesterase.** 2009. 234 p. Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, Campinas, SP. Disponível em: <<http://www.repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/249138>>. Acesso em: 13 ago. 2018.

SILVESTRI, J. D. F.; PAROUL, N.; CZYEWski, E.; LERIN, L.; ROTAVA, I.; CANSIAN, R. L.; MOSSI, A.; TONIAZZO, G.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. **Perfil da composição química e atividades antibacteriana e antioxidante do óleo essencial do cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata* Thunb.).** Revista Ceres, Viçosa, Vol. 57, No 5: 589-594, 2010.

SIMAS NK, Lima EC, Conceição SR, Kuster RM, Oliveira FA. **Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue - atividade larvicida de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides.** Rev Quím. Nova 27(1): 46-49, 2004.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. **Óleos voláteis.** In: SIMÕES, C. M. et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, cap. 18, p.467-495, 2003.

SIRAMON, P., Ohtani, Y., Ichiura, H. 2009. **Biological performance of *Eucalyptus camaldulensis* leaf oils from Thailand against the subterranean termite *Coptotermes formosanus* Shiraki.** Journal of Wood Science, v. 55, p. 41–46.

SOUZA, Thaúsi Frota Sá Nogueira Neves de. **Efeito antinociceptivo e anti-edematogênico do Eugenol.** 2007. 84p. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual do Ceará, Ceará, Fortaleza, 2007.

SOUZA, T. M.; CUNHA, A. P.; FARIAS, D. F.; MACHADO, L. K.; MORAIS, S. M.; RICARDO, N. M. P. S.; CARVALHO, A. F. **Insecticidal activity against *Aedes aegypti* of m-pentadecadienyl-phenol isolated from *Myracrodruon urundeuva* seeds.** Pest Management Science, v. 68, n. 10, p. 1380–1384, 2012

SOUZA, A., Silva, M.C., Cardoso-Lopes, E.M., Cordeiro, I., Sobral, M.E.G., Young, M.C.M., Moreno, P.R.H. 2009. **Differential acetyl cholinesterase inhibition by volatile oils**

from two specimens of *Marlierea racemosa* (Myrtaceae) collected from different areas of the.

SOUZA, A. A.; DIAS, N. A. A.; PICCOLI, R. H.; BERTOLUCCI, S. K. V. Composição química e concentração mínima bactericida de dezesseis óleos essenciais sobre *Escherichia coli* enterotoxigênica. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v.18, n.1, p.105-112, 2016

SOUZA, L. P.; ZAGO, H. B.; PINHEIRO, P. F.; VALBON, W. R.; ZUIM, V.; PRATISSO, D. Composição química e toxicidade do óleo essencial de eucalipto sobre o ácaro-rajado. **Comunicata Scientiae**, v. 7, n. 4, p. 486-493, 2016.

SRIVASTAVA, K.C.; MALHOTRA N. **Acetyl eugenol, a component of oil of cloves (*Syzygium aromaticum* L.) inhibits aggregation and alters arachidonic acid metabolism in human blood platelets.** Prostaglandins, Leukotrienes and essential fatty acids, v. 42, n^o. 1, p. 73-81, 1991.

TELES, R.M. **Estudo analítico do linalol contido no óleo essencial extraído de galhos da espécie *Aniba duckei* Kostermans e sua aplicação como agente bactericida.** São Luís, Programa de Pós-Graduação em Química, UFMA, 2003. Dissertação de Mestrado, 99p.

TRIPATHI, A. K.; UPADHYAY, S.; BHUYAN, M.; BHATTACHARYA, P. R. A review on prospects of essential oils as biopesticide in insect-pest management. **Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy**, v. 1, n. 15, p. 52–63, 2009 015.

VAN DE BRAAK, S.A.A.J., LEIJTEN, G.C.J.J. **Essential Oils and Oleoresins: A Survey in the Netherlands and other Major** Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Rio Grande do Sul, Erechim, 2014.

VORIS, D. G. R.; AFONSO, C. H. V.; ALMEIDA FILHO, C. A. C.; FERNANDES, C. O. J.; BRITO, D. Q. M.; MORAES, C. S.; LIMA, K. S. C.; LIMA, J. B. P.; MIRANDA, M. G.; AVELAR, K. E. S.; FRIEDE, R.; LIMA, A. L. S. Ethnopharmacological studies of essential oils with larvicidal activity against *Aedes aegypti* mosquito. **Revista Semioses**, v 11, n.01, 2017

VANIN, Adriana Biasi. **Produção, propriedades biológicas, antioxidantes e toxicidade do bioaromatizante obtido via esterificação enzimática de óleo essencial do cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus*).** 2014. 139 p. Tese (doutorado) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Rio Grande do Sul, Erechim, 2014.

WAGNER, E.; ARNDT, R.; HILTON, B. **Physiological stress responses, egg survival and sperm motility of rainbow trout broodstock anesthetized with clove oil, tricaine methanesulfonate or carbon dioxide.** Aquaculture, vol 211, 353–366. 2002
WESTFALL, T. C.; Westfall, D. P. Em Goodman & Gilman. **As bases farmacológicas da terapêutica**, 10a. Ed.; Brunton, L. L.; Lazo, J.S.; Parker, K. L., eds.; Mc Graw Hill, 2006, cap.6.

WILLIAMS, D. G. **The chemistry of essential oils**. England: Micelle Press. 334p., 1996.

WIMMER, Z.; SAMAN, D.; ZAREVÚČKA, M.; WIMMEROVÁ, M. **Synthesis of the respective E- and Z-isomers of ethyl 4-[(2-hydroxycyclohexyl) methylphenoxy-3-methyl-2-butenolate] using yeast whole cell bioreduction of the parent ketones**. *Tetrahedron: Asymmetry*, v. 16, p. 2810-2815, 2005.

YANG, Q., ASAI, M., MATSUURA, H., YOSHIHARA, T. **Potato micro-tuber inducing hydroxylasiodiplodins from *Lasioidiplodia theobromae***. *Phytochemistry*, v.54, n. 5, p. 489- 494, 2000.

YANG, Y.C.; LEE, S.H.; LEE, W.J.; CHOI, D.H.; AHN, Y.J. **Ovicidal and adulticidal effects of *Eugenia caryophyllata* bud and leaf oil compounds on *Pediculus capitis***. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, n°. 17, p. 4884, 2003.

YOUSEFIA, M.; MOHAMMADI, M.; HABIBIC, Z. **Enantioselective resolution of racemic ibuprofen esters using using different lipases immobilized on octyl sepharose**. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 104, 87-94. 2014.

YOO, C. B.; HAN, K. T.; CHO, K. S.; HA, J.; PARK, H. J.; NAM, J. H.; KIL, U. H.; LEE, K. T. **Eugenol isolated from the essential oil of *Eugenia caryophyllata* induces a reactive oxygen species-mediated apoptosis in HL-60 human promyelocytic leukemia cells**. *Cancer Letters*, 225: 41–52, 2005.

ZHENG, G.Q.; KENNEY, P.M.; LAM, L.K. **Sesquiterpenes from clove (*Eugenia caryophyllata*) as potential anticarcinogenic agents**. *Journal of Natural Products*, v. 55, n°. 7, p. 999-1003, 1992.