

POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE DERIVADOS SEMI-SINTÉTICOS DO EUGENOL

¹FERNANDA ANTUNES; ²ROSIANE MASTELARI MARTINS; ²MARÍLIA D'ÁVILA FARIAS; ³CLAITON LENCINA; ⁴RAFAEL GUERRA LUND

¹Universidade Federal de Pelotas, UFPEL, Graduação em Odontologia –
fe.antunes88@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas, UFPEL, Programa de Pós-Graduação em
 Bioquímica e Bioprospecção

³Universidade Federal de Pelotas, UFPEL, Centro de Ciências Químicas
 Farmacêuticas e de Alimentos

⁴Universidade Federal de Pelotas, Departamento de Odontologia Restauradora –
rafael.lund@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Infecções fúngicas e bacterianas representam hoje um grande problema de saúde pública. Apesar da enorme gama de fármacos antimicrobianos disponíveis, assim como de sua evolução química-medicinal, o uso indiscriminado destes medicamentos resultou no surgimento de patógenos resistentes (LIVERMORE, 2005). Neste contexto, a necessidade permanente do desenvolvimento de novos fármacos a serem utilizados no combate e/ou controle dos processos infecciosos causados por estes microrganismos permanece muito relevante no contexto científico mundial.

A variedade dos metabólitos secundários encontrados na natureza representa uma ferramenta essencial na descoberta e desenvolvimento de novos fármacos, tornando-se uma inspiração para os pesquisadores, em função da sua diversidade química estrutural (NICOLAOU et al., 2009).

O eugenol (4-alil-2-metoxifenol) é uma substância aromática natural, farmacologicamente ativa, presente em óleos essenciais vegetais. Dentre as plantas produtoras, destacam-se: *Eugenia caryophyllata*, “cravo-da-índia”; *Dicopelium cariophyllatum*, “craveiro do Maranhão ou cravinho”; *Ocimum gratissimum*, “alfavaca-cravo”; e o *Croton zehntneri*, “canela-de-cunha”; entre outras (MAGALHÃES, 2009; NAGABABU et al., 2010).

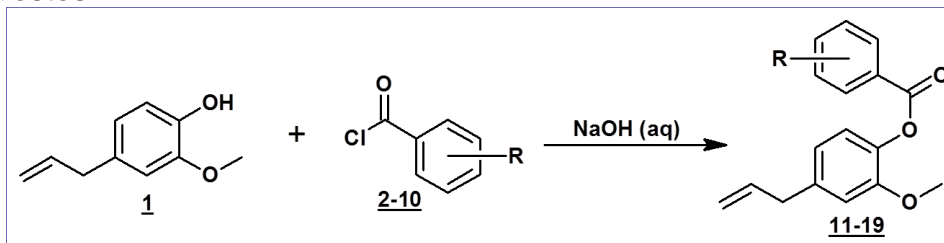
O eugenol possui diversas propriedades farmacológicas já comprovadas, incluindo atividades antifúngica e antibacteriana (RAKOTONIRAINY; LAVÉDRINE, 2005; MAGALHÃES, 2009). Assim, a busca pela otimização e aumento das atividades biológicas do eugenol através de modificações estruturais tem se mostrado bastante interessante para o desenvolvimento de novos antimicrobianos para aplicação clínica.

Este trabalho teve como objetivo projetar e realizar modificações estruturais no eugenol, buscando a obtenção de análogos bioativos e, posteriormente, avaliar seus derivados com relação ao seu potencial antimicrobiano, através da determinação da concentração inibitória de 50% (IC₅₀), concentração inibitória mínima (CIM) e concentração microbicida mínima (CMM).

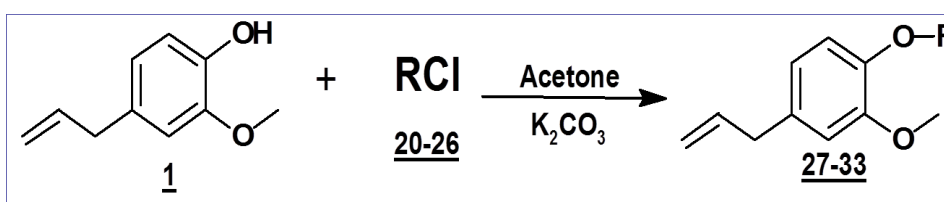
2. METODOLOGIA

O eugenol utilizado para a semi-síntese dos derivados foi obtido comercialmente e as modificações moleculares foram realizadas no Laboratório

de Heterociclos Bioativos e Bioprospecção da Universidade Federal de Pelotas. Reações de O-acilação (Esquema 1) e O-alkilação (Esquema 2) da hidroxila fenólica foram efetuadas, obtendo-se uma série de substâncias com características físico-químicas diferentes e potencial atividade nos ensaios biológicos, permitindo o delineamento das relações estrutura-atividade desses compostos.



Esquema 1- Reações de O-acilação da hidroxila fenólica



Esquema 2- Reações de O-alkilação da hidroxila fenólica

A atividade antimicrobiana de dez concentrações (1 a 500µg/ml) desses compostos foi avaliada sobre doze cepas de caráter patogênico: *Staphylococcus aureus* ATCC 19095, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Enterococcus faecalis* ATCC 4083, *Escherichia coli* ATCC 29214, *Candida albicans* ATCC 62342 e isolados clínicos orais de espécies de *Candida albicans* (3) e *C. não-albicans*: *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. lipolytica* e *C. famata*, isoladas da cavidade bucal de pacientes com Candidíase Atrófica Crônica (CAC) atendidos no Centro de Diagnóstico de Doenças da Boca da Universidade Federal de Pelotas e armazenadas na Micoteca do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Odontologia UFPel.

Os ensaios de susceptibilidade foram realizados pela técnica de microdiluição em caldo, utilizando os documentos de referência M27-A3 (CLSI, 2008) e M7-A7 (CLSI, 2006). Controles de viabilidade microbiana e esterilidade do meio e dos compostos foram incluídos. Fluconazol e tetraciclina foram fármacos utilizados como referência. Todos os ensaios foram realizados em triplicada.

O efeito antimicrobiano foi caracterizado por valores de IC₅₀, a concentração que proporciona 50% de inibição do crescimento dos microrganismos em relação ao controle de crescimento; e valores de CIM, a menor concentração que inibe totalmente o crescimento de bactérias/fungos. Os valores de IC₅₀ foram determinados por regressão não linear. Após a determinação da CIM, a CMM foi determinada pela subcultura em placas de ágar. A CMM foi definida como a menor concentração de cada composto que resultou na ausência de crescimento celular na superfície das placas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quatorze derivados do eugenol foram obtidos através das reações de O-acilação e O-alkilação da hidroxila fenólica (**Tabela 1**). Os compostos foram obtidos com bons rendimentos e de forma rápida.

Tabela 1. Compostos obtidos

Nome	R	Nome	R
11		18	
12		27	
13		28	
14		29	
15		31	
16		32	
17		33	

Os resultados da avaliação antimicrobiana mostram valores de IC₅₀ entre 1,92 e >500µg/ml para bactérias e entre 23,79 e >500µg/mL para fungos; e CIM/CMM entre 125 e >500µg/mL para ambos.

O composto **11** (CIM de 250-500µg/mL) mostrou efeito antibacteriano superior ao eugenol (CIM de 500-> 500µg/mL) sobre as quatro cepas de bactérias testadas. Os compostos **18** e **28** revelaram melhor efeito sobre *Staphylococcus aureus* (CIM de 125 µg/mL) e *Enterococcus faecalis* (CIM de 125 µg/mL) comparado ao eugenol (CIM de 500µg/mL para *Staphylococcus aureus* e >500µg/mL para *Enterococcus faecalis*).

Os compostos **13**, **15** e **17** demonstraram atividade antifúngica superior ao eugenol sobre cepas de *Candida albicans* e *C. não-albicans*. Além disso, os compostos **13** e **15** melhor efeito antifúngico/fungicida que o Fluconazol (fármaco padrão), sobre *C. albicans* ATCC 62342 e um isolado clínico oral da mesma espécie, que mostraram-se resistentes ao fármaco. O composto **15** também foi equipotente ao Fluconazol sobre o isolado clínico de *C. glabrata* (CIM de 125 µg/mL).

O composto **12** (CIM de 125 µg/mL e CMM de 250 µg/mL) mostrou-se mais antifúngico/fungicida que o eugenol (CIM de 500 µg/mL e CMM >500µg/MI) sobre *C. parapsilosis*. O efeito antifúngico do composto **29** (CIM de 125 µg/mL) foi superior ao eugenol (CIM de 250 µg/mL) sobre os isolados clínicos de *C. lipolytica* e *C. famata*.

Os derivados que apresentaram atividades promissoras podem possuir substituídos à hidroxila 1 do eugenol tanto grupamentos acilas (compostos **11**, **12**, **13**, **15**, **17** e **18**), variando, sobretudo, a posição e eletronegatividade dos substituintes da cadeia; quanto grupamentos alquílicos (compostos **28** e **29**),

variando, sobretudo, o tamanho da cadeia lateral. Assim, ambas características parecem favorecer a atividade antimicrobiana.

4. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstram a bioatividade de derivados do eugenol sobre cepas de fungos e bactérias, abrindo novas possibilidades de estudos com a finalidade de comprovar sua eficácia como possíveis agentes antimicrobiano.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

LIVERMORE, D. M. Minimising antibiotic resistance. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 5, p. 450-459, 2005.

MAGALHAES, D. V. **Atividade antifúngica de derivados sintéticos do eugenol e timol frente a cepas de *Candida* spp. e *Microsporium canis***. 2009. Dissertação (Mestrado)-Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará.

NAGABABU, E.; RIFKIND, J. M.; SESIKERAN, B.; LAKSHMAIAH, N. Assessment of Antioxidant Activities of Eugenol by *in vitro* and *in vivo* Methods. **Methods in Molecular Biology**, v.610, p.165-180, 2010.

NICOLAOU, K. C.; CHEN, J. S., EDMONDS, D. J., ESTRADA, A. A. Recent Advances in the Chemistry and Biology of Naturally Occurring Antibiotics. **Angewandte Chemie International Edition**, v.48, p. 660-719, 2009.

RAKOTONIRAINY, M. S.; LAVEDRINE, B. Screening for antifungal activity of essential oils and related compounds to control the biocontamination in libraries and archives storage areas. **International Biodeterioration e Biodegradation**, v.55, p.141-147, 2005.

Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Document M27-A3, Approved Standard, 3th ed.; Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI): Wayne, PA, USA, 2008. Volume 28, Nº 14, p. 25.

Reference Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that grow aerobically. Document M7-A7, Approved Standard, 7th ed.; Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI): Wayne, PA, USA, 2006, Volume 26, Nº 2, p. 16.