



DÉBORAH BRAGA RESENDE

**SÍNTESE DE GLICOSÍDEOS DE EUGENOL E ANÁLOGOS E
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA *IN VITRO*
E EM EMBALAGENS ATIVAS**

LAVRAS-MG

2016

DÉBORAH BRAGA RESENDE

**SÍNTESE DE GLICOSÍDEOS DE EUGENOL E ANÁLOGOS E AVALIAÇÃO
DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA *IN VITRO* E EM EMBALAGENS ATIVAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia, para a obtenção do título de Doutor.

Orientador

Prof. Dr. Disney Ribeiro Dias

Coorientadores

Prof. Dr. Diogo Teixeira Carvalho

Profa. Dra. Rosane Freitas Schwan

LAVRAS-MG

2016

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Resende, Déborah Braga.

Síntese de glicosídeos de eugenol e análogos e avaliação da
atividade antibacteriana *in vitro* e em embalagens ativas / Déborah
Braga Resende. – Lavras : UFLA, 2016.

69 p. : il.

Tese(doutorado)–Universidade Federal de Lavras, 2016.

Orientador(a): Disney Ribeiro Dias.

Bibliografia.

1. glicosilação. 2. polímeros. 3. diidroeugenol. I. Universidade
Federal de Lavras. II. Título.

DÉBORAH BRAGA RESENDE

**SÍNTESE DE GLICOSÍDEOS DE EUGENOL E ANÁLOGOS E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE ANTIBACTERIANA *IN VITRO* E EM EMBALAGENS ATIVAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA EM 11/11/2016

Dr. Diogo Teixeira Carvalho	UNIFAL-MG
Dra. Ivana Aparecida da Silveira	UNILAVRAS
Dra. Marali Vilela Dias	UFLA
Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli	UFLA

Dr. Disney Ribeiro Dias
Orientador

LAVRAS-MG

2016

Aos meus pais por serem meu exemplo de tudo e pela confiança sempre

Ao Ítalo pelo companheirismo em cada passo dado

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, sobre todas as coisas, sempre!

Ao PPGMA pela formação e crescimento pessoal, profissional, especialmente à Rose. À Capes pelo apoio financeiro. Ao Departamento de Ciência dos Alimentos e ao LQFar.

Aos meus pais, Casinho e Pilar, por estarem sempre torcendo e apoiando cada etapa, cada batalha, cada vitória. Por fazerem dos meus sonhos seus sonhos. Por tornarem tudo possível em minha vida. Por me ensinarem a buscar meus objetivos e acreditar em mim.

Ao Ítalo por estar ao meu lado desde sempre, por me fazer mais forte, por me fazer mais confiante. Pela paciência nas dúvidas de química. Pelo carinho e confiança. Por me fazer querer crescer e ser sempre melhor. Por todo o amor que me faz mais forte e feliz. Obrigada por tudo!

À Lívia e Aline por serem um pedaço de mim desde sempre e para sempre. Por acharem que eu sei muita coisa e me fazerem querer saber sempre mais. Ao Bob por ser um motivo de paz e felicidade só de lembrar da sua existência. Ao Luck por tornar nossos dias mais alegres e divertidos; pelo amor que não existe igual.

Ao prof. Disney que não hesitou em me acolher nessa caminhada e sempre confiou tanto em mim, espero ter retribuído. Pela paciência e compreensão nos meus momentos de ansiedade. Ao prof. Diogo que acreditou em mim de novo e é muito mais que um co-orientador, mas sim um grande amigo. Espero não te decepcionar.

À profa. Roberta pelo auxílio nos experimentos, sempre com muito bom humor e paciência, sempre disponível para ajudar. Ao prof. Whasley pelas conversas durante o estágio docência que contribuíram com minha formação. Agradeço à Annayara e Bárbara que tornaram os dias mais leves durante o primeiro ano de doutorado, com a amizade que certamente será para sempre.

Agradeço à Heloísa e ao Jorge pelo apoio no Laboratório, pela companhia, pelas aprendizagens juntos. Agradeço ao Lucas pela ajuda na etapa final do trabalho, com muita boa vontade e paciência. Agradeço ao Guilherme que me recebeu em Alfenas como uma amiga, me ensinou tanto, com tanta paciência, calma e educação. Que você esteja em paz...

“Na estrada da vida, caminhar sozinho é o mesmo que estar parado. Obrigada por me acompanharem”.

“Nas grandes batalhas da vida, o primeiro passo para a vitória é o desejo de vencer”.

Mahatma Ghandi

“Foi o tempo que dedicaste a tua rosa que fez tua rosa tão importante”

O Pequeno Príncipe – Antoine de Saint-Exupéry

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível”

Charles Chaplin

RESUMO

A composição dos alimentos favorece o desenvolvimento de microrganismos, o que sugere que técnicas de conservação são necessárias para ampliar sua vida útil. Os óleos essenciais, bem como seus componentes isoladamente, têm se mostrado alternativas promissoras para a substituição de conservantes sintéticos por naturais, devido às suas várias propriedades. Diante disso, torna-se interessante a otimização do efeito destes compostos e avaliação de sua aplicabilidade como aditivos em alimentos. Com o objetivo de se aprimorar a qualidade das embalagens bem como proporcionar avanço no seu papel diante de uma sociedade que busca cada vez mais o consumo de produtos saudáveis, seguros e pouco danosos ao ambiente, as embalagens vêm sofrendo modificações e com isso surgiu o que denominam-se embalagens ativas. As embalagens ativas são aquelas que interagem com o alimento de forma a proporcionar alguma propriedade a este, além da função de proteção. Neste trabalho, foram sintetizados seis glicosídeos acetilados e desacetilados a partir dos compostos eugenol, diidroeuogenol e isoeugenol, presentes no óleo essencial de cravo da Índia. Todos os glicosídeos foram caracterizados por espectroscopias no IV e RMN. Os compostos sintetizados e suas agliconas foram avaliados quanto à concentração mínima inibitória (CIM) e bactericida (CMB) frente às bactérias contaminantes de alimentos *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* Enteritidis, através da técnica de microdiluição em caldo, utilizando-se placas de poliestireno de 96 poços. Todos os glicosídeos desacetilados foram cerca de duas vezes mais ativos que as agliconas de origem, sendo que os glicosídeos peracetilados foram, na maioria das vezes, equipotentes às agliconas. Os resultados revelaram que o glicosídeo desacetilado do diidroeuogenol foi o composto mais ativo em comparação aos demais, frente às bactérias testadas, apresentando uma CIM e CMB de 0,37% v/v para *E. coli* e 0,18% v/v para as demais bactérias. O glicosídeo desacetilado do diidroeuogenol, bem como o diidroeuogenol, foram utilizados como aditivos na produção de embalagens ativas, as quais foram avaliadas quanto à atividade frente às mesmas bactérias. Os resultados mostraram que o filme produzido com a adição do glicosídeo foi significativamente mais eficiente na inibição do crescimento de todas as bactérias avaliadas em relação ao filme produzido com a adição do diidroeuogenol, confirmando a maior atividade do glicosídeo sintetizado.

Palavras-chave: glicosilação, diidroeuogenol, polímeros, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. Enteritidis*

ABSTRACT

The composition of food promotes microorganisms growth, which suggests that conservation techniques are needed to extend its useful life. Essential oils as well as its components separately, have shown promising alternatives to synthetic preservatives replacement for the natural ones due to its vast properties. Therefore, it becomes interesting to optimize the effect of these compounds and evaluation of its applicability as additives in food. In order to improve the quality of packaging and provide advancement in their role in a society that seeks increasingly consumption of healthy, safe and less harmful to the environment, packaging has undergone changes and it appeared that we called active packaging. Active packages are those that interact with food in order to provide some property to this, besides the protective function. Six acetylated and deacetylated glycosides were synthesized from eugenol, isoeugenol and dihydroeugenol present in the essential oil of clove. All glycosides were characterized by IR and NMR. The synthesized compounds and their aglycones were evaluated for the minimal inhibitory and bactericidal concentration (MIC and MBC) against the spoilage food bacteria *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* Enteritidis through the microdilution in broth technique, using 96 wells polystyrene plates. All deacetylated glycosides were about two times more active than aglycones source, and the peracetylated glycosides were, in most cases, equipotent to aglycones. The results revealed that the acetylated glycoside of dihydroeugenol proved to be the most active compound in comparison to the other ones, facing the bacteria tested, with a 0.37% MIC and MBC v/v for *E. coli* and 0.18% v/v for others bacteria. Deacetylated dihydroeugenol glycoside and dihydroeugenol were used as additives in production of active packaging, which were evaluated for activity against the same bacteria. The results show that the film produced with the addition of glycoside was significantly more effective in inhibiting the growth of all bacteria evaluated than film produced with the addition of dihydroeugenol, confirming the increased activity of synthesized glycoside.

Keywords: glycosylation, polymers, dihydroeugenol, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. Enteritidis*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Primeira parte

Tabela 1- Alimentos contaminados com <i>Listeria monocytogenes</i>	12
Tabela 2- Alguns óleos essenciais de interesse comercial.....	18
Figura 1 - Rota metabólica dos compostos secundários a partir da glicose	19
Figura 2- Estrutura química do eugenol.....	21

Segunda parte

Artigo 1

Figure 1 – Synthetic route to the glucosides of eugenol, isoeugenol e dihydroeugenol.....	48
Table 1- Compounds code.....	47
Table 2 - Minimum inhibitory and bactericidal concentration of eugenol, dihydroeugenol, isoeugenol and its glycosides (% v/v).....	47

Artigo 2

Figura 1 - Rota sintética dos glicosídeos de eugenol, isoeugenol e diidroeuogenol.....	52
Figura 2 - Filmes de Isolado Proteico de Soro de Leite preparados com a adição de diidroeuogenol (à esquerda) e glicosídeo de diidroeuogenol (à direita) como agentes antibacterianos.....	59
Tabela 1 - Atividade Antioxidante (% de sequestro de DPPH) dos Filmes de IPS preparado com adição de diidroeuogenol e glicosídeo de diidroeuogenol.....	60
Tabela 2 - Solubilidade em água dos filmes de IPS produzidos com adição de diidroeuogenol e glicosídeo de diidroeuogenol.....	61
Tabela 3 - Parâmetros de cor dos Filmes de IPS produzidos com adição de diidroeuogenol e glicosídeo de diidroeuogenol.....	61
Tabela 4 - Avaliação da Transparência dos Filmes de IPS produzidos com adição de diidroeuogenol e glicosídeo de diidroeuogenol.....	63
Tabela 5 - Atividade Antibacteriana de Filmes de IPS produzidos com adição de diidroeuogenol e glicosídeo de diidroeuogenol como agentes antimicrobianos.....	64
Tabela 6: Halos de Inibição (mm) formados pela Atividade Antibacteriana de Filmes de IPS produzidos com adição de glicosídeo de diidroeuogenol como agentes antimicrobianos	65

LISTA DE ABREVIATURAS

D – Diidroeuogenol

E – Eugenol

GDD – Glicosídeo Desacetilado de Diidroeuogenol

GDE – Glicosídeo Desacetilado de Eugenol

GDI – Glicosídeo Desacetilado de Isoeuogenol

GPD – Glicosídeo Peracetilado de Diidroeuogenol

GPE – Glicosídeo Peracetilado de Eugenol

GPI – Glicosídeo Peracetilado de Isoeuogenol

I – Isoeuogenol

m/v – massa por volume

v/v – volume por volume

LISTA DE SIGLAS

ATCC – American Type of Cell Culture Culture Collection

CC – Cromatografia em Coluna

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

CDC – Centers of for Disease Control and Prevention

CIM – Concentração mínima inibitória

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute

CMB – Concentração mínima bactericida

DPPH - 2,2-difenil-1-picrilidrazil

DTA'S – Doenças Transmitidas por Alimentos

IC₅₀ – Concentração capaz de inibir 50%

IPS – Isolado proteico de soro de leite

IR – Espectroscopia no Infravermelho

LQFar – Laboratório de Pesquisa em Química Farmacêutica

NCCLS – National Comitee Committee for Clinical Laboratory Standards

PAA – Poliésteres alifáticos aromáticos

PHA – Polihidroxicanoatos

PLA – Polilactatos

PUR – Poliuretanas

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

TLC – Thin Layer Chromatography

TSA – Tryptic Soy Agar

UFLA – Universidade Federal de Lavras

UNIFAL – Universidade Federal de Alfenas

SUMÁRIO

Primeira Parte	
1	INTRODUÇÃO.....12
2	REVISÃO DE LITERATURA.....14
2.1	Contaminação microbiológica dos alimentos: bactérias patogênicas14
2.1.1	<i>Salmonella</i> Enteritidis.....14
2.1.2	<i>Escherichia coli</i>15
2.1.3	<i>Staphylococcus aureus</i>15
2.1.4	<i>Listeria monocytogenes</i>16
2.2	Óleos essenciais como conservantes em alimentos.....17
2.2.1	Eugenol como antimicrobiano potencial.....21
2.3	Modificação estrutural como método de otimização da atividade biológica.....22
2.4	Embalagens.....23
3	OBJETIVOS.....26
4	CONCLUSÕES.....27
	REFERÊNCIAS.....28
Segunda parte	
	Artigo 1: Synthesis and <i>in vitro</i> evaluation of peracetyl and deacetyl glucosides from eugenol, isoeugenol and dihydroeugenol against food contaminant bacteria.....34
	Artigo 2: Glicosídeo de Diidroeuogenol: Síntese e avaliação como aditivo antimicrobiano em Polímeros de Isolado Proteico de Soro de Leite.....49

Primeira Parte

1 INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais são substâncias naturais, voláteis e complexas, caracterizadas por forte odor sendo sintetizados por plantas aromáticas durante o metabolismo secundário. Apresentam diferentes propriedades biológicas comprovadas, como a ação larvicida (RAJKUMAR et al., 2010), atividade antioxidante (WANNES et al., 2010), ação analgésica e anti-inflamatória (MENDES et al., 2010), fungicida (CARMO et al., 2008), atividade antitumoral (SILVA, 2008) e antimicrobiana (OKOH et al., 2010).

A ação antibacteriana tem sido demonstrada pela susceptibilidade de bactérias tanto Gram positivas quanto negativas, a baixas concentrações dos óleos essenciais. Devido aos seus múltiplos modos de ação, os óleos essenciais e seus componentes têm sido sugeridos como antimicrobianos alternativos em detrimento aos comumente utilizados, cujo alvo na célula normalmente é único (SOUZA; TEBALDI; PICCOLI, 2015).

Nas últimas décadas, a composição química destes óleos tem sido estudada e elucidada, verificando-se enorme diversidade de componentes, os quais consistem normalmente de mono e sesquiterpenos, fenilpropanoides e outros componentes voláteis (FRANZ, 2010).

A grande variedade de componentes dos óleos essenciais, com as mais variadas ações, faz deles substâncias aplicadas em diferentes ramos da ciência, destacando-se a área de ciência e tecnologia de alimentos na utilização desses produtos naturais.

A maioria dos alimentos possui composição intrínseca favorável ao desenvolvimento de microrganismos, o que diminui sua vida útil e algumas vezes os tornam risco à saúde do consumidor. Na tentativa de se utilizar técnicas naturais e eficazes de preservação dos alimentos, a adição de óleos essenciais torna-se potencial sistema de bioconservação, visto que podem prolongar a vida útil dos alimentos, controlando ou inibindo o crescimento microbiano (TRAJANO et al., 2009).

Embora os óleos essenciais ou seus componentes apresentem elevada atividade antimicrobiana, estes impactam fortemente no sabor e odor dos alimentos. Portanto,

quantidades diminutas devem ser utilizadas nas formulações quando o objetivo é apenas conservação microbiológica.

Na intenção de otimizar a atividade antimicrobiana dos produtos naturais, como aqueles provenientes de óleos essenciais, ferramentas de modificação molecular podem ser úteis na obtenção de derivados superiores do ponto de vista biológico. Dessa forma, a semi-síntese de derivados glicosídicos desses produtos naturais pode ser uma estratégia para aumentar a captação dos mesmos por microrganismos, já que o resíduo de glicose na estrutura, fonte de carbono, pode servir de carreador das agliconas antimicrobianas.

Além da possível adição direta dos óleos essenciais ou de seus derivados em alimentos, esses compostos podem ser usados como componentes incorporados em embalagens biopoliméricas ativas. Polímeros biodegradáveis têm sido alvo na busca por embalagens mais favoráveis ao meio ambiente. Dentre vários materiais usados com este fim, o soro de leite bovino destaca-se por agregar valor aos subprodutos dos laticínios. Segundo Yoshida e Antunes (2009), a produção de filmes de proteínas de soro de leite apresenta a vantagem na formação de filmes transparentes, flexíveis e sem odor e sabor. Filmes de polímeros naturais incorporados com compostos ativos diversos, que proporcionem diferentes propriedades ao filme como por exemplo atividade antimicrobiana, despertam interesse pois, além de reduzirem o impacto ambiental, condicionam qualidade de forma saudável e eficaz aos alimentos.

O objetivo desse estudo foi avaliar e comparar a atividade antimicrobiana de componentes de óleos essenciais e análogos com seus derivados glicosilados sobre patógenos de origem alimentar, onde aqueles compostos com as melhores atividades antibacteriana foram incorporados a embalagens, produzidas com polímeros biodegradáveis, sendo avaliados como possíveis aditivos antimicrobianos para embalagem ativa.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Contaminação microbiológica dos alimentos: bactérias patogênicas

A presença de microrganismos em alimentos pode levar às Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs), definidas pelo Ministério da Saúde na RDC nº12/2001 como uma síndrome originada na ingestão de alimentos e/ou água com agentes em quantidade tais que afetem a saúde do consumidor ou grupo de população (BRASIL, 2001).

Os alimentos, *in natura* e processados, podem conter diversos tipos de microrganismos contaminantes, bactérias, fungos e leveduras, tanto deteriorantes quanto patogênicos. Os microrganismos deteriorantes são aqueles que, devido ao seu metabolismo, causam no alimento alterações físicas, químicas e sensoriais. Já os microrganismos causadores de toxinfecções alimentares são aqueles que levam à morbidade do consumidor devido à ingestão de suas toxinas pré-elaboradas no alimento ou de células viáveis capazes de colonizar o intestino humano levando a processo infeccioso (COSTA, 2010).

As bactérias patogênicas envolvidas na contaminação de alimentos são *Salmonella* spp., patótipos de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum* dentre outros. Os alimentos mais comprometidos e afetados pela contaminação microbiana são, em sua maioria, de origem animal e seus derivados, como carnes, leite, ovos e queijos (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2010).

2.1.1 *Salmonella* Enteritidis

Salmonella é um gênero de bactérias amplamente distribuído na natureza. Pode ser isolada de locais variados, inclusive matérias primas alimentares, além de poder ser veiculada pelo homem na condição de portador assintomático (XIA et al., 2012). Qualquer alimento pode estar contaminado com *Salmonella* e um completo cozimento é capaz de destruir o microrganismo, no entanto, o consumo de produtos crus como ovos, frango e carne pode levar à contaminação do ser humano.

Segundo o Centro de Colaboração para Referência e Pesquisa sobre *Salmonella*, da Organização Mundial da Saúde, o gênero *Salmonella* apresenta as espécies *S. enterica* e *S. bongori*, que incluem 2519 e 22 sorotipos, respectivamente (POPOFF et al., 2004).

Salmonella enterica é subdividida em seis subespécies e sorotipos. *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorotipos Typhimurium e Enteritidis são os sorotipos predominantes em salmonelose humana (FERNANDES et al., 2006).

As salmonelas podem causar diversas doenças nos humanos como febre tifoide, bacteremia, gastrinenterite e infecções intestinais. São consideradas importante problema de saúde pública em diversos países (PAYMENT; RILEY, 2002).

2.1.2 *Escherichia coli*

Escherichia coli é o principal representante do grupo dos coliformes termotolerantes. Apresenta-se como bastonetes Gram negativos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, fermentam lactose produzindo gás a cerca de 45°C (FRANCO; LANDGRAF, 2005). Inclui cepas não patogênicas que habitam o trato entérico sadio e cepas altamente patogênicas que causam surtos de doenças com alta taxa de mortalidade. As cepas não patogênicas, quando presentes em alimentos e água, indicam contaminação fecal direta ou indireta, sendo indicador da possível presença de microrganismos patogênicos (JAY, 2005).

Escherichia coli pode contaminar carne, leite e vegetais. O controle desse contaminante em alimentos pode ser obtido através da desinfecção de vegetais crus com solução clorada, cozimento completo dos alimentos e cuidados de higiene na manipulação dos mesmos (FORSYTHE, 2013).

2.1.3 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus pertence à família Staphylococcaceae e se apresenta no formato de cocos Gram positivos, não esporulados e anaeróbios facultativos (BECKER; HEILMANN; PETERS, 2014). Pode crescer em uma margem ampla de temperatura, entre 7°C e 49°C, com produção de toxinas entre 10°C e 48°C.

É encontrado no ar, ambiente, microbiota natural humana e a preocupação acerca da presença deste microrganismo concerne à ocorrência de cepas produtoras de toxinas termorresistentes (MURRAY, 2005).

A forma mais comum de contaminação de alimentos por *S. aureus* é o contato dos manipuladores portadores naturais desta bactéria. Produz diversos tipos de toxinas, classificadas em exotoxinas e endotoxinas. Dentre as exotoxinas, destacam-se as enterotoxinas (CASEY et al., 2007). Durante multiplicação da bactéria no alimento, ocorre a produção e liberação de enterotoxinas, sendo estas termoestáveis permanecendo ativa no alimento mesmo após o processo de cozimento (RIM; BACON, 2007; ALCARÃS et al., 1997).

Staphylococcus aureus está associado a altas taxas de mortalidade e morbidade, pois é capaz de causar infecções em diversos tecidos humanos. É capaz de sobreviver em diferentes condições ambientais e é considerado a terceira causa mais relevante de DTAs (SAGINUR; SUH, 2008).

2.1.4 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes é uma bactéria Gram positiva, anaeróbica facultativa, não formadora de esporos. Sua morfologia a caracteriza como bacilo, com extremidades arredondadas e flagelos peritríquios (ADAMS; MOSS, 2004). Possui capacidade de crescimento em temperaturas variadas, entre -0,4° e 50°C, cuja natureza psicrotrófica possibilita seu desenvolvimento em alimentos refrigerados (BORUCKI et al., 2003).

Este microrganismo pode contaminar diversos tipos de alimentos, no entanto, como patógeno humano, são raros os casos de listeriose invasiva. Porém, surtos de listeriose invasiva já foram relatados em diferentes partes do mundo e pode vir a afetar principalmente indivíduos imunodeprimidos, gestantes e recém-nascidos (SILK et al., 2012). A Tabela 1 mostra diferentes alimentos nos quais já foram detectadas concentrações consideráveis de espécies de *Listeria monocytogenes*.

Tabela 1- Alimentos contaminados com *Listeria monocytogenes*

Alimento	Referência
Leite cru	Vanegas et al., 2009
Leite pasteurizado	Catão, Ceballos, 2001
Queijo coalho	Duarte et al., 2005
Queijo artesanal	Zaffari, Mello e Costa, 2007
Queijo minas frescal	Brito et al., 2008
Melões	CDC, 2011

Outros autores relatam também a presença deste microrganismo em equipamentos e ambiente industrial. Simões, Simões e Vieira (2010) relatam que o mesmo sobrevive por períodos longos em instalações, corroborando com Unnerstad et al. (1996) que verificaram a presença do microrganismo em uma indústria de laticínios por sete anos.

2.2 Óleos essenciais como conservantes em alimentos

Nas últimas décadas, tem sido observada intensa busca da sociedade por alimentos mais saudáveis e isso inclui o desejo pelo consumo de produtos com menores concentrações de aditivos sintéticos e impacto ambiental. A redução do consumo de sal, por exemplo, leva à necessidade de outros aditivos que garantam a segurança alimentar. Uma possibilidade que abrange esses aspectos é o uso de óleos essenciais como conservantes (BURT, 2004).

Os óleos essenciais são produtos do metabolismo secundário de plantas, que contêm compostos aromáticos voláteis, dentre eles terpenoides, benzenoides, propanoides, os quais são responsáveis pelas diferentes atividades biológicas atribuídas a estes óleos (SOUSA et al., 2008).

Os óleos essenciais desempenham papel importante na proteção das plantas como agentes antibacterianos, antivirais, antifúngicos, inseticidas e também contra herbívoros. Dentre várias de suas atividades relatadas na literatura, encontram-se a ação antimicrobiana, antinociceptiva, anticâncer, antiinflamatória, repelente de insetos e antioxidante. Os óleos essenciais são líquidos, voláteis, límpidos, lipossolúveis, com uma densidade geralmente mais baixa do que a da água. Eles podem ser sintetizados por toda a planta, como por exemplo em

brotos, flores, folhas, caules, galhos, sementes, frutos, raízes, madeira ou cascas e são armazenados em células secretoras, cavidades, canais, as células da epiderme ou tricomas glandulares (NAZZARO et al., 2013).

Atualmente estas substâncias são utilizadas como ingredientes em perfumes, cosméticos, materiais de limpeza, alimentos, bebidas e medicamentos (ADORJAN; BUCHBAUER, 2010).

Dentre os 300 óleos essenciais de importância comercial no mundo, 9 podem ser listados como sendo os principais, como pode ser visto na Tabela 2 (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009).

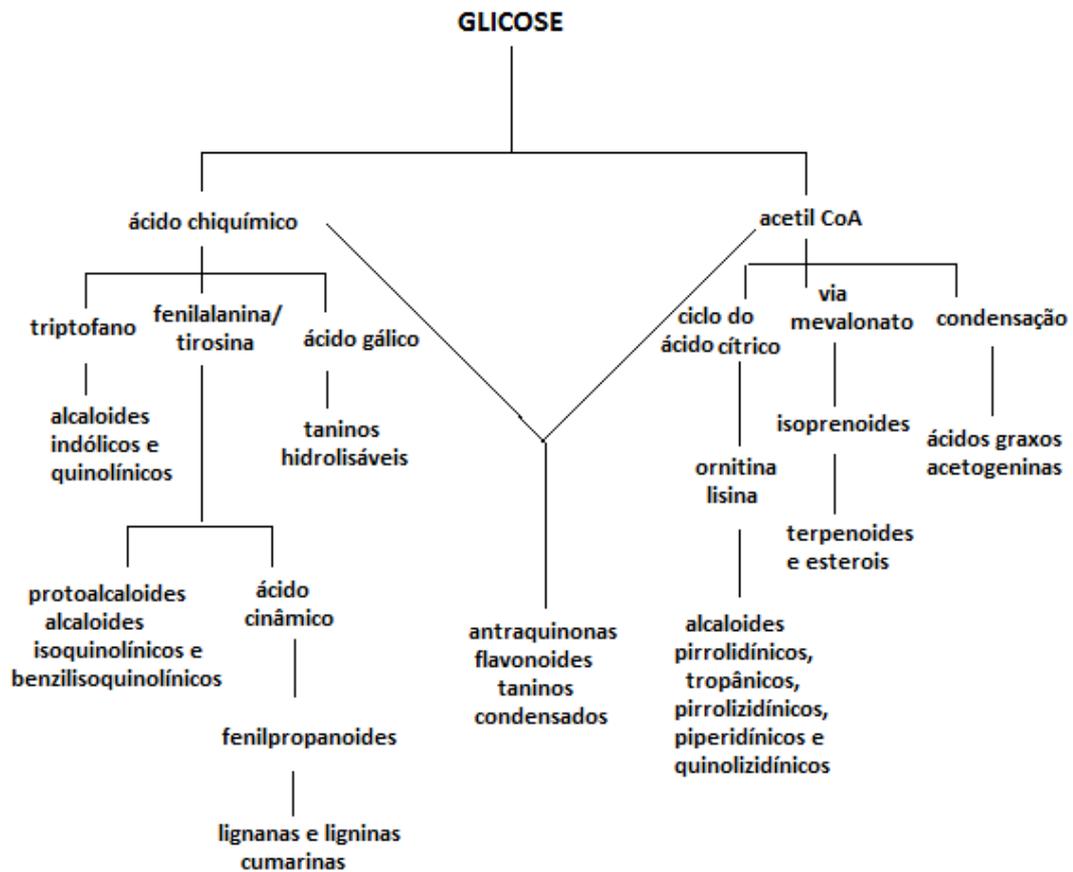
Tabela 2- Fontes de óleos essenciais de interesse comercial, espécie e componente majoritário

Fonte	Espécie	Principal constituinte
Laranja	<i>Citrus sinensis</i>	limoneno
Menta japonesa	<i>Mentha arvensis</i>	mentol
Eucalipto	<i>Eucalyptus globulus</i>	cineol
Citronela	<i>Cymbopogon winterianus</i>	citronelal
Hortelã-pimenta	<i>Mentha x piperita</i>	mentol
Limão	<i>Citrus limon</i>	limoneno
Cravo-da-Índia	<i>Syzygium aromaticum</i>	eugenol
Cânfora	<i>Cinnamomum camphora</i>	linalol
Patchouli	<i>Pogostemon cablin</i>	patchoulol

Fonte: Adaptado de BIZZO, HOVELL E REZENDE, 2009

Os componentes dos óleos essenciais estão incluídos essencialmente em dois grupos: terpenos e fenilpropanoides (BAKKALI et al., 2008). Estes componentes são formados no metabolismo da glicose, por meio dos intermediários ácido chiquímico e via do mevalonato. O ácido chiquímico produz precursores dos metabólitos secundários aromáticos, como os fenilpropanoides. Já a via do mevalonato dá origem aos terpenoides e esteróis (FIGURA 1).

Figura 1- Rota metabólica dos compostos secundários a partir da glicose.



Fonte: Adaptado de Simões et al. (2007).

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais pode ser influenciada por vários parâmetros, como sua composição, concentração dos componentes, forma de obtenção e estocagem. O tipo de microrganismo e a composição do substrato de crescimento do microrganismo também podem promover resultados distintos desta atividade (BERTINI et al., 2005). É importante destacar que, devido à vasta gama de componentes presentes nos óleos essenciais, torna-se difícil atribuir o efeito antimicrobiano a um deles, já que podem atuar de modo sinérgico ou antagônico. Entretanto, estudos mostram que os componentes majoritários normalmente são os maiores responsáveis pela atividade antimicrobiana.

Barbosa et al. (2009) investigaram a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho, manjeriço, manjerona, capim cidreira, gengibre e cravo da Índia sobre

cepas Gram positivas, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* e Gram negativas, *Escherichia coli* e *Salmonella* Enteritidis. Foram encontrados valores de concentração mínima inibitória variando entre 0,05% v/v para o óleo de capim cidreira e 0,46% v/v para o óleo de manjerona contra Gram positivas e entre 0,10% v/v para o óleo de cravo e 0,56% v/v para o óleo de gengibre contra Gram negativas. Os testes foram feitos em carnes moídas inoculadas com os microrganismos.

Os óleos essenciais e seus componentes possuem uma variedade de alvos para ação antimicrobiana, particularmente a membrana e o citoplasma e, em algumas situações, podem alterar completamente a morfologia das células microbianas (NAZZARO et al., 2013).

Dentre alguns alvos tem-se alterações da membrana citoplasmática, perturbações sobre os mecanismos de translocação de íons hidrogênio, no fluxo de elétrons, no transporte ativo e coagulação do conteúdo da célula. Nem todos esses mecanismos atingem alvos separados, podendo alguns ocorrerem em consequência de outro mecanismo (BURT, 2004).

Apesar dos conservantes sintéticos serem usados em alimentos, estes tiveram relatos de relação com doenças respiratórias, alergias e outros problemas de saúde (FLEMING et al., 2003). Portanto, buscam-se alternativas para controle de microrganismos durante a vida útil de produtos alimentícios. A crescente demanda dos consumidores por produtos naturais tem levado a investigação sobre novos agentes antimicrobianos a partir de plantas para melhorar a segurança de produtos (GONI et al., 2009).

Os óleos essenciais têm sido considerados alternativas seguras e eficazes e a sua aplicação em agentes patogênicos podem reduzir o risco de surtos de origem alimentar e assegurar aos consumidores produtos seguros (BAJPAI et al., 2013).

A concentração de conservantes naturais necessários para eficácia suficiente em produtos alimentares, em comparação aos utilizados em estudos *in vitro* pode ser consideravelmente maior, o que pode provocar impactos nas propriedades sensoriais dos alimentos (HSIEH et al., 2001). No entanto, alguns estudos sobre os efeitos sinérgicos da combinação entre óleos em concentrações suficientemente baixas, conseguindo-se reduzir o impacto sensorial negativo foram realizados (GUTIERREZ et al., 2009).

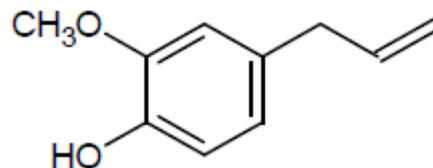
São necessários mais estudos que demonstrem o impacto dos produtos naturais utilizados como conservantes tanto em relação a qualidade quanto em relação a aceitação dos mesmos pelos consumidores.

2.2.1 Eugenol como antimicrobiano potencial

Em alguns casos, um constituinte do óleo essencial pode ter atividade melhor que a do próprio óleo. É o caso por exemplo do eugenol, componente majoritário do óleo de *Eugenia caryophyllata* (RAUT; KARUPPAYIL, 2014).

O eugenol (4-alil-2-metoxifenol) é um fenilpropanoide farmacologicamente ativo (FIGURA 2). Dentre as plantas produtoras, destacam-se: *Syzygium aromaticum*, *Dicypelium caryophyllatum*, *Ocimum gratissimum*, e *Croton zenhtneri*, entre outras (NAGABABU et al., 2010). No entanto, *Syzygium aromaticum* é considerada a principal fonte deste composto, o qual representa entre 45% a 90% da composição total do óleo. O eugenol comercial é derivado do óleo dos botões florais ou da folha do cravo, óleo de folha de canela ou manjeriço obtidas por destilação a vapor que é então refinado (KAMATOU; VERMAAK; VILJOEN, 2012).

Figura 2- Estrutura química do eugenol.



Fonte: do autor.

O eugenol tem sido usado com propósitos médicos há anos, tanto isolado quanto em associação a outros compostos (PRAMOD et al., 2010). Sua atividade contra microrganismos é conhecida há muito tempo.

Possui atividade antifúngica contra *Candida albicans* (RAKOTONIRAINY; LAVÉDRINE, 2005) e alguns de seus derivados como isoeugenol e metileugenol possuem atividade contra os fungos de podridão branca da madeira (*Betulina* L.) e fungos da podridão marrom da madeira (*Sulphureus* L.) (SEN-SUNG et al., 2008).

Foi mostrado que este composto foi capaz de inibir a produção de amilase e protease por *Bacillus cereus*, degradar parede celular e promover lise celular em outras situações (THOROSKI et al., 1989).

Os seus mecanismos de ação antimicrobiana têm sido documentados. Ahmad et al. (2010) estudaram os efeitos do eugenol na translocação de prótons na membrana citoplasmática de *Candida*. Foi mostrado que eugenol é capaz de inibir ATPase fúngica, essencial para manutenção do gradiente eletroquímico para captação de nutrientes.

A atividade antimicrobiana do eugenol, algumas vezes, tem sido atribuída à sua estrutura fenólica que, em concentrações mais elevadas, provoca a degeneração das proteínas das membranas celulares das bactérias resultando no dano na membrana celular. Em *Saccharomyces cerevisiae*, ele afeta a homeostase de íons Ca^{2+} e H^+ , levando à perda de íons e inibição da levedura (RAO et al., 2010).

2.3 Modificação estrutural como método de otimização da atividade biológica

Atualmente, o uso de padrões estruturais conhecidos com relação à atividade antimicrobiana tem sido evitado como estratégia na obtenção de novos compostos, uma vez que a resistência a estes agentes tem crescido cada vez mais. Portanto, a busca de novas entidades químicas bem como novos alvos de ação tem sido foco das pesquisas por novos agentes antimicrobianos (BUSH; PUCCI, 2011; MOELLERING JR., 2011).

Neste contexto, os produtos naturais, em especial derivados de plantas, têm sido considerados como excelentes fontes de novos compostos bioativos por mostrarem estruturas inovadoras que podem ser usadas como farmacóforos naturais para derivatização estrutural (SOUZA et al., 2014).

Uma vez obtido o composto biologicamente ativo, pode-se lançar mão de estudos envolvendo modificação molecular, também chamada de variação molecular ou manipulação molecular, que se constitui no método mais usado para otimização da atividade encontrada (FILHO; YUNES, 1998).

A glicosilação tem sido amplamente utilizada como método de modificação estrutural que otimiza as propriedades físico-químicas e biológicas do composto de partida (DO et al., 2002; KUROSU et al., 2002).

Souza et al. (2014) mostraram a síntese de seis derivados glicosídicos do eugenol, sendo que um deles se mostrou extremamente ativo na inibição do crescimento de espécies de *Candida*, com valores de IC_{50} muito menores que o do protótipo eugenol. O glicosídeo

peracetilado derivado do eugenol se mostrou 160 vezes mais ativo que o eugenol e 3,4 vezes mais ativo que o fármaco padrão fluconazol, tendo ainda baixa citotoxicidade.

Dessa forma, é possível perceber a importância da ferramenta de modificação estrutural no processo de síntese, bem como da técnica de glicosilação como uma estratégia para otimizar a atividade dos compostos planejados.

2.4 Embalagens

A preservação das características naturais dos alimentos, mantendo sua qualidade e segurança microbiológica, é uma das principais funções das embalagens (KADER, 2002). Além disso, as embalagens apresentam capacidade de proteção do alimento e facilitam o manuseio durante processamento, armazenamento e uso pelo consumidor.

Ainda segundo Kader (2002), novos conceitos pertinentes a embalagens vêm sendo desenvolvidos, com objetivo de facilitar o manuseio e também beneficiar o consumidor. As embalagens utilizadas para proteção de hortaliças envolvem bandejas plásticas ou de poliestireno com tampas ou envoltórios de filmes plásticos, sendo o policloreto de vinila (PVC), polipropileno (PP) e polietileno (PE) filmes plásticos muito utilizados nestes tipos de embalagens.

O filme biodegradável é um filme de fina espessura, produzido com material biológico, cujo objetivo é proteger o produto embalado de danos físicos e biológicos, aumentando sua vida útil, fazendo isso de forma sustentável (HENRIQUE et al., 2008). Quando utilizados em alimentos, podem ser dois tipos: coberturas, aplicados diretamente na superfície do alimento; ou filmes, películas finas formadas sobre um suporte. Ambos são uma camada que pode agir como barreira a elementos externos, aumentando a vida útil do alimento (KROCHITA; MULDER-JOHNSTON, 1997).

De acordo com Henrique et al. (2008), os compósitos biodegradáveis podem ser produzidos por diversos materiais como polissacarídeos, proteínas, lipídeos e outros. Sua obtenção se baseia na solubilização dos biopolímeros em um solvente e o acréscimo de aditivos, obtendo-se solução filmogênica. O interesse em polímeros biodegradáveis tem crescido nos últimos anos e já existem diversos materiais descritos na literatura que são biodegradáveis ou parcialmente biodegradáveis como polímeros de amido, polilactatos

(PLA), polihidroxicanoatos (PHA), poliésteres alifáticos aromáticos (PAA), poliuretanas (PUR) e *nylon* (PRADELLA et al., 2006).

Proteínas extraídas do soro de leite (whey protein) são estudadas pela qualidade nutricional, alto teor de aminoácidos essenciais, cálcio e peptídeos. As proteínas do leite (exemplo: caseína) e do soro têm sido usadas na elaboração de filmes comestíveis e biodegradáveis, sendo essa aplicação alternativa que agrega valor aos subprodutos da indústria de laticínios (VILLADIEGO et al., 2005).

O Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos calcula 76 milhões de casos de doenças alimentares por ano, com aproximadamente 5000 óbitos. Bactérias como *Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus* estão fortemente relacionadas a estes casos (CDC, 2010). No Brasil, entre os anos de 2000 e 2011 foram notificados 8.663 surtos de doenças veiculadas por alimentos com 163.425 pessoas doentes e 112 óbitos (BRASIL, 2012).

Tradicionalmente, as embalagens devem ser inertes, não interagindo com o produto acondicionado, tendo como principal função atuar como barreira a impactos físicos e/ou mecânicos, reações químicas e contaminação microbiana (OLIVEIRA, 2002).

Embalagens podem ser incorporadas com aditivos, como por exemplo, antimicrobianos, buscando aumentar a vida útil do produto (OLIVEIRA et al., 2008). Novos sistemas de embalagem vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de interagir de forma desejável com o produto. Esses sistemas são as embalagens ativas, que mudam as condições de acondicionamento para aumentar a vida útil e melhorar a segurança ou as propriedades sensoriais do produto, mantendo sua qualidade. Estas embalagens interagem de forma intencional com o alimento, indo além das funções de barreira contra o ambiente externo ao produto (SOARES et al., 2009).

Várias são as aplicações possíveis para embalagens ativas, de acordo com a necessidade do produto embalado, tais como a redução do nível de umidade; controle dos níveis de etileno para inibir amadurecimento e senescência das frutas; liberação de aditivos antimicrobianos; controle de trocas gasosas com o ambiente; controle de oxigênio em alimentos oxidáveis, dentre outras (MORAIS, 2006).

Filmes antimicrobianos são filmes de resinas sintéticas ou naturais, que contam com a adição de substâncias capazes de retardar ou inibir o crescimento de microrganismos quando

em contato com o produto acondicionado. A eficiência destes filmes pode ser devido à migração do agente para a superfície ou atuando apenas pelo contato (QUINTAVALLA; VICINI, 2002).

A liberação de aditivos por embalagens ativas aumenta a segurança do consumidor, uma vez que esses compostos, são difundidos para a superfície do alimento de maneira controlada. Este controle se dá pelo tempo de contato do produto com relação ao processo de difusão. Como estes compostos atuam principalmente na superfície, por ser o local onde a maior parte das deteriorações ocorrem, o produto apresenta uma baixa presença de conservante em seu interior (APPENDINI; HOTCHKISS, 2002).

3 OBJETIVOS

O objetivo geral com este trabalho foi sintetizar derivados glicosilados de eugenol, isoeugenol e diidroeuogenol e avaliar sua atividade contra bactérias contaminantes de alimentos.

Objetivos específicos:

- Glicosilar as moléculas de eugenol, isoeugenol e diidroeuogenol, seguido de análise estrutural por espectroscopias no infravermelho e de ressonância magnética nuclear dos produtos obtidos;
- Avaliar *in vitro* e comparar a atividade antimicrobiana desses produtos e dos mesmos antes da glicosilação, contra bactérias consideradas problema na indústria de alimentos;
- Avaliar o efeito dos compostos que apresentaram maior atividade antimicrobiana dentre todos testados como aditivos em embalagens de filme.

4 CONCLUSÃO

Pode-se perceber que a síntese dos compostos foi realizada com êxito, permitindo a obtenção de um produto mais ativo que o próprio eugenol frente a bactérias que são consideradas problemas na indústria de alimentos.

A subunidade sacarídica possivelmente favorece o transporte da aglicona antimicrobiana para o interior da célula bacteriana, promovendo com eficiência a morte do microrganismo.

Os resultados mostraram que as propriedades físicas e óticas dos filmes não apresentaram mudanças em relação ao filme sem aditivo que comprometessem a qualidade dos mesmos bem como sua aplicabilidade no mercado.

Quanto à avaliação antimicrobiana dos filmes, foi verificado que o filme desenvolvido com o glicosídeo do diidroeuugenol apresentou uma melhor atividade em comparação ao diidroeuugenol e também aos relatos da literatura de filmes incorporados com eugenol.

Dessa forma, o trabalho contribui de forma significativa, trazendo uma alternativa viável e sustentável de embalagem ativa com atividade frente a bactérias contaminantes de alimentos.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, M.R.; MOSS, M.O. **Food microbiology**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, England, 2004.
- ADORJAN, B.; BUCHBAUER, G. Biological properties of essential oils: an updated review. **Flavour and fragrance journal**, v. 25, p. 407-426, 2010.
- AHMAD, A. et al. Proton translocating ATPase mediated fungicidal activity of eugenol and thymol. **Fitoterapia**, v. 81, p. 1157–1162, 2010.
- ALCARÃS, L.E. et al. Deteccion de *Staphylococcus aureus* em manipuladores de alimentos. **La Alimentacion Latino Americana**, v. 219, p. 44-47, 1997.
- APPENDINI, P.; HOTCHKISS, J.H. Review of antimicrobial food packaging. **Innovative Food Science Emergency Technology**, v. 3, p. 113-126, 2002.
- BAJPAI, V.K.; SHARMA, A.; BAEK, K.H. Antibacterial mode of action of Cudraniatri-cuspidata fruit essential oil, affecting membrane permeability and surface characteristics of food-borne pathogens. **Food Control**, v.32, p. 582-590, 2013.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils: a review. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, p.446-475, 2008.
- BARBOSA, L. N. et al. Essential oils against foodborne pathogens and spoilage bacteria in minced meat. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 6, p.725-728, 2009.
- BERTINI, L. M. et al. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. **Infarma**, v. 17, p.80-83, 2005.
- BIZZO, H.; HOVELL, A.M.; REZENDE, C.M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química nova**, v. 32, p. 588-594, 2009.
- BORUCKI, M.K. et al. Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 69, n. 12, p. 7336-7342, 2003.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC N° 12, de 12 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos**. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 2001.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde/UHA/CGDT. Dados epidemiológicos – DTA período de 2000-2011, 2012.
- BRITO, J.R.F. et al. Retail Survey of Brazilian milk and minas frescal cheese and a contaminated dairy plant to establish prevalence, relatedness, and sources of *Listeria*

monocytogenes isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, n.15, p.4954-4961, 2008.

BURT, S. Essential Oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 233-253, 2004.

BUSH, K.; PUCCI, M.J. New antimicrobial agents on the horizon. **Biochemistry Pharmacology**, v. 82, p. 1528–1539, 2011.

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

CASEY, A.L.; LAMBERT, P.A.; ELLIOTT, T.S.J. Staphylococci. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 29, n. 3, p. 23-32, 2007.

CATÃO, R.M.R.; CEBALLOS, B.S.O. *Listeria* Spp., Coliformes Totais E Fecais E E.coli No Leite Cru E Pasteurizado De Uma Indústria De Laticínios, No Estado Da Paraíba (Brasil). **Food Science and Technology**, v.21, n.3, p.281-287, 2001.

Centers for Disease Control and Prevention - CDC. 2010. Preliminary FoodNet data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food – 10 states. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 59, p. 418-422, 2010.

COSTA, A.L.S. Microbiologia dos alimentos e a importância dos microrganismos úteis, deteriorantes e patogênicos. **Microbiologia e higiene alimentar**, 2010.

DO, H. et al. Enzymatic synthesis of l-menthyl alpha-maltoside and l-menthylalphanalto-oligosides from l-menthyl alpha-glucoside by cyclodextrin glucanotransferase. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 94, p. 119–123, 2002.

DUARTE, D.A.M. et al. Pesquisa De *Listeria monocytogenes* E Microrganismos Indicadores Higiênico-Sanitários Em Queijo De Coalho Produzido E comercializado No Estado De Pernambuco. **Arquivos Instituto Biologia.**, v.72, n.3, p.297-302, 2005.

FERNANDES, S.A. et al. Phenotypic and molecular characterization of *Salmonella* Enteritidis strains isolated in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 48, n. 4, p. 179-184, 2006.

FILHO, V.C.; YUNES, R.A. Estratégias Para A Obtenção De Compostos Farmacologicamente Ativos A Partir De Plantas Medicinais. Conceitos Sobre Modificação Estrutural Para Otimização Da Atividade. **Química Nova**, v. 21, p. 1, 1998.

FLEMING-JONES, M.; SMITH, R. Volatile organic compounds in foods: a five year study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p. 8120–8127, 2003.

FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da segurança alimentar**, 7ed., Porto Alegre, 2013.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2005. 182p.

FRANZ, C. M. Essential oil research: past, present and future. **Flavour Fragrance Journal**, v. 25, p. 112-113, 2010.

GONI, P. et al. Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. **Food Chemistry**, v. 116, p. 982–989, 2009.

GUTIERREZ, J.; BARRY-RYAN, C.; BOURKE, P. Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: Efficacy, synergistic potential and interactions with food components. **Food Microbiology**, v. 26, p. 142–150, 2009.

HENRIQUE, C.M.; CEREDA, M.P.; DUPUY, N. Características físicas de filmes biodegradáveis produzidos a partir de amidos modificados de mandioca. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, n.1, p.66-77, 2008.

HSIEH, P. C.; MAU, J. L.; HUANG, S. H. Antimicrobial effect of various combinations of plant extracts. **Food Microbiology**, v.18, p.35-43, 2001.

JAY, J. **Microbiologia de alimentos**. Porto Alegre: Artmed, 2005.

KADER, A.A. **Postharvest technology of horticultural crops**, 3. ed. Publication n. 3311. Oakland: Cooperative Extension of University of California. Division of Agriculture and Natural Resources, 2002, 535p.

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**, v.17, n.6, p.6953-6981, 2012.

KROCHITA, J.M.; MULDER-JOHNSTON, C. Edible and biodegradable polymer films: challenges and opportunities. **Food Technology**, v.51, n.2, p.60-74, 1997.

KUROSU, J. et al. Enzymatic synthesis of alpha-arbutin by alpha-anomer-selective glucosylation of hydroquinone using lyophilized cells of *Xanthomonas campestris* WU-9701. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 93, p. 328–330, 2002.

MENDES, S.S. et al. Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Lippia gracilis* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 129, n. 3, p. 391-397, 2010.

MOELLERING, R. C. Discovering new antimicrobial agents. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 37, p. 2-9, 2011.

MORAIS, S. M. et al. Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de *Croton* do nordeste do Brasil. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 5, p. 907-910, 2006.

MURRAY, R.J. Recognition and management of *S. aureus* toxin mediated disease. **Internal Medicine Journal**, v. 35, p. 106-119, 2005.

NAGABABU, E. et al. Assessment of Antioxidant Activities of Eugenol by *in vitro* and *in vivo* Methods. **Methods in Molecular Biology**, v.610, p.165-180, 2010.

NAZZARO, F. et al. Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. **Pharmaceuticals**, v.6, p.1451-1474, 2013.

OLIVEIRA, L.M. Filmes plásticos incorporados de agentes antimicrobianos. **Bol. Técnico Centro Tecnol. Embalagem**, v. 14, n. 2, p. 4-7, 2002.

OLIVEIRA, T.M. Uso de embalagem ativa na inibição do escurecimento enzimático de maçãs. **Semina: Ciências Agrárias**, v.29, n.1, p.117-128, 2008.

OKOH, O. O.; SADIMENKO, A. P.; AFOLAYAN, A. J. Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods. **Food Chemistry**, v. 120, p. 308-312, 2010.

PAYMENT, P.; RILEY, M.S. Resolving the global burden of gastrointestinal illness: a call for action. **American Academy of Microbiology**. Washington, 2002. Disponível em: <<http://www.asm.org>> Acesso em: 01 out 2016.

POPOFF, M.Y.; BOCKEMÜHL, J.; GHEESLING, L.L. Supplement 2002 to the Kauffman-White scheme. **Research in Microbiology**, Paris, v.155, n.7, p. 568-570, 2004.

PRADELLA, J.G.C. "Biopolímeros e Intermediários Químicos", relatório técnico nº 84396-205, Centro de Tecnologia de Processos e Produtos, Laboratório de Biotecnologia Industrial - LBI/CTPP (2006).

PRAMOD, K.; ANSARI, S.H.; ALI, J. Eugenol: a natural compound with versatile pharmacological actions. **Natural Products Commun**, v. 5, p. 1999–2006, 2010.

QUINTAVALLA, S.; VICINI, L. Antimicrobial food packaging in meat industry. **Meat Science**, v. 62, p. 373-380, 2002.

RAJKUMAR, S.; JEBANESAN, A. Chemical composition and larvicidal activity of leaf essential oil from *Clausenadentata* (Willd) M. Roam. (Rutaceae) against the chikungunya vector, *Aedes aegypti* Linn. (Diptera: Culicidae). **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 13, p. 107-109, 2010.

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

RAO, A. et al. Mechanism of antifungal activity of terpenoid phenols resembles calcium stress and inhibition of the TOR pathway. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 54, p. 5062–5069, 2010.

RAUT, J.S.; KARUPPAYIL, S.M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 250-264, 2014.

RIM, J.Y.; BACON, A.E. Prevalence of community acquire, methicillin resistant *S. aureus* colonization in random sample of healthy individuals. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 28, p. 1044-1046, 2007.

SAGINUR, R.; SUH, K.N. *Staphylococcus aureus* bacteraemia of unknown primary source: where do we stand? **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 32, n. 1, p. 21-25, 2008.

SEN-SUNG C. et al. Antifungal activity of cinnamaldehyde and eugenol congeners against wood-rot fungi. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 5145–5149, 2008

SILK, B.J. et al. Invasive listeriosis in the foodborne diseases active surveillance network. **Clinical Infectious Diseases**, v. 54, p. 369-404. 2012.

SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre: UFSC/UFRGS, 2007.

SIMÕES, M.; SIMÕES, M.L.; VIEIRA, M.J. A review of current and emergent biofilm control strategies. **LWT-Food Science and Technology**, v.43, n.4, p.573-583, 2010.

SILVA, S. L. et al. Cytotoxic evaluation of essential oil from *Casearia sylvestris* Sw on human cancer cells and erythrocytes. **Acta Amazonica**, v. 38, p. 107-112, 2008.

SOARES, N. et al. Novos desenvolvimentos e aplicações em embalagens de alimentos. **Revista Ceres**, v. 56, n. 4, p. 370- 378, 2009.

SOUSA, O.V. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of the essential oil from *Eremanthus erythropappus* leaves. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 60, p. 771-777, 2008.

SOUZA, T.B. et al. Synthesis and in vitro evaluation of antifungal and cytotoxic activities of eugenol glycosides. **Medicinal Chemistry Research**, v. 23, p. 496-502, 2014.

SOUZA, E. R. N.; TEBALDI, V. M. R.; PICCOLI, R. H. Adaptation and Cross adaptation of *Listeria monocytogenes* to eugenol and carvacrol compounds. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 4, p. 528-533, 2015.

TRAJANO, V. N. et al. Propriedade antibacteriana de óleos essenciais de especiarias sobre bactérias contaminantes de alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 3, p. 542-545, 2009.

THOROSKI, J.; BLANK, G.; BILIADERIS, C. Eugenol induced inhibition of extracellular enzyme production by *Bacillus cereus*. **Journal of Food Protection**, v. 52, p.399– 403, 1989.

UNNERSTAD, H. et al. Prolonged contamination of a dairy with *Listeria monocytogenes*. **Netherlands Milk Dairy Journal**, v. 50, p. 493-499, 1996.

VANEGAS, M.C. Detection of *Listeria monocytogenes* in raw whole milk for human consumption in Columbia by real time PCR. **Food Control**, v. 20, n. 4, p. 430-432, 2009.

VILLADIEGO, A.M.D. et al. Filmes e revestimentos comestíveis na conservação de produtos alimentícios. **Revista Ceres**, v. 52, n. 300, p. 221-244, 2005.

WANNES, W. A. et al. Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 1362-1370, 2010.

XIA, X. et al. Effects of tomato variety, temperature differential and post stem removal time on internalization of *Salmonella* entérica in tomatoes. **Journal of Food Protection**, v. 75, n. 2, p. 279-303, 2012.

YOSHIDA, C.M.P.; ANTUNES, A.J. Aplicação de filmes proteicos a base de soro de leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.29, p.420-430, 2009.

ZAFFARI, C.B.; MELLO, J.F.; COSTA, M. Qualidade bacteriológica de queijos artesanais comercializados em estradas do litoral norte do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v.37, n.3, p.862-867, 2007.

Segunda parte

Artigo 1: Elaborado conforme as normas do “Food Research International”

Synthesis and *in vitro* evaluation of peracetyl and deacetyl glucosides from eugenol, isoeugenol and dihydroeugenol against food contaminant bacteria

Déborah Braga Resende^a; Guilherme Tadeu Lemos Bastos^b; Heloísa Helena de Abreu Martins^c; Thiago Belarmino de Souza^b; Diogo Teixeira Carvalho^b, Roberta Hilsdorf Piccoli^c; Rosane Freitas Schwan^a; Disney Ribeiro Dias^c.

^aFederal University of Lavras, Department of Biology, P.O. Box 3037, ZIP code 37200-000, Lavras-MG. deborahbr@gmail.com*; rfschwan@gmail.com

^bFederal University of Alfenas, Laboratory of Pharmaceutical Chemistry, Gabriel Monteiro Silva st., ZIP code 37130-001, Alfenas-MG. diogotcarv@gmail.com; thiagobs83@yahoo.com.br

^cFederal University of Lavras, Department of Food Science, P.O. Box 3037, ZIP code 37200-000, Lavras-MG. heloisa_amartins@hotmail.com; rhpiccoli@dca.ufla.br; diasdr@gmail.com

Abstract: The composition of food promotes microorganisms growth, which suggests that conservation techniques are needed to extend its useful life. Essential oils as well as its components separately, have shown promising alternatives to synthetic preservatives replacement for the natural ones due to its vast properties. Therefore, it becomes interesting to optimize the effect of these compounds and evaluation of its applicability as additives in food. To make it happens, six peracetyl and deacetyl glucosides were synthesized from eugenol, isoeugenol and dihydroeugenol present in the essential oil of clove. All glucosides were characterized by IR and NMR. The synthesized compounds and their aglycones were evaluated for the minimal inhibitory and bactericidal concentration (MIC and MBC) against the spoilage food bacteria *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* Enteritidis through the microdilution in broth technique, using 96 wells polystyrene plates. All deacetyl glucosides were about two times more active than aglycones source, and the peracetyl glucosides were, in most cases, equipotent to aglycones. The results revealed that the deacetyl glycoside of dihydroeugenol proved to be the most active compound in comparison to the other ones, facing the bacteria tested, with a 0.37% MIC and MBC v/v for *E. coli* and 0.18% v/v for others bacteria.

Keywords: glucosides; eugenol; *Escherichia coli*; *Listeria monocytogenes*; *Staphylococcus aureus*; *Salmonella* Enteritidis.

Chemical compounds studied in this article

Eugenol (PubChem CID: 3314)

Dihydroeugenol (PubChem CID: 17739)

Isoeugenol (PubChem CID: 853433)

1. Introduction

Essential oils are described as natural compounds produced by secondary metabolism of plants with a proved wide range of biological properties, among them the antibacterial action, with low minimum inhibitory concentration values and opposite action to Gram positive and negative bacteria (Okoh et al., 2010). Due to their multiple mechanisms of action, essential oils and its components have been suggested as alternative drugs instead the most used, which cell target is usually only one (Souza, Tebaldi, & Piccoli, 2015).

It is important to note that due to the wide range of essential oils' components, it is difficult to attribute the antimicrobial effect to one of them, which reinforces the search for studies of the major oils' compounds.

Eugenol (4-allyl-2-methoxyphenol) is a phenylpropanoid, pharmacologically active, present in plant's essential oils. Among the producing plants, are *Syzygium aromaticum* or India's clove, *Dicypelium cariophyllatum* or stick cloves, *Ocimum gratissimum* or basil, and *Croton zenhtneri* or cinnamon-brava, and others (Nagababu et al., 2010).

The composition of food promotes the growth of microorganisms, which suggests that conservation techniques are needed to extend its useful life. Nowadays, the search for natural and less harmful techniques, to the organism and environment, is growing and essential oils have been studied as a potent conservation system (Trajano et al., 2009). Commonly involved in commonly involved in food's poisoning demonstrations are *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, and others (Centers For Disease Control And Prevention, 2010).

Natural products, mainly derived from plants, have been considered as an excellent source of new bioactive compounds for showing innovative structures that can be used as a structural natural pharmacophores for derivatizing (Souza et al, 2014).

Once got a biologically active compound, it is possible to make use of studies involving molecular modification, also called molecular variation or molecular manipulation, which is the most widely used method for optimizing the activity found (Filho & Yunes, 1998). Glycosylation has been widely used as a method of structural modification that optimizes the physico-chemical and biological properties of the starting compound (Do et al., 2002; Kurosu et al., 2002).

Face this context, it is notable the importance of a safe, effective and sustainable alternative introduction for food industry in order to make possible the control of contaminating microorganisms, considering the desire for free chemical additives products. A natural preservative, such as essential oils and its components, makes possible the food security rooted in biopreservation.

Based on what has been mentioned above this study aimed to evaluate the effects of glycosylation of eugenol, isoeugenol and dihydroeugenol, regarding the antibacterial activity of these aglycone. We seek to verify that the glycosylation is able to decrease the MIC values of the aglycones against pathogenic bacteria in food.

2. Materials and Methods

2.1. Local

Synthesis and glucosides characterization was conducted at LQFar – Laboratory of Pharmaceutical Chemistry Research – UNIFAL-MG. The phenolic starting compounds eugenol, isoeugenol and dihydroeugenol were provided by LQFar. Biological activities evaluation were conducted at Food Microbiology Laboratory – UFLA.

2.2. Chemistry

The reagents employed in synthesis were purchased from CS Cientifica and were used without previous purification. The reaction progress was monitored by Thin Layer Chromatography (TLC) performed on silica gel-G plates (Macherey-Nagel, DC-Fertigfolien Alugram® Xtra Sil G/UV254) using the mobile phases shown in each experiment. TLC spots were visualized under ultraviolet light. For Column Chromatography (CC), column grade silica gel (Sorbiline; 0.040-0.063 mm mesh size) was employed. Melting points (Mp) were

acquired on a Buchi, Model 535 apparatus and are uncorrected. The specific optical rotations $[\alpha]_D$ were measured on a Perkin Elmer 341 apparatus, at 20°C. The Infrared (IR) spectra was ran on a Thermo Scientific Nicolet spectrophotometer, Model iS50, by ATR technique. The Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectra was recorded on a Bruker Model DPX-200 (200 MHz for ^1H and 50 MHz for ^{13}C) or on an AC-300 spectrometer (300 MHz for ^1H and 75 MHz for ^{13}C), in CDCl_3 and $\text{DMSO-}d_6$, using TMS as the internal reference. Chemical shifts were given in δ and coupling constants (J) were reported in Hertz (Hz). The splitting of proton resonances in the ^1H NMR spectra is defined as s = singlet, br s = broad singlet, d = doublet, t = triplet and m = multiplet. The synthetic route to glucosyl products **4-9** is depicted in Fig. 1.

Penta-*O*-acetyl-D-glucopyranose (intermediate **2**) and α -D-tetra-*O*-acetylglucopyranosyl bromide (intermediate **3**) were prepared from D-glucose according to the well-established literature methods (Conchie et al., 1957). The synthesis of glucosides was based on the methodologies described by Lucchese and Marzorati (2000) and De Souza (2014) and was achieved as following: a solution of the respective phenol (1 eq - eugenol, isoeugenol or dihydroeugenol) in 50 mL of 10% aqueous K_2CO_3 (8 eq) was gradually added from a dropping funnel to a solution of **3** (1 eq) and tetrabutylammonium bromide (0.3 eq) in 50 ml of chloroform in a 250 mL round bottom flask. This mixture was left under magnetic stirring at room temperature. When the reaction was over, as shown by TLC (hexane/ethyl acetate, 7:3, v/v), the reaction mixture was poured over crushed ice and it was acidified with 10% aqueous HCl to pH 4. The organic phase was washed with water (5 x 50mL), dried by anhydrous Na_2SO_4 and the solvent was removed in a rotary evaporator. The pure products (**4**, **5** and **6**) were obtained by CC (hexane/ethyl acetate, 9:1, v/v). Next, these peracetyl glucosides were solubilized in a potassium methoxide/methanol solution and the solution was stirred at room temperature during 20 minutes. After the completion of the reaction, noticed by TLC (ethyl acetate 100%), the mixture was neutralized with IRA-120 resin. The resin was filtered off and washed with methanol. The filtrate was concentrated in vacuum and this afforded the deacetyl glucosides (**7**, **8** and **9**), which had no purification need.

2.2.1. 4-allyl-2-methoxyphenyl-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranoside) (**4**)

White crystals; Yield: 55 %. Mp: 117–119 °C. $[\alpha]_D$ -16.0 (*c* 0.5 CH₂Cl₂); FT-IR (KBr, cm⁻¹) 3050 (aromatic C–H), 2969, 2901 (sp³ C–H), 1751 (C=O), 1636 (C=C), 1595, 1512, 1466 (aromatic C=C); ¹H NMR data (δ , ppm, CDCl₃, 200 MHz): 7.0 (s, 1H, aromatic H), 6.69–6.64 (m, 2H, aromatic H), 5.9–5.8 (m, 1H, CH₂CHCH₂), 5.2–4.8 (m, 6H, sugar H), 4.3–4.0 (m, 2H, CH₂CHCH₂), 3.8–3.7 (m, 4H, OCH₃ and sugar H), 3.3 (d, 2H, CH₂CHCH₂), 2.05–2.01 (m, 12H, CH₃); ¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz): 170.4–169.1 (4C, C=O), 150.2 (1C, aromatic), 144.1 (1C, aromatic), 136.9 (1C, aromatic), 136.5 (1C, CH₂CHCH₂), 120.3 (1C, aromatic), 120.0 (1C, aromatic), 115.7 (1C, CH₂CHCH₂), 112.7 (1C, aromatic), 100.7 (1C, sugar), 72.3 (1C, sugar), 71.6 (1C, sugar), 70.9 (1C, sugar), 68.1 (1C, sugar), 61.6 (1C, sugar), 55.6 (1C, OCH₃), 39.6 (1C, CH₂CHCH₂), 20.3–20.3 (4C, CH₃).

2.2.2. (E)-2-methoxy-4-(prop-1-en-1-yl)phenyl-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranoside) (**5**)

Yellow crystals; Yield: 28 %. Mp: 142–144 °C. $[\alpha]_D$ -20.0 (*c* 0.5 CH₂Cl₂); FT-IR (KBr, cm⁻¹) 3045 (aromatic C–H), 2960, 2898 (sp³ C–H), 1747 (C=O), 1650 (C=C), 1598, 1501, 1480 (aromatic C=C); ¹H NMR data (δ , ppm, CDCl₃, 300 MHz): 7.02 (d, 1H, aromatic H, $J^3 = 8.1$ Hz), 6.86 (d, 1H, aromatic H, $J^3 = 1.9$ Hz), 6.80 (dd, 1H, aromatic H, $J^3 = 8.2$ Hz; $J^4 = 1.9$ Hz), 6.32 (dd, 1H, CHCHCH₃, $J^3 = 15.7$ Hz; $J^4 = 1.5$ Hz), 6.19–6.09 (m, 1H, CHCHCH₃), 5.28–5.25 (m, 2H, sugar H), 5.17–5.11 (m, 1H, sugar H), 4.93–4.90 (m, 1H, sugar H), 4.27 (dd, 1H, sugar H, $J^3 = 12.2$ Hz; $J^4 = 5.0$ Hz), 4.14 (dd, 1H, sugar H, $J^3 = 12.2$ Hz; $J^4 = 2.5$ Hz), 3.81 (s, 3H, OCH₃), 3.77–3.71 (m, 1H, sugar H), 2.06–2.02 (s, 12H, CH₃), 1.85 (dd, 3H, $J^3 = 6.4$ Hz; $J^4 = 1.5$ Hz); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz): 170.5–169.3 (4C, C=O), 150.6 (1C, aromatic), 145.0 (1C, aromatic), 134.9 (1C, aromatic), 130.3 (1C, CHCHCH₃), 125.3 (1C, CHCHCH₃), 120.2 (1C, aromatic), 118.4 (1C, aromatic), 109.8 (1C, aromatic); 100.9 (1C, sugar), 72.6 (1C, sugar), 71.9 (1C, sugar), 71.2 (1C, sugar), 68.4 (1C, sugar), 61.9 (1C, sugar), 55.9 (1C, OCH₃), 20.6 (4C, CH₃), 18.3 (1C, CHCHCH₃).

2.2.3. 2-methoxy-4-propylphenyl-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranoside) (**6**)

White crystals; Yield: 19 %. Mp: 107–110 °C. $[\alpha]_D$ -35.0 (*c* 0.5 CH₂Cl₂); FT-IR (KBr, cm⁻¹) 3076 (aromatic C–H), 2980, 2889 (sp³ C–H), 1754 (C=O), 1602, 1510, 1490 (aromatic C=C);

^1H NMR data (δ , ppm, CDCl_3 , 300 MHz): 6.95 (d, 1H, aromatic H, $J^3 = 8.2$ Hz), 6.79 (d, 1H, aromatic H, $J^4 = 1.9$ Hz), 6.65 (dd, 1H, aromatic H, $J^3 = 8.2$ Hz, $J^4 = 1.9$ Hz), 5.2–3.2 (m, 7H, sugar H), 3.81 (s, 3H, OCH_3), 2.06–2.02 (s, 12H, CH_3), 1.59–1.51 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.28–1.21 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 0.86 (t, 3H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$, $J^3 = 7.2$ Hz); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz): 170.4–169.2 (4C, C=O), 149.0 (1C, aromatic), 145.0 (1C, aromatic), 136.5 (1C, aromatic), 120.4 (1C, aromatic), 115.5 (1C, aromatic), 113.1 (1C, aromatic), 100.7 (1C, sugar), 77.4 (1C, sugar), 77.2 (1C, sugar), 73.7 (1C, sugar), 70.1 (1C, sugar), 61.1 (1C, sugar), 56.0 (1C, OCH_3), 37.3 (1C, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 24.7 (1C, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 20.5 (4C, CH_3), 14.1 (1C, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$).

2.2.4. 4-allyl-2-methoxyphenyl β -D-glucopyranoside (7)

Light yellow crystals; Yield: 78 %. Mp: 109–110 °C. $[\alpha]_{\text{D}} -38.4$ (c 0.5 MeOH); FT-IR (KBr, cm^{-1}) 3295 (OH), 3077 (aromatic C–H), 2975, 2917 (sp^3 C–H), 1638 (C=C), 1595, 1512, 1465 (aromatic C=C); ^1H NMR data (δ , ppm, DMSO, 50 MHz): 7.0 (d, 1H, aromatic H), 6.8 (s, 1H, aromatic H), 6.6 (d, 1H, aromatic H), 6.0–5.8 (m, 1H, CH_2CHCH_2), 5.1–4.8 (m, 6H, sp^3 H, CH_2CHCH_2 and OH), 4.5 (1H, OH), 3.7–3.1 (m, 10H, sp^3 H, CH_2CHCH_2 and OH); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 50 MHz, DMSO): 148.8 (1C, aromatic), 144.8 (1C, aromatic), 137.9 (1C, CH_2CHCH_2), 133.4 (1C, aromatic), 120.2 (1C, aromatic), 115.5 (1C, CH_2CHCH_2), 115.4 (1C, aromatic), 112.8 (1C, aromatic), 100.1 (1C, sugar), 76.9 (1C, sugar), 76.8 (1C, sugar), 73.2 (1C, sugar), 69.6 (1C, sugar), 60.5 (1C, sugar), 55.5 (1C, OCH_3), 38.8 (1C, CH_2CHCH_2).

2.2.5. (E)-2-methoxy-4-(prop-1-en-1-yl)phenyl β -D-glucopyranoside (8)

Yellow crystals; Yield: 89 %. Mp: 130–132 °C. $[\alpha]_{\text{D}} -55^\circ$ (c 0.5 MeOH); FT-IR (KBr, cm^{-1}) 3302 (OH), 3060 (aromatic C–H), 2965, 2924 (sp^3 C–H), 1648 (C=C), 1591, 1509, 1477 (aromatic C=C); ^1H NMR data (δ , ppm, CDCl_3 , 300 MHz): 7.00–6.98 (m, 2H, aromatic H), 6.83 (dd, 1H, aromatic H, $J^3 = 8.4$ Hz, $J^4 = 1.8$ Hz), 6.33 (dd, 1H, CHCHCH_3 , $J^3 = 15.9$ Hz; $J^4 = 1.2$ Hz), 6.23–6.14 (m, 1H, CHCHCH_3), 5.19 (d, 1H, OH, $J^3 = 4.6$ Hz), 5.0 (br s, 1H, OH), 4.99 (d, 1H, OH, $J^3 = 5.0$ Hz), 4.52 (t, 1H, OH, $J^3 = 5.7$ Hz), 4.86 (d, 1H, sugar H, $J^3 = 7.3$ Hz), 3.76 (s, 3H, OCH_3), 3.68–3.63 (m, 1H, sugar H), 3.25–3.14 (m, 1H, sugar H), 1.81 (dd, 3H, CHCHCH_3 , $J^3 = 6.3$ Hz; $J^4 = 1.1$ Hz); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz): 149.4 (1C, aromatic), 146.0 (1C, aromatic), 132.0 (1C, aromatic), 130.9 (1C, CHCHCH_3), 124.0 (1C, CHCHCH_3),

118.8 (1C, aromatic), 115.6 (1C, aromatic), 109.9 (1C, aromatic); 100.4 (1C, sugar), 77.4 (1C, sugar), 77.2 (1C, sugar), 73.6 (1C, sugar), 70.0 (1C, sugar), 61.0 (1C, sugar), 56.0 (1C, OCH₃), 18.5 (1C, CHCH₂CH₃).

2.2.6. 2-methoxy-4-propylphenyl β-D-glucopyranoside (9)

Yellow crystals; Yield: 62 %. Mp: 138-140 °C. [α]_D -12.5 (c 0.5 MeOH); FT-IR (KBr, cm⁻¹) 3051 (aromatic C–H), 2958, 2904 (sp³ C–H), 1600, 1506, 1476 (aromatic C=C); ¹H NMR data (δ, ppm, CDCl₃, 300 MHz): 6.96 (d, 1H, aromatic H, *J*³ = 8.2 Hz), 6.78 (d, 1H, aromatic H, *J*⁴ = 1.9 Hz), 6.65 (dd, 1H, aromatic H, *J*³ = 8.2 Hz, *J*⁴ = 1.9 Hz), 4.81 (d, 1H, sugar H, *J*³ = 7.3 Hz), 4.40-4.19 (m, 3H, sugar H), 3.73 (s, 3H, OCH₃), 3.64-3.62 (m, 1H, sugar H), 3.26-3.16 (m, 1H, sugar), 3.16 (br s, 1H, sugar H), 1.59-1.51 (m, 2H, CH₂CH₂CH₃), 1.29-1.22 (m, 2H, CH₂CH₂CH₃), 0.87 (t, 3H, CH₂CH₂CH₃, *J*³ = 7.2 Hz); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz): 149.1 (1C, aromatic), 145.0 (1C, aromatic), 136.4 (1C, aromatic), 120.6 (1C, aromatic), 115.7 (1C, aromatic), 113.3 (1C, aromatic), 100.7 (1C, sugar), 77.4 (1C, sugar), 77.2 (1C, sugar), 73.7 (1C, sugar), 70.1 (1C, sugar), 61.1 (1C, sugar), 56.0 (1C, OCH₃), 37.3 (1C, CH₂CH₂CH₃), 24.7 (1C, CH₂CH₂CH₃), 14.1 (1C, CH₂CH₂CH₃).

Aiming to ease the results exposition, are using the following code, as shown in Table 1.

2.3 Microorganisms, standardization and maintenance of the inoculum

The bacterial strains used were *Escherichia coli* ATCC 25922; *Listeria monocytogenes* ATCC 19117; *Staphylococcus aureus* ATCC 8702 and *Salmonella* Enteritidis S64.

The stock cultures were stored in freezing medium (glycerol - 15 ml; bacteriological peptone - 0.5 g; yeast extract - 0.3 g; NaCl - 0.5 g; distilled water 100 ml, pH 7.0). The cultures were thawed at room temperature and reactivated inoculating 100 μL aliquots into tubes containing 10 ml of Brain Heart Infusion broth (BHI) broth and incubated at 37 ° C / 24h. The culture was standardized at 10⁸ CFU / mL to perform the experiments.

2.4 Determination of minimum inhibitory and bactericidal concentration (MIC and MBC)

The minimum inhibitory concentration of the tested aglycones and their glucosides was determined using the microdilution broth technique in polystyrene plates of 96 wells, according to the CLSI (M7-A6) (NCCLS, 2003) with some adjustments.

For this purpose, solutions of TSB (Tryptic Soy Broth) plus 0.5% Tween 80 and the compound were obtained at the following concentrations (%): 0.09; 0.18; 0.37; 0.75; 1.50 and 3.00 (v/v). 150 μ L of solutions and 10 μ L of standard culture were inoculated in the wells. Plates were sealed and incubated at 37°C/24h to determine the minimum inhibitory concentration based on the visual growth.

Then, it was carried the microdrop test by culture plating aliquots in TSA and incubating at 37°C/24h and set the compound concentration able to kill bacteria cells, defining the minimum bactericidal concentration of tested compounds. TSA plus 0.5% of Tween 80 and compound, with no inoculum, was used as negative control.

The experiment was taken in triplicate and three replicates.

3. Results and Discussion

3.1. Chemistry

The synthetic route used to obtain the proposed glucosides involved typical organic reactions such as esterification (peracetyl derivative synthesis), saturated carbon in nucleophilic substitutions (bromination and glycosylation steps, respectively), and transesterification (acetylation step). These glucosides has been previously described by other studies. Glucosides **EPG**, **DPG** and **IPG** were obtained as pure white to light yellow solids, though in low yields (15% for EPG, 28% for IPG and 19% for DPG). The NMR spectra of these compounds showed all the expected signals and these results were comparable to those in literature, which confirmed their identities. The ^1H NMR signals for the aromatic hydrogens of the aglycones could be seen in the range of 7.00 to 6.25 ppm and the hydrogens of the saccharide unit were observed as signals in the range of 4.30 to 3.71 ppm. In the ^{13}C NMR spectra, signals in the range of 100.70 to 60.10 ppm were assigned to the carbons of the saccharide ring while the signals in the range of 170.10 to 169.00 ppm were assigned to the carbonyl carbons. Glucosides EDG, IDG and DDG were also obtained as white or yellowish

solids, with yields of 78% (EDG), 89% (IDG) and 62% (DDG). It was possible to confirm the success of this deacetylation step, since their ^1H and ^{13}C NMR spectra showed no signs of acetyl groups. Finally, all glucosides were obtained with β configuration, as can be confirmed by the average coupling constant value of 8 Hz for the anomeric H. All of the compounds were pure enough for the biological evaluation as proved by NMR e chromatography techniques.

3.2. Antimicrobial activities assay

All evaluated compounds showed activity against tested bacteria. MIC are exposed in Table 2 as well as MBC.

The peracetyl glucosides showed similar activities comparing to the starting compounds. In case of eugenol, its peracetyl glucoside has the same activity against all the tested bacteria. About dihydroeugenol, its peracetyl derivative was equipotente but, against *Salmonella* Enteritidis, it was more active. It is interesting to notice that dihydroeugenol was more active than eugenol against Gram positive strains tested, *Listeria monocytgenes* e *Staphylococcus aureus*. As for isoeugenol, it was the least active of the tested compounds and its peracetyl derivative was equipotente to it in all the evaluated cases.

As for deacetyl glucosides, it is possible to realize that they were more active than starting compound in every situation. About eugenol, its deacetyl glucoside showed a twice lower MIC than eugenol, suggesting a better capacity to promote bacteria growth inhibition. As for the dihydroeugenol, its deacetyl was three times more active against *Salmonella* Enteritidis and twice against the other strains. Isoeugenol deacetyl derivative had two times bigger activity in inhibiting bacteria comparing to isoeugenol.

Besides to MIC, the carried out experiment also provides the Minimum Bactericidal Concentration (MBC). Thus, when inoculated sample in a Petri dish, by microdrop test, it was verified that concentrations which promoted growth inhibition in the microtiter plates were able to kill bacteria assessed, since there was no growth on the Petri dish using the concentrations obtained in the MIC tests. This indicates that the tested compounds act as bactericides against the tested bacteria, since they were not able to retake growth when they were cultured in plate.

It can be noticed that, for *E. coli*, both the peracetyl glycoside of eugenol as peracetyl glycoside of dihydroeugenol, proved to be the most active of the series, with 0.37% v/v MIC and MBC. For other bacteria, the deacetyl derivative of dihydroeugenol was the most active of the series, with 0.18% v/v MIC and MBC. The less active compound was isoeugenol and its peracetyl derivative, with 1.5% v/v MIC and MBC against all tested bacteria.

The chemical structure of the synthesized compounds suggests that peracetyl glucosides are lipophilic products and, for this reason, they should be better absorbed by the bacterial system than deacetyl glucosides, hydrophilic.

However, it was observed that the effect of deacetyl glucosides was higher than the inhibitory effect of peracetyl glucosides. This might be explained by the present transport system in the bacterial walls, able to recognize saccharide residue and thus increase the supply of antimicrobial aglycone.

Bacterial nutrition occurs both by passive/facilitated diffusion as by active transport mechanisms. These active transport systems may be primary, sensitive to osmotic shock from the energy source ATP hydrolysis; or secondary, using the membrane electrochemical gradient for energy extraction (Berger, 1973). One of these primary systems include the ABC transporters (ATP Binding Cassette) that are directly related to the sugars uptake, as well as metals, poliminas and oligopeptides. These carriers are composed of three areas namely integral membrane domain (IMD), linker domain nucleotides (LDN) and substrate linker domain (SL) (Higgins, 2001). IMD forms a pore in the membrane where the solute is transported while LDN performs the hydrolysis of ATP and the energy supply system and SL recognizes the solute and directs it to the component responsible for the transport, according to the affinity (Dassa et al., 2001).

Griffin et al. (1999) report that hydrophobic molecules are forced into lipopolysaccharide membrane diffusion, while hydrophilic compounds pass more easily through the membrane through porins.

There is also the translocation system group. It is a transport system in which the compound is transported across the cytoplasmic membrane, and this system is mainly used for the sugars transport, which are phosphorylated by phosphotransferase system. This system acts as a chain carrier of the phosphoenolpyruvate (PEP) high power phosphate group for the sugar transport.

Thus, it can be concluded that glycoside transport, being deacetyl glucoside subunit easily recognizable by sugar transport system, leads to a better supply of the aglycones which are responsible for the inhibitory effect.

Furthermore, Griffin et al. (1999) evaluated 60 terpenoids MIC against some bacteria and concluded that the hydrogen bond forming ability is essential and relevant in antimicrobial activity as this capability facilitates the compound entry across the bacterial membrane. Therefore, the deacetyl glucosides are compounds with greater capacity for hydrogen bond formation of the evaluated series, which justifies the spare effect.

4. Conclusion

Six glucosides were synthesized from eugenol, dihydroeugenol and isoeugenol structures. Nine compounds were evaluated for antibacterial activity against *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* Enteritidis. The results showed a significantly higher activity from the peracetyl glycoside of dihydroeugenol in relation to other compounds in the series, for all tested bacteria. Among the aglycones, dihydroeugenol showed higher activity than eugenol and isoeugenol in most cases.

It can be noticed that synthesis of the compounds was undertaken successfully allowing to obtain products more active than eugenol against bacteria that are considered problems at the food industry.

The saccharide subunit favors the transport of the antimicrobial aglycone into the bacterial cell, efficiently promoting the death of the microorganism.

Acknowledgments

To Guilherme Tadeu Lemos Bastos for all help and collaboration. Rest in Peace.

Conflict of Interest

There is no conflict of interest to declare.

References

Berger, E.A. (1973). Different mechanisms of energy coupling for the active transport of proline and glutamine in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 70 (5), 1514-1518.

Centers for Disease Control and Prevention - CDC. (2010). Preliminary FoodNet data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food – 10 states. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 59, 418-422.

Conchie, J., Levvy, G. A., & Marsh, C. A (1957). Methyl and phenyl glucosides of the common sugars. *Advances in Carbohydrate Chemistry*, 12, 157-179.

Dassa, E., & Bouige, P. (2001). The ABC of ABCs: a phylogenetic and functional classification of ABC systems in living organisms. *Research in Microbiology*, 152 (3-4), 211-229.

De Souza, T.B., Orlandi, M., Coelho, L.F.L., Malaquias, L.C.C., Dias, A.L.T., Carvalho, R.R., Silva, N.C., & Carvalho, D.T. (2014). Synthesis and in vitro evaluation of antifungal and cytotoxic activities of eugenol glucosides. *Medicinal Chemistry Research*, 23, 496-502.

Do, H., Sato, T., Kirimura, K., Kino, K., & Usami, S (2002). Enzymatic synthesis of l-methyl alpha-maltoside and l-methylalphamalto-oligosides from l-methyl alpha-glucoside by cyclodextringlucanotransferase. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 94, 119–123.

Filho, V.C., & Yunes, R.A. (1998). Estratégias Para A Obtenção De Compostos Farmacologicamente Ativos A Partir De Plantas Medicinais. Conceitos Sobre Modificação Estrutural Para Otimização Da Atividade. *Química Nova*, 21, 1.

Griffin, S.G., Wyllie, S.G., Markham, J.L., & Leach, D.N. (1999). The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. *Flavour and Fragrance Journal*, 14, 322-332.

Higgins, C.F. (2001). ABC transporters: physiology, structure and mechanism – an overview. *Research in Microbiology*, 152 (3-4), 205-210.

Kurosu, J., Sato, T., Yoshida, K., Tsugane, T., Shimura, S., Kirimura, K., Kino, K., & Usami, S. (2002). Enzymatic synthesis of alpha-arbutin by alpha-anomer-selective glucosylation of hydroquinone using lyophilized cells of *Xanthomonas campestris* WU-9701. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 93, 328–330.

Lucchese, A. M., & Marzorati, L. (2000). Phase transfer catalysis. *Química Nova*, 23 (5), 641-652.

Nagababu, E., Rifkind, J.M., Boindala, S., & Nakka, L. (2010). Assessment of Antioxidant Activities of Eugenol by in vitro and in vivo Methods. *Methods in Molecular Biology*, 610, 165-180.

NCCLS (Clinical and Laboratory Standards Institute). (2003). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard. *NCCLS document M7-A6* (ISBN 1-56238-486-4), Wayne, Pennsylvania.

Okoh, O. O., Sadimenko, A. P., & Afolayan, A. J. (2010). Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods. *Food Chemistry*, 120, 308-312.

Souza, E. R. N., Tebaldi, V. M. R., & Piccoli, R. H. (2015). Adaptation and Cross adaptation of *Listeria monocytogenes* to eugenol and carvacrol compounds. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 17 (4), 528-533.

Trajano, V. N., Lima, E.O., Souza, E.L., & Travassos, A.E.R. (2009). Propriedade antibacteriana de óleos essenciais de especiarias sobre bactérias contaminantes de alimentos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 29 (3), 542-545.

Appendix – Tables and Figure

Table 1- Compounds code

Eugenol	E
Eugenol Peracetyl Glucoside (4)	EPG
Eugenol Deacetyl Glucoside (7)	EDG
Isoeugenol	I
Isoeugenol Peracetyl Glucoside (5)	IPG
Isoeugenol Deacetyl Glucoside (8)	IDG
Diidroeugenol	D
Dihydroeugenol Peracetyl Glucoside (6)	DPG
Dihydroeugenol Deacetyl Glucoside (9)	DDG

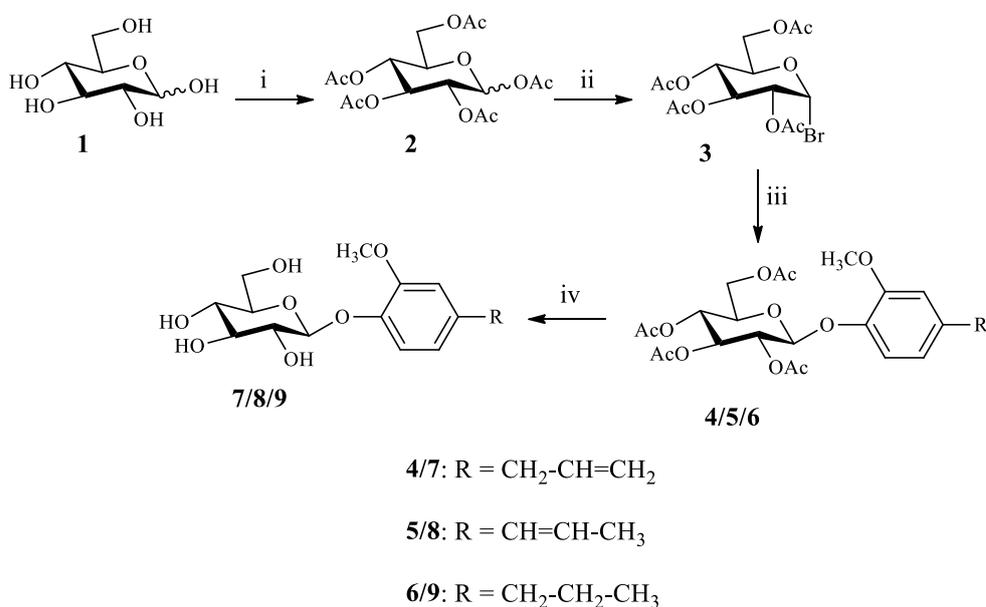
Table 2: Minimum inhibitory and bactericidal concentration of eugenol, dihydroeugenol, isoeugenol and its glucosides (% v/v).

Bacteria	E	EPG	EDG	D	DPG	DDG	I	IPG	IDG
EC	0.75	0.75	0.37	0.75	0.75	0.37	1.5	1.5	0.75
LM	0.75	0.75	0.37	0.37	0.37	0.18	1.5	1.5	0.75
SE	0.75	0.75	0.37	0.75	0.37	0.18	1.5	1.5	0.75
SA	0.75	0.75	0.37	0.37	0.37	0.18	1.5	1.5	0.75

EC: *Escherichia coli*; LM: *Listeria monocytogenes*; SE: *Salmonella Enteritidis*;

SA: *Staphylococcus aureus*

Figure 1 – Synthetic route to the glucosides of eugenol, isoeugenol e dihydroeugenol



i) Ac₂O, H₂SO₄ cat., ultrasound irradiation, 25 °C.; ii) HBr, Ac₂O, 0 °C to 25 °C; iii) eugenol (product 4), isoeugenol (product 5) or dihydroeugenol (product 6), aqueous K₂CO₃, NBu₄Br, CHCl₃, 25 °C; iv) KOH, MeOH, 0 °C.

Artigo 2

Glicosídeo de Diidroeuugenol: Síntese e avaliação como aditivo antimicrobiano em Polímeros de Isolado Proteico de Soro de Leite

Déborah Braga Resende; Lucas Baldo Luvizaro; Marali Vilela Dias; Diogo Teixeira Carvalho; Roberta Hilsdorf Piccoli; Rosane Freitas Schwan; Disney Ribeiro Dias.

Resumo: O aumento da vida útil dos alimentos permitiu uma maior disponibilidade destes aos consumidores e isso foi possível devido ao uso de embalagens. Diante de uma sociedade que busca cada vez mais o consumo de produtos saudáveis, seguros e pouco danosos ao ambiente, as embalagens vêm sofrendo modificações e com isso surgiu o que chamamos de embalagens ativas. As embalagens ativas são aquelas que interagem com o alimento de forma a proporcionar alguma propriedade a este, além da função de proteção. Os óleos essenciais são substâncias naturais que atualmente ganham destaque como agentes antimicrobianos associados às embalagens para alimentos. Diante disso, torna-se interessante a otimização do efeito destes compostos e avaliação de sua aplicabilidade como aditivos em alimentos. Para tal, foram sintetizados glicosídeos derivados de eugenol e seus análogos diidroeuugenol e isoeugenol. Dentre os compostos testados frente à patógenos de alimentos, o diidroeuugenol e seu glicosídeo mostraram-se como os mais ativos da série avaliada em estudos preliminares. Com isso, estes dois compostos foram utilizados neste trabalho como aditivos na produção de filmes biodegradáveis que foram avaliados quanto à ação antimicrobiana frente a *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella Enteritidis* através da técnica de difusão em ágar. Foram realizados testes de avaliação das propriedades físicas e óticas dos filmes produzidos. Os resultados mostraram que o filme produzido com a adição do glicosídeo foi significativamente mais eficiente na inibição do crescimento de todas as bactérias avaliadas em relação ao filme produzido com a adição do diidroeuugenol, confirmando a maior atividade do glicosídeo sintetizado. Além disso, não houve comprometimento das propriedades do filme.

1 INTRODUÇÃO

O aumento na preocupação com a sustentabilidade mundial tem favorecido a busca por alternativas de desenvolvimento de embalagens biodegradáveis, a base de biopolímeros de fontes renováveis (RHIM; PARK; HÁ, 2013). Com uma demanda crescente por alimentos em porções individualizadas, o uso de filmes como embalagens tende a crescer (FALGUERA et al., 2011).

As proteínas do soro do leite apresentam uma relevante capacidade de formação de filmes transparentes e flexíveis e, além disso, o soro é um material abundante na indústria de laticínios e que causa problemas quando descartado no ambiente. Tais fatores fazem com que estas proteínas sejam consideradas ecologicamente interessantes para o desenvolvimento de embalagens biosustentáveis (RAMOS et al., 2013).

Os filmes podem apresentar características que de alguma forma beneficie o alimento armazenado. Isso acontece quando há interação entre a embalagem e o alimento e esta apresenta a função de embalagem ativa, como por exemplo, atividade antimicrobiana. Estas embalagens antimicrobianas vêm sendo estudadas com o objetivo de controlar o risco do desenvolvimento de microrganismos patogênicos ou deteriorantes no alimento e também de aumentar a vida de prateleira do mesmo (SUPPAKUL et al., 2003).

Os óleos essenciais são produtos do metabolismo secundário de plantas, que contêm compostos aromáticos voláteis, dentre eles terpenoides, benzenoides, propanoides, os quais são responsáveis pelas diferentes atividades biológicas atribuídas a estes óleos (SOUSA et al., 2008). Estas substâncias têm sido consideradas alternativas seguras e eficazes para o controle microbiano. Sua composição heterogênea faz com que, muitas vezes, um de seus compostos seja ainda mais ativo do que o próprio óleo, como é o caso do eugenol e seu análogo diidroeuugenol.

A glicosilação tem sido amplamente utilizada como um método de modificação estrutural que otimiza as propriedades físico-químicas e biológicas do composto de partida (DO et al., 2002; KUROSU et al., 2002).

O desenvolvimento de uma embalagem biodegradável que conta com a incorporação de um agente antimicrobiano de origem semissintética é extremamente interessante no cenário

atual da indústria de embalagens, que busca aprimorar as embalagens de filme, cada dia mais utilizadas no mercado.

Com base nisso, os compostos diidroeugenol e o glicosídeo do diidroeugenol foram utilizados como aditivos antimicrobianos na produção de filmes de isolado proteico de soro de leite (IPS). Posteriormente, os filmes sintetizados foram avaliados quanto à capacidade de inibição do crescimento dos microrganismos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* Enteritidis e foi avaliada suas propriedades físicas e óticas, com objetivo de verificar se a adição dos compostos interfere nas características do filme.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Estudos preliminares realizados pelos autores e outros colaboradores mostraram o diidroeugenol como composto mais ativo que o eugenol. Foi realizada a glicosilação de ambos e o glicosídeo do diidroeugenol foi considerado o mais ativo da série sintetizada, na avaliação contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* Enteritidis.

2.1 Local do estudo:

A etapa de síntese e caracterização do glicosídeo foi conduzida no LQFar- Laboratório de Pesquisa em Química Farmacêutica da UNIFAL-MG, sendo que o composto fenólico de partida, diidroeugenol, foi fornecido pelo LQFar. A etapa de produção da embalagem foi conduzida no Laboratório de Embalagens da UFLA e a etapa de avaliação da atividade biológica foi conduzida no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da UFLA, ambos no Departamento de Ciência dos Alimentos.

2.2 Glicosilação do fenol:

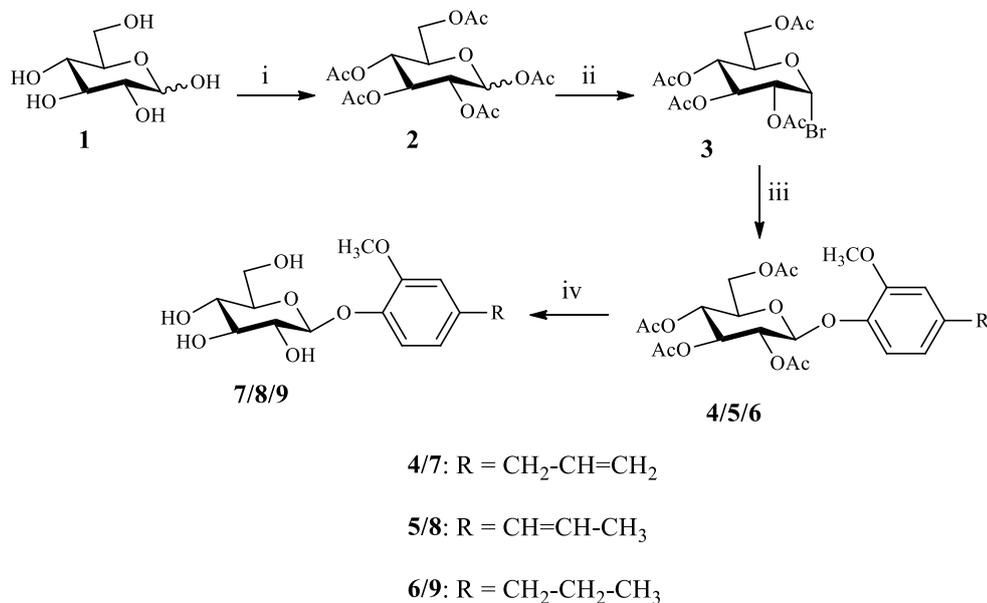
Os reagentes empregados na síntese dos glicosídeos foram comprados da empresa CS Científica e usados sem prévia purificação. O progresso reacional foi monitorado por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) em placas de sílica gel ((Macherey-Nagel, DC-

Fertigfolien Alugram® Xtra Sil G/UV254) utilizando as fases móveis mostradas em cada experimento.

As placas de CCD foram visualizadas sob luz ultravioleta. Para Coluna Cromatográfica (CC), foi empregada coluna preenchida com sílica gel (Sorbiline; 0.040-0.063 mm). Os pontos de fusão (Pf) foram obtidos em equipamento Buchi, modelo 535. As rotações óticas $[\alpha]_D$ foram avaliadas em um polarímetro Perkin Elmer 341, a 20°C.

O espectro no infravermelho foi obtido em espectrofotômetro Thermo Scientific Nicolet Modelo iS50, pela técnica ATR. O espectro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foi obtido em um Bruker Modelo DPX-200 (200 MHz para ^1H e 50 MHz para ^{13}C) ou em um espectrômetro AC-300 (300 MHz para ^1H e 75 MHz para ^{13}C), em CDCl_3 e $\text{DMSO-}d_6$, utilizando TMS como padrão interno. Os deslocamentos químicos foram dados em δ e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz). Os sinais de ressonância no espectro de ^1H RMN são definidos como s = singlete, br s = singlete largo, d = duplete, t = tripeto and m = multipeto. A rota sintética para os produtos glicosilados 4-9 está descrita na Figura 1.

Figura 1 - Rota sintética dos glicosídeos de eugenol, isoeugenol e diidroeugenol.



i) Ac_2O , H_2SO_4 cat., irradiação UV, 25 °C.; ii) HBr , Ac_2O , 0 °C a 25 °C; iii) eugenol (4), isoeugenol (5) ou diidroeugenol (6), $\text{K}_2\text{CO}_{3\text{aq}}$, NBu_4Br , CHCl_3 , 25 °C; iv) KOH , MeOH , 0 °C.

Penta-*O*-acetil-D-glicopiranosose (intermediário **2**) e α -D-tetra-*O*-acetilglucopiranosil brometo (intermediário **3**) foram preparados a partir da D-glicose (composto **1**) de acordo com métodos já bem estabelecidos na literatura (CONCHIE et al., 1957). A síntese do glicosídeo de diidroeugenol foi baseada na metodologia descrita por Lucchese e Marzorati (2000) e De Souza (2014) e foi executada como se segue: uma solução do fenol (1 eq – diidroeugenol) em 50 mL de K₂CO₃ (8 eq) aquoso a 10% foi gradualmente adicionada através de um funil gota a gota a uma solução de **3** (1 eq) e brometo de tetrabutilamônio (0,3 eq) em 50 mL de clorofórmio em balão de fundo redondo de 250 mL. Esta mistura foi deixada sob agitação magnética em temperatura ambiente. Quando terminada a reação, indicada por CCD (hexano/acetate de etila, 7:3, v/v), a mistura reacional foi vertida em gelo triturado e acidificada com HCl 10% até pH 4. A fase orgânica foi lavada com água (5 x 50 mL), seca com sulfato de sódio anidro e o solvente removido em rotaevaporador. O produto puro (GPD) foi obtido por CC (hexano/acetate de etila, 9:1, v/v). Em seguida, o glicosídeo peracetilado foi solubilizado em solução de metóxido de potássio/metanol e deixado em temperatura ambiente por 20 minutos. Após reação completa, indicada por CCD (acetato de etila 100%), a mistura foi neutralizada com resina IRA-120. A resina foi filtrada e lavada com metanol. O filtrado obtido foi concentrado a vácuo e assim obteve-se o glicosídeo desacetilado (GDD), sem necessidade de purificação.

2.1.2. 2-metoxi-4-propilfenil-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-glicopiranosídeo)(**6-GPD**)

Sólido branco; Rendimento: 19 %. Pf: 107-110 °C. [α]_D -35.0 (*c* 0.5 CH₂Cl₂); FT-IV (KBr, cm⁻¹) 3076 (aromático C–H), 2980, 2889 (sp³ C–H), 1754 (C=O), 1602, 1510, 1490 (aromático C=C); ¹H RMN dados (δ , ppm, CDCl₃, 300 MHz): 6.95 (d, 1H, aromático H, $J^3 = 8.2$ Hz), 6.79 (d, 1H, aromático H, $J^4 = 1.9$ Hz), 6.65 (dd, 1H, aromático H, $J^3 = 8.2$ Hz, $J^4 = 1.9$ Hz), 5.2–3.2 (m, 7H, açúcar H), 3.81 (s, 3H, OCH₃), 2.06-2.02 (s, 12H, CH₃), 1.59-1.51 (m, 2H, CH₂CH₂CH₃), 1.28-1.21 (m, 2H, CH₂CH₂CH₃), 0.86 (t, 3H, CH₂CH₂CH₃, $J^3 = 7.2$ Hz); ¹³C RMN (CDCl₃, 75 MHz): 170.4–169.2 (4C, C=O), 149.0 (1C, aromático), 145.0 (1C, aromático), 136.5 (1C, aromático), 120.4 (1C, aromático), 115.5 (1C, aromático), 113.1 (1C, aromático), 100.7 (1C, açúcar), 77.4 (1C, açúcar), 77.2 (1C, açúcar), 73.7 (1C, açúcar), 70.1 (1C, açúcar), 61.1 (1C, açúcar), 56.0 (1C, OCH₃), 37.3 (1C, CH₂CH₂CH₃), 24.7 (1C, CH₂CH₂CH₃), 20.5 (4C, CH₃)14.1 (1C, CH₂CH₂CH₃).

2.1.6 2-metoxi-4-propilfenil- β -D-glicopiranosídeo (**9-GDD**)

Sólido amarelo; Rendimento: 62 %. Pf: 138-140 °C. $[\alpha]_D -12.5$ (c 0.5 MeOH); FT-IV (KBr, cm^{-1}) 3051 (aromático C–H), 2958, 2904 (sp^3 C–H), 1600, 1506, 1476 (aromático C=C); ^1H RMN dados (δ , ppm, CDCl_3 , 300 MHz): 6.96 (d, 1H, aromático H, $J^3 = 8.2$ Hz), 6.78 (d, 1H, aromático H, $J^4 = 1.9$ Hz), 6.65 (dd, 1H, aromático H, $J^3 = 8.2$ Hz, $J^4 = 1.9$ Hz), 4.81 (d, 1H, açúcar H, $J^3 = 7.3$ Hz), 4.40-4.19 (m, 3H, açúcar H), 3.73 (s, 3H, OCH_3), 3.64-3.62 (m, 1H, açúcar H), 3.26-3.16 (m, 1H, açúcar), 3.16 (br s, 1H, açúcar H), 1.59-1.51 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.29-1.22 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 0.87 (t, 3H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$, $J^3 = 7.2$ Hz); ^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz): 149.1 (1C, aromático), 145.0 (1C, aromático), 136.4 (1C, aromático), 120.6 (1C, aromático), 115.7 (1C, aromático), 113.3 (1C, aromático), 100.7 (1C, açúcar), 77.4 (1C, açúcar), 77.2 (1C, açúcar), 73.7 (1C, açúcar), 70.1 (1C, açúcar), 61.1 (1C, açúcar), 56.0 (1C, OCH_3), 37.3 (1C, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 24.7 (1C, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 14.1 (1C, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$).

2.3 Desenvolvimento de polímeros de isolado proteico de soro de leite com adição do diidroeuugenol e seu glicosídeo desacetilado:

Os filmes de Isolado Proteico de Soro de Leite (IPS) foram preparados segundo Zinoviadou et al. (2009) e Azevedo et al. (2015), com adaptações. Dissolveu-se 0,981g (m/v) de IPS em 8,18 mL de água destilada; e 30% de glicerol (em relação ao polímero) com 1% de nanofibra em mais 8,18 mL de água destilada, sendo ambos separadamente submetidos à agitação magnética durante 30 minutos, em temperatura ambiente de 21°C. Após agitação, as soluções foram vertidas uma na outra e manteve-se agitação magnética durante 10 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, o pH foi ajustado para 8 com NaOH 2N e a solução final submetida a homogeneizador ultrassônico (Sonifier Cell Disruptor Branson – Model 450D, Manchester, UK) durante 10 minutos, com potência de 80 W, a 25°C. Posteriormente as soluções foram aquecidas a 90 °C por 30 minutos em banho-maria, para desnaturação das proteínas. Em seguida foram resfriadas a temperatura ambiente e vertidas em placas de plásticos. Para preparo do filme controle, o procedimento foi mesmo, excetuando-se a adição de diidroeuugenol e seu glicosídeo (filme controle: 0% de aditivo antimicrobiano).

Para os tratamentos ativos, o glicosídeo e o diidroeuugenol foram adicionados em concentração final de 6% (v/v) após o banho-maria para preservar os constituintes evitando a

evaporação ou degradação térmica. Em seguida, as soluções foram submetidas ao homogeneizador ultrassônico novamente.

O controle de espessura foi efetuado por volume aplicado no suporte, correspondendo a 16,36 mL em placa com área de 78,53 cm². Os filmes foram secos em temperatura ambiente durante 24 horas garantindo evaporação lenta do solvente e formação do filme.

Os filmes foram avaliados quanto à atividade antioxidante, solubilidade em água e propriedades óticas. Os resultados obtidos para os filmes incorporados com o diidroeugenol e com o glicosídeo de diidroeugenol foram comparados entre si e com o filme controle pelo Teste de Tukey a nível de 5% de significância no programa Sisvar.

2.3.1 Atividade Antioxidante dos filmes ativos:

Foi cortado 0,1 g de amostra em pequenos pedaços e misturados com 2 mL de etanol 80%. A mistura foi vigorosamente agitada em Vortex por 3 minutos e permaneceu em temperatura ambiente por 3 horas. Em seguida, foi agitada novamente. Uma alíquota do extrato foi misturada com 3,9 mL de 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH) 0,1 mM em etanol 80%. A mistura foi vigorosamente agitada em Vortex por 1 minuto e deixada repousar no escuro por 30 minutos.

A absorbância foi medida a 517 nm usando um espectrômetro (SPECTROPHOTOMETER SP 2000UV). O etanol 80% foi utilizado como controle e misturado com DPPH 0,1 mM. A atividade sequestradora de radicais (AA) foi calculada de acordo com a equação (BYUN et al., 2010):

$$(\%)AA = \frac{A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}}}{A_{\text{controle}}} \times 100 \quad \text{Eq. (1)}$$

Em que:

A_{controle} : absorbância do controle

A_{amostra} : absorbância da amostra

2.3.2 Solubilidade em água:

A solubilidade em água dos filmes foi determinada de acordo com o método de Rhim, Lee e Kwak (2005). As amostras (3 x 5 cm) foram pesadas (P1) e colocadas em béqueres

contendo 30 mL de água deionizada. Os béqueres foram cobertos com Parafilm e armazenados a $25,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ por 24 h. Após este período, pedaços dos filmes não dissolvidos foram recuperados usando papel de filtro. O material filtrado foi seco a 105°C por 24 horas e posteriormente pesado (P2). A solubilidade em água foi determinada a partir da matéria seca não dissolvida e calculada pela equação.

$$\text{Solubilidade em água (\%)} = \frac{(P1 - P2) \times 100}{P1} \quad \text{Eq. (2)}$$

2.3.3 Propriedades óticas:

2.3.3.1 Cor

Para determinação da cor dos filmes, foi utilizado colorímetro Color Quest XE, Hunter Lab (Reston, VA, USA) e sistema CIE – Commission Internationale de L'Éclairage (L^* , a^* , b^*) com uma fonte de luz D65, ângulo observador de 10° e modo refletância.

Foram analisados os parâmetros: (L^* , a^* , b^*), ângulo hue (h°) e índice de saturação chroma (C^*). O L^* indica a luminosidade variando de 0 (preto) a 100 (branco); a^* indica a intensidade da cor variando do verde (-) ao vermelho (+); b^* indica a intensidade da cor variando do azul (-) ao amarelo (+).

2.3.3.2 Transparência

Para determinação da transparência dos filmes, foi medida a porcentagem de transmitância (%T) a 600 nm usando um espectrofotômetro GBC UV/VIS 918 (Shimadzu, Tokyo, Japão) conforme método D1746 (ASTM, 2003). A transparência (T600) foi calculada pela equação:

$$T_{600} = \frac{(\text{Log } \%T)}{\delta} \quad \text{Eq. (3)}$$

Onde δ é a espessura do filme (mm).

2.4 Microrganismos, padronização e manutenção do inóculo:

As cepas bacterianas utilizadas foram *Escherichia coli* ATCC 25922; *Listeria monocytogenes* ATCC 19117; *Staphylococcus aureus* ATCC 8702 e *Salmonella* Enteritidis S64.

As culturas estoque foram armazenadas em meio de congelamento (glicerol - 15 mL; peptona bacteriológica - 0,5 g; extrato de levedura - 0,3 g; NaCl - 0,5 g; água destilada 100 mL, pH 7,0). As culturas foram descongeladas à temperatura ambiente e reativadas inoculando-se alíquotas de 100 µL em tubos contendo 10 mL de caldo Brain Heart Infusion (BHI) e incubadas a 37°C/24h. As culturas foram padronizadas em 10⁸ UFC/mL em leitura no espectrofotômetro para execução dos experimentos.

2.5 Determinação da atividade antimicrobiana das embalagens:

A avaliação do potencial antibacteriano foi realizada pelo método de difusão em disco, conforme Bauer et al. (1966), com algumas modificações. Foram utilizadas as bactérias *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* Enteritidis, provenientes do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, da Universidade Federal de Lavras.

Após o crescimento em caldo, alíquotas de 200 µL das culturas foram plaqueadas em superfície de TSA (Tryptic Soy Agar). Sobre o TSA já inoculado, foram dispostos discos de filmes ativos, com diâmetro de 15 mm. Os discos foram previamente submetidos a luz UV durante 30 minutos para cada lado e em seguida aplicados em cada quadrante das placas contendo as respectivas bactérias.

O experimento foi realizado em triplicata para cada cultura bacteriana e em três repetições. As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas em estufa microbiológica. A leitura do tamanho dos halos foi realizada com auxílio de paquímetro. Os resultados foram expressos em milímetros pela média dos valores obtidos nas repetições, sendo estas comparadas pelo Teste de Tukey (p<0,05) no programa Sisvar.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Glicosilação do fenol

A rota sintética empregada na obtenção do glicosídeo proposto envolveu tipos diversos de reações orgânicas como esterificação (etapa de síntese do derivado peracetilado), substituições nucleofílicas em carbono saturado (etapas de bromação e glicosilação, respectivamente) e transesterificação (etapa de desacetilação).

O glicosídeo GPD (Glicosídeo peracetilado de diidroeugenol) foi obtido como sólido amarelo claro, com rendimento líquido de 19%.

Seu espectro de RMN mostrou sinais que confirmaram a obtenção do mesmo, como os sinais no RMN de ^1H no intervalo de δ 7,00-6,25 ppm, relativos aos hidrogênios aromáticos da aglicona, e a δ 4,30-3,71 ppm, condizentes com os hidrogênios da unidade sacarídica. Além disso, destacam-se os sinais a δ 2,05-2,01 ppm, pertencentes às metilas do grupo acetila. No espectro de RMN de ^{13}C , podem ser evidenciados sinais no intervalo de δ 100,70-60,10 ppm atribuídos aos carbonos do anel sacarídico e sinais no intervalo de δ 170,10-169,00 ppm gerados pelos carbonos carbonílicos das acetilas.

O glicosídeo GDD (Glicosídeo desacetilado de diidroeugenol) foi obtido também como sólido amarelado, com rendimento líquido de 62%. Foi possível confirmar o sucesso nessa etapa de desproteção, uma vez que o espectro de RMN de ^1H não apresentou sinais característicos de grupo acetila, assim como foi possível notar que os mesmos estão ausentes no espectro de RMN de ^{13}C .

Todos os glicosídeos foram obtidos com configuração β , que foi confirmado pelo valor da constante de acoplamento do H anomérico com valor médio de 8 Hz.

3.2 Embalagens

3.2.1 Aparência dos filmes

Os filmes elaborados a partir do concentrado proteico de soro de leite apresentaram aspecto flexível, com superfícies lisas e homogêneas.

Figura 2: Filmes de Isolado Proteico de Soro de Leite preparados com a adição de diidroeugenol (à esquerda) e glicosídeo de diidroeugenol (à direita) como agentes Antibacterianos.



Fonte: do autor.

3.2.2 Atividade Antioxidante dos Filmes Ativos de Isolado Proteico de Soro de Leite

A molécula de DPPH é caracterizada por um radical livre estável em virtude da deslocalização do elétron desemparelhado por toda a molécula. Isto confere ao composto uma coloração violeta, caracterizada por uma banda de absorção em etanol em cerca de 520 nm (MOLYNEUX, 2004).

O método utilizado, DPPH, baseia-se na habilidade do radical DPPH ser sequestrado e descolorido na presença de um composto antioxidante, resultando na redução dos valores de absorbância. Neste teste, os compostos antioxidantes reduzem o radical DPPH a um composto amarelado, difenilpicrilhidrazina, ao agirem como doadores de átomos de hidrogênio (ASTM, 2003).

Os resultados obtidos mostraram que não houve diferença estatisticamente relevante na atividade antioxidante dos filmes elaborados com a adição do diidroeugenol para aqueles elaborados com o glicosídeo.

Tabela 1: Atividade Antioxidante (% de sequestro de DPPH) dos Filmes de IPS preparado com adição de diidroeuugenol e glicosídeo de diidroeuugenol

Tratamento	% AA*
Controle	15,10±1,63 ^a
D	39,79±8,05 ^b
G	43,42±6,82 ^b

D = Filme preparado com adição do Diidroeuugenol; G = Filme preparado com adição do glicosídeo; %AA = % de Atividade Antioxidante; *Médias observadas com mesma letra não diferem estatisticamente ($p < 0,05$)

Espécies radicalares atuam como iniciadores na cadeia de oxidação de lipídeos, causando efeitos indesejáveis nos alimentos (LÓPEZ et al., 2012). Com isso, a eliminação destes radicais pelas embalagens que irão acondicionar alimentos, a partir da incorporação com espécies antioxidantes, mostra-se como uma alternativa inovadora e interessante. No entanto, os filmes sintetizados não apresentam característica antioxidante considerável uma vez que a literatura relata filmes com atividade de sequestro de radicais DPPH acima de 50% (SIRIPATRAWAN; HARTE, 2010).

A amostra controle mostrou que a atividade antioxidante do filme preparado a partir de isolado proteico de soro de leite, sem outros aditivos, apresenta um valor de 15,10% ± 1,63. Com base neste resultado percebe-se que os compostos sintetizados aumentaram significativamente a atividade antioxidante, concordando com Moradi et al (2012), uma vez que derivam do eugenol que possui atividade antioxidante já elucidada.

3.2.3 Solubilidade dos Filmes

Filmes biodegradáveis pouco solúveis em água são desejáveis para acondicionamento de alimentos com média/alta umidade pois, se o filme tiver alta solubilidade, este poderá se dissolver rapidamente e perder seu princípio ativo.

Os resultados obtidos mostraram uma baixa solubilidade dos filmes produzidos, com médias de 23% e 24% para o filme com diidroeuugenol e o filme com glicosídeo, respectivamente. A solubilidade do filme produzido nas mesmas condições e pelos mesmos pesquisadores, sem aditivos, apresenta um valor médio de 68%, indicando que os compostos sintetizados adicionados ao filme diminuíram a solubilidade dos filmes, por apresentarem caráter hidrofóbico.

Tabela 2: Solubilidade em água dos filmes de IPS produzidos com adição de diidroeuogenol e glicosídeo de diidroeuogenol

Tratamento	% Solubilidade em água*
Controle	68,40±1,63 ^a
D	23,00±5,00 ^b
G	24,00±10,00 ^b

D = Filme preparado com adição do Diidroeuogenol; G = Filme preparado com adição do glicosídeo; *Médias observadas com mesma letra não diferem estatisticamente ($p < 0,05$)

Ramos et al. (2012) e Fairley et al. (1996) relataram em seus trabalhos a insolubilidade parcial de filmes de IPS e atribuíram esta característica à presença de fortes ligações intermoleculares (ligações dissulfeto) entre as moléculas de proteína no interior da matriz polimérica de filmes de IPS. Apesar do caráter hidrofílico da subunidade glicosídica, o glicosídeo do diidroeuogenol não aumentou a solubilidade do filme pois, além de sua subunidade aglicona ser de caráter hidrofóbico, pode haver a formação de ligações de hidrogênio entre a subunidade glicosídica e a matriz de IPS, impedindo a quebra da estrutura pelas moléculas de água.

3.2.4 Propriedades óticas

3.2.4.1 Cor

Os atributos de cor são importantes pois influenciam a aceitação dos produtos pelo consumidor. Nesse sentido, os parâmetros estão apresentados no Tabela 3.

Tabela 3: Parâmetros de cor dos Filmes de IPS produzidos com adição de diidroeuogenol e glicosídeo de diidroeuogenol

Tratamento	L*	a*	b*	c*	h*
Controle	97,20±0,04 ^a	-0,97±0,02 ^a	9,49±1,69 ^a	9,54±0,31 ^a	99,17±0,27 ^a
D	87,91±0,59 ^b	-1,47±0,04 ^b	28,17±0,98 ^b	28,20±0,97 ^b	92,99±0,14 ^a
G	89,43±1,41 ^b	-2,36±0,24 ^c	24,22±4,90 ^b	24,30±4,96 ^b	95,82±1,88 ^a

D = Filme preparado com adição do Diidroeuogenol; G = Filme preparado com adição do glicosídeo; *Médias observadas com mesma letra na mesma coluna não diferem estatisticamente ($p < 0,05$)

O atributo L^* (luminosidade) não teve variação significativa entre os dois tratamentos avaliados. Este parâmetro reflete quão clara é a amostra, sendo que o filme de IPS sem aditivos apresenta valor em torno de 97. O uso dos aditivos diidroeugenol e glicosídeo do diidroeugenol diminuiu o valor de L^* com relação a filmes de IPS sem aditivos mas, visualmente, são suficientemente claros para acondicionamento de alimentos.

Valores de a^* , que podem variar de -90 a 70, foram significativamente mais altos para o filme contendo glicosídeo, mostrando sua melhor habilidade em colorir com relação ao Diidroeugenol. Já os valores de b^* , que variam de -80 a 100, não variaram significativamente, mas mostraram uma tendência ao amarelo. A presença de gorduras e fosfolipídeos é responsável pela tendência destes filmes a cor amarelada (LORENZEN; SCHRADER, 2006, RAMOS et al., 2013).

O índice de saturação, chroma (C^*), define a intensidade de cor, sendo que valores próximos a zero são indicativos de cores neutras (cinza) e valores ao redor de 60 indicam cores vívidas e intensas (MINOLTA, 1994). As amostras apresentaram valores intermediários a este intervalo, caracterizando uma intensidade mediana nas cores.

O ângulo Hue (h°), representa a tonalidade de cor e através dele pode-se estimar a posição da amostra no sólido de cor. Valores próximos a 0° representam o vermelho (valores positivos de a^*), a 90° representam o amarelo (valores positivos de b^*), a 180° representam o verde (valores negativos de a^*) e a 270° representam o azul (valores negativos de b^*) (MINOLTA, 1994). Os tratamentos analisados apresentaram valores próximos de 90° , sendo este valor apresentado, situado em uma tonalidade de cor amarela.

3.2.4.2 Transparência

A transparência de um filme é importante para que permita ao consumidor visualizar o produto ali armazenado. Dessa forma, torna-se um atributo que influencia na compra do produto e, por isso, um filme deve ter uma transparência que não comprometa o objetivo da embalagem.

Tabela 4: Avaliação da Transparência dos Filmes de IPS produzidos com adição de diidroeuogenol e glicosídeo de diidroeuogenol

Tratamento	Transparência*
Controle	11,63±0,35 ^a
D	9,95±0,96 ^b
G	8,92±0,54 ^b

D = Filme preparado com adição do Diidroeuogenol; G = Filme preparado com adição do glicosídeo;
*Médias observadas com mesma letra na mesma coluna não diferem estatisticamente ($p < 0,05$)

Sothornvit et al. (2010) encontraram uma transparência de 14,38 em filmes de IPS, sendo que a adição de outros compostos foi capaz de reduzir significativamente essa transparência. O filme de IPS produzido sem a adição de compostos modificadores apresentou transparência média de 11,63. Observa-se que não houve diferença na transparência para os tratamentos realizados, sendo que, em comparação com filmes de IPS sem aditivos, a transparência foi reduzida.

Em um trabalho de Corrêa e Filho (2009), foi feita a determinação da transparência de filme comercial de polietileno, a 600nm. O valor de absorbância obtido foi de 2,657, mostrando uma menor transparência em relação aos filmes sintetizados no presente trabalho.

3.3 Avaliação da Atividade Antimicrobiana de Filmes Ativos

A tabela 5 apresenta os valores das médias das medidas dos halos nas triplicatas após três repetições do experimento. Pode-se verificar que não houve inibição do crescimento bacteriano quando utilizado o filme controle, ou seja, aquele sem a adição dos compostos sintetizados. Houve diferença significativa entre os tratamentos para todos os microrganismos avaliados, sendo que o filme de IPS adicionado de glicosídeo de diidroeuogenol foi capaz de formar halos de inibição maiores do que o filme de IPS adicionado do diidroeuogenol, comprovando a eficácia do glicosídeo na atividade contra as bactérias testadas.

Tabela 5: Halos de Inibição (mm) formados pela Atividade Antibacteriana de Filmes de IPS produzidos com adição de diidroeuogenol e glicosídeo de diidroeuogenol como agentes antimicrobianos

Tratamento	<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>	<i>L.monocytogenes</i>	<i>S.Enteritidis</i>
Controle	00,00±0,00 ^a	00,00±0,00 ^a	00,00±0,00 ^a	00,00±0,00 ^a
D	22,50±2,00 ^b	30,00±1,00 ^b	24,00±1,50 ^b	22,50±1,00 ^b
G	30,00±1,00 ^c	37,00±2,00 ^c	38,00±1,00 ^c	33,00±2,50 ^c

D = Filme preparado com adição do diidroeuogenol; G = Filme preparado com adição do glicosídeo; *Está incluso o diâmetro de 15 mm dos discos. Médias observadas com letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($p>0,05$)

Muitos trabalhos já foram publicados relatando a eficácia de óleos essenciais como agentes antimicrobianos quando adicionados aos filmes (CAMPOS et al., 2011). Visto que o eugenol é um componente do óleo de *Eugenia caryophyllata* considerado mais ativo que o próprio óleo (RAUT; KARUPPAYIL, 2014) e que, nos estudos preliminares realizados por este grupo de estudo, o diidroeuogenol mostrou-se mais ativo que o eugenol para as bactérias testadas, bem como o seu glicosídeo sintetizado, verifica-se a relevância destes resultados obtidos.

Não foram encontrados na literatura trabalhos utilizando filmes de IPS incorporados com eugenol ou diidroeuogenol para fins comparativos. Entretanto, em trabalho de Narayanan et al. (2013) foi avaliada a atividade antimicrobiana de filmes de polihidroxibutirato incorporados com eugenol. Frente à *S. aureus* a zona de inibição formada foi de 14±1 mm e frente à *Escherichia coli* este valor foi de 19±1 mm sendo o diâmetro dos discos de filmes igual a 6 mm. Verifica-se que, nos filmes de IPS incorporados com Diidroeuogenol o efeito sobre *E. coli* foi menor do que no trabalho citado e contra *S. aureus* foi maior do que no trabalho citado. Já nos filmes de IPS incorporados com o glicosídeo, a atividade foi maior contra as duas bactérias em relação ao filme incorporado com eugenol.

Já Sanla-Ead et al. (2012) desenvolveram filmes de celulose e utilizaram como aditivos o eugenol e também o cinamaldeído, ambos em concentração de 1% v/v. Dentre outros testes, os pesquisadores avaliaram a atividade antibacteriana dos filmes, pelo mesmo método utilizado no presente trabalho, exceto pelo diâmetro dos discos, de 5 mm. Os resultados obtidos pelos pesquisadores mostraram nenhuma atividade sobre os microrganismos testados, dentre eles *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*,

Escherichia coli e *Salmonella* Enteritidis. Os autores atribuíram o resultado à baixa solubilidade dos compostos nos filmes e também à baixa concentração dos mesmos.

Dessa forma, pode-se verificar que, com base nos poucos trabalhos disponíveis na literatura, é possível ser feita uma breve comparação destes resultados com o análogo eugenol incorporado a outros tipos de filmes. Nos casos avaliados, o filme de IPS incorporado com glicosídeo de diidroeugenol mostrou-se como mais eficiente frente às bactérias testadas. Com isso, os filmes produzidos podem ser avaliados para aplicação em alimentos, aumentando sua vida útil e beneficiando os consumidores na busca por conservantes naturais e embalagens sustentáveis.

Com base nos resultados de atividade antimicrobiana do filme ativo produzido com o glicosídeo, foi realizada a comparação entre a atividade perante os diferentes microrganismos avaliados.

Tabela 6: Halos de Inibição (mm) formados pela Atividade Antibacteriana de Filmes de IPS produzidos com adição de glicosídeo de diidroeugenol como agentes antimicrobianos

Tratamento	<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>	<i>L.monocytogenes</i>	<i>S.Enteritidis</i>
G	30,00±1,00 ^a	37,00±2,00 ^{b,c}	38,00±1,00 ^c	33,00±2,50 ^{a,b}

G = Filme preparado com adição do glicosídeo; *Está incluso o diâmetro de 15 mm dos discos. Médias observadas com letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente (p>0,05)

É possível verificar que as médias dos halos de inibição frente às bactérias Gram negativas, *E. coli* e *S. Enteritidis*, foram significativamente semelhantes. Da mesma forma ocorreu para as médias frente às Gram positivas, *S. aureus* e *L. monocytogenes*. No entanto, as médias dos halos de *S. aureus* e *S. Enteritidis* não diferem estatisticamente.

De forma geral, é possível perceber uma atividade significativamente superior frente às bactérias Gram positivas, sugerindo uma melhor permeabilidade na membrana destas células.

4 CONCLUSÕES

Os resultados mostraram que as propriedades físicas e óticas dos filmes não apresentaram mudanças em relação ao filme sem aditivo que comprometessem a qualidade dos mesmos bem como sua aplicabilidade no mercado.

Quanto à avaliação antimicrobiana dos filmes, foi verificado que o filme desenvolvido com o glicosídeo apresentou melhor atividade em comparação ao diidroeu genol.

REFERÊNCIAS

ASTM. E398-03: Standard test method for water vapor transmission rate of sheet materials using dynamic relative humidity measurement. Philadelphia, 2003.

AZEVEDO, V.M. et al. Development of whey protein isolate bio-nanocomposites: Effect of montmorillonite and citric acid on structural, thermal, morphological and mechanical properties. **Food Hydrocolloids**, v. 48, p. 179-188, 2015.

BAUER, A.W. et al. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, n. 4, p. 493-496, 1966.

BYUN, Y.; KIM, Y.T.; WHITESIDE, S. Characterization of an antioxidant polylactic acid (PLA) film prepared with α -tocopherol, BHT and polyethylene glycol using film cast extruder. **Journal of Food Engineering**, v. 100, p. 239–244, 2010.

CAMPOS, C. A.; GERSCHENSON, L. N.; FLORES, S. K. Development of Edible Films and Coatings with Antimicrobial Activity. **Food Bioprocess Technology**, v.4, p. 849–875, 2011.

CORRÊA, B.M.; FILHO, J.F.L. Elaboração e Caracterização de Biofilmes à base de Zeína. VIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química. Anais do Congresso Brasileiro de Engenharia Química. Uberlândia. 2009.

DO, H. et al. Enzymatic synthesis of l-menthyl α -maltoside and l-menthyl α -maltotrioses from l-menthyl α -glucoside by cyclodextrin glucanotransferase. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 94, p. 119–123, 2002.

FAIRLEY, P. et al. Mechanical properties and water vapor permeability of edible films from whey protein isolate and sodium dodecyl sulfate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.44, p. 438-443, 1996.

FALGUERA, V. et al. Edible films and coatings: structure, active functions and trends in their use. **Trends in Food Science & Technology**, v. 22, p. 292-303, 2011.

KUROSU, J. et al. Enzymatic synthesis of alpha-arbutin by alpha-anomer-selective glucosylation of hydroquinone using lyophilized cells of *Xanthomonas campestris* WU-9701. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 93, p. 328–330, 2002.

LÓPEZ-DE-DICASTILLO, C. et al. Active antioxidant packaging films: Development and effect on lipid stability of brined sardines. **Food Chemistry**, v. 131, p. 1376–1384, 2012.

LORENZEN, P. C.; SCHRADER, K. A comparative study of the gelation properties of whey protein concentrate and whey protein isolate. **Le Lait**, v. 86, n. 4, p. 259-271, 2006.

MINOLTA. Precise Color Communication: Color Control from Feeling to Instrumentation. Osaka: MINOLTA Co. Ltda., 1994. 49 p.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin Journal Science Technology**, v. 26, n. 2, p. 211-219, 2004.

MORADI, M. et al. Characterization of antioxidant chitosan film incorporated with *Zataria multiflora* Boiss essential oil and grape seed extract. **Food Science Technology**, v. 46, n. 2, p. 477-484, 2012.

NARAYANAN, A. et al. Synergized Antimicrobial Activity of Eugenol Incorporated Polyhydroxybutyrate Films Against Food Spoilage Microorganisms in Conjunction with Pediocin. **Applied Biochemical Biotechnology**, v. 170, p. 1379-1388, 2013.

OSTROSKY, E.A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008 .

RAMOS, O.L. et al. Features and performance of edible films, obtained from whey protein isolate formulated with antimicrobial compounds. **Food Research International**, Barking, v.45, p.351-361, 2012.

RAMOS, O. L. et al. Effect of whey protein purity and glycerol content upon physical properties of edible films manufactured therefrom. **Food Hydrocolloids**, v. 30, n. 1, p. 110-122, 2013.

RAUT, J.S.; KARUPPAYIL, S.M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 250-264, 2014.

RHIM, J.W.; LEE, J.H.; KWAK, H.S. Mechanical and water barriers properties of soy protein and clay mineral composite films. **Food Science Biotechnology**, v. 14, p. 112-116, 2005.

- RHIM, J.W.; PARK, H.M.; HA, C.S. Bio-nanocomposites for food packaging applications. **Progress in Polymer Science**, v. 38, n. 10-11, p. 1629–1652, 2013.
- ROY, R.; KIM, J.M. Cu(II)-self-assembling bipyridyl-glycoclusters and dendrimers bearing the Tn-antigen cancer marker: synthesis and lectin binding properties. **Tetrahedron**, v. 59, p. 3881-3893, 2003.
- SANLA-EAD, N. et al. Antimicrobial activity of cinnamaldehyde and eugenol and their activity after incorporation into cellulose-based packaging film. **Packaging Technology and Science**, v. 25, n. 1, p. 7-17, 2012.
- SIRIPATRAWAN, U.; HARTE, B. Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. **Food Hydrocolloids**, v. 24, p. 770-775, 2010.
- SOTHORNVIT, R. et al. Effect of clay content on the physical and antimicrobial properties of whey protein isolate/organo-clay composite films. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, n. 2, p. 279–284, 2010.
- SOUSA, O.V. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of the essential oil from *Eremanthus erythropappus* leaves. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 60, p. 771-777, 2008.
- SUPPAKUL, P. et al. Active packaging Technologies with emphasis on antimicrobial packaging and its applications. **Journal of Food Science**, v. 68, p. 408-420, 2003.
- ZINOVIADOU, K. G., KOUTSOUMANIS, K. P., BILIADERIS, C. G. Physico-chemical properties of whey protein isolate films containing oregano oil and their antimicrobial action against spoilage flora of fresh beef. **Meat Science**, v. 82, p. 338–345, 2009.