



Isolamento e atividade antimicrobiana do composto espatulenol da espécie *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae)

Isolation and antimicrobial activity of the compound spathulenol from the species *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae)

Christiano Cattani Belini¹, Jociani Ascari², Erika Izumi³,

RESUMO

A espécie *Eugenia uniflora* L. pertencente à família Myrtaceae é conhecida popularmente como pitangueira. É uma espécie nativa do Brasil com predominância na América Central e América do Sul, apresenta interessantes atividades biológicas e é popularmente utilizada no tratamento de febre, doenças estomacais, inflamações entre outras. O objetivo deste trabalho foi a obtenção do composto espatulenol presente no óleo essencial das folhas da espécie *E. uniflora* e a avaliação antimicrobiana deste composto frente a espécies patogênicas para seres humanos. O isolamento e purificação foi realizado por técnicas cromatográficas e a identificação da estrutura por Ressonância Magnética Nuclear. A determinação de atividade antimicrobiana do composto espatulenol foi realizada utilizando-se o teste de microdiluição em caldo para determinar concentração inibitória mínima (CIM), concentração bactericida mínima (CBM) e concentração fungicida mínima (CFM). Observou-se que o espatulenol apresentou interessante resultado frente a bactéria gram-positiva *Enterococcus faecium* e para uma levedura *Candida albicans*, ambas as concentrações CIM foram de 0,25 mg/mL. E atividade CIM de 1 mg/mL contra cepas da espécie *Staphylococcus aureus*.

PALAVRAS-CHAVE: Epatulenol; *Eugenia uniflora*; Isolamento.

ABSTRACT

The species *Eugenia uniflora* L., belonging to the *Myrtaceae* family, is popularly known as the Surinam cherry tree. It is a native species of Brazil with a predominant presence in Central and South America. This plant exhibits interesting biological activities and is commonly used in the treatment of fever, stomach-related ailments, inflammations, among others. The objective of this study was to obtain the compound *spathulenol* present in the essential oil of *E. uniflora* leaves and evaluate its antimicrobial activity against pathogenic species for humans. Isolation and purification were carried out using chromatographic techniques, and the structure was identified through Nuclear Magnetic Resonance. The determination of *spathulenol* is antimicrobial activity was conducted using the broth microdilution test to determine the minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC), and minimum fungicidal concentration (MFC). It was observed that *spathulenol* exhibited interesting results against the gram-positive bacterium *Enterococcus faecium* and the yeast *Candida albicans*, with both MIC concentrations being 0.25 mg/mL. Additionally, it showed a MIC activity of 1 mg/mL against strains of *Staphylococcus aureus*.

KEYWORDS: *Eugenia uniflora*; Isolation; Spathulenol.

INTRODUÇÃO

A espécie *Eugenia uniflora* nativa do Brasil conhecida mundialmente pelos seus frutos, os quais, em território brasileiro são popularmente chamados de pitanga, nome de origem indígena Tupi, a palavra carrega em sua etimologia o significado de “fruto

¹ Voluntário. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Santa Helena, Paraná, Brasil. E-mail: cbelini@alunos.utfpr.edu.br. ID Lattes: 3740746126650300.

² Docente no curso de Ciências Biológicas. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Santa Helena, Paraná, Brasil. E-mail: jascari@utfpr.edu.br. ID Lattes: 2679876816448668.

³ Docente no curso de Ciências Biológicas. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Santa Helena, Paraná, Brasil. E-mail: erikaizumi@utfpr.edu.br. ID Lattes: 4256803942936872.



vermelho”. A planta como um todo apresenta interessante atividade biológica sendo utilizada popularmente para o tratamento de febre, doenças estomacais, inflamações e outras condições. (CORADIN *et al.*, 2018).

Os terpenos são moléculas formadas a partir de unidades chamadas isoprenos. Esse tipo de metabólito secundário tem presença ampla e diversa nos organismos presentes na natureza podendo apresentar grande complexidade (SIMÕES *et al.*, 2017).

O espatulenol é um sesquiterpeno com uma função álcool, sendo um dos constituintes majoritários do óleo essencial parte aérea da *E. uniflora*. DZUL-BEH (2019) relata a atividade bacteriológica de concentração inibitória mínima (CIM) 0,0125 mg/ml do espatulenol contra *Mycobacterium tuberculosis*.

A cromatografia é um método de separação de substâncias que ocorre através das interações intermoleculares entre duas fases. A espectrometria de ressonância magnética nuclear é uma técnica de elucidação estrutural molecular utilizando propriedades de interações magnéticas da mecânica quântica dos átomos (COLLINS *et al.*, 2013; GEROTHASNASSIS *et al.*, 2002).

OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é isolar, purificar, identificar a estrutura do espatulenol e avaliar a atividade antimicrobiana do composto.

MATERIAIS E MÉTODOS

A amostra de óleo essencial das folhas da espécie *E. uniflora* foi adquirida em comércio local.

O isolamento e purificação do composto espatulenol do óleo essencial da espécie *E. uniflora* foi realizado através de técnicas cromatográficas. Inicialmente foram realizados ensaios de cromatografia em camada delgada (CCDs) com uso placas de sílica 60 HG/254 (Macherey-Nagel) para identificação da presença do espatulenol na amostra comparanda em comparação com o padrão, assim como, para a determinação da melhor fase móvel para isolar o composto por cromatografia líquida em coluna de vidro (CLV) e também para verificar a pureza do mesmo.

A técnica de CLV foi feita utilizando-se como fase estacionária sílica gel 230 – 400 mesh (Merck) e como a fase móvel éter de petróleo. As frações foram recolhidas em frascos com aproximadamente 5 mL com um fluxo de 5mL/min. Foram coletadas 30 frações sendo reunidas as frações que continham o composto espatulenol, posteriormente o solvente foi evaporado em aparelho de evaporação rotativa sob baixa pressão e temperatura controlada.

A elucidação estrutural do composto purificado foi feita utilizando-se a técnica espectroscópica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C . A amostra foi enviada para o Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá, utilizando-se espectrômetro da Bruker DRX-400, linha AVANCE. O tetrametilsilano, (TMS), foi utilizado com padrão de referência interno. Como solvente, empregou clorofórmio deuterado.

Para determinação de atividade antimicrobiana do espatulenol foi utilizado o teste de microdiluição em caldo adaptado, utilizando-se 7 espécies patogênicas para seres humanos sendo eles as bactérias gram-positivas *Staphylococcus aureus* (cepas N315 e

BEC9393), *Streptococcus mutans* e *Enterococcus faecium*, bactérias gram-negativas *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*, e o fungo *Candida albicans*.

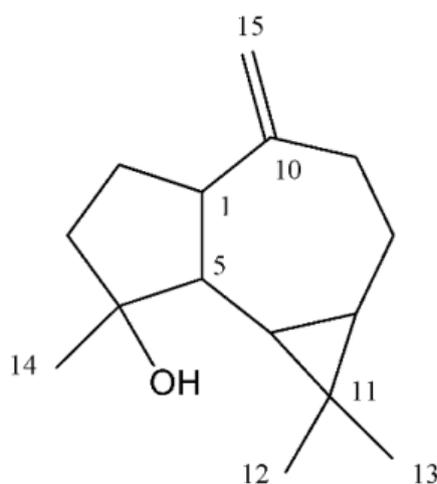
A determinação da concentração inibitória mínima foi realizada em duplicata através do ensaio de microdiluição em caldo, seguindo as recomendações do NCCLS. O espatulenol diluído em solução contendo menos de 1% de DMSO e testado nas concentrações de 1 mg/mL até 0,015 mg/mL. Poços controle foram utilizados, com e sem os microrganismos, para verificação de crescimento microbiano e ausência de contaminação. As microplacas foram incubadas a 35 C° por 24h para bactérias e 48h para leveduras. Após a incubação, alíquotas foram coletadas dos poços onde não houve crescimento microbiano e semeadas em meio sólido, para confirmação de atividade inibitória microbicida ou microbiostática (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018; Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008).

Os experimentos de isolamento e purificação e a avaliação da atividade biológica foram realizados nos laboratórios da Universidade Tecnológica Federal do Paraná no Campus Santa Helena.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O espatulenol (figura 1) foi isolado e purificado do óleo essencial extraído das folhas da espécie *E. uniflora*. A partir de aproximadamente 3,7 mL do óleo essencial bruto foi possível purificar 53,6 mg de espatulenol puro. A identificação do espatulenol foi realizada com base na análise dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C , e por comparação com dados obtidos na literatura (MOREIRA *et al.*, 2017).

Figura 1: Estrutura do espatulenol.



Fonte: Autoria própria, 2023.

O espectro de RMN de ^1H apresentou três simpletos em δH 1,05, δH 1,06 e δH 01,28, atribuídos a hidrogênios de grupos metila de H-12, H-13 e H-14. Observou-se dois singletos em δH 4,69 e δH 4,66, característicos de hidrogênio de dupla exocíclica

referentes aos hidrogênios H-15a e H-15b, respectivamente. Os sinais em δH 0,46 e δH 0,72 foram atribuídos aos hidrogênios metínicos H-6 e H-7, respectivamente.

O espectro de RMN de ^{13}C apresentou sinal característico de carbono olefínico metilênico em δC 106,2 (C-15) e de carbono quaternário sp² em δC 153,4 (C10). Observou-se a presença de quatro sinais de carbonos metínicos em δC 54,3 (C-1), δC 53,4 (C-5), δC 29,9 (C-6) and δC 27,4 (C-7) e quatro metilênicos em δC 26,7 (C-2), δC 41,7 (C-3), δC 24,7 (C-8) and δC 38,8 (C-9), três carbonos metílicos em δC 28,6 (C12), δC 16,3 (C-13) e δC 26,0 (C-14) e dois quaternários em δC 80,9 (C-4) e δC 20,2 (C11).

Tabela 1: Valores de CIM e CBM/CFM do espatulenol contra os microrganismos testados

| Microrganismos | CIM mg/mL | CBM/CFM mg/mL |
|---------------------------------|-----------|---------------|
| Bactérias Gram positivas | | |
| <i>S. aureus</i> ATCC 25923 | 1,00 | >1,00 |
| <i>S. aureus</i> N315 (MRSA) | 1,00 | >1,00 |
| <i>S. aureus</i> BEC9393 (MRSA) | 1,00 | 1,00 |
| <i>S. mutans</i> ATCC 25175 | >1,00 | >1,00 |
| <i>E. faecium</i> ATCC 6569 | 0,25 | ND |
| Bactérias Gram negativas | | |
| <i>E. coli</i> ATCC 25922 | >1,00 | >1,00 |
| <i>K. pneumoniae</i> ATCC 10031 | >1,00 | >1,00 |
| <i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442 | >1,00 | >1,00 |
| Levedura | | |
| <i>C. albicans</i> ATCC 26790 | 0,25 | ND |

Fonte: Autoria própria, 2023.

A avaliação da atividade antimicrobiana do espatulenol (tabela 1) apresentou resultados CIM de 0,25 mg/mL contra a bactéria gram-positiva *E. faecium* e contra a levedura *C. albicans*. As bactérias gram-positivas *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* N315 (MRSA) e *S. aureus* BEC9393 (MRSA) obtiveram resultado CIM de 1 mg/mL. Não foi possível verificar o CIM dos demais microrganismos nas concentrações testadas. O espatulenol apresentou valor de mortalidade microbiana apenas para a bactéria *S. aureus* BEC9393 (MRSA) sendo um CBM de 1 mg/mL.

A diferença de composição, tamanho e quantidades de camadas da parede celular entre os grupos de bactérias gram-positivas e gram-negativas pode ser o motivo da diferença quando comparados os resultados obtidos entre os dois grupos.

A literatura ao avaliar o CIM do espatulenol em cepas de *E. faecium* obteve como resultado 0,2 mg/mL, valor similar ao resultado de 0,25 mg/mL encontrado no presente trabalho (FERNANDES *et al.*, 2015).

O óleo essencial de *Thecocarpus meifolios* Boiss apresentando o espatulenol como um de seus constituintes majoritários (20,51%) e obteve um resultado CIM para a cepa *S. aureus* ATCC 25923 de 2,5 mg/mL e um resultado de concentração mínima bactericida de 5 mg/mL. O mesmo óleo essencial de *T. meifolios* foi testado contra *C.*

albicans apresentando um resultado CIM de 0,5 mg/mL enquanto o presente estudo apresentou um CIM de 0,25 mg/mL utilizando o espatulenol puro. O resultado obtido para a cepa de *C. albicans* pode estar relacionado à estrutura da membrana celular dos fungos que apresentam uma composição diferente da membrana bacteriana (TAHERKHANI *et al.*, 2013).

Resistência bacteriana pode ser definida como a capacidade de uma bactéria resistir à concentração inibitória mínima que um fármaco pode chegar no sangue humano. As cepas de *S. aureus* BEC9393 (MRSA) e *S. aureus* N315 (MRSA) apresentam resistência ao antibiótico betalactâmico metilicina. O resultado CIM do espatulenol de 1 mg/mL similar entre as três cepas, como pode ser visto na tabela 1, muito provavelmente está relacionado a uma interação entre o patógeno e espatulenol diferente da interação do patógeno com o antibiótico metilicina (COURA *et al.*, 2015).

CONCLUSÕES

Foram isolados e purificados aproximadamente 53,6 mg de espatulenol do óleo essencial de *E. uniflora* através de técnicas cromatográficas. Após purificação do material o espatulenol teve sua estrutura elucidada e confirmada pela técnica de RMN. A molécula já isolada e purificada foi avaliada quanto a atividade antimicrobiana pela técnica de microdiluição contra patógenos humanos, onde mostrou resultados de interesse farmacológico para uma bactéria gram-positiva *E. faecium* e para uma levedura *C. albicans*, ambas as concentrações CIM foram de 0,25 mg/mL. Além disso, também obtivemos atividade CIM de 1 mg/mL na espécie *S. aureus*, incluindo duas cepas do patógeno resistentes ao medicamento metilicina indicando que o espatulenol apresenta um alvo diferente no microrganismo.

Agradecimentos

Agradeço a UTFPR pela disponibilidade do espaço dos laboratórios, assim como pelos materiais utilizados. Também agradeço pela orientação da professora Jociani Ascari, assim como pela orientação da professora Erika Izumi quanto aos ensaios biológicos.

Conflito de interesse

Não há conflito de interesse.

REFERÊNCIAS

Clinical and Laboratory Standards Institute. **Method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts**: approved standard-third edition M27-A3. CLSI, Wayne, PA, USA, 2008.

Clinical and Laboratory Standards Institute. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**. 11 th ed. CLSI standard M07. CLSI, Wayne, PA, USA, 2018.



COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. São Carlos: Pedro & João Editores, 2013.

CORADIN, L; CAMILO, J; PAREYN, F. G. C. **Espécies Nativas da Flora Brasileira de Valor Econômico Atual ou Potencial Plantas para o Futuro: Região Nordeste**. Brasília, DF: MMA, 2018.

COURA, J. R. **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015. 1173 p.

DOS SANTOS, J. F. S. *et al.* Chemical composition, antifungal activity and potential anti-virulence evaluation of the *Eugenia uniflora* essential oil against *Candida* spp. **Food Chemistry**, v. 261, p. 233–239, 30 set. 2018.

DZUL-BEH, A. J. *et al.* In vitro growth inhibition and bactericidal activity of spathulenol against drug-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Local, v. 29, n. 6, p. 798-800, nov.-dec. 2019.

FERNANDES, F. H. *et al.* Evaluation of mutagenic and antimicrobial properties of brown propolis essential oil from the Brazilian Cerrado biome. **Toxicology Reports**. Brasil, v. 2, p. 1482-1488, nov. 2015.

GEROTHANASSIS, I. P. *et al.* NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE (RMN) SPECTROSCOPY: BASIC PRINCIPLES AND PHENOMENA, AND THEIR APPLICATIONS TO CHEMISTRY, BIOLOGY AND MEDICINE. **CHEMISTRY EDUCATION: RESEARCH AND PRATICE IN EUROPA**, Grécia, v.3, n. 2, p. 229-252, maio. 2002.

MOREIRA, I. C. *et al.* Sesquiterpenos e Hidrocarbonetos dos frutos de *Xylopia emarginata* (Annonacia). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. São Paulo, v. 17, n.1, p. 55-58, jan. 2007.

SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: do Produto Natural ao Medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2017. 502 p.

TAHERKHANI, M.; RUSTAIYAN A. Chemical Constituents, Antimicrobial Activity, Antioxidant and Total Phenolic Content Within the leaves of *Thecocarpos meifoliosus* Boiss. Umbelliferae Herbs Growing Wild in Iran. **Asian Journal of Chemistry**. Irã, v. 25, n. 13, p. 7173-7176, jun. 2013.