

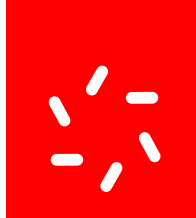


Universidade do Minho
Escola de Ciências

Diana Margarida Correia Pereira

Conservantes alimentares baseados
em compostos bioativos

Diana Margarida Correia Pereira **Conservantes alimentares baseados em compostos bioativos**



Universidade do Minho
Escola de Ciências

Diana Margarida Correia Pereira

Conservantes alimentares baseados em compostos bioativos

Dissertação de Mestrado
Mestrado em Bioquímica Aplicada

Trabalho efetuado sob a orientação da
Dra. Maria Sameiro Torres Gonçalves
e do
Dr. David Alexandre Micael Pereira

DIREITOS DE AUTOR E CONDIÇÕES DE UTILIZAÇÃO DO TRABALHO POR TERCEIROS

Este é um trabalho académico que pode ser utilizado por terceiros desde que respeitadas as regras e boas práticas internacionalmente aceites, no que concerne aos direitos de autor e direitos conexos.

Assim, o presente trabalho pode ser utilizado nos termos previstos na licença abaixo indicada.

Caso o utilizador necessite de permissão para poder fazer um uso do trabalho em condições não previstas no licenciamento indicado, deverá contactar o autor, através do RepositóriUM da Universidade do Minho.

Licença concedida aos utilizadores deste trabalho



Atribuição-NãoComercial-SemDerivações

CC BY-NC-ND

Agradecimentos

Desejo exprimir o meu obrigado a todos os que, de alguma forma, permitiram que este barco chegasse a bom porto.

Em especial, aos meus orientadores, à Professora Doutora Sameiro Gonçalves, da Universidade do Minho, minha orientadora, o meu obrigado por desde o primeiro momento ter acreditado em mim e nas minhas capacidades. Agradeço todo o carinho e o acompanhamento manifestados durante todo o trabalho, e a preocupação durante todo o percurso.

Ao Professor Doutor David Pereira, da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, meu coorientador, o meu obrigado por me ter deixado fazer parte do seu grupo de trabalho, e desde o primeiro segundo, me ter feito sentir acolhida no mesmo. Agradeço o trato simples, que sempre usou durante as nossas reuniões de trabalho, e ainda, a preocupação e nunca ter permitido o desalento, quando as coisas não correram como esperado.

Aos meus amigos e colegas do *BioTarget Research Group*, agradeço todas as dicas e ajuda prestadas durante todo o trabalho laboratorial.

À Cristina e ao Dr. Rui, funcionários do Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, o meu maior agradecimento por estarem sempre dispostos a indicar-me onde estaria o material, e, ainda, obrigada pelas palavras amigas.

Não poderia deixar de agradecer à Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) pelo financiamento fornecido no âmbito do Projeto PTDC/ASP-AGR/30154/2017, o meu muito obrigada.

Um agradecimento especial à minha avó Júlia e ao meu Pai, que sempre estiveram presentes durante toda a caminhada e nunca permitiram que eu desistisse.

À minha Mãe, que decerto que teria ficado feliz por este momento.

E à minha irmã Rita e à minha afilhada Mafalda, a luz da minha vida, que permitiram que eu nunca baixasse os braços, e por sempre me impulsionarem a dar o meu melhor.

À minha família pela compreensão e paciência durante todo este tempo.

Por fim, a todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização desta dissertação, o meu sincero agradecimento.

DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE

Declaro ter atuado com integridade na elaboração do presente trabalho académico e confirmo que não recorri à prática de plágio nem a qualquer forma de utilização indevida ou falsificação de informações ou resultados em nenhuma das etapas conducente à sua elaboração.

Mais declaro que conheço e que respeitei o Código de Conduta Ética da Universidade do Minho.

Conservantes alimentares baseados em compostos bioativos

Resumo

Nos últimos anos, a investigação ao nível dos produtos naturais registou um crescimento exponencial. A indústria alimentar tem acompanhado os avanços registados, com o propósito de utilizar produtos naturais no revestimento dos alimentos, nas embalagens e constituição nutricional, assim como na incorporação direta com funções tecnológicas, como conservantes alimentares. Estes compostos têm vindo a aumentar a vida útil dos produtos alimentícios devido à sua capacidade antimicrobiana e à sua atividade na inibição da tirosinase, sendo já utilizado na cosmética e na odontologia.

Um destes compostos é o eugenol, um fenilpropanóide que tem sido muito estudado quanto à capacidade para inibir o crescimento de diversos microrganismos, como bactérias, fungos, patogéneos orais e alimentares, entre outros. Os diversos estudos que têm sido reportados demonstraram que o eugenol, composto bioativo extraído de diversas plantas, como o cravinho-da-índia, tem um importante potencial inibitório no crescimento microbiano e ainda um relevante potencial antioxidante. Atendendo aos aspetos referidos, o eugenol, seus derivados *O*-alquilados, oxiranos e β -amino álcoois e um análogo, assim como um derivado *O*-alquilado do carvacrol, anteriormente obtidos por síntese química, foram usados neste trabalho. Os estudos de atividade biológica efetuados com os vinte compostos incluíram a atividade antimicrobiana, contra a *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*. Dezoito dos compostos foram também avaliados relativamente à atividade inibitória da tirosinase, de modo a verificar-se o potencial destes na diminuição do escurecimento enzimático dos alimentos.

Os resultados obtidos mostraram que alguns dos compostos estudados são promissores como potenciais conservantes alimentares aumentando a vida útil dos alimentos, devido às suas atividades inibitórias do crescimento microbiano, bem como à capacidade de inibição da atividade da tirosinase.

Palavras-Chave: Atividade antimicrobiana; composto bioativo; conservante alimentar; escurecimento enzimático; eugenol; óleos essenciais; tirosinase.

Food preservatives based on bioactive compounds

Abstract

In last years, research into natural products has grown exponentially. The food industry has followed the advances made, with the purpose of using natural products in food coating, packaging, and nutritional constitution, as well as in the direct incorporation with technological functions, such as food preservatives. These compounds have been increasing the shelf life of food products due to their antimicrobial capacity and their activity in inhibiting tyrosinase.

One of these compounds is eugenol, a phenylpropanoid that has been widely studied as to the ability to inhibit the growth of various microorganisms, such as bacteria, fungi, oral and food pathogens, among others. The several studies that have been reported have shown that eugenol, a bioactive compound extracted from several plants, such as clove, has an important inhibitory potential in microbial growth, and a relevant antioxidant potential, being already used in cosmetics and dentistry.

In view of the afore mentioned aspects, eugenol, its *O*-alkylated derivatives, oxiranes and β -amino alcohols and an analogue, as well as an *O*-alkylated derivative of carvacrol, previously obtained by chemical synthesis, were used in this work. Biological activity studies performed with the twenty compounds included antimicrobial activity against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. Eighteen of the compounds were also evaluated for tyrosinase inhibitory activity, to verify their potential in decreasing the enzymatic browning of foods.

The results obtained showed that some of the compounds studied are promising as potential food preservatives, increasing the shelf life of foods, due to their microbial growth inhibitory activities, as well as their capacity to inhibit tyrosinase activity.

Keywords: Antimicrobial activity; bioactive compound; food preservative; enzymatic browning; eugenol; essential oils; tyrosinase.

Índice

Agradecimentos.....	ii
DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE.....	iii
Resumo	iv
Abstract	v
Índice.....	vi
Abreviaturas	viii
Lista de figuras.....	xi
Lista de tabelas	xiii
Lista de esquemas	xiv
Dedicatória.....	xv
Objetivos	xvi
Capítulo 1 – Introdução teórica	17
1.1 Conservantes alimentares	18
1.2 Óleos essenciais e outros compostos bioativos.....	20
1.2.1 Definição de compostos bioativos	20
1.2.2 Classificação química dos produtos naturais	20
1.2.2.1 Compostos fenólicos.....	20
1.2.2.2 Terpenos	22
1.2.3 Extração de óleos essenciais.....	24
1.2.4 Atividade biológica dos componentes dos óleos essenciais	27
1.2.4.1. Atividade antibacteriana	29
1.2.4.2. Atividade antifúngica	31
1.3. Eugenol.....	33
1.3.1. Mecanismo de ação do eugenol	34

1.3.2.	Aplicações do eugenol como conservante alimentar	41
1.4.	Carvacrol	42
1.4.1.	Mecanismo de ação do carvacrol	43
1.5.	Polifenóis oxidases	47
1.5.1.	Tirosinase.....	49
1.5.1.1.	Escurecimento enzimático	50
1.5.1.1.1.	Inibidores da atividade da tirosinase.....	51
Capítulo 2 –	Materiais e Métodos.....	53
2.1.	Reagentes	54
2.2.	Determinação da atividade antimicrobiana.....	54
2.2.1.	Preparação dos microrganismos.....	54
2.2.2.	Preparação dos compostos.....	54
2.2.2.1.	Obtenção dos compostos.....	54
2.2.3.	Determinação da MIC.....	59
2.3.	Avaliação da inibição da atividade da tirosinase	59
2.3.1.	Preparação dos reagentes	59
2.3.2.	Ensaio da atividade inibitória da tirosinase	59
2.4.	Análise estatística.....	60
Capítulo 3 –	Discussão de resultados.....	61
3.1.	Compostos estudados nos ensaios biológicos	62
3.2.	Atividade antimicrobiana.....	64
3.3.	Atividade inibitória da tirosinase.....	67
Capítulo 4 –	Conclusão e perspectivas futuras	70
Capítulo 5 –	Referências bibliográficas.....	74

Abreviaturas

2-HT – 2-Hidroxitirosol

ACN – Acetonitrilo

ATCC – Coleção de culturas americanas (do inglês: *American type culture collection*)

ATP – Adenosina trifosfato

ATPase – Adenosinatrifosfatase

CA – Anidrase carbônica

CAT – Catalase

CFU – Unidade de formação de colônias (do inglês: *Colony-forming unit*)

COX-2 – Cicloxigenase 2

DCM – Diclorometano

DMAPP – Pirofosfato de dimetilalilo

DMBA – 7,12-Dimetilbenzantraceno

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DXP – 1-Desoxixilulose-5-fosfato

HBSS – Solução salina balanceada de Hank (do inglês: *Hank's balanced salt solution*)

IC₅₀ – Concentração inibitória (50%)

IL- β – Interleucina beta

IL-4 – Interleucina 4

IL-5 – Interleucina 5

IL-6 – Interleucina 6

iNOS – Óxido nítrico sintetase induzida (do inglês: *Inducible Nitric Oxide Synthase*)

IPP – Pirofosfato de isopentilo

IZ – Zona inibitória

FPP – Pirofosfato de farnesilo

GGPP – Pirofosfato de geranylgeranilo

GPP – Pirofosfato de geranilo

GPx – Glutathione peroxidase

GSH – Glutathione

GST – Glutathione S-transferase

L-DOPA – Levodopa

LDL – Lipoproteínas de baixa densidade (do inglês: *Low-density lipoproteins*)

LPS – lipossacarídeos

m-CPBA – Ácido *m*-cloroperbenzóico

MAO – Monoamina oxidase

MBC – Concentração mínima bactericida (do inglês: *Minimum bactericidal concentration*)

MIC – Concentração mínima inibitória (do inglês: *Minimum inhibitory concentrations*)

MLC – Concentração mínima letal (do inglês: *Minimum lethal concentration*)

mRNA – RNA mensageiro

NO – Óxido nítrico (do inglês: *Nitric oxide*)

NTM – Micobactérias não tuberculosas (do inglês: *Nontuberculous mycobacteria*)

OEs – Óleos essenciais

PARP – Polimerase poli (ADP-ribose) (do inglês: *Poly (ADP-ribose) polymerase*)

PDB – Base de dados de proteínas (do inglês: *Protein data bank*)

PGs – Prostaglandinas

PMs – Peneiros moleculares

PPAR – Recetores ativados por proliferadores de peroxissoma (do inglês: *Peroxisome proliferator-activated receptor*)

PPOs – Polifenóis oxidases

qRT-PCR – Reação em cadeia de polimerase quantitativo em tempo real (do inglês: *quantitative real time polymerase chain reaction*)

ROS – Radicais livres de oxigénio (do inglês: *Reactive oxygen species*)

SOD – Superóxido dismutase

t.a. – Temperatura ambiente

TBAI – Iodeto de tetrabutílamónio (do inglês: *Tetrabutylammonium iodide*)

TBARs – Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (do inglês: *Thiobarbituric acid reactive substances*)

THC – Tetrahydrocannabinol

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

Lista de figuras

Figura 1-Exemplos de compostos fenólicos: ácido sináptico **I** (ácido fenilpropanóico), esculetina **II** (cumarina), magnoliol **III** (neolenhana), pinosilvina **IV** (estilbeno), mangiferina **V** (xantona), quercetina **VI** (flavonol), fisciona **VII** (antraquinona), xantoxilina **VIII** (benzofenona) e tetrahidrocanabinol (THC) **IX** (canabinóide).

Figura 2-Vias biossintéticas de formação de terpenos. ***IPP** ou **DMAPP**; **IPP**: pirofosfato de isopentilo; **DMAPP**: pirofosfato de dimetilalilo; **GPP**: pirofosfato de geranilo; **FPP**: pirofosfato de farnesilo; **GGPP**: pirofosfato de geranilgeranilo, adaptado de (Felipe & Bicas, 2017).

Figura 3-Exemplos de terpenos: *p*-cimeno **X**, limoneno: isómero R **XI a** e isómero S **XI b**, timol **XII** e carvacrol **XIII**.

Figura 4-Exemplos de fenilpropanóides: assarona **XIV** e eugenol **XV**.

Figura 5-Esquema de destilação a vapor, adaptado de (Masango, 2005).

Figura 6-Estrutura das bactérias Gram-negativas (**A**) e Gram-positivas (**B**).

Figura 7-Estrutura de mecanismos celulares de uma célula bacteriana, adaptado de (Burt, 2004).

Figura 8-Composição celular de um fungo, adaptado de (Chopra, 2010).

Figura 9-Estrutura química do eugenol e sua fonte, o cravinho-da-índia.

Figura 10-Mecanismos da resposta inflamatória, adaptado de (Barboza *et al.*, 2018).

Figura 11-Estrutura química do carvacrol. Fontes do carvacrol: *Origanum vulgare* (orégano) e *Thymus vulgaris* (tomilho).

Figura 12-Propriedades do carvacrol, adaptado de (Alagawany, 2015).

Figura 13-Estrutura da tirosinase obtida através da PDB.

Figura 14-Ligação dos átomos de cobre aos resíduos de histidina.

Figura 15-Estrutura química da L-DOPA.

Figura 16-Adição de Michael.

Figura 17-Estrutura química do ácido kójico.

Figura 18-Atividade da tirosinase referente aos compostos testados. Legenda: **- $p < 0.01$; ***- $p < 0.001$.

Figura 19-Estrutura química do 2-HT.

Lista de tabelas

Tabela 1-Composição química de alguns OEs que exibem propriedades antimicrobianas.

Tabela 2-Ocorrência e % de eugenol em diferentes plantas (Marchese *et al.*, 2017).

Tabela 3-Ocorrência e abundância de carvacrol em diferentes plantas (Burt, 2004; De Vincenzi *et al.*, 2004; Rai *et al.*, 2017).

Tabela 4-Nomenclatura dos compostos testados.

Tabela 5-Conclusão da MIC dos compostos testados (μM).

Lista de esquemas

Esquema 1-Via sintética da melanina, adaptado de (Murray, 2016).

Esquema 2-Atividades das PPOs, adaptado de (Dwivedi, 2013).

Esquema 3-Diferentes estruturas conformacionais do local ativo da tirosinase, adaptado de (Murray, 2016).

Esquema 4-Síntese dos derivados *O*-alquilados e oxiranos do eugenol **2-12**.

Esquema 5-Derivados do eugenol **14-17** resultantes do oxirano **7** e diferentes aminas.

Esquema 6-Síntese do composto **19**.

Esquema 7-Reação de *O*-alquilação do carvacrol.

Dedicatória

À minha mãe (*in memoriam*), **Inês**, que, onde está, deve sentir orgulho ao ver um dos nossos sonhos a ser realizado.

À minha avó materna, **Júlia**, por ser a melhor segunda mãe que eu poderia desejar e a melhor amiga do mundo.

Ao meu pai, **Agostinho**, que apesar das dificuldades e da doença nunca deixou de estar presente em todos os momentos da minha vida.

À minha irmã, **Rita**, por ser a luz da minha vida, somos e seremos sempre o apoio uma da outra.

À minha afilhada, **Mafalda**, por ser a minha princesinha e, apenas, o teu sorriso faz o meu dia.

Objetivos

Este trabalho consistiu no estudo de atividade biológica do eugenol, seus derivados *O*-alquilados, oxiranos e β -amino álcoois e um análogo, assim como um derivado *O*-alquilado do carvacrol, anteriormente obtidos por síntese química.

Os objetivos incluíram a avaliação da atividade antimicrobiana dos compostos referidos contra espécies de relevância alimentar e na inibição do escurecimento enzimático de modo a avaliar o potencial dos mesmos como conservantes alimentares, pelas capacidades antimicrobianas e/ou antioxidantes.

Especificamente, estudou-se a atividade dos compostos anteriormente mencionados contra microrganismos de diferentes tipos como a *Escherichia coli*, a *Pseudomonas aeruginosa*, a *Salmonella typhi*, o *Staphylococcus aureus* e a *Candida albicans* e determinou-se a Concentração Mínima Inibitória (MIC). Foi igualmente estudado o efeito dos compostos na inibição da atividade da tirosinase e consequentemente na inibição do escurecimento enzimático.

Capítulo 1 – Introdução teórica

1.1 Conservantes alimentares

Desde o início da Humanidade que produtos naturais são usados como conservantes dos alimentos, devido aos seus benefícios. Ao longo dos anos, alguns estudos experimentais, com vista à avaliação das potencialidades de algumas plantas, conduziram à descoberta de novos compostos com propriedades físico-químicas específicas e benéficas para a sua utilização na medicina, na indústria farmacêutica e em outras áreas que advêm destas (Lubbe & Verpoorte, 2011).

Fatores bióticos, tais como os microrganismos, e abióticos, tais como a oxidação de alimentos, têm sido um grave problema para a indústria alimentar, quer a nível económico, quer ético e quer legal, pois estes alteram a vida útil dos alimentos (Kourkoutas & Proestos, 2020).

Para resolver este problema são adicionados aos alimentos diferentes aditivos, substâncias que aumentam a durabilidade dos produtos, e ainda podem modificar as suas propriedades, como a aparência, o sabor e a estrutura (Silva & Lidon, 2016). Estes compostos aumentam a vida útil dos alimentos através da supressão da atividade dos microrganismos patogénicos (Kourkoutas & Proestos, 2020), pois têm a capacidade de atuar contra bactérias, fungos, patógenos alimentares e orais, e biofilmes microbianos (Marchese *et al.*, 2017), não alterando os benefícios alimentares para os consumidores, nem provocando alterações químicas e biológicas nos alimentos.

Estas substâncias podem ser naturais ou sintéticas, sem valor nutricional, sendo adicionadas em pequenas quantidades aos alimentos durante o seu processamento industrial e o seu embalamento (Silva & Lidon, 2016).

Têm sido realizados alguns estudos, de modo a investigar o uso de compostos naturais, tais como os óleos essenciais (OEs), para o revestimento de alimentos.

Os óleos essenciais (OEs) são líquidos lipofílicos de natureza aromática obtidos a partir de material vegetal, que pode ser flores, sementes, folhas, galhos e cascos das árvores, ervas, madeira, frutas e raízes. Podem ser obtidos de diversas formas, desde expressão, fermentação, enfloramento, ou hidrodestilação, mas o método mais comumente usado é a destilação por arrastamento de vapor, usado na produção comercial de OEs (Nehme *et al.*, 2021).

Atualmente, os OEs são usados em diversos campos, tais como o farmacêutico e o cosmético, devido às suas atividades biológicas, tais como a antibacteriana, antifúngica e antioxidante.

Futuramente, o intuito é o uso de OEs na indústria alimentar. Para tal, vários estudos têm vindo a ser realizados sobre o revestimento de frutos. Um dos estudos realizados foi com o revestimento da maçã, sendo usado um único composto ou a combinação de vários, nomeadamente o eugenol e o citral. Neste estudo, ficou comprovado que o uso destes revestimentos comestíveis limitou a colonização de diferentes patogéneos, contribuindo para um consumo seguro destes frutos que foram ligeiramente processados (Vieira *et al.*, 2019).

1.2 Óleos essenciais e outros compostos bioativos

1.2.1 Definição de compostos bioativos

Todos os seres vivos necessitam de sintetizar compostos químicos para a sua sobrevivência e para o seu crescimento. Os compostos bioativos das plantas são metabolitos produzidos pelas células, podendo dividir-se em dois grupos, os metabolitos primários e os metabolitos secundários. Os primários estão interligados com o crescimento e desenvolvimento, enquanto os secundários estão relacionados com a capacidade de sobrevivência da planta em relação ao ambiente que a rodeia.

Os metabolitos primários advêm do metabolismo geral comum a todos os seres vivos, animais e vegetais, tendo como objetivo a síntese de compostos essenciais para a sua sobrevivência. Nas plantas, este metabolismo está associado a diversos processos, como o Ciclo de Krebs, para a formação de ácidos carboxílicos, e ainda originam a formação de açúcares, aminoácidos, ácidos gordos, hidratos de carbono, ácidos nucleicos e proteínas, estando todos estes envolvidos nos processos vitais da planta (D. F. L. dos S. Almeida, 2017; Schaaf *et al.*, 1995).

Os metabolitos secundários são originados através de vias biossintéticas dedicadas e permitem que a planta responda a diferentes fatores ambientais, físicos ou biológicos, permitindo por vezes a comunicação com diferentes organismos (Castro *et al.*, 2005). Estas moléculas podem desempenhar funções na reprodução e no crescimento, fundamentalmente na polinização, e, ainda, atuam como mecanismos de defesa contra radiação ultravioleta, agentes patogénicos, parasitas e predadores, contribuindo também para a cor e o sabor das plantas.

1.2.2 Classificação química dos produtos naturais

Os produtos naturais podem ser classificados em diferentes famílias de acordo com a sua estrutura química e origem biossintética. Entre estes grupos encontram-se, por exemplo, os (poli)fenóis, terpenos, alcaloides, entre outros.

1.2.2.1 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são caracterizados pela presença de um anel aromático que contém, no mínimo, um grupo hidroxilo (fenol) na sua estrutura, podendo ser livre ou, em alguns casos, de natureza heterosídica.

A grande diversidade estrutural dos compostos fenólicos permite dividi-los em duas grandes classes, devido à sua origem biossintética, os derivados do ácido chiquímico e os derivados da via acetato (Bruneton et al., 2001).

Dentro dos compostos fenólicos podem considerar-se diversas subclasses, incluindo os ácidos fenólicos, cumarinas, lenhanas, flavonóides, antocianinas, taninos, entre outras.

Exemplos destes podem ser encontrados na Figura 1.

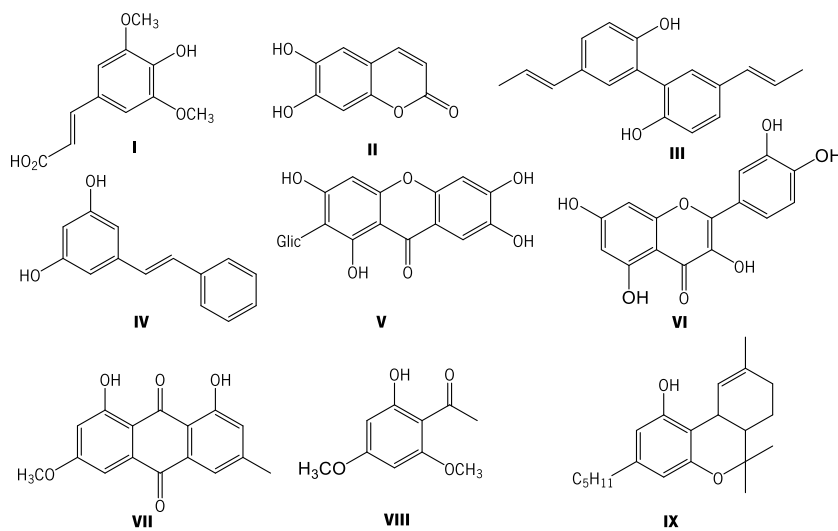


Figura 1-Exemplos de compostos fenólicos: ácido sináptico **I** (ácido fenilpropanóico), esculetina **II** (cumarina), magnoliol **III** (neolenhana), pinosilvina **IV** (estilbeno), mangiferina **V** (xantona), quercetina **VI** (flavonol), fisciona **VII** (antraquinona), xantoxilina **VIII** (benzofenona) e tetrahidrocanabinol (THC) **IX** (canabinóide).

Os ácidos fenólicos incluem as moléculas que apresentam uma função carboxílica e um hidroxilo fenólico, enquanto os fenóis simples não apresentam a função carboxílica.

As cumarinas são 2H-1-benzopirano-2-onas, podendo considerar-se como lactonas dos ácidos 2-hidroxil-Z-cinâmicos. As cumarinas encontram-se substituídas no carbono C7 por um hidroxilo. Este grupo hidroxilo pode sofrer metilação ou estar envolvido numa ligação heterosídica.

As lenhanas resultam de compostos cujo esqueleto resulta do estabelecimento de uma união entre os carbonos β das cadeias laterais das unidades derivados do 1-fenilpropano.

Todos os flavonóides possuem uma origem biossintética comum, e por este motivo podem ser consideradas diversas subclasses, como flavonas, flavonóis, flavanonas, di-hidroflavonóis, flavan-3-óis, chalconas, auronas e antocianinas (Bruneton et al., 2001; Cuyckens & Claeys, 2004).

Os flavonóides são ubíquos nas plantas vasculares e são responsáveis pelas colorações do espectro amarelo-laranja das flores, dos frutos e por vezes das folhas. As antocianinas, também flavonoides, estão associadas aos pigmentos azuis, roxos, rosa, malva, púrpura ou violeta. Na sua estrutura encontra-se, normalmente, um grupo OH em C3, e frequentemente, penta- (3,5,7, 3', 4') ou hexa-(3,5,7, 3', 4', 5') substituídos por hidroxilos ou metoxilos.

Em plantas superiores distinguem-se, geralmente, dois grupos diferentes de taninos, tanto pela sua estrutura como pela sua origem biossintética, os taninos hidrolisáveis e os taninos condensados. Os taninos hidrolisáveis são oligo ou poliésteres de um açúcar e de um número variável de moléculas de ácido fenólico. Os taninos condensados são constituídos por unidades de flavan-3-óis ligadas entre si por ligações carbono-carbono, geralmente 4 → 8 ou 4 → 6.

As quinonas são compostos oxigenados que correspondem à oxidação de derivados aromáticos e caracterizam-se por um agrupamento de 1,4-dicetociclo-hexan-2,5-diénico, *para*-quinonas, e ocasionalmente, por um agrupamento de 1,2-dicetociclo-hexan-3,5-diénico, *orto*-quinonas.

1.2.2.2 Terpenos

As plantas produzem várias moléculas de natureza volátil necessárias para a sua sobrevivência, pois atraem polinizadores para que ocorra a reprodução, atuando na defesa contra diferentes fatores bióticos e abióticos, transportando informação para as plantas vizinhas, bem como para a própria planta (Dudareva et al., 2006). Quimicamente, estes compostos voláteis incluem alguns terpenos, bem como alcanos, alcenos, álcoois, ésteres, aldeídos e cetonas de baixa massa molecular (Maffei, 2010).

Os terpenos podem ser divididos em diferentes classes, tais como monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos ou tetraterpenos, considerando o número de átomos de carbono que os constituem (10, 15, 20, 30, 40, respetivamente). São sintetizados pela via mevalonato, no citoplasma, e pela via 1-desoxixilulose-5-fosfato (DXP), nos plastídeos, como os cloroplastos, descritos no esquema da Figura 2 (Felipe & Bicas, 2017; Kitaoka *et al.*, 2015; Sharmeen *et al.*, 2021).

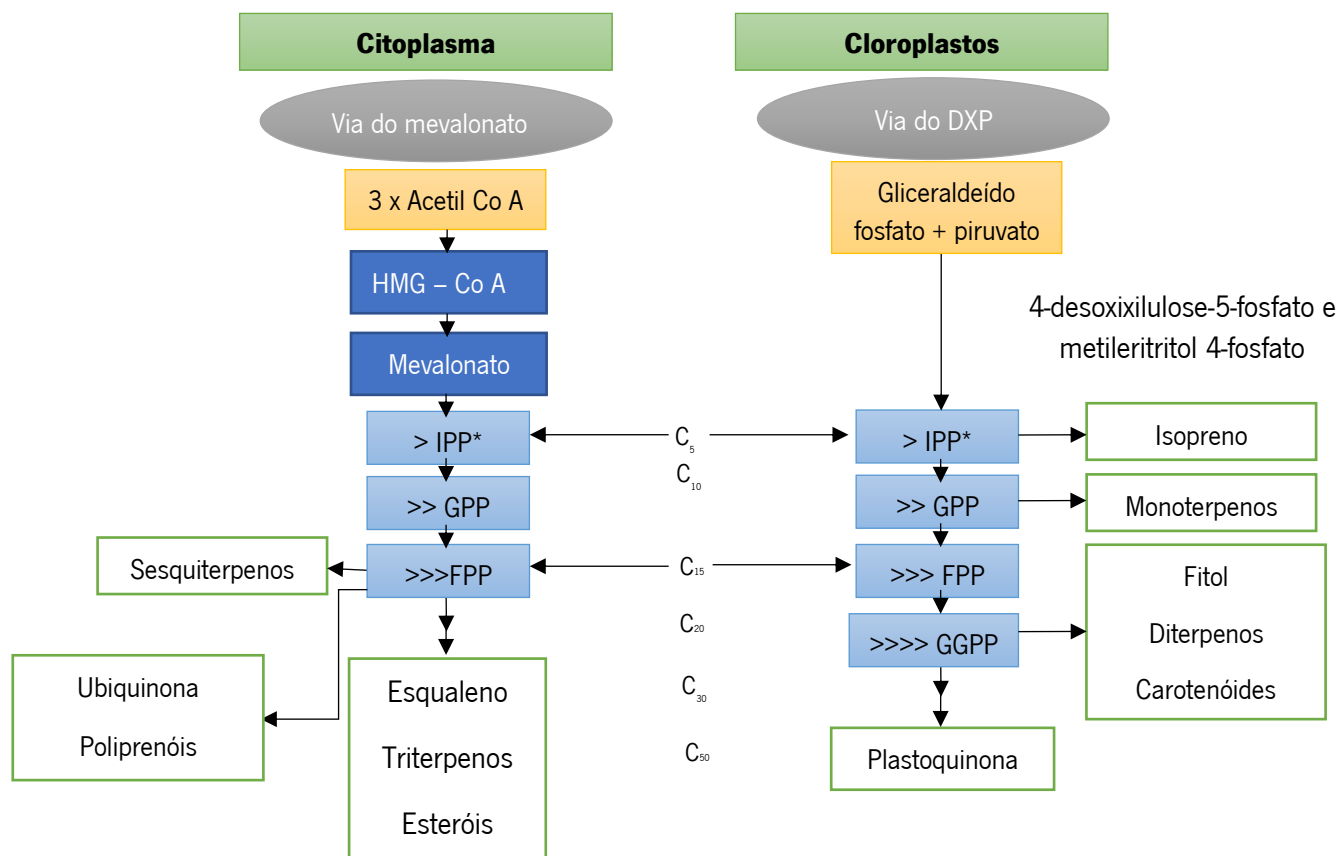


Figura 2- Vias biossintéticas de formação de terpenos. ***IPP** ou **DMAPP**; **IPP**: pirofosfato de isopentilo; **DMAPP**: pirofosfato de dimetilalilo; **GPP**: pirofosfato de geranilo; **FPP**: pirofosfato de farnesilo; **GGPP**: pirofosfato de geranilgeranilo, adaptado de (Felipe & Bicas, 2017).

Exemplos de terpenos são apresentados na Figura 3.

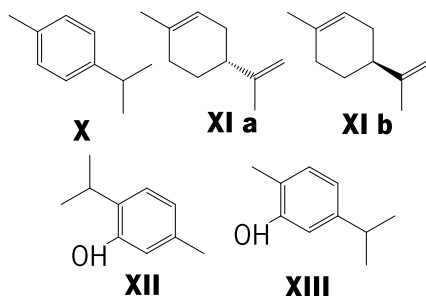


Figura 3- Exemplos de terpenos: *p*-cimeno **X**, limoneno: isômero R **XI a** e isômero S **XI b**, timol **XII** e carvacrol **XIII**.

Os terpenos têm atividade anti-inflamatória, anti-carcinogénica, antitumoral, antibacteriana, antiviral e, ainda, atividade como hepatoprotetores. A atividade antimicrobiana que apresentam está relacionada com os seus grupos funcionais e com os efeitos que despoletam, como será discutido (Hyltdgaard *et al.*, 2012).

Os fenilpropanóides constituem uma família de compostos orgânicos sintetizados a partir da fenilalanina presente nas plantas, sendo este um aminoácido precursor (Hyltdgaard *et al.*, 2012). A sua estrutura é caracterizada pela presença de uma anel aromático e de uma cadeia lateral insaturada. Os compostos demonstrados anteriormente são parcialmente responsáveis pelas propriedades antibacterianas dos OEs. Vários destes compostos surgem em OEs como é o caso da assarona **XIV** e eugenol **XV**, representados na Figura 4.

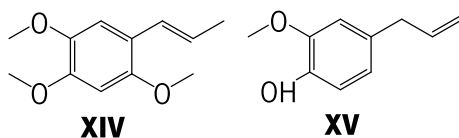


Figura 4-Exemplos de fenilpropanóides: assarona **XIV** e eugenol **XV**.

Os ácidos hidroxicinâmicos são derivados dos fenilpropanóides e contêm grupos fenólicos nos carbonos C3 e C6, uma função carboxilo e uma ligação dupla na cadeia lateral. Estas características possibilitam as duas formas isoméricas, *cis* e *trans*, sendo a forma *trans* a mais estável e a mais predominante na Natureza (Bruneton *et al.*, 2001; Hyltdgaard *et al.*, 2012; Ribéreau-Gayon & Gautheret, 1968).

Os óleos essenciais (OEs) são produtos de composição geralmente complexa que são produzidos por células especializadas e que contêm moléculas de natureza volátil, frequentemente terpenos de baixo peso molecular, tais como monoterpenos e sesquiterpenos.

1.2.3 Extração de óleos essenciais

As diferentes metodologias de extração de óleos essenciais devem ter em consideração diferentes aspetos, incluindo a classe química-alvo, a sua estabilidade, quantidade, entre outros (Smith, 2003).

Como técnicas de extração mais conhecidas surgem, por um lado, a extração por Soxhlet, maceração e hidrodestilação, sendo estas consideradas técnicas convencionais. Por outro lado, como técnicas não-convencionais surgem a extração assistida por ultrassons, extração assistida por enzimas, extração assistida por microondas, extração assistida pelo pulso do campo elétrico, extração com fluido

supercrítico e extração de líquido pressurizado (Azmir *et al.*, 2013). Estas diferentes técnicas apresentam resultados diferentes de acordo com a espécie de origem e tecido vegetal utilizado.

Destilação por arrastamento de vapor

O método mais comum para a extração de óleos essenciais é a destilação por arrastamento de vapor descrita na Figura 5. O vapor pode ser saturado ou superaquecido, sendo introduzido na parte mais abaixo do extrator onde irá passar até atingir a matéria prima (Asbahani *et al.*, 2015; Khalil *et al.*, 2017).

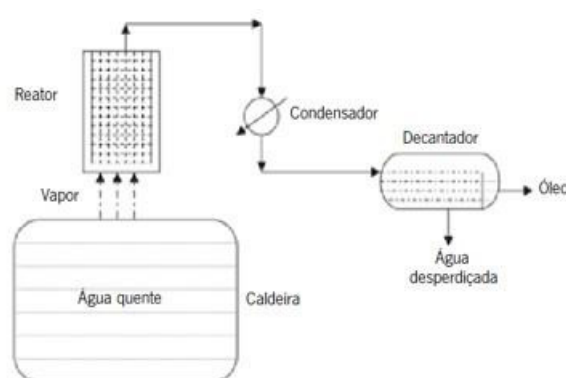


Figura 5-Esquema de destilação a vapor, adaptado de (Masango, 2005).

Hidrodestilação

Este método consiste em colocar os materiais vegetais, inicialmente, num compartimento imóvel, e a água é adicionada e, em seguida, a mistura é levada à ebulição. O arrefecimento condensa a mistura que flui do condensador para o separador, onde o óleo essencial e os compostos bioativos se separam automaticamente da água (Vankar, 2004).

Extração por solvente

A extração por solvente orgânico é outro método muito usado na extração de OEs das plantas. Diversos solventes podem ser usados como o metanol, etanol, *n*-hexano, de entre outros. Este método consiste na maceração por um solvente orgânico do material vegetal, sendo que o extrato é concentrado pela remoção do solvente, por evaporação, sob pressão reduzida. Algumas modificações experimentais foram realizadas ao longo dos tempos, de modo a aumentar a sua eficácia em comparação com métodos

tradicionais, como por exemplo a extração em *batch*, que é uma alternativa à extração de Soxhlet (Asbahani *et al.*, 2015; Khalil *et al.*, 2017).

Extração assistida por microondas

Os métodos tradicionais usados na extração de OEs estão associados a diversas desvantagens como a hidrólise, a degradação térmica e a lixiviação de alguns componentes da planta. Para combater estes problemas, surgiu um novo método, a extração assistida por microondas, que é utilizada para extrair produtos solúveis, num fluido, a partir de materiais através da energia de microondas. As microondas correspondem a campos eletromagnéticos com frequências na gama dos 300 MHz a 300 GHz, compostas por dois campos oscilantes, o campo elétrico e o campo magnético. O mecanismo de extração envolve três etapas: a separação de solutos dos locais ativos da matriz da amostra, sob o aumento da temperatura e da pressão, a difusão do solvente através da matriz da amostra e a libertação de solutos da matriz da amostra para o solvente. Este tipo de extração obtém compostos bioativos mais rapidamente que outras técnicas convencionais, sendo reconhecido como uma tecnologia ecológica, pois reduz o uso de solvente orgânico (Alupului *et al.*, 2012).

Extração com fluido supercrítico

A extração com CO₂ supercrítico é um método eficiente para a extração de compostos bioativos. O ponto crítico de uma substância define-se como a temperatura e pressão acima das quais não existem fases distintas de gás e de líquido. Um sistema de extração através de um fluido supercrítico é constituído por um reservatório de fase móvel, como o CO₂, uma bomba para pressurizar o gás, vaso, um forno que contém o vaso de extração, um controlador para manter a elevada pressão dentro do sistema e um sistema de captura. Exemplos de compostos obtidos usando esta técnica são o eucaliptol, o pinocarveol, o eugenol e o γ -terpineno (Azmir *et al.*, 2013; Yousefi *et al.*, 2019).

Extração assistida por ultrassons

A extração assistida por ultrassom é outra técnica de extração com sucesso para superar as desvantagens dos métodos tradicionais através do uso de ultrassom (Khalil *et al.*, 2017). O ultrassom é uma onda sonora especial, usada em química entre 20 kHz a 100 MHz, que, ao passar por um meio,

cria compressão e expansão, formando um fenómeno chamado cavitação, que consiste na produção, crescimento e colapso de bolhas. Uma elevada quantidade de energia é produzida, pela conversão da energia cinética do movimento no aquecimento do conteúdo da bolha. A energia do ultrassom facilita a lixiviação de compostos orgânicos e inorgânicos da matriz de plantas (Herrera & Luque De Castro, 2005). O mecanismo de extração por ultrassom envolve dois fenómenos físicos principais, a difusão através da parede celular e a limpeza do conteúdo das células após a quebra das suas paredes (Mason *et al.*, 1996).

1.2.4 Atividade biológica dos componentes dos óleos essenciais

Com os OEs extraídos das diversas plantas, através de diferentes técnicas, é possível avaliar as respetivas atividades biológicas em diferentes modelos experimentais. Estas atividades estão, invariavelmente, associadas à composição química dos constituintes presentes nos OEs, motivo pelo qual o estudo fitoquímico da amostra é fundamental (Nehme *et al.*, 2021). Normalmente, os compostos bioativos constituem uma percentagem relevante na mistura, como descrito na Tabela 1.

Entre as várias atividades biológicas podem destacar-se antibacteriana, antifúngica, atividade antiviral, citotóxica ou anti-inflamatória. Neste trabalho serão focadas as atividades antibacteriana e antifúngica.

Tabela 1-Composição química de alguns OEs que exibem propriedades antimicrobianas.

Nome da planta	Componentes principais	Composição relativa	Referências
<i>Origanum vulgare</i>	Carvacrol	Vestigial – 80	(Burt, 2004; Daferera et al., 2000; Karpouhtsis et al., 1998)
	Timol	Vestigial – 64	
	γ -Terpineno	2 – 52	
	<i>p</i> -Cimeno	Vestigial – 52	
<i>Rosmarinus officinalis</i>	α -Pineno	2 – 25	(Daferera et al., 2000; Marino et al., 2001; Pintore et al., 2002)
	Acetato bornílico	0 – 17	
	Cânfora	2 – 14	
	1,8-Cineol	3 – 89	
<i>Salvia officinalis</i> L.	Cânfora	6 – 15	(Marino et al., 2001)
	α -Pineno	4 – 5	
	β -Pineno	2 – 10	
	1,8-Cineol	6 – 14	
	α -tuiona	20 – 42	
<i>Syzygium aromaticum</i>	Eugenol	75 – 85	(Bauer et al., 2006)
	Acetato de eugenol	8 – 15	
<i>Thymus vulgaris</i>	Timol	10 – 64	(Burt, 2004; Daferera et al., 2000; Lens - Lisvonne et al., 1987)
	Carvacrol	2 – 11	
	γ -Terpineno	2 – 31	
	<i>p</i> -Cimeno	10 – 56	

1.2.4.1. Atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana de diferentes compostos tem sido muito estudada, devido à emergência da resistência a antibióticos e à multirresistência de algumas estirpes de bactérias.

As bactérias Gram-negativas têm uma camada fina de peptidoglicano e uma membrana lipídica externa, enquanto as bactérias Gram-positivas têm uma camada espessa de peptidoglicano e nenhuma membrana lipídica externa, o que lhes confere uma maior resistência aos antimicrobianos (Figura 6).

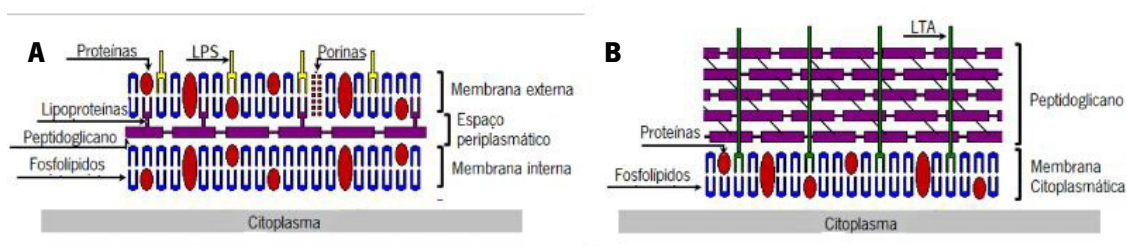


Figura 6-Estrutura das bactérias: Gram-negativa (A) e Gram-positiva (B).

A atividade antibacteriana do eugenol é devida à presença de grupos hidroxilo livres na sua estrutura, pois estes promovem a ruptura da membrana citoplasmática e consequentemente aumentam a permeabilidade não específica, devido à ligação do grupo OH às proteínas presentes, prevenindo a ação de enzimas (Devi *et al.*, 2010; Marchese *et al.*, 2017; Nazzaro *et al.*, 2013).

A performance de um determinado composto relativa à atividade antibacteriana está relacionada com a sua Concentração Mínima Inibitória (MIC) que se define como a mais baixa concentração do composto necessária para limitar o crescimento de um inóculo (C. Carson e Riley, 1995). A Concentração Mínima Bactericida (MBC) é também útil na observação da capacidade antibacteriana de um composto bioativo, dado que se trata da concentração a que um dado composto provoca pelo menos 99,9 % de morte do inóculo (C. F. Carson *et al.*, 1995). A Zona Inibitória de Crescimento (IZ) é medida pelo diâmetro do halo de inibição do crescimento. A Concentração Mínima Letal (MLC) é a concentração mínima de um determinado composto capaz de matar um microrganismo.

Para obter estas concentrações diferentes podem ser usados testes como a difusão em disco, para o *screening* da atividade bacteriana, e o método de diluição em agar, para a determinação da força das propriedades antibacterianas (Burt, 2004).

Mecanismo de ação antibacteriano

Os OEs podem ter diferentes grupos funcionais na sua estrutura, conforme a classe de compostos a que pertençam. A atividade antibacteriana não é caracterizada por nenhum grupo funcional específico, no entanto, as bactérias têm determinados alvos moleculares, que podem ser modulados por moléculas bioativas que têm em conta a especificidade do local de ligação.

Na Figura 7, está representada a estrutura de alguns mecanismos celulares de uma célula bacteriana, os quais consistem especialmente na degradação da parede celular, em danos na membrana citoplasmática, em danos nas proteínas membranares, na perda de constituintes citoplasmáticos, como metabolitos e iões, na coagulação do citoplasma e no esgotamento da força motriz de protões (Burt, 2004).

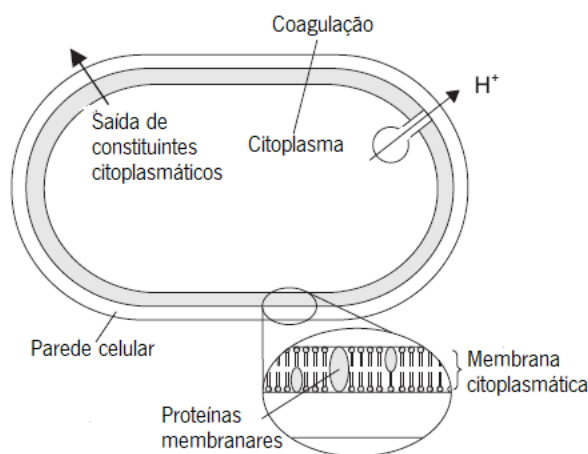


Figura 7-Estrutura de mecanismos celulares de uma célula bacteriana, adaptado de (Burt, 2004).

A degradação da parede celular está associada à capacidade de pequenos solutos hidrofílicos serem capazes de passar a membrana externa, através de proteínas especializadas, fornecendo canais transmembranares hidrofílicos, sendo que a membrana externa serve como barreira de penetração para macromoléculas e compostos hidrofóbicos. Em geral, destruir ou danificar a membrana externa é um requisito para qualquer soluto exercer atividade bactericida, principalmente nas bactérias Gram-negativas (Faleiro M.L., 2011; Helander *et al.*, 1998). Os OEs quando estão presentes no meio intracelular de uma bactéria provocam a acidificação dentro da célula, que promove o bloqueio da produção de energia celular (ATP-Adenosina Trifosfato), devido à perda de iões, ao colapso das bombas de protões e à redução do potencial de membrana (Saad *et al.*, 2013; Turgis *et al.*, 2009).

A membrana bacteriana tem um papel importante na regulação da pressão osmótica celular, na entrada e saída de biomoléculas. Os compostos bioativos ao promoverem alterações na membrana

plasmática levam a uma ruptura da pressão osmótica, levando a uma perda de constituintes intracelulares, e eventualmente, à destruição das células (Yang *et al.*, 2021).

Diferentes moléculas, dependendo da sua hidrofobia, permeiam mais facilmente ou menos a membrana, sendo que a porção interna hidrofóbica desta favorece o fluxo dos componentes que atravessam a membrana, e da composição da membrana, portanto, uma mudança de perfil hidrofóbico/hidrofílico pode levar a uma perda de componentes celulares, devida à ruptura da membrana celular. A coagulação do citoplasma está associada a proteínas e membranas desnaturadas, dependente da hidrofobicidade dos solutos que atravessam a membrana celular e da composição da membrana bacteriana (Gustafson *et al.*, 1998; Lambert *et al.*, 2001; Sikkema *et al.*, 1995; Turgis *et al.*, 2009).

1.2.4.2. Atividade antifúngica

Os fungos estão cada vez mais associados a doenças infecciosas, devido aos fatores de virulência, que lhes permitem causar variados tipos de infecções, podendo levar à morte. Exemplos de doenças fúngicas são as candidíases, micoses, aspergiloses, de entre muitas outras.

As candidíases são uma doença fúngica causada por uma levedura do género *Candida*, sendo a mais comum a espécie *Candida albicans*. Esta levedura vive normalmente na pele e dentro do nosso corpo, fazendo parte da nossa flora comensal, causando infecções no organismo pela entrada na corrente sanguínea e, conseqüentemente, nos órgãos internos.

As micoses podem ser de diferentes tipos blastomicoses, coccidioidomicoses e mucormicoses, causadas por diferentes tipos de fungos como *Blastomyces*, *Coccidioides* e por um grupo de bolores conhecidos como mucormicetes, respetivamente.

As aspergiloses são doenças causadas por um fungo, *Aspergillus*, um bolor comum. Estas doenças são mais comuns em pessoas com o sistema imunitário mais debilitado, pois todos os dias muitas pessoas respiram *Aspergillus*, que se encontra no ar, e não ficam doentes. Os problemas causados por este fungo estão associados a reações alérgicas, infecções pulmonares e em outros órgãos (Fungal Diseases Homepage | CDC., 2020).

Mecanismo de ação antifúngico

Os antifúngicos utilizados normalmente são os polienos, como a anfotericina B, os azóis, como fluconazole, itraconazole, entre outros, e as equinocandinas.

Estes compostos atuam principalmente na parede celular, inibindo as sínteses de β -glucanos e de quitina; na membrana celular inibindo a síntese de ergosterol; e, ainda, podem atuar na inibição de síntese de outros alvos como ácidos nucleicos, proteínas e microtúbulos.

A Figura 8 exemplifica a arquitetura membranar de um fungo (Chopra, 2010).

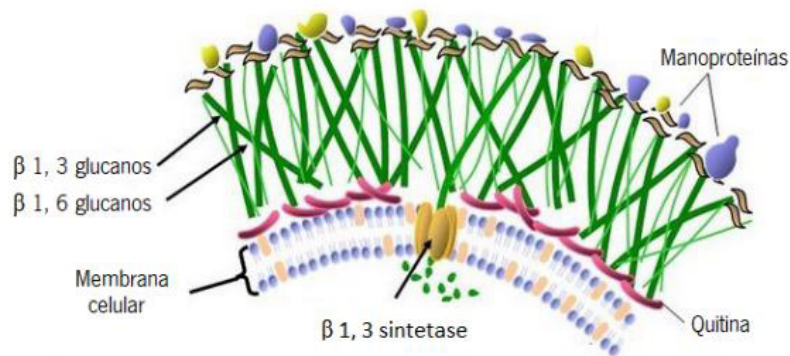


Figura 8-Composição celular de um fungo, adaptado de (Chopra, 2010).

1.3. Eugenol

O **eugenol**, designação convencional para **4-alil-2-metoxifenol** (Figura 9) é um fenilpropanóide presente em diversos elementos da flora mundial, tais como o cravinho-da-índia, exemplificado na Figura 9, e também, manjerição, canela, noz-moscada, alfavaca-cravo, entre muitos outros (Mishra *et al.*, 2013), sendo os seus epítetos científicos mostrados na Tabela 2, juntamente com a percentagem de eugenol presente em cada uma destas plantas.

Além destas fontes, existem outras, que também contêm eugenol na sua constituição, mas em quantidades mais reduzidas, como é o caso da *Myristica fragrans*, *Melissa officinalis*, *Illicium anisatum* (Jaganathan & Supriyanto, 2012), entre outras.

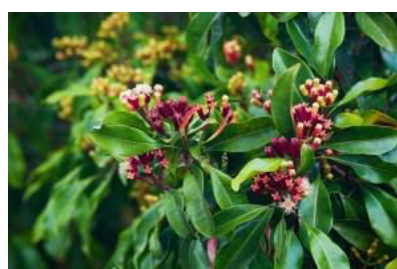
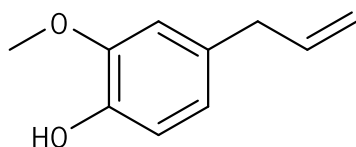


Figura 9-Estrutura química do eugenol e sua fonte, o cravinho-da-índia.

Tabela 2-Ocorrência e % de eugenol em diferentes plantas (Marchese *et al.*, 2017).

Nome científico	Planta		Abundância em eugenol (%)
	Nome comum	Partes específicas	
<i>Syngium aromaticum</i>			
<i>Eugenia aromaticum</i>	Cravinho-da-índia	Flores e rebentos	75 – 85
<i>Eugenia cariophyllata</i>			
<i>Ocimum basilicum</i>	Manjerição	Óleo essencial	70 – 80
<i>Ocimum gratissimum</i>			
<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	Canela	Casca	70 – 95

O eugenol tem como fórmula química $C_{10}H_{12}O_2$, com uma massa molar de $164,2 \text{ g mol}^{-1}$, é parcialmente solúvel em água e altamente solúvel em solventes orgânicos. De incolor a amarelo pálido, quanto à cor, é absorvido através do intestino delgado e excretado na urina, ou através de CO_2 expirado (Khalil *et al.*, 2017).

Devido à sua ação farmacológica, poderá vir a ser usado, após testes *in vivo*, no tratamento de diversas doenças, tais como acne, asma, artrite reumatóide, cicatrizes, verrugas e alergias. Por enquanto, a sua utilização no mercado é apenas restrita à cosmética e medicina dentária, devido às suas propriedades antioxidantes e antissépticas. O eugenol poderá também vir a ser usado no tratamento de doenças infecciosas e como conservante alimentar, devido às suas propriedades antimicrobianas (Marchese *et al.*, 2017).

1.3.1. Mecanismo de ação do eugenol

Diversas investigações descritas, na bibliografia, demonstram o potencial do eugenol, devido às propriedades antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória, anticancerígena, neuroprotetora e antistressante, potencial antidiabético e perspectivas hipocolesterolémicas.

Atividade antibacteriana

Os compostos fenólicos, como o eugenol, estão diretamente relacionados com diversos mecanismos celulares, descritos na Figura 7, que englobam distúrbios na membrana citoplasmática, ruptura da força motriz de prótons, fluxo de elétrons, transporte ativo, coagulação de componentes celulares e perda de lipídios nas paredes celulares, tanto nas bactérias Gram-negativas como nas Gram-positivas (Burt, 2004; A. L. De Almeida *et al.*, 2019).

No caso da ruptura da membrana citoplasmática, uma vez que leva a um aumento da permeabilidade da membrana, afetando o transporte de íons e ATP, a liberação de íons e a extensiva perda de componentes celulares, pode resultar na morte da célula (Marchese *et al.*, 2017).

Vários autores sugerem que a atividade antibacteriana do eugenol é devida à presença de um grupo OH fenólico livre, que se irá ligar a proteínas impedindo a ação de enzimas (Burt, 2004; Marchese *et al.*, 2017).

Um estudo realizado por Qian, com células CRKP-12 tratadas com eugenol, demonstra hiperpolarização da membrana celular, pois revela que este composto perturba a estrutura da membrana celular e aumenta a sua permeabilidade, provocando, ainda, um intumescimento destas células, levando ao colapso da superfície e a detritos celulares anormais, pois a forma bacilar e a superfície lisa das células estudadas é desintegrada pela ação do eugenol. A perturbação na permeabilidade da membrana

é devida à despolarização da mesma, ao aumento de H⁺ intracelular e à perda de ATP, resultando na formação de poros não seletivos, que promovem a perda de iões essenciais e de outras biomoléculas (Bot & Prodan, 2009; Qian *et al.*, 2020).

Estudos focados em microrganismos responsáveis por doenças infecciosas em humanos, tais como *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida glabrata*, *Aspergillus niger*, entre outros, demonstraram através dos valores de IZ, bem como MIC e MBC, o potencial inibitório de crescimento destes organismos, sendo, portanto, possível o seu uso para o controlo de doenças infecciosas (Marchese *et al.*, 2017).

A nível de patogéneos de origem alimentar, como *E. coli*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella spp.*, o eugenol demonstrou inibição do crescimento destes patogéneos, diminuindo a proeminência de doenças alimentares, como listerioses, colites hemorrágicas e salmoneloses, e ainda o potencial para atuar como conservantes alimentares, de modo a aumentar a vida útil de produtos alimentícios (Mith *et al.*, 2014). Um patogéneo alimentar causador de gastroenterite - *Vibrio parahaemolyticus*, resistente a antibióticos, devido ao consumo de frutos do mar mal cozinhados, serviu como alvo no estudo da atividade do eugenol. Ficou demonstrada uma atividade efetiva contra o crescimento bacteriano deste microrganismo, apresentando atividade na prevenção de biofilmes, importante para a manutenção da segurança alimentar destes alimentos (Ashrafudoulla *et al.*, 2020). Um biofilme é definido como uma comunidade de células anexadas a uma superfície inseridas numa matriz exopolimérica, que são dificilmente erradicadas representando um foco de infeção.

A inibição da formação de biofilmes, comprovada por diferentes estudos, deve-se à deterioração violenta das células presentes nos biofilmes, causando uma significativa dispersão celular dentro da matriz do biofilme (De Paula *et al.*, 2014).

Alguns estudos realizados em biofilmes de CRKP-12, *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenemos, demonstram um forte efeito do eugenol na inibição destes biofilmes. Resultados referentes a qRT-PCR mostram que os mRNA dos genes relativos a estes biofilmes encontram-se diminuídos na presença do eugenol. Portanto, a inibição de biofilmes causada pelo eugenol, pode atribuir-se a um mecanismo de desregulação génica (Qian *et al.*, 2020).

Outro estudo realizado por Triana e colegas, usando derivados do eugenol, como o isoeugenol e o acetato de eugenol, comprovam que a atividade antibacteriana destes compostos se deve à sua estrutura do fenilpropanóide, conferindo-lhe carácter lipofílico, podendo assim danificar a célula bacteriana

ao penetrar na membrana lipídica e, assim, danificar a permeabilidade da membrana. O isoeugenol apresenta elevado efeito antibacteriano, devido à ligação dupla próxima ao anel aromático presente na sua estrutura, atuando como detergente, tanto nas membranas internas como externas, pois ambas têm alvos onde o eugenol pode promover um ataque nucleofílico. No entanto, o acetato do eugenol não apresenta atividade antibacteriana, pois o grupo hidroxilo presente no eugenol encontra-se substituído por um grupo acilo, podendo, assim, afirmar-se que a atividade antimicrobiana do eugenol e derivados se deve ao grupo hidroxilo livre (Triana *et al.*, 2019).

Há estudos da ação do eugenol contra isolados de *Staphylococcus aureus*, alguns resistentes à vancomicina, que mostraram que o eugenol é capaz de desencadear citotoxicidade na célula, devido à produção intracelular de radicais livres de oxigénio (ROS), que induz a inibição do crescimento celular, disrupção da membrana celular e danos no DNA resultando na decomposição celular e morte (Das *et al.*, 2016).

Atividade antifúngica

Um estudo de Olea e outros afirma que a atividade antifúngica do eugenol está atribuída à disrupção da estrutura da sua membrana, através da acumulação deste composto na bicamada fosfolipídica, devido ao seu carácter lipofílico. Esta interação altera a fluidez e a permeabilidade das membranas fúngicas, afetando as funções das enzimas ou proteínas importantes ligadas à membrana. A ligação dupla da cadeia lateral do eugenol e o seu sistema aromático promovem a inibição do crescimento fúngico (Olea *et al.*, 2019).

Estes investigadores também estudaram modificações na estrutura do eugenol, através da adição de grupos contendo nitrogénio no anel aromático e modificações na estrutura inicial do composto. A adição do grupo com nitrogénio no anel aromático promove a retirada de eletrões e, diretamente, reage com as ligações duplas substituídas com outros grupos de retirada de eletrões, que promove a produção de ROS pelos compostos aromáticos, num processo mediado por enzimas, levando a uma disrupção química da paliçada da membrana. Os arranjos espaciais dos grupos estruturais presentes no eugenol promovem o aumento do ataque nucleofílico das ligações duplas nos grupos nitro eletrofilicos afetando a permeabilidade da membrana e o transporte de eletrões. A presença de outros grupos no anel aromático afeta a reatividade dos compostos, que é comprovada pela substituição do grupo hidroxilo livre por um grupo acetilo, diminuindo fortemente a atividade destes compostos, pois esta atividade é devida

a elevada atração eletrônica do grupo hidroxilo, que aumenta as reações com as ligações duplas do anel aromático (Olea *et al.*, 2019).

Marchese estudou o mecanismo de ação do eugenol em diversas vertentes, a nível fúngico, o carácter lipofílico do eugenol promove a entrada deste nas cadeias de ácidos gordos, e, assim, na bicamada fosfolipídica da membrana fúngica. Este mecanismo promove perturbações na permeabilidade e na fluidez, conduzindo a uma interferência na patogenicidade fúngica, pois compromete a adesão destas células fúngicas a células hospedeiro, e, ainda, o seu dimorfismo, importante fator de virulência dos fungos, conduz a uma redução da habilidade dos fungos colonizarem e infetarem os tecidos hospedeiros (Marchese *et al.*, 2017).

Outros estudos mostram que o transporte de iões é afetado pelo eugenol nas leveduras, pois inibe a atividade H^+ - ATPase e a extrusão de H^+ estimulada pela glicose (Ahmad *et al.*, 2010), e mostraram, ainda, que o tratamento com eugenol e metil-eugenol em *Candida albicans* induz um stress oxidativo, caracterizado pelo aumento do superóxido dismutase e, consequentemente, uma elevada produção de ROS, os quais causam peroxidação lipídica das membranas citoplasmáticas e morte celular (Khan *et al.*, 2011).

O eugenol tem a aptidão de afetar a hidrofobicidade da superfície celular e a capacidade de adesão de células planctónicas, como, por exemplo, em estirpes de *Candida*, como a *Candida tropicalis* e *Candida dubliniensis*. Esta atividade é devida à ligação dupla localizada nas posições α e β da cadeia lateral e ainda ao grupo metilo localizado na posição γ (De Paula *et al.*, 2014; Qian *et al.*, 2020).

Estudos referentes à inibição de biofilmes provocados pela *Candida dubliniensis* e pela *Candida tropicalis* retratam que o eugenol apresenta atividade inibitória e reduz atividade metabólica dos biofilmes. O mecanismo pelo qual o eugenol induz a morte destes biofilmes consiste no facto de este provocar mudanças profundas na morfologia das células e, ainda, provocar perda de constituintes citoplasmáticos, indicando que existe ações no envelope celular.

Atividade anticancerígena

O cancro está documentado como a segunda maior causa de mortalidade mundial, associado a diferentes fatores como o tabaco, ambiente, fatores genéticos, entre outros, consistindo, essencialmente, na proliferação anormal de células tumorais.

O eugenol apresenta-se como um agente inibidor de metástases associadas ao stress oxidativo, e os seus derivados como o isoeugenol, di-hidroisoeugenol e diisoeugenol revelam-se também agentes anticancerígenos do cancro da mama, através das suas moléculas citotóxicas que interagem com a membrana celular (Khalil *et al.*, 2017).

Jaganathan no seu estudo, afirma que a produção de ROS pelo eugenol, está envolvida na indução da apoptose, levando a uma redução do potencial da membrana mitocondrial e na indução da fragmentação do DNA, confirmada pelo padrão de DNA *ladder*, através da ativação da caspase-3 e pelo produto de clivagem de PARP (Polimerase de poli (ADP-ribose)), e, ainda, pela libertação do citocromo *c* da mitocôndria para o citosol, tendo um papel importante na via mitocondrial, através da modulação das proteínas da família Bcl2, angiogénese e invasão nas células em estudo (Jaganathan, Saravana Kumar; Supriyanto, 2012). Jaganathan, no seu estudo, afirma que, no caso de um melanoma, o dihidroisoeugenol apresenta uma percentagem de inibição de crescimento de 40 a 60 %, e o *o,o'*-dimetil-dihidro-eugenol apresenta 70 a 80 %, a uma concentração de 10 μ M. O eugenol para diferentes tipos de cancro, como melanoma, osteossarcomas, leucemias, cancro gástrico, tumores na pele e cancro na próstata, apresenta diminuição do crescimento das células tumorais. Particularmente, no caso de uma leucemia, o eugenol apresenta um IC_{50} de 23,7 μ M em linhas celulares HL-60, aumentando a produção de ROS e a depleção de glutathione (GSH), o metileugenol, para a mesma linha celular, apresenta um IC_{50} de 76,5 μ M (Yoo *et al.*, 2005).

Atividade anti-inflamatória

A inflamação consiste numa resposta natural do corpo, que acontece quando o organismo se encontra debilitado, seja por uma infeção por agentes infecciosos como bactérias, vírus ou parasitas, ou por intoxicação por veneno, seja por uma lesão por calor, radiação ou trauma. Devido a estas situações, o organismo dá início à resposta inflamatória, tendo por objetivo eliminar as lesões, removendo as células mortas e tecidos danificados, iniciando assim a sua reparação. O tratamento de uma inflamação é realizado através de anti-inflamatórios não esteróides e anti-inflamatórios esteróides, sendo que estes provocam alguns efeitos secundários indesejados ao organismo, como por exemplo cansaço, má digestão, e ainda podem provocar mudanças no peso.

De modo a diminuir os efeitos colaterais, tem-se procurado formas mais naturais que ajudem na resposta inflamatória. Para tal, diversos estudos têm vindo a ser realizados de forma a encontrar estas soluções, como é o caso do estudo do eugenol.

Um estudo de Barboza e equipa, demonstra que o eugenol apresenta uma ação benéfica no stress oxidativo, através da inibição de enzimas e processos oxidativos. Estes mecanismos, de diminuição da resposta inflamatória pelo sistema imunológico, estão descritos na Figura 10 (Barboza *et al.*, 2018).

Em modelos *in vitro*, o eugenol inibe a eosinofilia, isto é, o aumento de eosinófilos circulantes no sangue, induzida pela ovalbumina no tecido pulmonar, prevenindo o aumento dos níveis das interleucinas 4 e 5 (IL-4 e IL-5). No caso de lesão pulmonar aguda induzida por lipossacarídeos (LPS), o eugenol inibe o recrutamento de leucócitos para o tecido pulmonar, pela regulação negativa da expressão de citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- α (fator de necrose tumoral alfa). Além disto, o eugenol aumenta a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutatona peroxidase (GPx) e glutatona-S-transferase (GST), sendo estas enzimas antioxidantes importantes.

Um outro estudo demonstra que o eugenol inibe a expressão da enzima óxido nítrico induzível (iNOS) dos macrófagos em resposta ao LPS, culminando na redução dos níveis de óxido nítrico, um mediador inflamatório. O eugenol reduz também o TNF- α e a interleucina 1 β (IL-1 β) (Yeh *et al.*, 2011).

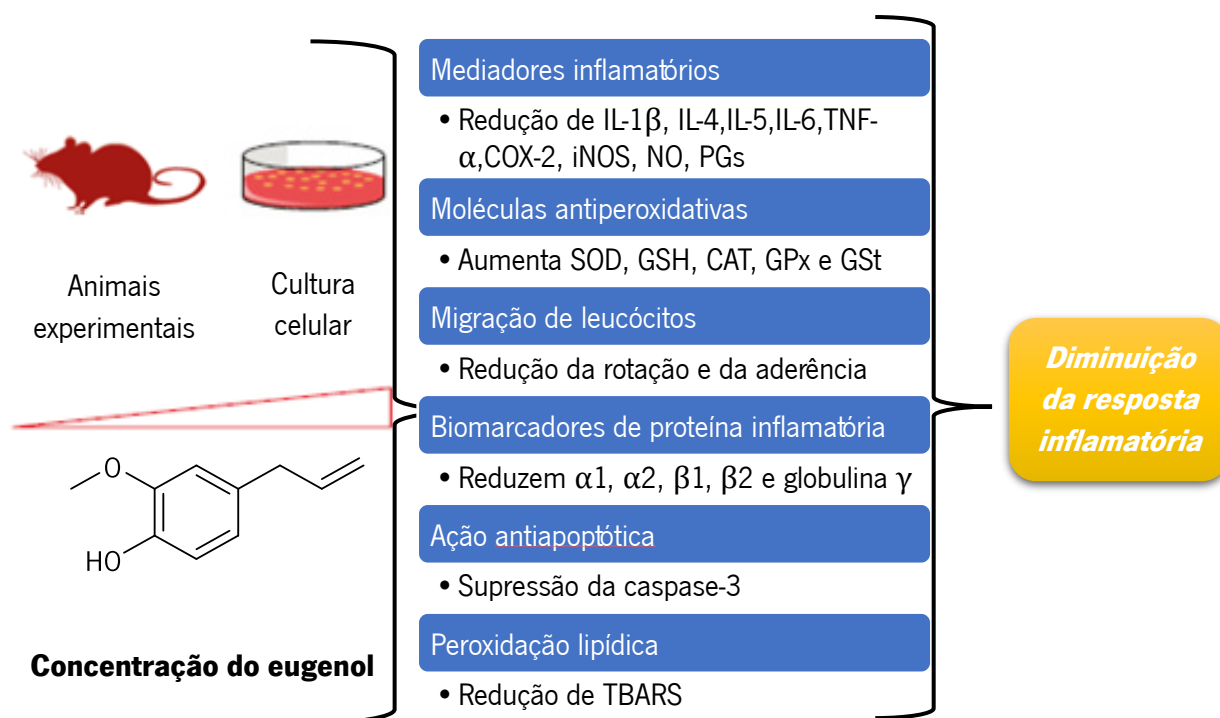


Figura 10-Mecanismos da resposta inflamatória, adaptado de (Barboza *et al.*, 2018).

Um outro estudo refere que o eugenol inibe a cicloxigenase-2 (COX-2) nos macrófagos, e assim inibe a síntese de prostaglandinas (PGs), resultantes da competição com o ácido araquidónico, pois o eugenol é capaz de resistir à libertação de mediadores pro-inflamatórios como a interleucina-1 β , o fator de necrose tumoral α e da prostaglandina E2 dos macrófagos (Pramod *et al.*, 2010).

Atividade antioxidante

Um dos mecanismos referentes à atividade antioxidante do eugenol e derivados, é relativa ao efeito protetor, conferido pelo eugenol, na peroxidação lipídica, mediada por metais explicada pela sua estrutura metoxifenólica. O eugenol, devido a estas propriedades, é usado como agente aromatizante em cosméticos e produtos alimentícios, e, também, como antisséptico em odontologia (Ito *et al.*, 2005).

Um estudo de Makuch afirma que o fenol do eugenol, o qual apresenta propriedades ácidas, está principalmente interligado com a atividade antioxidante, pois promove a eliminação de radicais livres de oxigénio (ROS), pela formação de radicais fenoxilo, devido à ressonância causada pela transferência de carga. Porém, a substituição do átomo de hidrogénio por heteroátomos aumenta as suas propriedades antioxidantes, como é o caso de ésteres de eugenol contendo átomos de cloro, que conseguem facilmente sequestrar as ROS, devido às mudanças no formato da molécula, como o seu tamanho, direção, alcance e polarização das ligações e mudança na simetria das partículas. O cloro provoca a polarização das ligações entre os átomos de carbono e cloro, que promove a redução da densidade da nuvem de eletrões em toda a molécula, causando polarização de todas as ligações próximas presentes na estrutura (Makuch *et al.*, 2020).

Os derivados do eugenol contendo grupos ésteres penetram melhor as membranas biológicas, o que tem um impacto positivo no aumento no transporte de substâncias ativas através destas membranas, sendo este fenómeno particularmente importante no caso de substâncias ativas, como antioxidantes. Estas substâncias ativas contêm alta atividade antioxidante e maior lipofilicidade, são uma alternativa para a obtenção de preparações cosméticas caracterizadas pela proteção duradoura contra ROS (Makuch *et al.*, 2020). A substituição do hidrogénio do grupo fenol por grupos alquila aumenta a sua atividade antioxidante (Topal *et al.*, 2017).

O eugenol causa supressão significativa da peroxidação lipídica e oxidação de lipoproteínas de baixa densidade. Os derivados do eugenol reduzem significativamente a oxidação dependente de cobre de lipoproteínas de baixa densidade e, ainda, peroxidação lipídica e auto-oxidação de Fe²⁺.

1.3.2. Aplicações do eugenol como conservante alimentar

Ao longo dos últimos anos, vários estudos têm vindo a ser realizados, de modo a usar o eugenol como conservante, seja no revestimento de embalagens ou dos produtos, como antioxidante, seja inserido na matriz do alimento, de modo a prevenir a ocorrência de crescimento e atividade microbiana, de forma a aumentar a vida útil do produto alimentício.

Veja-se o exemplo da *Escherichia coli* e do *Zygosaccharomyces rouxii* que são dois organismos que provocam alterações na matriz alimentar de sumos de fruta. Estudos da atividade antimicrobiana do eugenol, carvacrol e vanilina demonstraram que estes compostos bioativos apresentam potencial inibitório do crescimento *in vitro* da *E. coli* e *Z. rouxii*, usados individualmente ou em combinações binárias, sendo que, em combinação, exibem uma atividade aditiva ou sinérgica, a concentrações variáveis entre 0,025 mg/mL e 0,25 mg/mL, consoante o composto bioativo em questão, sendo mais eficaz o eugenol e o carvacrol. Estes factos comprovam que estes compostos bioativos podem ser usados como conservantes ou, ainda, como aditivos no processamento alimentar (Ribes *et al.*, 2019).

Outro exemplo é o robalo japonês, *Lateolabrax japonicus*, que apresenta uma ótima composição nutricional, devido à elevada quantidade de proteína e baixa quantidade de gordura. No seu estado cru apodrece rapidamente, tal como todos os peixes, uma vez que sofre elevada atividade microbiana e, também, devido às suas enzimas endógenas. Para combater este problema, estudaram-se emulsões de eugenol (0,075, 0,15 e 0,3% (p/v)) na presença de 1,5% de alginato de sódio no embalamento do robalo, usando armazenamento a frio (4°C). Comprovou-se que este revestimento para a embalagem suprime o crescimento microbiano, previne a oxidação lipídica e reduz mudanças nos metabolitos principais do robalo (Li *et al.*, 2020).

Outro exemplo ainda é a validade do pão que é reduzida devido à ocorrência de bolores, provocados por fungos como *Aspergillus niger*. Para resolver este problema, foi estudada a atividade sinérgica do eugenol e do citral. Devido ao dano na membrana celular do *A. Niger*, provocada pelo eugenol, e, ainda, a peroxidação lipídica da membrana, levando a uma libertação de ROS, provocada pelo citral, foi comprovado que estes dois compostos bioativos atuam na redução de bolores e apresentam um elevado potencial como antifúngicos ativos, sendo a concentração da MIC do eugenol em ação sinérgica com o citral 0,23 mg/mL (Ju, Xie, Yu, Guo, Cheng, Zhang, *et al.*, 2020). Outro estudo usando estes compostos bioativos contra *Penicillium roqueforti* comprovou serem uma potente combinação bacteriostática com potencial para atuarem como conservante natural (Ju, Xie, Yu, Guo, Cheng, Qian, *et al.*, 2020).

1.4. Carvacrol

O **carvacrol**, designação convencional do **5-isopropil-2-metilfenol**, representado na Figura 11, é um monoterpene fenólico presente em diversas plantas da flora mundial, como é o caso do *Origanum vulgare* e *Thymus vulgaris* (Figura 11), sendo as percentagens de carvacrol descritas na Tabela 3 (Burt, 2004; Memar *et al.*, 2017).



Figura 11-Estrutura química do carvacrol. Fontes do carvacrol: *Origanum vulgare* (orégano) e *Thymus vulgaris* (tomilho).

Tabela 3-Ocorrência e abundância de carvacrol em diferentes plantas (Burt, 2004; De Vincenzi *et al.*, 2004; Rai *et al.*, 2017).

Planta			Abundância em carvacrol (%)
Nome científico	Nome comum	Partes específicas	
<i>Origanum vulgare</i>	Orégano	Folhas	Vestigial – 80
<i>O. dictamnus</i>		-	58,8 – 82,3
<i>Thymus vulgaris</i>	Tomilho	Folhas	2 – 11
<i>Satureja montana</i>	Segurelha-das-montanhas	-	30 – 40

O carvacrol tem como fórmula química C₁₀H₁₄O, é altamente lipofílico, solúvel em tetracloreto de carbono, etanol, éter dietílico, acetona e insolúvel em água (Alagawany, 2015), como todos os compostos pertencentes à mesma classe, os terpenos.

O carvacrol é um componente significativo dos OEs e recentemente tem atraído atenção como resultado das suas propriedades biológicas, pela sua atividade antimicrobiana. Além desta atividade

apresenta ainda propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antibacterianas, antifúngicas, anticancerígenas, entre outras, como as representadas na Figura 12 (Alagawany, 2015).

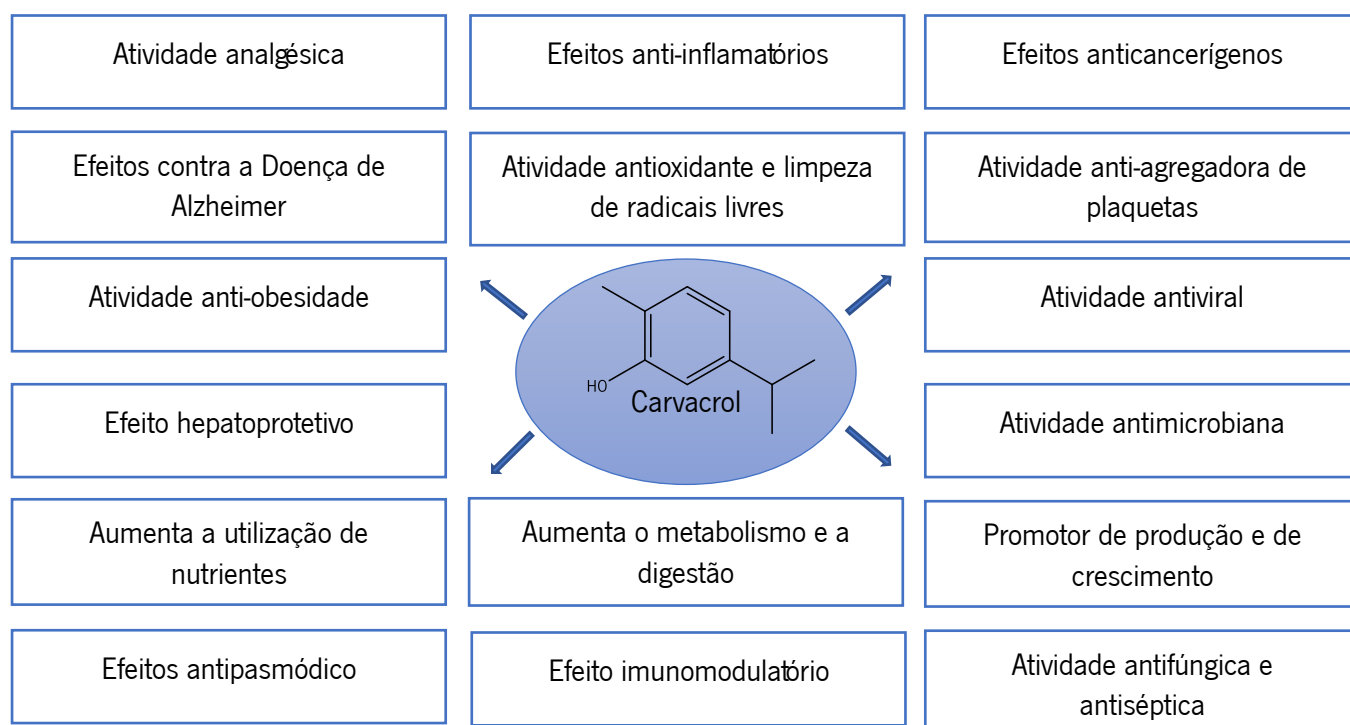


Figura 12-Propriedades do carvacrol, adaptado de (Alagawany, 2015).

1.4.1. Mecanismo de ação do carvacrol

Como descrito na figura anterior, Figura 13, o carvacrol tem diversas propriedades que lhe conferem várias atividades importantes.

Compostos hidrofóbicos, como o carvacrol, têm influência nas membranas biológicas, através de duas principais funções: função de barreira e transdução de energia, que permite à membrana formar gradientes de iões que levam a diversos processos, como, por exemplo, a formação de uma matriz para as proteínas embutidas na membrana (Ultee *et al.*, 1999). A característica de hidrofobicidade permite a interação com a membrana celular fúngica que interfere com a sua integridade, uma vez que interage com o ergosterol, permitindo uma maior permeabilidade, que por fim poderá causar a morte do micélio (Lima *et al.*, 2013; Nóbrega *et al.*, 2019). Estudos mostram que o carvacrol em comparação com o eugenol e o timol demonstra maior atividade antifúngica (Moussa *et al.*, 2020).

Atividade antibacteriana

Carvacrol consegue inibir o crescimento do biofilme pré-formado e interferir na formação do biofilme em superfícies de aço inoxidável, porque através da sua natureza anfipática, teorizou-se que a hidrofília relativa pode permitir a difusão do carvacrol através da matriz polissacarídea polar dos biofilmes, enquanto que as propriedades hidrofóbicas do carvacrol podem levar a interações específicas com a membrana bacteriana com efeitos consideráveis na estrutura e nas propriedades funcionais de forma a levar à perda da sua integridade (Suntres *et al.*, 2015).

O carvacrol consegue desintegrar a membrana externa das bactérias através da libertação de LPS, aumentando a permeabilidade da membrana citoplasmática a ATP, e, consequentemente, aumenta a fluidez da membrana, pois dissolve a bicamada fosfolipídica e assume lugar entre os ácidos gordos (Lima *et al.*, 2013). Este composto conduz ainda a uma diminuição do potencial da membrana sugerindo que a membrana se tornou mais permeável a prótons e a análise do potássio intracelular e extracelular revela que existe um aumento da permeabilidade da membrana celular a K^+ , sendo este ião importante na ativação de enzimas citoplasmáticas, na manutenção da pressão de turgescência e numa possível regulação do pH citoplasmático. O efluxo de iões de potássio é a primeira indicação de danos na bactéria que é provocada por influência na síntese de DNA e ainda na redução de atividades metabólicas e processos celulares, pois estes causam diminuição da viabilidade celular. Uma perda da integridade da membrana é devida a um distúrbio das interações hidrofóbicas entre lípidos e proteínas, fator importante quando consideramos a atividade de compostos tóxicos. O carvacrol interage com as membranas de *B. cereus* através da mudança da permeabilidade a catiões, como H^+ e K^+ , e a dissipação de gradientes de iões leva a um emparelhamento do processo essencial na célula que conduz à morte celular (Ultee *et al.*, 1999).

Atividade antioxidante

Radicais livres e espécies intermediárias reativas de oxigénio são geradas durante o metabolismo normal das células. Quando estes são acumulados excessivamente levam a danos nos tecidos e na provação de várias funções celulares. O carvacrol ao atuar como antioxidante natural, protege a célula dos ROS, atuando na redução da peroxidação lipídica que leva à destruição oxidativa das membranas celulares, e ainda no aumento de metabolitos tóxicos levando consequentemente à apoptose (Azirak & Rencuzogullari, 2008). Alguns estudos afirmam que o grupo OH ligado ao anel pode ser a razão da

elevada atividade antioxidante do carvacrol, quer *in vivo*, quer *in vitro* (Guimarães *et al.*, 2010). A reação do carvacrol com o radical livre é facilitada pelo seu caráter de ácido fraco, pois cede átomos de H aos elétrons desemparelhados, produzindo outro radical estabilizado pela dispersão eletrônica, gerando uma estrutura de ressonância para a molécula (Alagawany, 2015).

Atividade analgésica

As propriedades analgésicas do carvacrol mediadas pela inibição de mediadores periféricos, bem como mecanismos inibitórios centrais, podem estar relacionados à sua forte atividade antioxidante; foram demonstrados em vários outros modelos de algisia *in vivo*, onde o pré-tratamento de ratos-domésticos com o carvacrol foi eficaz no alívio da dor contra contorções e alongamentos induzidos pelo ácido acético, e ainda nas fases neurogênicas e inflamatórias da dor induzida pela formalina. Carvacrol diminui a peroxidação dos lipossomas fosfolipídicos na presença de ferro III e ascorbato, pelo facto ser um bom sequestrador de radicais peroxilo, gerados pela radiólise de pulso, que inibe a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), de maneira dependente da concentração num sistema *in vitro* usando células endoteliais da aorta humana para mediar a oxidação das LDL (Suntres *et al.*, 2015).

Atividade anticancerígena e antiplaquetária

Há estudos que demonstram o efeito do carvacrol como anticancerígeno e antiplaquetário *in vivo* e *in vitro* durante carcinoma de células hepáticas, tumores pulmonares e carcinogénese quimicamente induzida. A suplementação com carvacrol também aponta para a indução da fragmentação de DNA genómico e da expressão genética de enzimas como caspase 3, 6 ou 9. Ainda, induz a regulação de genes da apoptose no cancro da mama humano na linha celular MCF-7 (Alagawany, 2015).

Os efeitos anti proliferativos em linhas de cancro da mama humano metastático e em linhas de cancro de pulmão humano são demonstrados pela indução da apoptose pelo carvacrol associado a mudanças, como diminuições do potencial da membrana, libertação do citocromo C pela mitocôndria, ativação da caspase e ainda clivagem de PARP (polimerase poli (ADP-ribose)) e irregularidades no formato (Suntres *et al.*, 2015).

Atividade anti-inflamatória

O carvacrol mostra atividade anti-inflamatória devida à supressão da expressão da cicloxigenase 2 (COX-2), enzima que limita a relação na biossíntese de prostaglandinas, desempenhando um papel fundamental na inflamação, dor e homeostase circulatória, inibindo a ativação dos recetores ativados pelo proliferador de peroxissoma (PPAR) α e γ , a inibição da produção e as ações do óxido nítrico (Suntres *et al.*, 2015).

1.5. Polifenóis oxidases

As polifenóis oxidases (PPOs) estão largamente distribuídas na flora mundial, nos micróbios e em tecidos animais, e representam uma grande família de enzimas que contêm cobre (Cu), com dois locais de ligação para substratos fenólicos (Dwivedi, 2013).

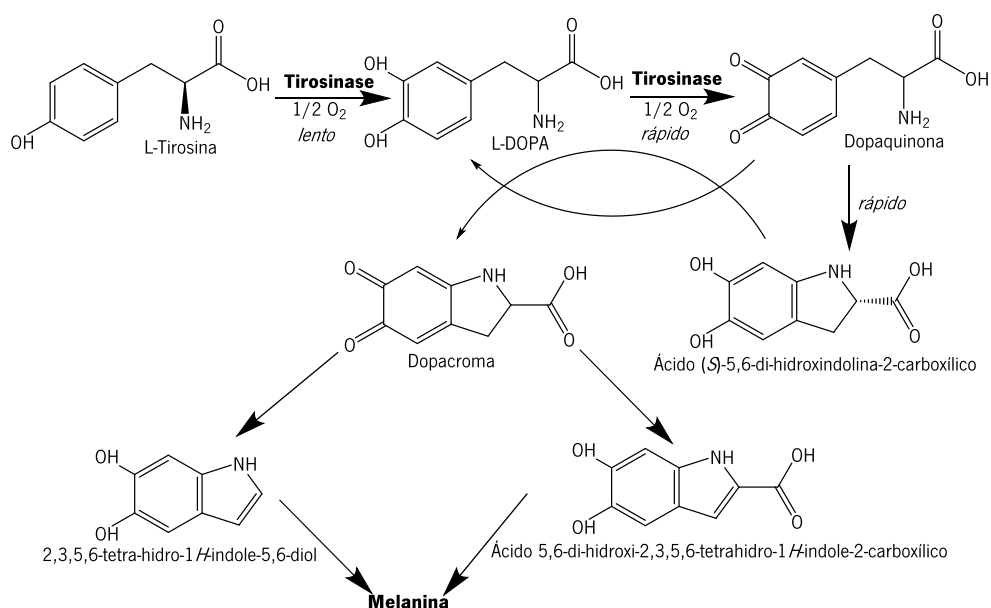
As PPOs podem ser encontradas em diversos seres vivos como nos animais, como é o caso do camarão, da lagosta, dos caranguejos e ainda, nos humanos e nos ratos. É também encontrada em diversos fungos como *Pycnoporou* spp., *Aspergillus niger*, *Pycnoporou sanguineus* e *Aspergillus* spp. Nas bactérias, podem ser vistas no caso de *Bacillus* spp., *Thermus* spp., *Streptomyces* spp. e *Thermoactinomyces* spp. Nas plantas, as PPOs são encontradas nas maçãs, nas bananas, nos pêssegos, no tubérculo da batata, nas sementes das favas e ainda em *Helianthus tubrosus*, *Pyrus communis* e *Crocus saliv*s (Dwivedi, 2013).

O papel fisiológico destas enzimas inclui a formação de pigmentos, a remoção do oxigênio molecular presente nos cloroplastos, a participação no sistema de defesa nas plantas, e ainda, no enraizamento induzido por feridas e na sua cicatrização (Dwivedi, 2013).

Estão ainda presentes em reações de escurecimento oxidativo de alimentos causando deterioração da qualidade dos alimentos, através da alteração das propriedades nutricionais e organoléticas (Dwivedi, 2013), sendo que estas reações diminuem a aceitação dos alimentos por parte do consumidor, e ainda a sua validade e valor.

Diferentes tipos de PPOs podem ser consideradas de acordo com a sua habilidade de oxidar diferentes tipos de compostos fenólicos.

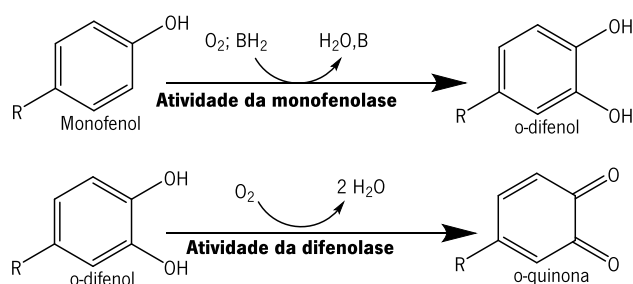
Um tipo de PPOs é a tirosinase, que pode ser encontrada em animais, como os humanos, sendo importante para o cabelo, para a pele e para a pigmentação dos olhos, devido à sua influência na via biossintética da melanina, presente no Esquema 1. Um segundo tipo é conhecido como polifenolase ou catecolase, e são encontradas em plantas como as maçãs, pêssegos, no tabaco e em folhas de chá, e, ainda, nos cogumelos, e são caracterizadas por catalisar dois tipos de reações, uma que envolve a hidroxilação do monofenol, que dá origem a um difenol, e outra que envolve a remoção de hidrogênio do difenol que será doado à quinona (Dwivedi, 2013).



Esquema 1-Via sintética da melanina, adaptado de (Murray, 2016).

A PPO realiza a o-hidroxilação de monofenóis, caracterizada pela atividade da monofenolase e a oxidação de difenóis em o-quinonas, é caracterizada pela atividade da difenolase, sendo o oxigênio o oxidante primário, representado no Esquema 2.

A atividade da monofenolase é também conhecida como hidroxilase ou cresolase e é sempre acoplada à atividade da difenolase, também conhecida como catecolase ou oxidase. Esta última não é sempre precedida da monofenolase (Dwivedi, 2013).



Esquema 2-Atividades das PPOs, adaptado de (Dwivedi, 2013).

Neste trabalho o foco foi a tirosinase, mais propriamente na inibição da atividade da difenolase, de modo a avaliar a capacidade de diferentes compostos para a atuação como potenciais novos

inibidores, naturais ou de origem natural, para serem integrados na matriz dos alimentos, permitindo diminuir o escurecimento oxidativo provocado pela tirosinase.

1.5.1. Tirosinase

A **tirosinase, monofenol monooxigenase** (E.C. 1.14.18.1), é uma proteína heterotetramérica binuclear tipo II, que contém átomos de cobre no seu local de ligação, como demonstrado na Figura 13 (Murray, 2016). O par de íons de cobre no local ativo da enzima promove a interação com ambos os oxigênios moleculares e com a estrutura fenólica, Figura 14 (Seo *et al.*, 2003).

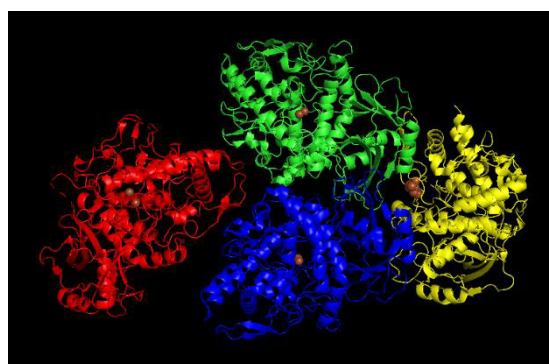


Figura 13-Estrutura da tirosinase obtida através da PDB.

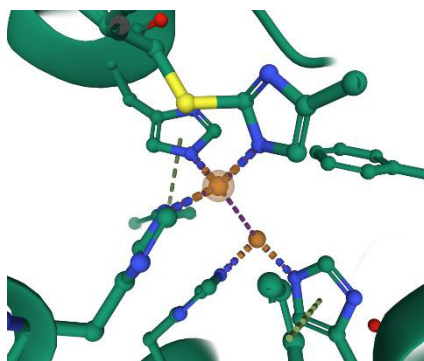
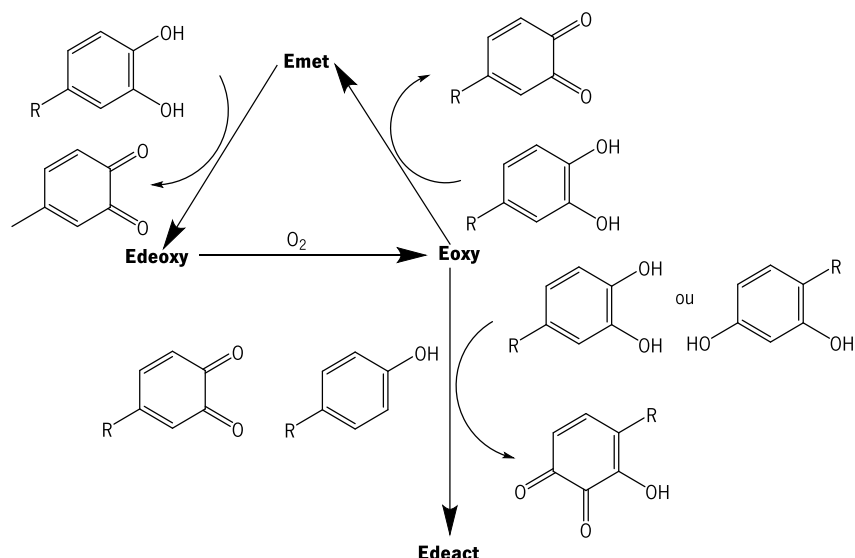


Figura 14-Ligação dos átomos de cobre aos resíduos de histidina.

A tirosinase apresenta quatro estruturas conformacionais dependendo do estado de oxidação dos íons de Cu, denominadas por *Emet*, *Edeoxy*, *Eoxy* e *Edeact* (Murray, 2016), demonstradas no Esquema 3. A formação *Emet*, relembrando a via de síntese da melanina, representada no Esquema 1, catalisa a oxidação da L-DOPA a dopaquinona (Murray, 2016).



Esquema 3-Diferentes estruturas conformacionais do local ativo da tirosinase, adaptado de (Murray, 2016).

1.5.1.1. Escurecimento enzimático

O escurecimento enzimático resulta da ação de um grupo de enzimas, nomeadamente a tirosinase, tendo lugar quando, na presença de oxigénio, a tirosinase e seus substratos fenólicos são misturados, após escovagem, descamação e operações de britagem, que levam à rutura da estrutura celular (Loizzo *et al.*, 2012).

Este acontecimento representa um dos maiores problemas da indústria alimentar, pois o escurecimento dos alimentos leva à diminuição da sua vida útil, à não aceitação do produto por parte do consumidor, levando à diminuição do seu valor no mercado (Dwivedi, 2013).

A tirosinase contém uma elevada afinidade para os isómeros L dos substratos, como é o exemplo da L-DOPA, também conhecida como levodopa, com nome IUPAC, ácido (S)-2-amino-3-(3,4-diidróxifenil) propanóico, representada na Figura 15 (Loizzo *et al.*, 2012).

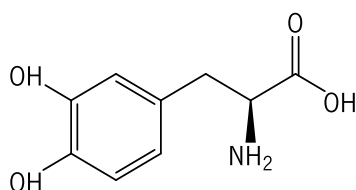


Figura 15-Estrutura química da L-DOPA.

Durante o processo de escurecimento, a o-quinona pode ser convertida em pigmentos de melanina escuros, através de uma série de reações enzimáticas e não enzimáticas. As o-quinonas são poderosos eletrófilos, podendo nucleofilicamente ser atacadas por uma molécula de água, outros polifenóis, aminoácidos, péptidos e proteínas, levando a uma adição de Michael.

Uma adição de Michael consiste na adição nucleofílica de um carboanião ou outro nucleófilo a um composto carbonilo alfa, que se encontra beta insaturado, representado no esquema da Figura 16.

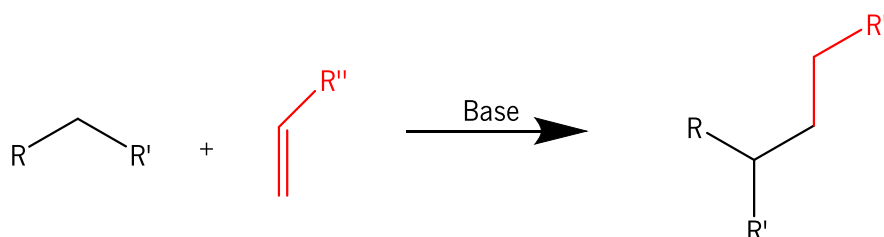


Figura 16-Adição de Michael.

As extremidades R e R' são dadores de Michael e estão presentes no nucleófilo e funcionam como grupos retiradores de elétrons, fazendo com que o H ácido forme um carboanião em resultado da reação com a base. O substituinte no alceno ativado é também chamado de aceitador de Michael (Mather *et al.*, 2006).

1.5.1.1.1. Inibidores da atividade da tirosinase

Para combater o escurecimento enzimático, a indústria alimentar tem utilizado diferentes técnicas convencionais, como o uso da autoclave e métodos de branqueamento, mas estas técnicas causam perdas de valor nutricional dos alimentos. Outra abordagem testada foi o uso da energia de microondas, mas devido ao gradiente de temperatura gerado, causa danos aos alimentos, mais propriamente ao cogumelo, elemento testado no estudo de Devec (Devec *et al.*, 1999).

Usualmente para combater a degradação de alimentos, a indústria alimentar adiciona à matriz alimentar, aditivos, que consistem em substâncias que têm como propósito manter ou modificar o sabor dos alimentos, melhorar a sua aparência, através da inibição do escurecimento enzimático, e ainda, prolongar o seu tempo de conservação. Muitas categorias de aditivos alimentares podem ser consideradas como acidulantes, regulares de acidez, antioxidantes, agentes espessantes, corantes e conservantes, emulsificantes, de entre muitos outros (Silva & Lidon, 2016).

Contudo, estes aditivos diminuem o valor nutricional dos alimentos, e portanto, há uma busca constante por inibidores da atividade da tirosinase de origem natural, pois estes são livres de quaisquer efeitos colaterais prejudiciais para o consumidor (Seo *et al.*, 2003).

Vários estudos demonstram que extratos metanólicos de plantas, como os obtidos das flores *Magnolia denudata* e a *M. denudata* var *purpurascens* apresentam atividade inibitória da tirosinase, representando valores IC₅₀ de 3,34 e 10,55 mg/mL (Loizzo *et al.*, 2012).

Exemplos destes efeitos são os demonstrados no estudo de Seo em que a partir de plantas superiores diversos inibidores podem ser considerados, como os polifenóis, aldeídos e outros derivados (Seo *et al.*, 2003).

Os flavonoides inibem a ação da tirosinase devido à sua capacidade de quelatar o cobre presente no sítio ativo da tirosinase, mas esta situação apenas é aplicável quando o grupo 3-hidroxilo está livre. Outros compostos, como por exemplo a luteolina 4'-*O*-glucósido e a luteolina 7-*O*-glucósido mesmo sem apresentarem o grupo 3-OH, apresentam atividade inibitória da ação da tirosinase (Seo *et al.*, 2003).

Compostos como os aldeídos e outros derivados, por exemplo, o *trans*-cinamaldeído e o cuminaldeído, o grupo aldeído reage com os grupos nucleofílicos biológicos, como o sulfidril, amino e grupos hidroxilo, promovendo a formação de uma base de Schiff com o grupo amina primário da enzima tirosinase (Kubo & Kinst-Hori, 1998).

Capítulo 2 – Materiais e Métodos

2.1. Reagentes

O dimetilsulfóxido (DMSO) foi obtido da empresa Enzymatic e a gentamicina foi adquirida da Sigma, dissolvida em água para obter as concentrações pretendidas ao estudo. O meio de cultura utilizado foi o Muller-Huiton tendo sido adquirido da empresa Sigma.

Para o estudo da inibição da tirosinase foram adquiridos os reagentes necessários a partir da empresa Sigma. A enzima polifenol oxidase foi obtida a partir de cogumelos *Agaricus bisporus*., o substrato utilizado foi a L-DOPA, e o inibidor de referência foi o ácido kójico.

2.2. Determinação da atividade antimicrobiana

2.2.1. Preparação dos microrganismos

Os microrganismos, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 e a *Salmonella typhi* ATCC 3076, bactérias Gram-negativas, *Staphylococcus aureus* ATCC 25623, bactéria Gram-positiva e um fungo diplóide *Candida albicans* ATCC 18804, foram colocados em crescimento na estufa a 37°C, durante 5 dias, em placas de petri.

De modo a obter uma suspensão bacteriana, inoculou-se cada um dos microrganismos em meio de cultura Muller-Huiton. Para cada ensaio mediu-se a absorbância das suspensões a 600 nm, para obter um CFU/mL entre 1×10^{-7} a 1×10^{-5} .

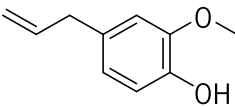
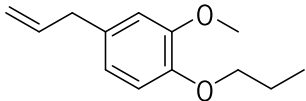
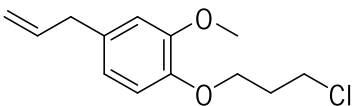
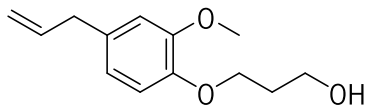
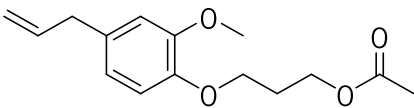
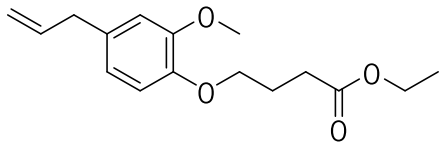
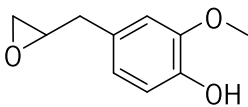
2.2.2. Preparação dos compostos

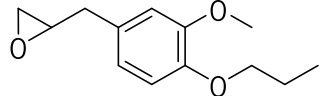
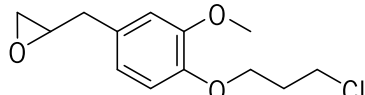
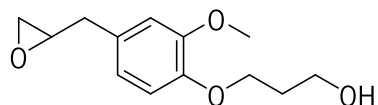
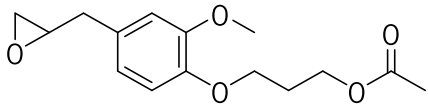
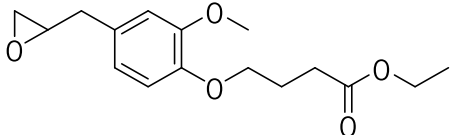
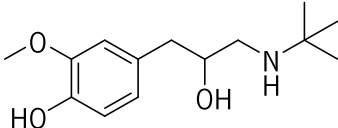
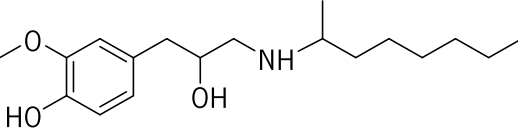
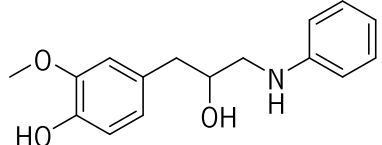
2.2.2.1. Obtenção dos compostos

O grupo de investigação da Universidade do Minho sintetizou diferentes compostos derivados de eugenol **1** (compostos **2-17**), designadamente dez *O*-alquilados, cinco dos quais contêm o anel de oxirano (compostos **8-12**), para além do oxirano diretamente obtido do eugenol (composto **7**); e cinco amino álcoois (**13-17**). Foi sintetizado o análogo **19** a partir da 6-hidroxi-2-fenilcromen-4-ona. O derivado *O*-alquilado do carvacrol **20** foi também obtido.

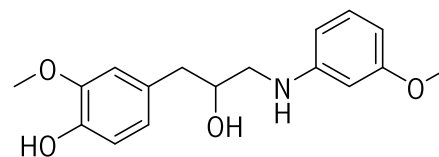
As estruturas de todos os compostos referidos são apresentadas na Tabela 4 (Fernandes *et al.*, 2020; Natal *et al.*, n.d.; Pinto *et al.*, n.d.) e foram utilizados nos testes de atividade biológica efetuados ao longo deste trabalho.

Tabela 4-Nomenclatura dos compostos testados.

Ref.	Nome do composto	Estrutura	Fórmula química
1	Eugenol		$C_{10}H_{12}O_2$
2	4-Alil-2-metoxi-1-propoxibenzeno		$C_{13}H_{18}O_2$
3	4-Alil-1-(3-cloropropoxi)-2-metoxibenzeno		$C_{13}H_{17}ClO_2$
4	3-(4-Alil-2-metoxifenoxi) propan-1-ol		$C_{13}H_{18}O_3$
5	Acetato de 3-(4-alil-2-metoxifenoxi) propilo		$C_{15}H_{20}O_4$
6	4-(4-Alil-2-metoxifenoxi) butanoato de etilo		$C_{16}H_{22}O_4$
7	2-Metoxi-4-(oxiran-2-ilmetil) fenol		$C_{10}H_{12}O_3$

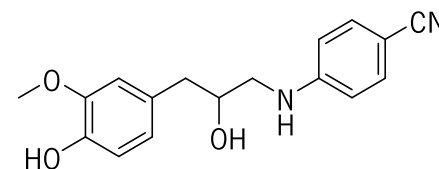
8	2-(3-Metoxi-4-propoxibenzil) oxirano		$C_{13}H_{18}O_3$
9	2-(4-(3-Cloropropoxi)-3-metoxibenzil) oxirano		$C_{13}H_{17}ClO_3$
10	3-(2-Metoxi-4-(oxiran-2-ilmetil) fenoxi) propan-1-ol		$C_{13}H_{18}O_4$
11	Acetato de 3-(2-metoxi-4-(oxiran-2-ilmetil) fenoxi) propilo		$C_{15}H_{20}O_5$
12	4-(2-Metoxi- 4-(oxiran-2-ilmetil) fenoxi) butanoato de etilo		$C_{16}H_{22}O_5$
13	4-(3-(<i>terc</i> -Butilamino)-2-hidroxiampil)-2-metoxifenol		$C_{14}H_{23}NO_3$
14	4-(2-hidroxi-3-((2-metiloctil) amino)propil)-2-metoxifenol		$C_{19}H_{33}NO_3$
15	4-(2-hidroxi-3-(fenilamino) propil)-2-metoxifenol		$C_{16}H_{19}NO_3$

16 4-(2-Hidroxi-3-((3-metoxifenil) amino) propil)-2-metoxifenol



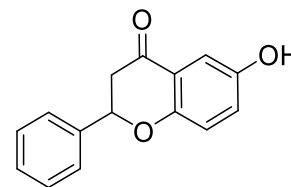
$C_{17}H_{21}NO_4$

17 4-((2-Hidroxi-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)propil)amino) benzonitrilo



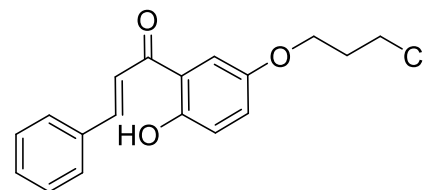
$C_{17}H_{18}N_2O_3$

18 6-Hidroxi-2-fenilcroman-4-ona (reagente comercial)



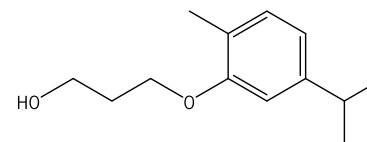
$C_{15}H_{12}O_3$

19 1-(5-(3-Cloropropoxi)-2-hidroxifenil)-3-fenilprop-2-en-1-ona



$C_{18}H_{17}ClO_3$

20 3-(5-Isopropil-2-metilfenoxi)propan-1-ol



$C_{13}H_{20}O_2$

O composto **1**, eugenol, o 4-alil-2-metoxifenol, foi extraído por hidrodestilação do cravinho-da-india (*Syzygium aromaticum*), com elevada pureza ($\geq 98\%$), obtendo-se um óleo de cor branca, com um rendimento de 14% (Fernandes *et al.*, 2020).

Os compostos **2**, 4-alil-2-metoxi-1-propoxibenzeno, o **3**, 4-alil-1-(3-cloropropoxi)-2-metoxibenzeno, o **4**, 3-(4-alil-2-metoxifenoxi) propan-1-ol, o **6**, 4-(4-alil-2-metoxifenoxi) butanoato de etilo, foram obtidos através da reação do composto **1** (eugenol) com o 1-bromopropano, 1-bromo-3-cloro-propano, 3-bromopropan-1-ol, 4-bromobutirato de etilo, respetivamente, obtendo um óleo de cor amarela clara, para os primeiros três e para o último um óleo incolor, com rendimentos entre 53% e 89% (Fernandes *et al.*, 2020).

A reação do composto **4** com anidrido acético resultou no composto **5**, acetato de 3-(4-alil-2-metoxifenoxi) propilo, um óleo amarelo-claro, com rendimento de 84%.

O composto **8** foi obtido a partir da reação do **2** com o ácido *m*-perclorobenzóico, na forma de um óleo amarelo, com um rendimento de 7%.

A reação dos compostos **3**, **4**, **5** e **6**, com o ácido *m*-cloroperbenzóico resultou nos compostos **9**, **10**, **11** e **12**, respetivamente, como óleo amarelos, com rendimentos para o **9** e para o **11** de 67%, para o **10** de 57% e para o composto **12** um rendimento de 13% (Fernandes *et al.*, 2020).

O composto **7** foi obtido da reação do eugenol **1** em diclorometano com ácido *m*-perclorobenzóico, tendo sido originado um óleo amarelo-escuro, num rendimento de 48%.

A partir do oxirano **7** foram obtidos os compostos **13**, **14**, **15**, **16** e **17**. O composto **13**, com rendimento de 42%, um óleo de cor laranja, foi obtido através da reação do 2-metilpropan-2-amino com o composto **7**. A reação do **7** com octa-2-amina resultou num óleo acastanhado, com um rendimento de 59%, o composto **14**. O composto **15** foi obtido através da reação do **7** com a anilina, resultando num óleo amarelo, com um rendimento de 36%. O composto **7** reagiu também com a 3-metoxianilina originando o composto **16**, um óleo de cor tendo sido obtido o composto **17**, um óleo amarelo-escuro, com um rendimento de 9% (Pinto et al., n.d.).

O compostos 1-(5-(3-cloropropoxi)-2-hidroxifenil)-3-fenilprop-2-en-1-ona **19** foi obtido através da reação da 6-hidroxi flavanona, designação convencional de 6-hidroxi-2-fenilcroman-4-ona **18**, reagente comercial, com 1-bromo-3-cloropropano em meio básico e temperatura ambiente (t.a.), usando hidróxido de cézio e iodeto de tetrabutylamónio (TBAI), em acetonitrilo, contendo peneiros moleculares (PMs).

O composto **20** foi obtido da reação do carvacrol, 5-isopropil-2-metilfenol, com o 3-bromopropan-1-ol, e surgiu na forma de um óleo incolor, com um rendimento de 8% (Natal *et al.*, n.d.).

2.2.3. Determinação da MIC

A determinação da MIC foi realizada através do Método de Microdiluições numa placa de 96 poços. Cada poço continha um volume total de 100 μ L, sendo que na primeira coluna (A) continha o controlo negativo, na segunda coluna (B) o controlo positivo e na terceira (C) o controlo veículo. As colunas D-F continham as concentrações analíticas dos compostos de 800, 400, 200, 100, 50 e 25 μ M.

Após inoculação a placa foi incubada a 37°C durante 24 horas. Os valores de MIC foram obtidos através da análise visual do crescimento microbiano, sendo a MIC determinada pela mais baixa concentração de compostos testados capaz de minimizar o crescimento bacteriano.

2.3. Avaliação da inibição da atividade da tirosinase

2.3.1. Preparação dos reagentes

Para o estudo da inibição da atividade da tirosinase, foi adquirida a enzima polifenol oxidase, tendo sido preparada em HBSS (50 000 U/mL). O substrato L-DOPA (20 mM) e o ácido kójico (35 mM), inibidor de referência, foram preparados em água.

2.3.2. Ensaio da atividade inibitória da tirosinase

Para o estudo da atividade inibitória da tirosinase, utilizou-se o método de Suganya, com algumas modificações (Suganya *et al.*, 2015). A 40 μ L de polifenol oxidase (250 U/mL), enzima usada neste ensaio, foi adicionado 40 μ L de cada composto (800 μ M), numa placa de 96 poços. A mistura resultante foi incubada a 37°C durante 10 minutos. Após a incubação, 40 μ L de L-DOPA (5 mM, para a atividade da difenolase) foram adicionados juntamente com 80 μ L de HBSS (pH=6.8), a cada poço da placa. A placa foi lida a 475 nm usando um leitor de ELISA durante 3 horas, a intervalos de 10 min. HBSS foi usado como controlo negativo e o ácido kójico (280 μ M) foi usado como controlo positivo.

A inibição de cada ensaio enzimático foi calculada através da seguinte fórmula:

$$\% \text{ Inibição} = \frac{(Abs_{\text{Controlo negativo}} - Abs_{\text{amostra}})}{Abs_{\text{Controlo negativo}}} \times 100$$

Cada procedimento foi realizado três vezes em triplicado (n=3).

2.4. Análise estatística

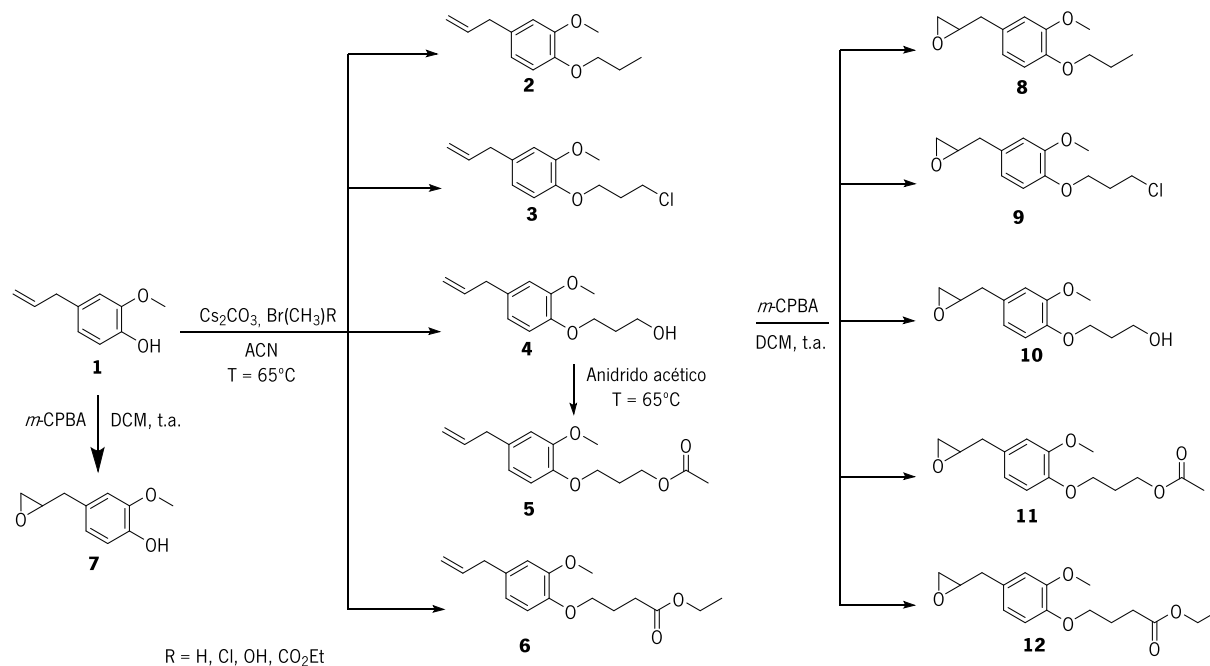
A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste Shapiro-Wilks e os “outliers” recorrendo ao teste de Grubb’s. A comparação entre tratamentos e controlos foi feita recorrendo ao teste ANOVA. Todas as experiências foram executadas pelo menos 3 vezes, em triplicado.

Capítulo 3 – Discussão de resultados

3.1. Compostos estudados nos ensaios biológicos

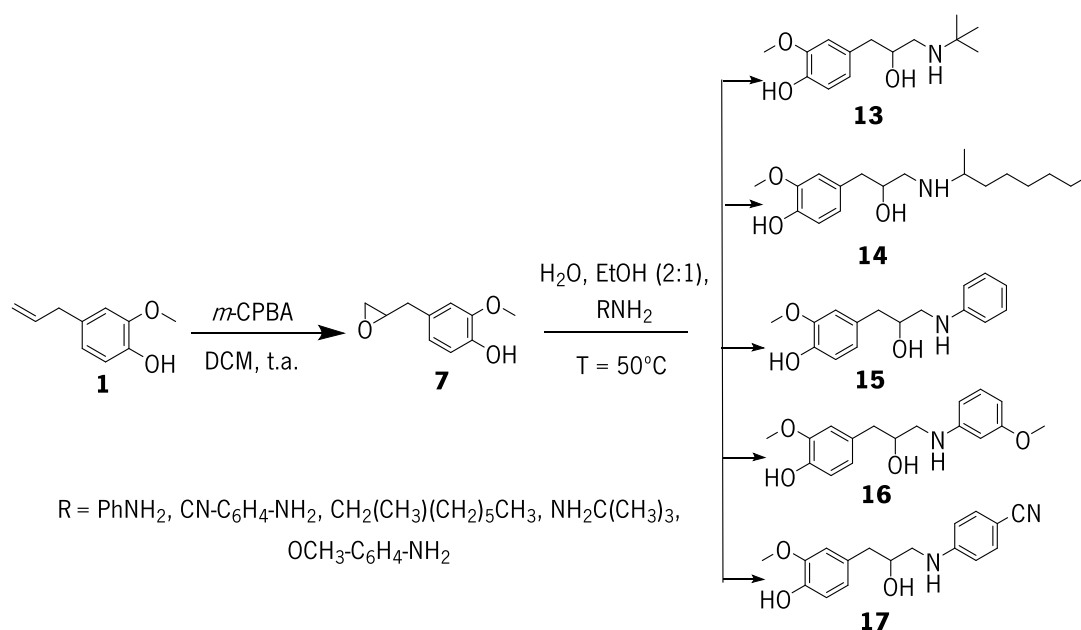
Os compostos testados ao longo deste trabalho são apresentados nos Esquemas 4-7.

No Esquema 4 surge o eugenol **1**, os derivados *O*-alquilados **2**, **3**, **4**, **5** e **6** e os oxiranos **8**, **9**, **10**, **11** e **12** correspondentes, assim como o oxirano do eugenol **7**.



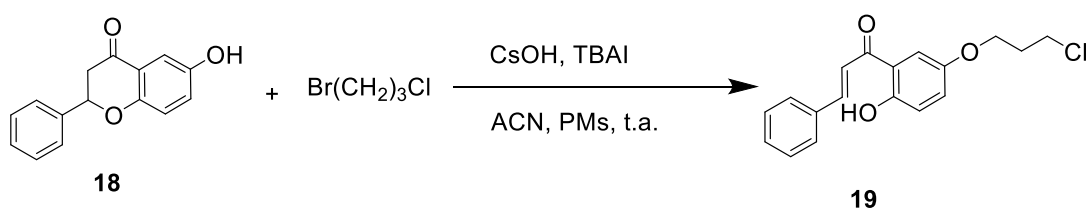
Esquema 4-Síntese dos derivados *O*-alquilados e oxiranos do eugenol **2-12**.

No Esquema 5 surgem os derivados do eugenol **1** resultantes da reação de abertura do anel de oxirano com aminas alifáticas (**13** e **14**) e aromáticas sem ou com substituintes no anel aromático (**15**, **16** e **17**).



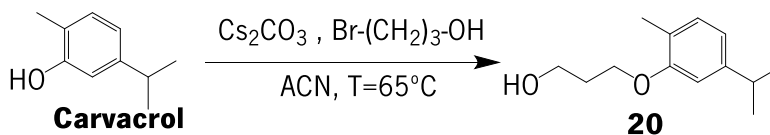
Esquema 5-Derivados do eugenol **14-17** resultantes do oxirano **7** e diferentes aminas.

No Esquema 6 surge a síntese do composto **19** por reação do composto **18** com 1-bromo-3-cloropropano em meio básico.



Esquema 6-Síntese do composto **19**.

No Esquema 7 surge o composto **20** resultante da *O*-alquilação do carvacrol, 5-isopropil-2-metilfenol.



Esquema 7-Reação de *O*-alquilação do carvacrol.

3.2. Atividade antimicrobiana

Como demonstrado na Tabela 5, é aparente a existência de uma relação estrutura-atividade no que diz respeito à atividade antimicrobiana dos compostos testados.

Os compostos que apresentam atividade antimicrobiana são o eugenol **1** e os seus derivados *O*-alquilados e oxiranos, como os compostos **2** e **12**, bem como o oxirano **7** e os seus derivados com diferentes aminas, os compostos **13**, **14**, **15** e **16**.

Particularmente, o composto **1** apresenta atividade contra a *E. coli*, *S. aureus* e *C. albicans* a uma concentração de 100 µM, e para a *P. aeruginosa* e *S. typhi* apresenta atividade a uma concentração de 800 µM.

A uma concentração de 200 µM, o composto **7**, apresenta atividade contra *C. albicans*, o **15** contra *E. coli* e *C. albicans*. O crescimento da *Escherichia coli* também é inibido a uma concentração de 200 µM pelos compostos **13**, **14** e **16**.

Os compostos **2** e **12** também apresentam atividade contra *S. aureus* e *C. albicans* a uma concentração de 800 µM.

Do ponto de vista da relação estrutura-atividade, o composto **1** apresenta atividade antimicrobiana, sendo que esta poderá dever-se ao grupo OH fenólico presente na sua estrutura, como descrito anteriormente. Esta situação também é visível nos compostos **7**, **13**, **14** e **16**, que têm também na sua estrutura um grupo OH fenólico. Esta atividade devida ao OH fenólico poderá resultar da ligação dos compostos em questão a proteínas impedindo a ação de enzimas (Marchese et al., 2017).

Como se verifica pela análise dos esquemas, existem outros compostos estudados com características estruturais análogas, mas nos quais o grupo OH fenólico está alquilado, e que não apresentam atividade antimicrobiana, o que poderá estar relacionado com a ausência do grupo OH fenólico livre, como é o caso dos compostos de **8**, **9**, **10**, **11**.

Os compostos **13**, **14** e **16** apresentam na sua estrutura um grupo com nitrogénio. A presença deste grupo pode promover a retirada de eletrões e, diretamente, a reação com ligações duplas substituídas com outros grupos de retirada de eletrões, promovendo a produção de ROS pelos compostos aromáticos levando a uma disrupção da membrana (Olea et al., 2019). A atividade do composto **16** poderá estar relacionada não apenas com o OH fenólico, mas também pela presença de um grupo fenilo substituído, bem como de um grupo com nitrogénio.

O composto **2**, apresenta um caráter de fenilpropanóide, que lhe confere um caráter lipofílico, podendo, assim, danificar a célula bacteriana ao penetrar a membrana lipídica (Triana *et al.*, 2019), provavelmente a razão pela qual este composto apresenta atividade antimicrobiana relevante.

O composto **12**, torna-se a exceção a estas percepções, pois não apresenta um grupo OH fenólico, nem características de fenilpropanóide, no entanto, apresenta uma atividade antimicrobiana relevante para *S. aureus* e *C. albicans*, podendo dever-se à presença de um maior número de carbonos envolvidos na sua cadeia alifática com propriedade éster.

O composto **18** é um reagente comercial e o **19** é o composto que advém da reação do **18** com 1-bromo-3-cloropropano. Estes compostos não apresentam atividade antimicrobiana, podendo isto dever-se à ausência de características de fenilpropanóide, apesar de na sua estrutura estar presente um grupo OH fenólico livre. Além disso, a presença de um halogênio terminal, o cloro, no composto **19** pode estar envolvido na inatividade antibacteriana deste composto.

O composto **20** é sintetizado através da reação do carvacrol com o 3-bromopropan-1-ol. O carvacrol apresenta atividade antibacteriana devido à presença de um grupo OH fenólico na sua estrutura e de um sistema deslocalizado de elétrons, que promove uma diminuição da variação de pH, resultando na ausência de uma força motriz de prótons e, conseqüentemente, na interrupção da síntese de ATP. A diminuição de ATP leva a um comprometimento de alguns processos essenciais na célula, podendo finalmente levar à morte celular (Ultee *et al.*, 2002). Neste caso, o composto **20** não apresenta um grupo OH fenólico o que poderá ser a razão pela qual este composto não apresenta atividade antimicrobiana.

Em geral, a relação estrutura-atividade, isto é, a presença de um grupo OH fenólico e características de fenilpropanóide, está relacionada com a atividade antimicrobiana, mas como descrito anteriormente existem algumas exceções a esta relação, podendo dever-se a diferentes características estruturais dos compostos em questão. Portanto, não se pode afirmar com certeza que a atividade antimicrobiana dos compostos estudados se deve à presença de um grupo OH fenólico ou a características de fenilpropanóide.

Tabela 5-Conclusão da MIC dos compostos testados (μM).

Compostos	Microrganismos				
	Gram negativa			Gram positiva	Fungo
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Salmonella typhi</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>
1	100	800	800	100	100
2	>800	>800	>800	800	800
3	>800	>800	>800	>800	>800
4	>800	>800	>800	>800	>800
5	>800	>800	>800	>800	>800
6	>800	>800	>800	>800	>800
7	>800	>800	>800	>800	200
8	>800	>800	>800	>800	>800
9	>800	>800	>800	>800	>800
10	>800	>800	>800	>800	>800
11	>800	>800	>800	>800	>800
12	>800	>800	>800	800	800
13	200	>800	>800	>800	>800
14	200	>800	>800	>800	800
15	200	>800	>800	>800	200
16	200	>800	>800	>800	>800
17	>800	>800	>800	>800	>800
18	>800	>800	>800	>800	>800
19	>800	>800	>800	>800	>800
20	>800	>800	>800	>800	>800

3.3. Atividade inibitória da tirosinase

De entre os compostos apresentados na Tabela 5, 18 compostos foram testados de modo a se perceber quais podiam ter atividade inibitória da ação da tirosinase.

Um composto pode ser considerado um inibidor da atividade da tirosinase dependendo de diferentes tipos de mecanismos, como por exemplo, através da ação como agentes redutores que causam redução química da dopaquinona a dopa, que evita a formação de dopacroma e melanina; através de eliminadores de α -dopaquinona; por inativadores de enzimas não específicos que desnaturam a enzima; inativadores específicos que podem ser catalisados pela tirosinase, e consequentemente, formam uma ligação covalente com a enzima, inativando-a irreversivelmente durante a reação catalítica; e ainda, inibidores específicos da tirosinase que se ligam reversivelmente e reduzem a sua capacidade catalítica. De todos estes mecanismos os mais usuais são os inibidores específicos que podem reversível ou irreversivelmente ligar-se à tirosinase e reduzem a sua capacidade catalítica (Chang, 2009), sendo considerados “verdadeiros inibidores”. O ácido kójico, representado na Figura 17, é um dos inibidores da tirosinase mais estudados, usado como agente de clareamento a pele e como aditivo alimentar para prevenir o escurecimento enzimático (Chen *et al.*, 1991).

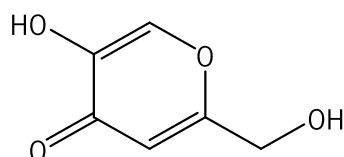


Figura 17-Estrutura química do ácido kójico.

O ácido kójico tem a habilidade de quelatar o cobre no local ativo da tirosinase, e é reportado como um inibidor de ligação lenta da atividade da difenolase da tirosinase (Cabanés *et al.*, 1994), atividade esta estudada neste trabalho.

Neste trabalho foi estudado a ação de diversos compostos, eugenol e os seus derivados, bem como um derivado do carvacrol, na inibição da atividade da difenolase da tirosinase. Para tal foi utilizado como controlo positivo o ácido kójico, sendo este um inibidor de referência da atividade da tirosinase. A concentração à qual o ácido kójico inibe a atividade da tirosinase é 280 μ M, o que é concordante com o IC_{50} encontrado na bibliografia (Cui *et al.*, 2018; Saghaie *et al.*, 2013). Os resultados referentes a esta atividade dos compostos testados estão presentes na Figura 18.

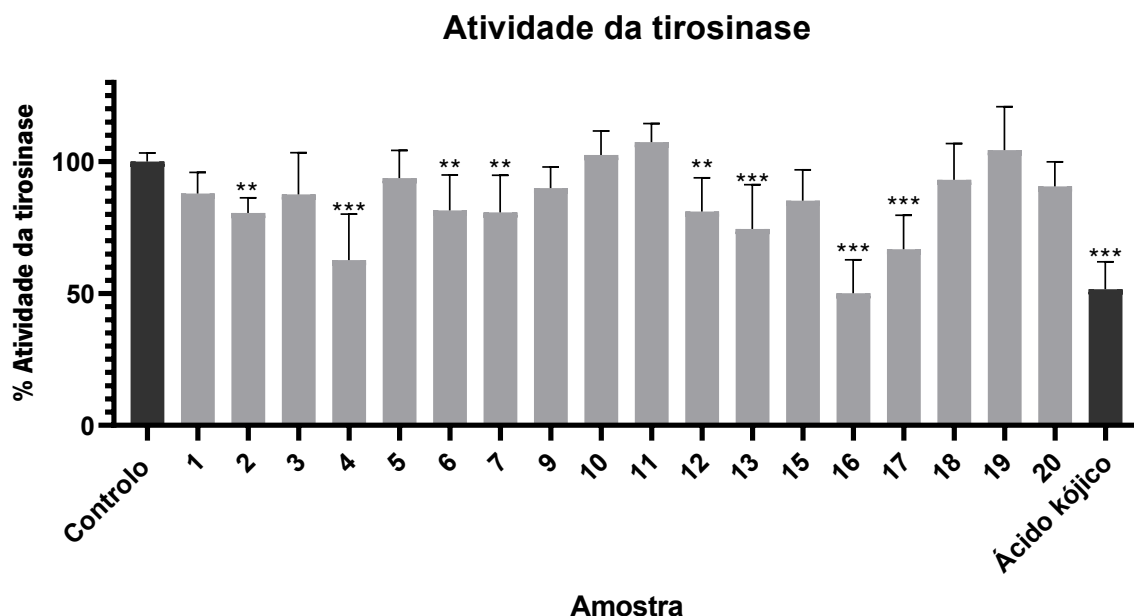


Figura 18- Atividade da tirosinase referente aos compostos testados.

Legenda: **- $p < 0.01$; ***- $p < 0.001$.

Pela análise dos resultados podemos constatar que os compostos com atividade mais significativa na diminuição da atividade da tirosinase são os compostos **4**, **16** e **17**, pois são aqueles em que a % de atividade da tirosinase está semelhante à do ácido kójico, o inibidor de referência.

O composto **4** é ativo na inibição da atividade da tirosinase, sendo que esta atividade pode dever-se à presença de um grupo OH na sua estrutura de fenilpropanóide, promovendo um ataque nucleofílico ao cobre presente no local ativo da tirosinase, e diretamente envolvido na transferência de prótons durante a catálise, impedindo assim a sua atividade (Loizzo et al., 2012; Seo et al., 2003).

Em comparação com os outros compostos testados, podemos dizer que a presença de um OH terminal na estrutura de fenilpropanóide é a razão pela qual o composto **4** ser o único dos derivados *O*-alquilados e oxiranos do eugenol a ter atividade contra a ação da tirosinase.

Os compostos **16** e **17** têm na sua estrutura vários grupos OH, o que segundo um estudo com o 2-hidroxitirosol (2-HT), estrutura representada na Figura 19, o que se apresenta estruturalmente relacionado com o substrato usado neste estudo, a L-DOPA, o que é plausível que o 2-HT funcione competitivamente com o substrato, o que poderá levar à inatividade da tirosinase (Uchida *et al.*, 2014), e consequentemente, à não produção de melanina, estando esta diretamente interligada com o escurecimento enzimático.

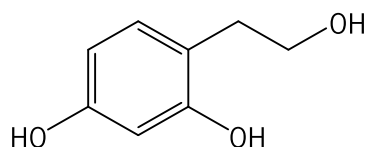


Figura 19-Estrutura química do 2-HT.

Além disso, estes compostos são os únicos dos derivados resultantes do oxirano **7** e diferentes aminas, com atividade o que além da presença de mais de um grupo OH na estrutura, poderá dever-se a um grupo fenilo substituído.

Em relação ao composto obtido da *O*-alquilação do carvacrol, o composto **20**, e os compostos **18**, reagente comercial, e o **19**, composto este obtido a partir do reagente comercial, não apresentam inibição da atividade da tirosinase, devido à presença de apenas um grupo OH na sua estrutura, bem como à não substituição do grupo fenilo.

Capítulo 4 – Conclusão e perspectivas futuras

Os produtos naturais têm vindo a ser usados como conservantes alimentares, como por exemplo o limão, o sal, o mel, de entre muitos outros, devido aos seus benefícios, como por exemplo as suas propriedades antimicrobianas e antioxidantes, de entre muitas outras descritas anteriormente.

Assim, o estudo destes produtos naturais tem sido cada vez mais frequente, e em especial neste trabalho, utilizou-se como produto natural, o cravinho-da-índia, mais propriamente o óleo essencial dele extraído, sendo um dos seus componentes, o eugenol.

O eugenol, tendo sido alvo já de diversos estudos, é um forte candidato a ser usado como conservante alimentar, sendo já usado como antisséptico na odontologia e na cosmética. Porém, o estudo de derivados do eugenol não é tão frequente, e, além disso, podem gerar-se uma vasta imensidão de derivados através de diferentes reações químicas.

Neste caso estudou-se o eugenol e seus derivados *O*-alquilados e oxiranos, bem como os derivados do oxirano com diferentes aminas, os β -amino álcoois e estudou-se ainda um derivado do carvacrol, um reagente comercial e um derivado deste.

Os compostos estudados foram obtidos através de diversos derivados com estruturas químicas variadas, designadamente contendo o grupo propoxilo ou outros grupos éter com cadeias alifáticas com diferentes terminais (grupos OH, CO₂Et ou Cl) e/ou oxiranos, assim como cadeias alifáticas com terminais amino substituídos com grupos alquilo ou fenilo, com ou sem substituintes, o que é motivo para a diferença de atividade entre os diversos compostos testados.

Os compostos estudados ora apresentaram atividade antimicrobiana ora atividade na inibição da tirosinase. Por um lado, os compostos que apresentaram atividade antimicrobiana são o eugenol **1** e alguns dos seus derivados, como os *O*-alquilados e os oxiranos, tais como os compostos **2** e **12**, bem como o oxirano **7** e os seus derivados com diferentes aminas, os compostos **13**, **14**, **15**, **16**. Por outro lado, os compostos com atividade na inibição da tirosinase são o derivado *O*-alquilado do eugenol o composto **4**, bem como os β -amino álcoois com aminas aromáticas, os compostos **16** e **17**.

Os compostos com atividade antimicrobiana atuam como inibidores do crescimento microbiano e promovem uma diminuição da ação destes microrganismos no local onde estes se encontram, como por exemplo nos alimentos. Sendo a ação destes microrganismos inibida, ocorre um aumento da vida útil dos alimentos, conduzindo ao não prejuízo da indústria alimentar.

No caso da inibição da atividade da tirosinase, os compostos com atividade são os derivados do eugenol, mais propriamente, os compostos **4**, derivado *O*-alquilado do eugenol, e os provenientes do oxirano com diferentes aminas, os compostos **16** e **17**. Estes derivados do eugenol apresentam esta característica devido às suas propriedades químicas conferidas na sua estrutura.

O composto **4** e o composto **17** ao apresentarem atividade de inibição da tirosinase, mesmo não apresentando atividade antimicrobiana relevante, podem na mesma vir a ser usados pela indústria alimentar, principalmente na inibição do escurecimento enzimático.

A inibição da tirosinase promove a inibição do escurecimento enzimático devido à interrupção da produção da melanina, molécula esta que provoca o aparecimento de manchas escuras nos alimentos. Dado isto, o uso destes compostos pela indústria alimentar é uma hipótese, sendo que estes compostos seriam inseridos mais propriamente na matriz alimentícia, de modo a diminuir a apodrecimento dos alimentos, e consequentemente, aumentar a sua vida útil dos mesmos, e aumentar o lucro dos produtores e vendedores, além de provocar uma maior procura, por parte dos consumidores, por estes alimentos, devido à sua aparência de produtos mais frescos.

A conjugação entre a atividade antimicrobiana e a inibição da tirosinase é a ideia ideal de um conservante alimentar, pois tanto diminui o crescimento e a ação dos microrganismos, bem como a atividade da tirosinase, enzima responsável pelo escurecimento enzimático.

De entre todos os compostos testados, o composto **16**, o 4-(2-hidroxi-3-((3-metoxifenil) amino) propil)-2-metoxifenol, apresenta tanto atividade antibacteriana, neste caso na inibição do crescimento de *Escherichia coli* a uma MIC de 200 µM, e ainda, atividade na inibição da tirosinase, com cerca duma diminuição de 50% da atividade da difenolase da enzima tirosinase.

Este composto **16**, dado as suas características e a sua atividade torna-se o composto chave deste trabalho, pois atua tanto como agente antibacteriano, como inibidor da tirosinase. Estas duas atividades em conjunto sugerem que este composto, o 4-(2-hidroxi-3-((3-metoxifenil) amino) propil)-2-metoxifenol, pode vir a ser usado como conservante alimentar.

De modo que tanto o composto **16** bem como os outros compostos possam vir a ser usados pela indústria alimentar é necessário proceder a testes na matriz alimentícia, de modo a avaliar estas atividades e confirmar a inibição do crescimento de microrganismos bem como a inibição do escurecimento enzimático.

Além disso, em futuros estudos é necessário testar outros derivados destes compostos mantendo a mesma tipologia de estrutura, ou seja, os mesmos grupos funcionais, de modo a avaliar a sua atividade antimicrobiana e, ainda, a inibição da atividade da tirosinase, de modo a se poder chegar a uma relação estrutura-atividade.

O uso destes compostos provenientes de produtos naturais é muito importante, pois diminui os malefícios, que os produtos químicos, usados usualmente como conservantes alimentares, provocam nos consumidores. No caso da indústria alimentar torna-se cada vez mais iminente a procura destes compostos de modo a diminuir o desperdício alimentar, que têm consequências negativas tanto para o ambiente, como para a economia da própria indústria, que se encontra avaliada em 2.59 bilhões de dólares.

Capítulo 5 – Referências bibliográficas

- Ahmad, A., Khan, A., Yousuf, S., Khan, L. A., & Manzoor, N. (2010). Proton translocating ATPase mediated fungicidal activity of eugenol and thymol. *Fitoterapia*, 81(8), 1157–1162. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2010.07.020>
- Alagawany, M. (2015). Biological Effects and Modes of Action of Carvacrol in Animal and Poultry Production and Health - A Review. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, 3(2s), 73–84. <https://doi.org/10.14737/journal.aavs/2015/3.2s.73.84>
- Almeida, D. F. L. dos S. (2017). *Estudo das Vias Metabólicas das Plantas na Síntese de Pigmentos Naturais*. Universidade Fernando Pessoa.
- Alupului, A., Călinescu, I., & Lavric, V. (2012). Microwave Extraction of active principles from medicinal plants. *UPB Scientific Bulletin, Series B: Chemistry and Materials Science*, 74(2), 129–142.
- Asbahani, A. El, Miladi, K., Badri, W., Sala, M., Addi, E. H. A., Casabianca, H., Mousadik, A. El, Hartmann, D., Jilale, A., Renaud, F. N. R., & Elaissari, A. (2015). Essential oils: From extraction to encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics*, 483(1–2), 220–243. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.12.069>
- Ashrafudoulla, M., Mizan, M. F. R., Ha, A. J. won, Park, S. H., & Ha, S. Do. (2020). Antibacterial and antibiofilm mechanism of eugenol against antibiotic resistance *Vibrio parahaemolyticus*. *Food Microbiology*, 91(April 2019), 103500. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103500>
- Azirak, S., & Rencuzogullari, E. (2008). The in vivo genotoxic effects of carvacrol and thymol in rat bone marrow cells. *Environmental Toxicology*, 23(6), 728–735. <https://doi.org/10.1002/TOX.20380>
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M. H. A., Ghafoor, K., Norulaini, N. A. N., & Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426–436. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>
- Barboza, J. N., da Silva Maia Bezerra Filho, C., Silva, R. O., Medeiros, J. V. R., & de Sousa, D. P. (2018). An overview on the anti-inflammatory potential and antioxidant profile of eugenol. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/3957262>
- Bauer, K., Garbe, D., & Surburg, H. (2006). *Common Fragrance and Flavor Materials* (4^a). Wiley - VCH, Weinheim. <https://doi.org/10.1002/3527608214>
- Bot, C., & Prodan, C. (2009). Probing the membrane potential of living cells by dielectric spectroscopy.

- European Biophysics Journal*, 38(8), 1049–1059. <https://doi.org/10.1007/s00249-009-0507-0>
- Bruneton, J., Villar, F. A., Carretero, A. E., & Rebuelta, L. M. (2001). *Farmacognosia, fitoquímica, plantas medicinales* (Editorial Acribia (ed.); 2ª). [https://books.google.pt/books?hl=pt-PT&lr=&id=2UXvAQAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR2&dq=Bruneton+J.+Pharmacognosie,+phytochimie,+plantes+médicinales.+3e+éd.+Paris:+Tec+%26+Doc%3B+1999&ots=luqxhok50a&sig=Koibx6mKyxaurSveCMPeAyrkZ7Y&redir_esc=y#v=onepage&q=Bruneton J.](https://books.google.pt/books?hl=pt-PT&lr=&id=2UXvAQAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR2&dq=Bruneton+J.+Pharmacognosie,+phytochimie,+plantes+médicinales.+3e+éd.+Paris:+Tec+%26+Doc%3B+1999&ots=luqxhok50a&sig=Koibx6mKyxaurSveCMPeAyrkZ7Y&redir_esc=y#v=onepage&q=Bruneton+J.)
- Burt, S. (2004). Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods - A review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223–253. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>
- Cabanes, J., Chazarra, S., & Garcia-Carmona, F. (1994). Kojic Acid, a Cosmetic Skin Whitening Agent, is a Slow-binding Inhibitor of Catecholase Activity of Tyrosinase. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 46(12), 982–985. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1994.tb03253.x>
- Carson, C. F., Hammer, K. A., & Riley, T. V. (1995). Broth micro-dilution method for determining the susceptibility of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Microbios*, 82(332), 181–185.
- Carson, C., & Riley, T. V. (1995). Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Journal of Applied Microbiology*, 78, 264–269. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1995.tb05025.x>
- Castro, P. R. C., Kluge, R. A., & Peres, L. E. P. P. P.-P. (2005). *Manual de fisiologia vegetal: teoria e prática* (Piracicaba (ed.); 1ª). Agronômica Ceres.
- Chang, T. S. (2009). An updated review of tyrosinase inhibitors. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(6), 2440–2475. <https://doi.org/10.3390/ijms10062440>
- Chen, J. S., Wei, C. I., & Marshall, M. R. (1991). Inhibition mechanism of kojic acid on polyphenol oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39(11), 1897–1901. <https://doi.org/10.1021/jf00011a001>
- Chopra, I. (2010). Capítulo 2. In R. G. Finch, D. Greenwood, S. R. Norrby, & R. J. B. T.-A. and C. (Ninth E. Whitley (Eds.), *Modes of action* (pp. 10–23). W.B. Saunders. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-4064-1.00002-6>
- Cui, H. X., Duan, F. F., Jia, S. S., Cheng, F. R., & Yuan, K. (2018). Antioxidant and tyrosinase inhibitory

- activities of seed oils from *torreya grandis* Fort. ex Lindl. *BioMed Research International*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/5314320>
- Cuyckens, F., & Claeys, M. (2004). Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *Journal of Mass Spectrometry*, 39(1), 1–15. <https://doi.org/10.1002/jms.585>
- Daferera, D. J., Ziogas, B. N., & Polissiou, M. G. (2000). GC-MS Analysis of Essential Oils from Some Greek Aromatic Plants and Their Fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(6), 2576–2581. <https://doi.org/10.1021/jf990835x>
- Das, B., Mandal, D., Dash, S. K., Chattopadhyay, S., Tripathy, S., Dolai, D. P., Dey, S. K., & Roy, S. (2016). Eugenol Provokes ROS-Mediated Membrane Damage-Associated Antibacterial Activity against Clinically Isolated Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains . *Infectious Diseases: Research and Treatment*, 9, IDRT.S31741. <https://doi.org/10.4137/idrt.s31741>
- De Almeida, A. L., Caleffi-Ferracioli, K. R., De Scodro, R. B., Baldin, V. P., Montaholi, D. C., Spricigo, L. F., Nakamura-Vasconcelos, S. S., Hegeto, L. A., Sampiron, E. G., Costacurta, G. F., Dos Yamazaki, D. A., F Gauze, G. De, Siqueira, V. L., & Cardoso, R. F. (2019). Eugenol and derivatives activity against *Mycobacterium tuberculosis*, nontuberculous mycobacteria and other bacteria. *Future Microbiology*, 14(4), 331–344. <https://doi.org/10.2217/fmb-2018-0333>
- De Paula, S. B., Bartelli, T. F., Di Raimo, V., Santos, J. P., Morey, A. T., Bosini, M. A., Nakamura, C. V., Yamauchi, L. M., & Yamada-Ogatta, S. F. (2014). Effect of eugenol on cell surface hydrophobicity, adhesion, and biofilm of *Candida tropicalis* and *Candida dubliniensis* isolated from oral cavity of HIV-infected patients. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/505204>
- De Vincenzi, M., Stamatou, A., De Vincenzi, A., & Silano, M. (2004). Constituents of aromatic plants: carvacrol. *Fitoterapia*, 75, 801–804. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2004.05.002>
- Devece, C., Neptuno Rodríguez-López, J., Fenoll, L. G., Tudela, J., Catalá, J. M., De Los Reyes, E., & García-Cá, F. (1999). Enzyme Inactivation Analysis for Industrial Blanching Applications: Comparison of Microwave, Conventional, and Combination Heat Treatments on Mushroom Polyphenoloxidase Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(11), 4506–4511. <https://doi.org/10.1021/jf981398>
- Devi, K. P., Nisha, S. A., Sakthivel, R., & Pandian, S. K. (2010). Eugenol (an essential oil of clove) acts

- as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. *Journal of Ethnopharmacology*, 130(1), 107–115. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.04.025>
- Dudareva, N., Negre, F., Nagegowda, D. A., & Orlova, I. (2006). Plant Volatiles: Recent Advances and Future Perspectives. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 25(5), 417–440. <https://doi.org/10.1080/07352680600899973>
- Dwivedi, A. kumar. (2013). Polyphenol Oxidase Enzyme: a Review. In *Transdisciplinary Environmental Issues* (pp. 39–88). LAP LAMBERT Academic Publishing.
- Faleiro M.L. (2011). The mode of antibacterial action of essential oils. *Science against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances*, 3(3), 1143–1156.
- Felipe, L. O., & Bicas, J. L. (2017). Química e Sociedade. *Química e Sociedade*, 39(2), 120–130. <https://doi.org/10.21577/0104-8899.20160068>
- Fernandes, M. J. G., Pereira, R. B., Pereira, D. M., Fortes, A. G., Castanheira, E. M. S., & Gonçalves, M. S. T. (2020). New eugenol derivatives with enhanced insecticidal activity. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(23), 1–14. <https://doi.org/10.3390/ijms21239257>
- Fungal Diseases Homepage | CDC. (2020). *Cdc.gov*.
- Guimarães, A. G., Oliveira, G. F., Melo, M. S., Cavalcanti, S. C. H., Antonioli, A. R., Bonjardim, L. R., Silva, F. A., Santos, J. P. A., Rocha, R. F., Moreira, J. C. F., Araújo, A. A. S., Gelain, D. P., & Quintans-Júnior, L. J. (2010). Bioassay-guided evaluation of antioxidant and antinociceptive activities of carvacrol. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 107(6), 949–957. <https://doi.org/10.1111/J.1742-7843.2010.00609.X>
- Gustafson, J. E., Liew, Y. C., Chew, S., Markham, J., Bell, H. C., Wyllie, S. G., & Warmington, J. R. (1998). Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology*, 26(3), 194–198. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.1998.00317.x>
- Helander, I. M., Alakomi, H. L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E. J., Gorris, L. G. M., & Von Wright, A. (1998). Characterization of the Action of Selected Essential Oil Components on Gram-Negative Bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(9), 3590–3595. <https://doi.org/10.1021/jf980154m>
- Herrera, M. C., & Luque De Castro, M. D. (2005). Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from strawberries prior to liquid chromatographic separation and photodiode array ultraviolet

- detection. *Journal of Chromatography A*, 1100(1), 1–7.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.09.021>
- Hyldgaard, M., Mygind, T., & Meyer, R. L. (2012). Essential oils in food preservation: Mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology*, 3(JAN), 1–24.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00012>
- Ito, M., Murakami, K., & Yoshino, M. (2005). Antioxidant action of eugenol compounds: Role of metal ion in the inhibition of lipid peroxidation. *Food and Chemical Toxicology*, 43(3), 461–466.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2004.11.019>
- Jaganathan, Saravana Kumar; Supriyanto, E. (2012). Antiproliferative and Molecular Mechanism of Eugenol-Induced Apoptosis in Cancer Cells. *Molecules*, 17(6), 6277–6289.
<https://doi.org/10.3390/molecules17066290>
- Ju, J., Xie, Y., Yu, H., Guo, Y., Cheng, Y., Qian, H., & Yao, W. (2020). Analysis of the synergistic antifungal mechanism of eugenol and citral. *Lwt*, 123(February), 109128.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109128>
- Ju, J., Xie, Y., Yu, H., Guo, Y., Cheng, Y., Zhang, R., & Yao, W. (2020). Synergistic inhibition effect of citral and eugenol against *Aspergillus niger* and their application in bread preservation. *Food Chemistry*, 310(September 2019), 125974. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125974>
- Karpouhtsis, I., Pardali, E., Feggou, E., Kokkini, S., Scouras, Z. G., & Mavragani-Tsipidou, P. (1998). Insecticidal and Genotoxic Activities of Oregano Essential Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(3), 1111–1115. <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
- Khalil, A. A., Rahman, U. U., Khan, M. R., Sahar, A., Mehmood, T., & Khan, M. (2017). Essential oil eugenol: Sources, extraction techniques and nutraceutical perspectives. *RSC Advances*, 7(52), 32669–32681. <https://doi.org/10.1039/c7ra04803c>
- Khan, A., Ahmad, A., Akhtar, F., Yousuf, S., Xess, I., Khan, L. A., & Manzoor, N. (2011). Induction of oxidative stress as a possible mechanism of the antifungal action of three phenylpropanoids. *FEMS Yeast Research*, 11(1), 114–122. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2010.00697.x>
- Kitaoka, N., Lu, X., Yang, B., & Peters, R. J. (2015). The application of synthetic biology to elucidation of plant mono-, sesqui- and di-terpenoid metabolism. *Molecular Plant*, 8(1), 6–16.
<https://doi.org/10.1016/j.molp.2014.12.002>

- Kourkoutas, Y., & Proestos, C. (2020). Food Preservation : Challenges and Efforts for. *Foods*, 9(391), 1–2.
- Kubo, I., & Kinst-Hori, I. (1998). Tyrosinase Inhibitors from Cumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(12), 5338–5341. <https://doi.org/10.1021/jf980226>
- Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. J., & Nychas, G. J. E. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 91(3), 453–462. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01428.x>
- Lens - Lisvonne, C., Cremieux, A., Maillard, C., & Balansard, G. (1987). Methodes d'evaluation de l'activite' antibacterienne des huiles essentielles: application aux essences de thym et de cannelle. *Journal Od Pharmacie de Belgique*, 42(5), 297–302.
- Li, P., Peng, Y., Mei, J., & Xie, J. (2020). Effects of microencapsulated eugenol emulsions on microbiological, chemical and organoleptic qualities of farmed Japanese sea bass (*Lateolabrax japonicus*) during cold storage. *Lwt*, 118(August 2019), 108831. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108831>
- Lima, I. O., De Oliveira Pereira, F., De Oliveira, W. A., De Oliveira Lima, E., Menezes, E. A., Cunha, F. A., & De Fátima Formiga Melo Diniz, M. (2013). Antifungal activity and mode of action of carvacrol against *Candida albicans* strains. *Journal of Essential Oil Research*, 25(2), 138–142. <https://doi.org/10.1080/10412905.2012.754728>
- Loizzo, M. R., Tundis, R., & Menichini, F. (2012). Natural and Synthetic Tyrosinase Inhibitors as Antibrowning Agents: An Update. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11(4), 378–398. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2012.00191.x>
- Lubbe, A., & Verpoorte, R. (2011). Cultivation of medicinal and aromatic plants for specialty industrial materials. *Industrial Crops and Products*, 34(1), 785–801. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.01.019>
- Maffei, M. E. (2010). Sites of synthesis, biochemistry and functional role of plant volatiles. *South African Journal of Botany*, 76(4), 612–631. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2010.03.003>
- Makuch, E., Nowak, A., Günther, A., Pełech, R., Kucharski, Ł., Duchnik, W., & Klimowicz, A. (2020). Enhancement of the antioxidant and skin permeation properties of eugenol by the esterification of eugenol to new derivatives. *AMB Express*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/s13568-020-01122-3>

- Marchese, A., Barbieri, R., Coppo, E., Orhan, I. E., Daglia, M., Nabavi, S. F., Izadi, M., Abdollahi, M., Nabavi, S. M., & Ajami, M. (2017). Antimicrobial activity of eugenol and essential oils containing eugenol: A mechanistic viewpoint. *Critical Reviews in Microbiology*, 43(6), 668–689. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2017.1295225>
- Marino, M., Bersani, C., & Comi, G. (2001). Impedance measurements to study the antimicrobial activity of.pdf. *International Journal of Food Microbiology*, 67, 187–195. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168160504001680>
- Masango, P. (2005). Cleaner production of essential oils by steam distillation. *Journal of Cleaner Production*, 13(8), 833–839. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2004.02.039>
- Mason, T. J., Paniwnyk, L., & Lorimer, J. P. (1996). The uses of ultrasound in food technology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 3(3), 253–260. [https://doi.org/10.1016/S1350-4177\(96\)00034-X](https://doi.org/10.1016/S1350-4177(96)00034-X)
- Mather, B. D., Viswanathan, K., Miller, K. M., & Long, T. E. (2006). Michael addition reactions in macromolecular design for emerging technologies. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 31(5), 487–531. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2006.03.001>
- Memar, M. Y., Raei, P., Alizadeh, N., Aghdam, M. A., & Kafil, H. S. (2017). Carvacrol and thymol: Strong antimicrobial agents against resistant isolates. *Reviews in Medical Microbiology*, 28(2), 63–68. <https://doi.org/10.1097/MRM.0000000000000100>
- Mishra, S., Sachan, A., & Sachan, S. G. (2013). Production of natural value-added compounds: An insight into the eugenol biotransformation pathway. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 40(6), 545–550. <https://doi.org/10.1007/s10295-013-1255-9>
- Mith, H., Duré, R., Delcenserie, V., Zhiri, A., Daube, G., & Clinquart, A. (2014). Antimicrobial activities of commercial essential oils and their components against food-borne pathogens and food spoilage bacteria. *Food Science & Nutrition*, 2(4), 403–416. <https://doi.org/10.1002/fsn3.116>
- Moussa, H., El Omari, B., Chefchaou, H., Tanghort, M., Mzabi, A., Chami, N., & Remmal, A. (2020). Action of thymol, carvacrol and eugenol on *Penicillium* and *Geotrichum* isolates resistant to commercial fungicides and causing postharvest citrus decay. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 00(00), 1–9. <https://doi.org/10.1080/07060661.2020.1767692>
- Murray, A. F. (2016). *Tyrosinase inhibitors identified from phytochemicals and their mechanism of control* (Vol. 53, Issue 9). University of California, Berkeley.

- Natal, C. M., Fernandes, M. J. G., Pereira, R. B., Pereira, D. M., Fortes, A. G., Castanheira, E. M. S., & Gonçalves, M. S. T. (n.d.). New carvacrol and thymol derivatives: synthesis, insecticidal activity and nanoencapsulation. *A Publicar*.
- Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., & De Feo, V. (2013). Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals*, 6(12), 1451–1474. <https://doi.org/10.3390/ph6121451>
- Nehme, R., Andrés, S., Pereira, R. B., Jemaa, M. Ben, Bouhallab, S., Ceciliani, F., López, S., Rahali, F. Z., Ksouri, R., Pereira, D. M., & Abdennebi-najar, L. (2021). Essential oils in livestock: From health to food quality. *Antioxidants*, 10(330), 1–36. <https://doi.org/10.3390/antiox10020330>
- Nóbrega, J., Sousa, P., Mota, K., Cordeiro, L., Andrade Júnior, F., & Oliveira, W. (2019). Investigation of the Activity and Mechanism of Action of Carvacrol against *Rhodotorula Rubra*. *Indo American Journal of Pharmaceutical Sciences*, 6(10)(October), 13219–13223. <https://doi.org/10.5281/zenodo.3497438>
- Olea, A. F., Bravo, A., Martínez, R., Thomas, M., Sedan, C., Espinoza, L., Zambrano, E., Carvajal, D., Silva-Moreno, E., & Carrasco, H. (2019). Antifungal activity of eugenol derivatives against *Botrytis cinerea*. *Molecules*, 24(7), 1–14. <https://doi.org/10.3390/molecules24071239>
- Pinto, N. F. S. , Fernandes, M. J. G., Pereira, R. B., Pereira, D. M., Castanheira, E. M. S., Fortes, A. G., & Gonçalves, M. S. T. (n.d.). Amino alcohools from eugenol as potential semisynthetic insecticides. *A Publicar*.
- Pintore, G., Usai, M., Bradesi, P., Juliano, C., Boatto, G., Tomi, F., Chessa, M., Cerri, R., & Casanova, J. (2002). Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. oils from Sardinia and Corsica. *Flavour and Fragrance Journal*, 17(1), 15–19. <https://doi.org/10.1002/ffj.1022>
- Pramod, K., Ansari, S. H., & Ali, J. (2010). Eugenol: A natural compound with versatile pharmacological actions. *Natural Product Communications*, 5(12), 1999–2006. <https://doi.org/10.1177/1934578x1000501236>
- Qian, W., Sun, Z., Wang, T., Yang, M., Liu, M., Zhang, J., & Li, Y. (2020). Antimicrobial activity of eugenol against carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* and its effect on biofilms. *Microbial Pathogenesis*, 139(September 2019). <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103924>
- Rai, M., Paralikar, P., Jogee, P., Agarkar, G., Ingle, A. P., Derita, M., & Zacchino, S. (2017). Synergistic

- antimicrobial potential of essential oils in combination with nanoparticles: Emerging trends and future perspectives. *International Journal of Pharmaceutics*, 519(1–2), 67–78. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.01.013>
- Ribéreau-Gayon, P., & Gautheret, R. J. (1968). Les composés phénoliques des végétaux. In *Paris : Dunod*. Paris : Dunod, 1968. <https://lib.ugent.be/catalog/rug01:000945897>
- Ribes, S., Ruiz-Rico, M., Pérez-Esteve, É., Fuentes, A., & Barat, J. M. (2019). Enhancing the antimicrobial activity of eugenol, carvacrol and vanillin immobilised on silica supports against *Escherichia coli* or *Zygosaccharomyces rouxii* in fruit juices by their binary combinations. *Lwt*, 113(March), 108326. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108326>
- Saad, N. Y., Muller, C. D., & Lobstein, A. (2013). Major bioactivities and mechanism of action of essential oils and their components. *Flavour and Fragrance Journal*, 28, 269–279. <https://doi.org/10.1002/ffj.3165>
- Saghaie, L., Pourfarzam, M., Fassihi, A., & Sartippour, B. (2013). Synthesis and tyrosinase inhibitory properties of some novel derivatives of kojic acid. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 8(4), 233–242.
- Schaaf, J., Walter, M. H., & Hess, D. (1995). Primary Metabolism in Plant Defense (Regulation of a Bean Malic Enzyme Gene Promoter in Transgenic Tobacco by Developmental and Environmental Cues). *Plant Physiology*, 108(3), 949–960. <https://doi.org/10.1104/pp.108.3.949>
- Seo, S. Y., Sharma, V. K., & Sharma, N. (2003). Mushroom tyrosinase: Recent prospects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(10), 2837–2853. <https://doi.org/10.1021/jf020826f>
- Sharmeen, J. B., Mahomoodally, F. M., Zengin, G., Maggi, F., Montesano, D., & Petrelli, R. (2021). Essential Oils as Natural Sources of Fragrance Compounds for Cosmetics and Cosmeceuticals. *Molecules*, 26(666), 1–24. <https://doi.org/10.3390/molecules26030666>
- Sikkema, J., De Bont, J. A. M., & Poolman, B. (1995). Mechanisms of Membrane Toxicity of Hydrocarbons. *MICROBIOLOGICAL REVIEWS*, 59(2), 201–222.
- Silva, M. M., & Lidon, F. C. (2016). Food preservatives - An overview on applications and side effects. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 28(6), 366–373. <https://doi.org/10.9755/ejfa.2016-04-351>

- Smith, R. M. (2003). Before the injection - Modern methods of sample preparation for separation techniques. *Journal of Chromatography A*, 1000(1–2), 3–27. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)00511-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)00511-9)
- Suganya, P., Jeyaprakash, K., Mallavarapu, G. R., & Murugan, R. (2015). Comparison of the chemical composition, tyrosinase inhibitory and anti-inflammatory activities of the essential oils of *Pogostemon plectranthoides* from India. *Industrial Crops and Products*, 69(July), 300–307. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.02.045>
- Suntres, Z. E., Coccimiglio, J., & Alipour, M. (2015). The Bioactivity and Toxicological Actions of Carvacrol. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(3), 304–318. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.653458>
- Topal, F., Gulcin, I., Dastan, A., & Guney, M. (2017). Novel eugenol derivatives: Potent acetylcholinesterase and carbonic anhydrase inhibitors. *International Journal of Biological Macromolecules*, 94, 845–851. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.10.096>
- Triana, D., Tafdilla, M. A., Antika, L. D., & Ernawati, T. (2019). Conversion Eugenol to Vanillin : Evaluation of Antimicrobial Activity. *International Summit on Science Technology and Humanity (ISETH2019)*, December, 594–602.
- Turgis, M., Han, J., Caillet, S., & Lacroix, M. (2009). Antimicrobial activity of mustard essential oil against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhi*. *Food Control*, 20, 1073–1079. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.02.001>
- Uchida, R., Ishikawa, S., & Tomoda, H. (2014). Inhibition of tyrosinase activity and melanine pigmentation by 2-hydroxytyrosol. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 4(2), 141–145. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2013.12.008>
- Ultee, A., Bennik, M. H. J., & Moezelaar, R. (2002). The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4), 1561–1568. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.4.1561-1568.2002>
- Ultee, A., Kets, E., & Smid, J. (1999). Mechanisms of Action of Carvacrol on the Food-Borne Pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(10), 4606–4610.
- Vankar, P. S. (2004). Essential oils and fragrances from natural sources. *Resonance*, 9(4), 30–41. <https://doi.org/10.1007/bf02834854>

- Vieira, A. I., Guerreiro, A., Antunes, M. D., Da Graça Miguel, M., & Faleiro, M. L. (2019). Edible coatings enriched with essential oils on apples impair the survival of bacterial pathogens through a simulated gastrointestinal system. *Foods*, *8*(2). <https://doi.org/10.3390/foods8020057>
- Yang, S. K., Tan, N. P., Chong, C. W., Abushelaibi, A., Lim, S. H. E., & Lai, K. S. (2021). The Missing Piece: Recent Approaches Investigating the Antimicrobial Mode of Action of Essential Oils. *Evolutionary Bioinformatics*, *17*, 1–6. <https://doi.org/10.1177/1176934320938391>
- Yeh, J. L., Hsu, J. H., Hong, Y. S., Wu, J. R., Liang, J. E., Wu, B. N., Chen, I. J., & Liou, S. F. (2011). EUGENOL AND GLYCERYL-ISOEUGENOL SUPPRESS LPS-INDUCED INOS EXPRESSION BY DOWN-REGULATING NF-KB AND AP-1 THROUGH INHIBITION OF MAPKS AND AKT/IKBa SIGNALING PATHWAYS IN MACROPHAGES. *INTERNATIONAL JOURNAL OF IMMUNOPATHOLOGY AND PHARMACOLOGY*, *24*(2), 345–356.
- Yoo, C. Bin, Han, K. T., Cho, K. S., Ha, J., Park, H. J., Nam, J. H., Kil, U. H., & Lee, K. T. (2005). Eugenol isolated from the essential oil of *Eugenia caryophyllata* induces a reactive oxygen species-mediated apoptosis in HL-60 human promyelocytic leukemia cells. *Cancer Letters*, *225*(1), 41–52. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2004.11.018>
- Yousefi, M., Rahimi-Nasrabadi, M., Pourmortazavi, S. M., Wysokowski, M., Jesionowski, T., Ehrlich, H., & Mirsadeghi, S. (2019). Supercritical fluid extraction of essential oils. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, *118*, 182–193. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.05.038>

