



## Bioatividade do composto furanodieno da espécie *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae).

### *BIOACTIVITY OF THE FURANODIENE COMPOUND FROM THE SPECIES EUGENIA UNIFLORA L. (MYRTACEAE).*

Marcos Felipe Maciel Pereira\*, Jociani Ascari<sup>†</sup>, Erika Izumi<sup>‡</sup>, Antônio Augusto Ignácio<sup>§</sup>.

#### RESUMO

A família Myrtaceae pertence as principais famílias frutíferas do mundo, tendo alto potencial de valor econômico e valia fitoquímica. A espécie *Eugenia uniflora* L. nativa do Brasil e pertencente à família Myrtaceae, conhecida popularmente como pintagueira, localizada nas regiões Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul. A espécie é amplamente relevante pela importância das propriedades antimicrobianas, realizadas por componentes bioativos. O objetivo da pesquisa foi o isolamento, purificação e elucidação estrutural do composto sesquiterpênico furanodieno e a avaliação das bioatividades antimicrobianas para desenvolvimento de aplicações tecnológicas. Realizou-se o método da Cromatografia em Camada Delgada juntamente com Cromatografia em Coluna de Vidro para isolamento e purificação, bem como a Ressonância Magnética Nuclear para elucidação. Utilizou-se a técnica de microdiluição em caldo para determinar concentração inibitória mínima (CIM), concentração bactericida mínima (CBM) e concentração fungicida mínima (CFM). Constatou-se a avaliação antimicrobiana da molécula química furanodieno contra os microrganismos patogênicos de origem clínico e alimentar, resultando CIM acima de 1000 µg/mL. Portanto, o presente estudo necessita de pesquisas complementares para investigar a eficácia do constituinte químico.

**Palavras-chave:** Furanodieno, purificação, antimicrobiano, tecnológico.

#### ABSTRACT

The Myrtaceae family belongs to the main fruit families in the world, having high economic value potential and excellent phytochemical value. The species *Eugenia uniflora* L. is native to Brazil and belongs to the Myrtaceae family, popularly known as pintagueira, located in the Northeast, Midwest, Southeast and South regions. The species is widely relevant due to the importance of its antimicrobial properties, carried out by bioactive components. The objective of the research was the isolation, purification and structural elucidation of the sesquiterpene compound furanodiene and the evaluation of antimicrobial bioactivities for the development of technological applications. The Thin Layer Chromatography method was carried out together with Glass Column Chromatography for isolation and purification, as well as Nuclear Magnetic Resonance for elucidation. The broth microdilution technique was used to determine minimum inhibitory concentration (CIM), minimum bactericidal concentration (MBC) and minimum fungicidal concentration (MFC). The antimicrobial evaluation of the furanodiene chemical molecule against pathogenic microorganisms of clinical and food origin was contacted, resulting in a MIC above 1000 µg/mL. Therefore, the present study needs further research to investigate the effectiveness of the chemical constituent.

**Keywords:** Furanodiene, purification, antimicrobial, technological.

\* Licenciatura em Ciências Biológicas, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Santa Helena, Paraná, Brasil.; [marper@alunos.utfpr.edu.br](mailto:marper@alunos.utfpr.edu.br)

<sup>†</sup> Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Santa Helena; [jascari@utfpr.edu.br](mailto:jascari@utfpr.edu.br)

<sup>‡</sup> Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Santa Helena; [erikaizumi@utfpr.edu.br](mailto:erikaizumi@utfpr.edu.br)

<sup>§</sup> Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Santa Helena; [ignacio@alunos.utfpr.edu.br](mailto:ignacio@alunos.utfpr.edu.br)

## 1 INTRODUÇÃO

A espécie *Eugenia uniflora* L. pertence à família Myrtaceae, considerada uma das principais famílias frutíferas comerciais do mundo, com alto valor potencial econômico e fitoquímico (DE PAULO FARIAS et al., 2020). A *E. uniflora* espécie nativa do Brasil, ocorre nas regiões Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste, Sul e em outros locais do mundo, Caribe, Estados Unidos da América e na África do Sul. Popularmente conhecida como pitanga e cerejeira brasileira, por seu fruto característico de cor vermelho intenso, com aroma único e polpa succulenta (SANTOS, J. F. S. et al., 2018).

As moléculas orgânicas presentes no óleo essencial de *E. uniflora*, destaca-se o composto furanodieno, apresenta aplicações na elaboração de medicamentos no aspecto interno e externo, como comprimidos, cápsulas, pílulas, preparações líquidas orais, supositórios, aerossóis, géis e pomadas para o tratamento de herpesvírus, vírus influenza e vírus da hepatite B. Pelo o método de Reed-Muench, obteve resultados relevantes contra o vírus herpes do tipo I e II e o vírus influenza A e B. Portanto, para vírus da hepatite B, utilizou-se o método da hibridização pontual obtendo o grau de replicação, observou-se que o furanodieno inibiu a replicação do DNA do HBV (CHUNXIA WU et al., 2010).

O invento CN102091064, emprega a aplicação do furanodieno para o tratamento do carcinoma cervical causado pela infecção papilomavírus humano (HPV). Utilizou-se o método de processamento de amostras isolando o HPV; extração do HPV-DNA; aplicação de DNA e o cálculo de curva padrão. Os manipulados farmacêuticos foram por via oral, dérmica, vaginal e retal. Comprovou-se que o furanodieno como ingrediente ativo inibiu a infecção por HPV, atuando principalmente nas proteínas E6 e E7 (CHEN RONG et al., 2011).

O desenvolvimento de novas tecnologias aplicadas à saúde é complexo, portanto, esforços científicos são necessários para progresso nessa área. Desse modo, novos produtos farmacológicos são essenciais para beneficiar a saúde (WAGNER, 2016). O presente estudo tem como objetivo isolar, purificar e elucidar a estrutura do composto furanodieno localizado no óleo essencial das folhas espécie *E. uniflora*. Assim como, avaliar a atividade antimicrobiana para o desenvolvimento científico tecnológico.

## 2 MÉTODO

O estudo fitoquímico, foi realizado no laboratório de Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, campus Santa Helena.

O óleo essencial das folhas de *E. uniflora*, foi adquirido em comércio local (empresa Leggé). A análise prévia da constituição química do óleo foi executada por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) em cromatoplasmas de sílica gel 60 HG/254 (Macherey-Nagel). A fase móvel foi composta pela proporção de hexano/acetato de etila 2%. Para a revelação das cromatoplasmas utilizou-se a visualização na lâmpada UV 254 nm e revelador químico anisaldeído/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> específico para a classe de compostos sesquiterpênicos.

Cerca de 2,0 mL do óleo essencial foi submetido a cromatografia em coluna aberta de vidro (Figura 1) para isolamento do composto. A fase estacionária empregada, foi sílica gel 230–400 mesh (Merck) e a fase móvel foi hexano e proporção de hexano/acetato de etila 2% com fluxo de  $\pm 5$  mL/min. A reunião das frações foi realizada utilizando as informações obtidas pelas CCD's.

**Figura 1 – Cromatografia em coluna de vidro, fase estacionária de sílica em gel, contendo óleo essencial da espécie *E. uniflora* e fase móvel solventes de diferentes polaridades.**



Fonte: Autoria própria (2021).

A técnica de espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foi realizada para elucidar a estrutura do composto furanodieno, por espectrômetro da Bruker DRX-400, linha AVANCE do Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá. Os deslocamentos químicos foram registrados em unidade  $\delta$  e as constantes de acoplamento escalar J fornecidas em Hz. O tetrametilsilano (TMS), foi utilizado com padrão de referência interno. Como solvente, empregou clorofórmio deuterado.

Os bioensaios, foram realizados nos Laboratório Microbiologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, campus Santa Helena e conduzido em duplicata. O composto furanodieno, foi avaliado quanto a bioatividade antimicrobiana na concentração de 2000  $\mu\text{g/mL}$ , em meio de cultivo, contendo 2,5% de DMSO como solvente. Calculou-se a diluição seriada 1:2 nos poços, estabelecendo que a maior concentração da substância 1000  $\mu\text{g/mL}$  contendo 1,25% de DMSO, impedindo efeito tóxico em concentrações elevadas.

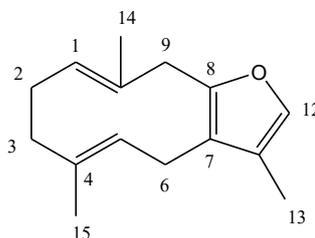
A avaliação da substância realizada contra os seguintes microrganismos foram: bactérias Gram positivas- *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecium* ATCC 6559; bactérias Gram negativas - *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27587; fungo leveduriforme - *Candida albicans* ATCC 10231.

Utilizou-se o método microdiluição em caldo, para avaliar a suscetibilidade dos microrganismos, seguindo instruções do National Committee for Clinical Laboratory Standards, com modificações. Os meios de cultivos selecionados, foram Mueller Hinton para bactérias e Sabouraud 2% para levedura. O constituinte furanodieno, foi avaliado na concentração 1000  $\mu\text{g/mL}$ , seguindo diluição seriada 1:2. Posteriormente a incubação, determinou-se a CIM, CBM e CFM por observação direta de crescimento nos poços. Após, realizou-se a leitura das microplacas em 630 nm para confirmação. Os poços que não ocorreu proliferação tiveram alíquotas semeadas em meio sólido para designar a concentração microbicida e microbiostática. Foi utilizada como controle padrão cloranfenicol e fluconazol.

### 3 RESULTADOS

O metabólito secundário da classe sesquiterpênica Furanodieno (Figura 2), foi isolado e purificado do óleo essencial das folhas de *E. uniflora*, utilizando-se de técnicas cromatográficas. A partir do fracionamento do óleo essencial, por cromatografia em coluna aberta de vidro de sílica gel e com fase móvel hexano 100%, foi possível obter 146,1 mg do composto com característica viscosa e incolor. A análise prévia da pureza do composto, foi feita por CCD com fase móvel  $\text{C}_6\text{H}_{14}$ : AcOEt 2% e revelação com anisaldeído/ $\text{H}_2\text{SO}_4$  sob aquecimento apresentou uma única mancha de coloração marrom escura.

Figura 2 – Estrutura do furanodieno.



Fonte: Autoria própria (2021) utilizando ChewDraw.

A elucidação estrutural do composto furanodieno, foi realizada com base na análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ , por comparação com dados obtidos na literatura (SANTOS, F. R; BRAZ-FILHO; CASTRO, 2015).

O furanodieno, apresentou no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  sinais de dois simpletos em  $\delta_{\text{H}}$  1,60 e  $\delta_{\text{H}}$  1,27, atribuídos a hidrogênios de grupos metila sendo eles H-14 e H-15. Observou-se, também, um duplete em  $\delta_{\text{H}}$  1,92, referente aos hidrogênios da metila H-13 o qual acopla-se com o hidrogênio metínico H-12  $\delta_{\text{H}}$  7,08, como descrito na literatura (SANTOS, F. R; BRAZ-FILHO; CASTRO, 2015). O espectro apresentou, ainda, dois dupletos duplos em  $\delta_{\text{H}}$  4,95 e  $\delta_{\text{H}}$  4,73, atribuídos aos hidrogênicos metínicos H-1 e H-5, respectivamente, demonstrando a presença de duplas trissubstituídas. O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ , apresentou sinal em  $\delta_{\text{C}}$  149,69 (C-8 do anel furânico), quatro sinais relativos a carbonos quaternários em  $\delta_{\text{C}}$  128,84, 118,86, 121,88 e 134,33, atribuídos aos carbonos C-10, C-7, C-11 e C-4, respectivamente. Além de um sinal relativo a carbono metínico aromático em  $\delta_{\text{C}}$  135,95 referente ao C-12. As atribuições de sinais de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foram confirmados com a comparação com a literatura (SANTOS, F. R; BRAZ-FILHO; CASTRO, 2015).

A *S. aureus*, faz parte da microbiota humana e pode acarretar doenças associadas a inflamação simples, como espinhas e furúnculos, até infecções mais graves, como pneumonia, meningite, endocardite, síndrome do choque tóxico e septicemia (ALMEIDA et al., 2016). A bactéria *E. faecium*, apresenta susceptibilidade ao desenvolvimento de resistência e é comumente encontrada na microbiota do trato gastrointestinal, mucosa oral e vaginal e na pele, contudo, são responsáveis por várias infecções como, de ferida cirúrgica, do trato urinário e endocardite (BOUZA et al., 2015). A *E. coli*, faz parte da flora intestinal normal humana, no entanto, pode apresentar quadros clínicos como diarreia, infecção do trato urinário e meningite (CHEN; FRANKEL, 2004). A bactéria *P. aeruginosa*, demonstra uma ampla distribuição, infectando água e seres humanos, considerada um patógeno oportunista. Podendo causar pneumonia, bacteremias e insuficiência respiratória (OCHOA et al., 2013). A *C. albicans* é uma leveduriforme, coloniza de forma assintomática o trato gastrointestinal em microbiota saudável, entretanto em pacientes imunocomprometidos podem sofrer com infecções na mucosa, vaginal e hematogênica (PAPPAS et al., 2004).

O composto xantotoxina, apresenta similaridade molecular com o furanodieno, por constituírem anel furano e grupo funcional éter, no entanto, um dos anéis benzênicos possui grupo funcional éster. A xantotoxina, demonstrou atividade contra bactérias Gram-positivas, obtendo CIM para *S. aureus* de 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e CBM de 2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , também para *Bacillus cereus* CIM de 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e CBM 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (SOUZA, 2005).

O constituído furanodieno, não obteve CIM em 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$  diante os microrganismos, logo, não atingindo o efeito inibitório microbicida e bacteriostático. Consequentemente, sendo possível alcançar a CIM acima da concentração testada.

#### 4 CONCLUSÃO



A presente análise, pouca evidenciada na literatura, apresenta técnicas cromatográficas de isolamento, purificação e elucidação estrutural, denominada por CCD, cromatografia em coluna de vidro e RMN para viabilizar o fitoquímico puro furanodieno, pertencente ao grupo químico sesquiterpeno, extraído do óleo essencial da espécie *E. uniflora*. O ensaio biológico, permitiu constatar a avaliação antimicrobiana do constituído furanodieno contra os microrganismos patogênicos de origem clínica e alimentar, resultando CIM acima de 1000 µg/mL, sendo assim, não alcançado o CIM testada.

O desenvolvimento de aplicações e produtos tecnológicos para ampliação de novos compostos químicos de modo alternativo diferente dos convencionais, apresenta tratamento clínico para pacientes com restrições a medicamentos tradicionais. Pesquisas complementares devem ser realizadas para analisar a ação de mecanismo do furanodieno em oposição aos microrganismos.

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Jociani Ascari e Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Erika Izumi, pelo apoio na iniciação científica, pelas suas correções e incentivos.

À UTFPR, lar de ensinamentos e grandes lições que serão levadas para a vida.

A Fundação Araucária, pela bolsa de Iniciação Científica e suporte financeiro.

## REFERÊNCIAS

DE PAULO FARIAS, d., NERI-NUMA, I. A., DE ARAÚJO, F. F., & PASTORE, G. M. (2020). A critical review of some fruit trees from the Myrtaceae family as promising sources for food applications with functional claims. **Food Chemistry**, 306, 125630. doi:10.1016/j.foodchem.2019.125630

SANTOS, J. F. S., ROCHA, J. E., BEZERRA, C. F., NASCIMENTO SILVA, M. K., MATOS, Y. M. L. S., DE FREITAS, T. S., et al. (2018). Chemical composition, antifungal activity and potential anti-virulence evaluation of the *Eugenia uniflora* essential oil against *Candida* spp. **Food Chemistry**, 261, 233–239. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.015>.

CHUNXIA WU; DIANWU GUO; XIANGJUN WANG; YAODONG WU; ZHAOKE MENG; GUO DIANWU; MENG ZHAOKE; WANG XIANGJUN; WU CHUNXIA; WU YAODONG. 2010. Application of furanodiene in preparation of medicaments for treating diseases caused by viruses. CN101697966A. Disponível em: <<https://worldwide.espacenet.com/patent/search/family/042146430/publication/CN101697966A?q=pn%3DCN101697966A>>. Acesso em: 15 jan. 2021.

CHEN RONG; FENG ZHONGYI; HUANG XIAN; XU YANG; XU LANG. (2011). **Use of furanodiene**. CN102091064. Depósito: 24 dezembro 2010. Concessão: 15 junho 2011. Disponível em <[https://patentscope.wipo.int/search/pt/detail.jsf?docId=CN84669098&tab=NATIONALBIBLIO&\\_cid=P22-KJYHUZ-06392-1](https://patentscope.wipo.int/search/pt/detail.jsf?docId=CN84669098&tab=NATIONALBIBLIO&_cid=P22-KJYHUZ-06392-1)>. Acesso em: 15 janeiro 2021.



Wagner JA, Kroetz DL. Transforming translation: impact of clinical and translational science. **Clin Transl Sci.** 2016; 9(1):3-5. doi: 10.1111/cts.12380

NCCLS. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras; Norma Aprovada—Segunda Edição. **NCCLS document M27-A2 [ISBN 1-56238-469-4]**. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, Estados Unidos, 2002. Tradução pela ANVISA com permissão do CLSI.

SANTOS, F. R.; BRAZ-FILHO, R.; CASTRO, R. N. influência da idade das folhas de eugenia uniflora l. na composição química do óleo essencial. **Química. Nova.** 2015. Disponível em: <https://www.crossref.org/iPage?doi=10.5935%2F0100-4042.20150072>. Acesso em: 30 ago. 2021.

ALMEIDA, M. S. C., MENDONÇA, R. L., FREITAS M. Z. C., & VANDESMET L. C. (2016). Staphylococcus aureus. **Mostra científica em biomedicina, 1**. Disponível em <<http://publicacoesacademicas.unicatolicaquixada.edu.br/index.php/mostrabiomedicina/article/view/842>>. Acesso em: 31 ago. 2021.

BOUZA E, KESTLER M, BECA T, MARISCAL G, RODRÍGUEZ-CRÉIXEMS M, BERMEJO J, et al. **The NOVA score: a proposal to reduce the need for transesophageal echocardiography in patients with enterococcal bacteremia.** Clin Infect Dis. Feb 15. 60 (4):528-35. 2015. doi: 10.1093/cid/ciu872.

CHEN, D.H. AND FRANKEL, G. (2004) Enteropathogenic Escherichia coli: unravelling pathogenesis. **FEMS Microbiology Reviews** 29: 83-98. 10.1016/j.femsre.2004.07.002.

OCHOA. Características patogênicas de cepas de Pseudomonas aeruginosa resistentes a carbapenêmicos, associadas con la formación de biopelículas. **Bol. Med. Infant. Mex.**, México, v. 70, n. 2, p. 136-150, 2013. Disponível em <[http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1665-11462013000200010](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-11462013000200010)>. Acesso em: 31 ago. 2021.

PAPPAS PG, REX JH, SOBEL JD, FILLER SG, DISMUKES WE, et al. Guidelines for treatment of candidiasis. **Clin Infect Dis.** 2004; 38:161–89. doi: 10.1086/380796.

SOUZA, S. M. atividade antibacteriana de cumarinas naturais e derivados. **centro de ciências biológicas: departamento de microbiologia e parasitologia, universidade federal de santa catarina, 2005.** Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/xmlui/bitstream/handle/123456789/102097/221535.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 1 set. 2021.