

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DE ENGENHARIA E CIÊNCIA DE
ALIMENTOS

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS, LETRAS E CIÊNCIAS EXATAS

SÍNTESE DE SUCROÉSTERES DERIVADOS DE ÁCIDOS PIRIDÍNICOS
(ÁCIDO NICOTÍNICO, ISONICOTÍNICO E PICOLÍNICO) E AVALIAÇÃO
DE SUAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANAS.

Victor Zanardi Rodrigues dos Santos

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO – SP

2011

VICTOR ZANARDI RODRIGUES DOS SANTOS

**SÍNTESE DE SUCROÉSTERES DERIVADOS DE ÁCIDOS PIRIDÍNICOS
(ÁCIDO NICOTÍNICO, ISONICOTÍNICO E PICOLÍNICO) E AVALIAÇÃO
DE SUAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANAS.**

Dissertação apresentada, como parte dos requisitos, para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, junto ao programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Campus de São José do Rio Preto.

Orientador:

Prof. Dr. Maurício Boscolo

(IBILCE-UNESP)

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO – SP

2011

VICTOR ZANARDI RODRIGUES DOS SANTOS

SÍNTESE DE SUCROÉSTERES DERIVADOS DE ÁCIDOS PIRIDÍNICOS
(ÁCIDO NICOTÍNICO, ISONICOTÍNICO E PICOLÍNICO) E AVALIAÇÃO
DE SUAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANAS.

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Maurício Boscolo (orientador)

Prof. Dr. Daniel Rodrigues Cardoso

(IQSC-USP)

Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia-Cruz

(IBILCE-UNESP)

São José do Rio Preto, 14 de dezembro de 2011

Dedicatória

Dedico a todos que auxiliaram e apoiaram este projeto.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Dirceu e Márcia pelo apoio em todas minhas decisões tomadas e pelo incentivo na busca do meu sonho.

À minha madrinha Verônica pelo suporte nos momentos em que precisei, tanto durante o período de graduação, quanto nessa nova etapa em minha vida.

Ao Prof. Dr. Maurício Boscolo pela orientação, apoio, confiança, paciência e atenção em todas as etapas do presente projeto. Meu especial agradecimento e admiração.

Ao Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia-Cruz por ter cedido o espaço físico do laboratório de biopolímeros, além dos microrganismos utilizados no projeto.

À Prof^a Dr^a Lídia Maria de Almeida Plicas pela orientação na disciplina de Estágio em Docência e pela oportunidade dada, encarregando-me das aulas de Físico-Química para a turma do segundo ano de Engenharia de Alimentos.

À doutoranda Juliana Guerra de Oliveira pelo auxílio na parte microbiológica do trabalho.

Ao doutorando André Garcia, o “Barbie”, ao professor Dr. Douglas W. Franco e ao professor Dr. Daniel Rodrigues Cardoso do IQSC-USP pelo grande auxílio com os equipamentos para caracterização dos produtos.

Ao professor Dr. Benedito dos Santos Lima Neto e seu aluno de doutorado José Luiz pelo auxílio e pela disponibilização do RMN.

Às meninas do laboratório de Biopolímeros, Adriana, Aline, Catharina, Melina e Vidiany pelos momentos de descontração no laboratório de biopolímeros.

Aos amigos do laboratório de sucroquímica e química analítica.

Aos amigos da república Tupinambá e da república Vitrine, Rafael Nava, Rafael Macedo, Guilherme Dorighello, Victor Vinícius, Raphael Alonso, Tathiane, Leandro Toshi, Leandro Gordo, Ricardo Mariutti, Otávio e Douglas pelos 6 anos de convívio e momentos agradáveis durante minha estadia em São José do Rio Preto.

Aos grandes amigos Lenard Serrano e Edson Zillo, pela amizade, convívio, paciência, companheirismo, que, com certeza, foi muito importante durante todos os anos em que residi em São José do Rio Preto.

Aos amigos de longa data Luiz Guilherme e Matheus Pasquali pela lealdade, fidelidade e companheirismo, durante todos esses 15 anos de amizade.

Aos amigos Elton Zanetti e José Diego pela amizade construída de muitos anos.

À Gleyce Teixeira Correia por ser uma pessoa muito especial. Meus profundos agradecimentos pelo carinho, pela companhia e por todos os momentos maravilhosos que passamos durante nossos seis anos de convivência.

A todas as outras pessoas não citadas, mas que, de alguma forma, contribuíram para o meu crescimento pessoal e também para o projeto de pesquisa desenvolvido.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

A Deus por todos os sonhos que estão se realizando.

RESUMO

Nos últimos anos, tem sido observado um crescente interesse por derivados de sacarose e também por outros materiais de origem renovável que possam resultar em produtos tecnológicos de baixo impacto ambiental. Alguns ésteres derivados de sacarose apresentam propriedades controladoras sobre bactérias mesofílicas e termofílicas formadoras de esporos. Neste projeto foram sintetizados ésteres de sacarose com três diferentes isômeros de metil ésteres derivados de ácidos piridínicos bioativos, sendo eles: picolinato de metila, nicotinato de metila e isonicotinato de metila. Este grupo de sucroésteres é inédito na literatura e sua atividade biológica, portanto não foi ainda explorada. A metodologia escolhida para se avaliar a bioatividade dos compostos formados e isolados por cromatografia semi-preparativa sobre microrganismos foi o da difusão em meio sólido em ágar dispostos em placas de Petri inoculadas com diferentes microrganismos, denominado de antibiograma. A avaliação se dá por medição do diâmetro dos halos de inibição. Os objetivos do trabalho foram: (i) Realizar a síntese dos sucroésteres mencionados por meio de reações de transesterificação e a separação por cromatografia; (ii) Estudar a atividade antimicrobiana dos produtos sobre bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, e leveduras; (iii) identificar por espectrometria de massas, espectroscopia de infravermelho e espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C as estruturas dos compostos que apresentaram atividade biológica contra os microrganismos; (iv) comparar o poder antimicrobiano dos compostos com antibióticos de uso comercial; e (v) estudar um possível efeito sinérgico da combinação dos compostos sintetizados com outros tipos de compostos de baixo poder antimicrobiano. A síntese foi realizada empregando a sacarose e os ésteres metílicos picolinato, isonicotinato e nicotinato de metila como reagentes de partida e com DMSO como solvente, por 24 horas e depois separado por HPLC no modo semi-preparativo. Os produtos brutos das sínteses foram aplicados em 4 bactérias Gram-positivas, 4 Gram-negativas e 2 leveduras, apresentando resposta positiva em 2 bactérias Gram-positivas (*Bacillus cereus* e *Bacillus subtilis*) e 2 bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli* e *Salmonella enteritidis*). As frações separadas dos três grupos de sucroésteres foram testadas contra as bactérias que foram susceptíveis aos produtos brutos. As concentrações utilizadas foram de 150; 300; 450; 600; 750 e 900 ppm e os experimentos foram realizados em duplicata. As frações 2; 3; 4; 6 do nicotinato de sacarose; 2; 3; 4; 6 do isonicotinato de sacarose e 2; 3; 5; 6 do picolinato de sacarose foram as

que geraram halos de inibição em, pelo menos uma bactéria testada. Para teste de efeito sinérgico, adicionou-se EDTA juntamente a algumas frações dos sucroésteres piridínicos, em concentrações selecionadas previamente. O EDTA foi utilizado nas concentrações de 250; 500 e 750 ppm e o experimento de efeito sinérgico foi realizado em duplicata. As frações 4 do isonicotinato de sacarose a 600 ppm e picolinato de sacarose a 900 ppm, juntamente com EDTA a 750 ppm apresentaram efeito sinérgico contra as bactérias *E. coli* e *B. cereus*. As frações em que as bactérias testadas foram susceptíveis aos testes antimicrobianos foram encaminhadas para espectrometria de massas, onde foi confirmada a presença de sucroésteres monossustituídos e dissustituídos. Uma fração do nicotinato de sacarose, do isonicotinato de sacarose e do picolinato de sacarose foi submetida à espectroscopia de infravermelho, e essa confirmou a presença de grupos orgânicos essenciais da molécula, assim como o grupo éster e o anel aromático piridínico. As frações que apresentaram efeito sinérgico juntamente com o EDTA, contra as bactérias *E. coli* e *B. cereus* foram submetidas a espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C , com o objetivo de localizar a hidroxila que sofreu substituição nucleofílica. Porém, não foi possível a obtenção da informação desejada.

ABSTRACT

In recent years, there has been a growing interest in sucrose derivatives and other raw materials that can result in technological products with low environment impact. Some sucrose esters presents control properties on spore-forming mesophilic and thermophilic bacteria. In this project, sucrose esters was synthesized using three different methyl esters isomers derived from bioactive pyridinic acids. The pyridinic acids used for the synthesis were: Methyl picolinate, Methyl nicotinate and Methyl isonicotinate. These sucroester groups are new in literature as their biological activity, so these compounds aren't explored. The chosen methodology to measure the biological activity of compounds formed and isolated by semi-preparative chromatography in microorganisms were the solid-medium diffusion in agar prepared in Petri dishes, inoculated with different ones. This technique is called antibiogram. The evaluation of the results is provided by inhibition zone measuring. The objective of this project was (i) Realize the mentioned sucroesters synthesis by transesterification reactions and its separation by chromatography (ii) Study the antimicrobial activity of the formed products on Gram-positive and Gram-negative bacteria and in yeasts. (iii) Identify by mass spectrometry, infrared spectroscopy and nuclear magnetic resonance spectroscopy of ^1H and ^{13}C the compounds structure that presents antimicrobial activity. (iv) Make a comparison of the antimicrobial power of the synthesized compounds with conventional antibiotics. (v) Study a possible synergistic effect between the sucroesters and other compounds with low antimicrobial power. The synthesis was realized using sucrose and the methyl esters (methyl picolinate, methyl nicotinate and methyl isonicotinate) as starting reagent and DMSO as the solvent by 24 hours and after all, separated by HPLC in semi-preparative mode. The crude products were applied in syntheses of four Gram-positive bacteria, four Gram-negative and two yeasts, with positive response in two Gram-positive bacteria (*Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis*) and two Gram-negative bacteria (*Escherichia coli* and *Salmonella enteritidis*). The fractions separated from sucroesters three groups were tested against the bacteria that were capable of crude products. The concentrations used were 150, 300, 450, 600, 750 and 900 ppm and the experiments were performed in duplicate. Fractions 2, 3, 4, 6 of nicotinate sucrose, 2, 3, 4, 6 of sucrose isonicotinate and 2, 3, 5, 6 of picolinate sucrose were those that generated inhibition circle on at least one bacterium tested. To test the synergistic effect, we added EDTA along with a few fractions of pyridine sucroesters at concentrations previously selected. EDTA was used at concentrations of 250, 500 and 750

ppm and the synergistic effect experiment was performed in duplicate. The four fractions of sucrose isonicotinate to 600 ppm and sucrose picolinate 900 ppm, with EDTA to 750 ppm showed a synergistic effect against the bacteria *E. coli* and *B. cereus*. The fractions in which the bacteria tested were susceptible to the antimicrobial tests were sent for mass spectrometry, which confirmed the presence of monosubstituted and disubstituted sucroesters. Fractions of sucrose nicotinate, sucrose isonicotinate and sucrose picolinate was subjected to infrared spectroscopy, and this confirmed the presence of organics essential groups of the molecule, as well as the ester group and aromatic ring pyridine. The fractions that showed a synergistic effect with EDTA against *E. coli* and *B. cereus* were subjected to nuclear magnetic resonance spectroscopy of ^1H and ^{13}C , in order to locate the hydroxyl that suffered nucleophilic substitution but it wasn't possible to identify that one.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1. A Sacarose como Reagente	15
2.2. Ésteres de Sacarose	17
2.2.1. Atividade Biológica de Ésteres de Sacarose	20
2.3. Compostos Piridínicos	24
2.3.1. Ácido Nicotínico e Derivados	24
2.3.2. Ácido Isonicotínico e Derivados	25
2.3.3. Ácido Picolínico e Derivados	25
2.4. Estudo da Sensibilidade Microbiana Utilizando a Técnica do Antibiograma de Disco de Difusão em Meio Sólido	26
3. OBJETIVOS	29
3.1 Objetivo Geral	29
3.2 Objetivos Específicos	29
4. MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1. Síntese de Sucroésteres	30
4.2. Separação dos Sucroésteres	30
4.3. Estudo da Sensibilidade Microbiana Utilizando a Técnica do Antibiograma de Disco de Difusão em Meio Sólido	31
4.3.1. Microrganismos Empregados nos Testes	31
4.3.2. Preparo do Inóculo para o Plaqueamento	31
4.3.3. Plaqueamento dos Microrganismos	32

4.3.4. Preparo do Disco de Difusão para os Testes de Antibiógrama	32
4.3.5. Leitura do Resultado do Antibiógrama por Disco-difusão	33
4.4. Caracterização das Frações dos Sucroésteres Bioativos	33
4.4.1. Espectrometria de Massas	34
4.4.2. Espectroscopia no Infravermelho	34
4.4.3. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1. Síntese e Separação dos Sucroésteres	35
5.2. Testes Microbiológicos	37
5.2.1. Testes com Antibióticos Convencionais	37
5.2.2. Testes de Antibiógrama com os Produtos Brutos das Sínteses dos Sucroésteres	39
5.2.3. Testes de Antibiógrama com as Frações dos Sucroésteres	41
5.2.4. Testes das Frações dos Sucroésteres Seleccionadas com EDTA	50
5.3. Caracterização dos Sucroésteres	55
5.3.1. Espectrometria de Massas	55
5.3.2. Espectroscopia no Infravermelho	62
5.3.3. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear	64
6. CONCLUSÃO	68
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1	Viabilidade do emprego da sacarose em diversas áreas 13
Figura 2	Forma estrutural da molécula de sacarose. 16
Figura 3	Estrutura da Olestra® e do Acetato-isobutirato de sacarose (SAIB) 18
Figura 4	Modelo de reações de transesterificação objetivando a formação do sucroéster. Reação da sacarose com um triacilglicerídeo e reação de um metil éster com a sacarose 19
Figura 5	Compostos piridínicos que estão sendo utilizados como reagente de partida no presente trabalho 24
Figura 6	Estrutura do isonicotinato de 2-metil-heptila, composto que possui atividade antimicrobiana 25
Figura 7	Introdução dos discos de papel nas placas com o meio de cultura, com microrganismos previamente inoculados. 27
Figura 8	Exemplo de halo de inibição em um teste de difusão em meio sólido 28
Figura 9	Possível isômero de nicotinato de sacarose formado no processo de transesterificação entre a sacarose e o nicotinato de metila 28
Figura 10	Separação cromatográfica do nicotinato de sacarose em coluna semi-preparativa C18 com detector de fotodiodo, em 225 nm. 35
Figura 11	Separação cromatográfica do isonicotinato de sacarose em coluna semi-preparativa C18 com detector de fotodiodo, em 225 nm 36
Figura 12	Separação cromatográfica do picolinato de sacarose em coluna semi-preparativa C18 com detector de fotodiodo, em 225 nm. 36
Figura 13	Halo de inibição provocado por sucroéster piridínico em <i>E. coli</i> 48
Figura 14	Exemplo de resistência contra sucroéster piridínico apresentada em <i>Bacillus subtilis</i> . 49
Figura 15	Esquema do mecanismo de ação do EDTA juntamente com um composto hidrofóbico 53

Figura 16	Halos de Inibição em <i>Bacillus cereus</i> com a introdução do EDTA juntamente dos sucroésteres	54
Figura 17	Espectro de massas obtido por ESI-MS da Fração 2 do nicotinato de sacarose	55
Figura 18	Espectro de massa obtido por ESI-MS da Fração 3 do nicotinato de sacarose	56
Figura 19	Espectro de massa obtido por ESI-MS da Fração 4 do nicotinato de sacarose	56
Figura 20	Espectro de massa obtido por ESI-MS da Fração 6 do nicotinato de sacarose	57
Figura 21	Espectro de massa obtido por ESI-MS da Fração 2 do isonicotinato de sacarose.	58
Figura 22	Espectro de massa obtido por ESI-MS da Fração 3 do isonicotinato de sacarose	58
Figura 23	Espectro de massa obtido por ESI-MS da Fração 4 do isonicotinato de sacarose	59
Figura 24	Espectro de massa obtido por ESI-MS da Fração 6 do isonicotinato de sacarose	59
Figura 25	Espectro de massa obtido por ESI-MS da Fração 2 do picolinato de sacarose	60
Figura 26	Espectro de massa obtido por ESI-MS da Fração 4 do picolinato de sacarose	60
Figura 27	Espectro de massa obtido por ESI-MS da Fração 5 do picolinato de sacarose	61
Figura 28	Espectro de massa obtido por ESI-MS da Fração 6 do picolinato de sacarose	61
Figura 29	Espectro de infravermelho em modo transmitância da Fração 4 do nicotinato de sacarose	62
Figura 30	Espectro de infravermelho em modo transmitância da Fração 4 do isonicotinato de sacarose	63
Figura 31	Espectro de infravermelho em modo transmitância da fração 4 do picolinato de sacarose	63

Figura 32	Espectro de ressonância magnética nuclear de ^{13}C da fração 4 do isonicotinato de sacarose	64
Figura 33	Espectro de ressonância magnética nuclear de ^1H da fração 4 do isonicotinato de sacarose	65
Figura 34	Espectro de ressonância magnética nuclear de ^{13}C da fração 4 do picolinato de sacarose	66
Figura 35	Espectro de ressonância magnética nuclear de ^1H da fração 4 do picolinato de sacarose	67

LISTA DE TABELAS

		Página
Tabela 1	Susceptibilidade de micro-organismos à ésteres de sacarose a partir de ácidos graxos	22
Tabela 2	Testes com antibióticos convencionais em bactérias Gram-positivas	38
Tabela 3	Testes com antibióticos convencionais em bactérias Gram-negativas	38
Tabela 4	Testes com antifúngicos convencionais em Leveduras	39
Tabela 5	Teste com a síntese bruta de nicotinato de sacarose nas proporções de 50; 100; 200 e 500 microlitros	39
Tabela 6	Teste com a síntese bruta de isonicotinato de sacarose nas proporções de 50; 100; 200 e 500 microlitros	40
Tabela 7	Teste com a síntese bruta de picolinato de sacarose nas proporções de 50; 100; 200 e 500 microlitros	40
Tabela 8	Resultados dos halos de inibição expressos em centímetros (cm) em <i>E. coli</i> das frações do nicotinato de sacarose	42
Tabela 9	Resultados dos halos de inibição expressos em centímetros (cm) em <i>S. enteritidis</i> das frações do nicotinato de sacarose	42
Tabela 10	Resultados dos halos de inibição expressos em centímetros (cm) em <i>B. cereus</i> das frações do nicotinato de sacarose	43
Tabela 11	Resultados dos halos de inibição expressos em cm em <i>E. coli</i> das frações do isonicotinato de sacarose	44
Tabela 12	Resultados dos halos de inibição, expressos em centímetros (cm) em <i>S. enteritidis</i> das frações do isonicotinato de sacarose	44
Tabela 13	Resultados dos halos de inibição expressos em centímetros (cm) em <i>B. cereus</i> das frações dos isonicotinato de sacarose	45

Tabela 14	Resultados dos halos de inibição expressos em centímetros (cm) em <i>E. coli</i> das frações do picolinato de sacarose	46
Tabela 15	Resultados dos halos de inibição expressos em centímetros (cm) em <i>S. enteritidis</i> das frações do picolinato de sacarose	46
Tabela 16	Resultados dos halos de inibição expressos em centímetros (cm) em <i>B. cereus</i> das frações do picolinato de sacarose	47
Tabela 17	Resultados dos halos de inibição expressos em centímetros (cm) em <i>E. coli</i> nas concentrações específicas das frações dos sucroésteres selecionados com adição de EDTA	50
Tabela 18	Resultados dos halos de inibição expressos em centímetros (cm) em <i>S. enteritidis</i> nas concentrações específicas das frações dos sucroésteres selecionados com adição de EDTA	51
Tabela 19	Resultados dos halos de inibição expressos em centímetros (cm) em <i>B. cereus</i> nas concentrações específicas das frações dos sucroésteres selecionados com adição de EDTA.	51

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

EDTA	Ácido Etilenodiaminotetraacético
BHA	Butilhidroxianisol
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMF	Dimetilformamida
PCA	Ágar padrão para contagem
PDA	Batata Dextrose Ágar
CIM	Concentração Inibitória Mínima
NCCLS	National Comitee for Clinical Laboratory Standards
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
ESI-MS	Espectrometria de Massa com Ionização por Eletronebulização
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho
RMN	Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear
UNICA	União da Indústria de Cana-de-Açúcar

1. INTRODUÇÃO

O açúcar brasileiro atualmente é um dos mais competitivos do mundo em relação ao custo de produção. O produto é produzido no País a um valor quatro vezes menor que o custo médio mundial de produção de açúcar de beterraba. O comércio exportador do produto no Brasil deixou de ser regulamentado pelo governo, embora o mercado de açúcar seja um dos mais regulamentados em nível mundial, sendo que há tendência de maior liberalização em futuras negociações da Organização Mundial do Comércio (OMC). Na safra 2008/09, o Brasil produziu mais de 31 milhões de toneladas de açúcar, segundo dados da União da Indústria da Cana-de-Açúcar (UNICA 2009).

Nos últimos anos tem sido observado um crescente interesse por derivados de sacarose e também por outros materiais de origem renovável que possam resultar em produtos de baixo impacto ambiental. A sacarose é um dos compostos orgânicos mais abundantes e é utilizada em larga escala devido a sua alta disponibilidade, alto grau de pureza e baixo custo. Esse açúcar é produzido através do processo de fotossíntese das plantas e ficam estocadas nas mesmas como uma reserva energética. A aplicação desse composto orgânico e de seus derivados se deve majoritariamente, na indústria alimentícia, como ingredientes de bebidas e alimentos. A sacarose pode também ser aplicada nas indústrias químicas e de processamentos. Um exemplo bem conhecido de aplicação na indústria química é na conversão desse composto orgânico em matérias primas de grande importância econômica, assim como o etanol e o etileno (POLAT; LINHARDT, 2001). Outras aplicações da sacarose estão ilustradas na Figura 1.

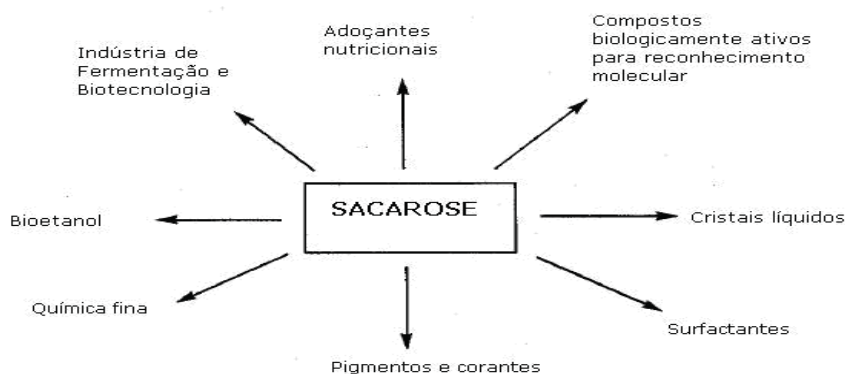


Figura 1. Viabilidade do emprego da sacarose em diversas áreas. Adaptado de Polat; Linhardt, 2001.

Apesar de existir outras aplicações destinadas à diversos setores que não visam o setor alimentício, a porcentagem da produção de sacarose destinada aos setores não alimentícios ainda é muito pequena. Novas tecnologias podem ser empregadas, visando a formação de compostos orgânicos que utilizam as propriedades particulares da molécula de sacarose (POLAT; LINHARDT, 2001). O segmento da química que visa o interesse na síntese de novos produtos utilizando a sacarose como substrato denomina-se sucroquímica (BOSCOLO, 2003). Um desses produtos que podem vir a ser sintetizados e possuem propriedades importantes são os ésteres de sacarose ou sucroésteres, que são ésteres formados por meio de uma síntese orgânica, na maioria das vezes a partir de uma reação de esterificação, utilizando a sacarose como reagente de partida. Esses ésteres possuem inúmeras finalidades, sendo uma delas na inibição de microrganismos, que é o foco da presente dissertação.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A Sacarose como reagente

Estruturalmente e funcionalmente, a molécula de sacarose é única, podendo ser utilizada para diversos fins. Há muitos anos o estudo da sacarose como matéria-prima para a produção de insumos para a indústria química e a produção de novos derivados com maior valor agregado tem despertado o interesse dos pesquisadores e de políticas específicas para este setor. Esse ramo da química é tão importante que passou a ser conhecido como sucroquímica e é entendida como o ramo da ciência e da tecnologia cujo objetivo é acrescentar ao mercado novas utilizações da sacarose e seus derivados, seja por processos de transformações radicais na estrutura carbônica ou por processos que envolvem modificações nas hidroxilas (KHAN, 1995, FERREIRA; DA ROCHA, 2009).

A sacarose ou α -D-glucopiranosideo β -D-fructofuranosil é um dissacarídeo não-redutor constituído de dois monossacarídeos, D-glicose e D-frutose, que estão ligados entre si por meio dos seus carbonos anoméricos. Possui oito hidroxilas reativas sendo três hidroxilas primárias (6, 1' e 6') e cinco hidroxilas secundárias (2, 3, 4, 2' e 3') (KHAN, 1995). Como ocorre com os álcoois, os grupos hidroxilas da sacarose podem ser substituídos por hidrogênio, haletos, tióis, tiocianatos, tioacetatos, azidas e outros grupos monovalentes, implicando em modificações nas suas propriedades químicas, e podendo resultar em compostos de interesse tecnológico. Desta forma, é necessário não somente o conhecimento de síntese destes novos compostos, mas, fundamentalmente, conhecer suas propriedades químicas e suas interações com outros meios, sejam biológicos ou ambientais (PARKER, 1981).

O grande problema enfrentado em sucroquímica é o baixo controle na regioseletividade e no grau de substituição, ou seja, na quantidade produtos que podem vir a serem formados em uma reação de substituição nucleofílica. Os oito grupos hidroxilas reativos da molécula da sacarose proporcionam a possibilidade da formação de 255 diferentes compostos, considerando todas as combinações dos possíveis isômeros a serem formados, desde compostos monossustituídos à compostos polissustituídos (de dois à oito grupos hidroxilas substituídos), de acordo com a Equação 1 (MOH; TANG; TAN, 2000, BOSCOLO, 2003).

$$i = \sum_{m=1}^8 \frac{8!}{m!(8-m)!}$$

(Equação 1)

Onde i é o número total de compostos possíveis e m o grau de substituições.

Por fatores estéricos, a reatividade dos grupos hidroxilas depende, a priori, de serem primários ou secundários, sendo os primários os mais reativos, o que pode ser explorado como fator de seletividade em reações químicas (Figura 2). Mas sabe-se que esta seletividade ocorre somente em casos em que esse tipo de impedimento está envolvido. (PARKER, 1981). A seletividade pode ser alterada com a utilização de metais como o Mn(II) e o Co(II) modificando a ordem de reatividade das hidroxilas. A nova ordem de reatividade, utilizando os cátions Mn(II) e Co(II) fica: (O-3' >> O-2 > O-1' > outras) em função de alterações da nucleofilicidade das hidroxilas coordenadas (MACINDOE; WILLIAMS; KHAN, 1996). Em condições aniônicas não-seletivas, ou seja, com a formação do íon sucato, a reatividade das hidroxilas obedece à seguinte ordem: O-2 >> O-1' > O-3' > O-6 > O-6' (NAVIA; ROBERTS; WINGARD, 1995).

Assim como em um processo competitivo, fatores termodinâmicos e de solvatação contribuem para que ocorram migrações intra e intermoleculares dos grupos substituintes das hidroxilas secundárias para as primárias, possibilitando uma redução no número de regioisômeros produzidos (THEVENET, et al., 1999). As reações de substituição nucleofílica da sacarose são estáveis em meios com pH entre 4 e 8 e em meios com pH baixo pode ocorrer a inversão da sacarose (DEVULAPALLE et al, 2004).

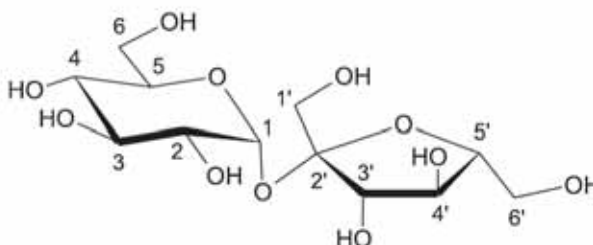


Figura 2. Forma estrutural da molécula de sacarose. A reatividade deste dissacarídeo é diretamente relacionada aos grupos hidroxilas presente na molécula.

Como ilustrado anteriormente, a sacarose pode ser utilizada para diversas finalidades, simplesmente pelo fato da possibilidade da transformação de sua molécula em

vários produtos com valor agregado maior e com a viabilidade de aplicação desses compostos sintetizados em diversas áreas. Uma classe desses compostos são os ésteres de sacarose, que será o foco de nossa discussão.

2.2. Ésteres de Sacarose

A síntese de ésteres de sacarose a partir de ácidos graxos de cadeia longa foi uma das grandes conquistas da Sugar Research Foundation. Esses compostos foram rapidamente aprovados no Japão como aditivos alimentares em 1959 (POLAT; LINHARDT, 2001). Esses sucroésteres são surfactantes não-iônicos, atóxicos ao meio ambiente, proveniente de fontes renováveis e biodegradáveis, e são empregados nas indústrias de cosméticos, alimentos e também na medicina (LIU et al., 1999, CRUCES et al., 2001). Como não são considerados agentes poluidores e são atóxicos aos seres humanos, os ésteres alquílicos de sacarose são usados para a prevenção da separação de fases em produtos compostos de misturas de água/óleo como margarina, manteiga, chocolate, patê sorvetes, pães entre outros (AKOH, 1992, HUSBAND et al., 1998.). A Food and Agriculture Organization (FAO) sugere um nível máximo de sucroésteres obtidos a partir de ácidos graxos de 10 g/kg, quando esses produtos são utilizados como agentes emulsificantes (FAVIER; ESCUDERO; GUZMÁN, 2009).

Os ésteres de sacarose de cadeia alquílica longa podem ser formados pela reação da sacarose com anidridos ou ácidos graxos. Um dos sucroésteres mais difundidos é o acetato-isobutirato de sacarose, usado em diversos produtos alimentícios industrializados como pães, bolos, bebidas lácteas e xaropes e, sua síntese se dá por meio da reação da sacarose com anidrido acético e ácido isobutírico (PARKER, 1981). Dentre os poliésteres de ácidos graxos o produto comercial Olestra[®] (Procter & Gamble Co) ou Olean[®] (Twin Rivers Technologies) tem recebido atenção especial nos últimos anos devido à sua utilização em dietas hipocalóricas e como depressor do nível de colesterol sanguíneo. Este poliéster graxo da sacarose com grau de esterificação superior a seis foi aprovado pelo FDA em 1996 para consumo humano. Ele apresenta propriedades físico-químicas semelhantes às dos triglicerídeos naturais (gorduras naturais), sendo atualmente utilizado como substituto não calórico de gorduras na fabricação de produtos alimentícios como batatas fritas, biscoitos, pipocas etc (FERREIRA; DA ROCHA, 2009). A Figura 3 ilustra a estrutura molecular do acetato-isobutirato de sacarose (SAIB) e da Olestra[®].

A ação combinada de ésteres de sacarose com antioxidantes, como por exemplo, o palmitato de ascorbila tem possibilitado a redução no escurecimento de células hipodérmicas de frutas como maçã e pêra, resultante da oxidação de α -farneseno contido nesses vegetais (BAUCHOT et al., 1995). Os ésteres de sacarose são capazes de formar microemulsões apenas na presença de co-surfactantes, como álcoois com C2-C8, podendo levar à solubilização de até 45% de água em óleo (GARTI; FANUN, 2000).

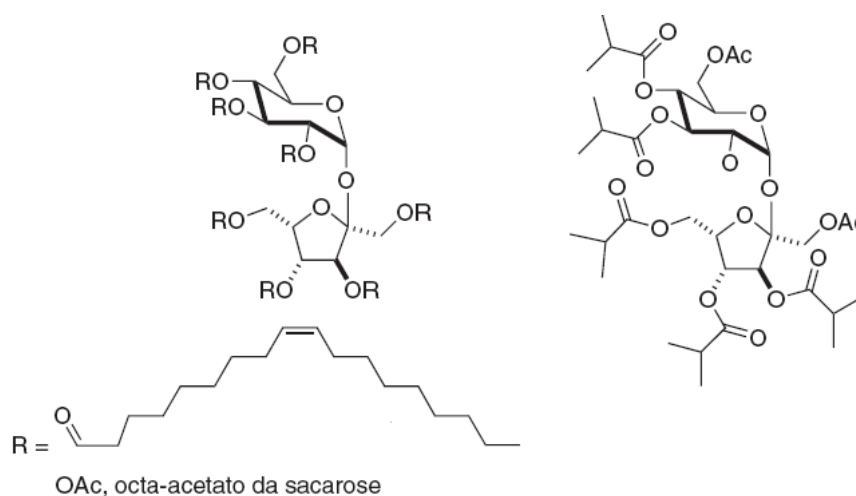


Figura 3. Estrutura da Olestra® (à esquerda) e do Acetato-isobutirato de sacarose (SAIB) (à direita). Fonte: Ferreira; Da Rocha, 2009

Os sucroésteres podem ser sintetizados por três vias: a transesterificação (MOH; TANG; TAN, 2000), a utilização de cloretos de ácidos e anidridos (BOSCOLO, 2003), ou por catálise enzimática (RAKU et al., 2003). O processo de transesterificação que visa a formação do éster de sacarose consiste na reação de um composto, na maioria das vezes uma gordura, ou um triacilglicerídeo com a sacarose, formando o produto final (Figura 4A). Além disso, também é comumente utilizado como reagente de partida os metil ésteres (Figura 4B). Porém, na etapa de formação do sucroéster, necessita-se remover o metanol, que é um subproduto dessa reação, por destilação.

A transesterificação é realizada por meio de um catalisador (geralmente carbonato de potássio) em uma temperatura por volta de 90°C, utilizando DMF (dimetilformamida) ou DMSO (dimetilsulfóxido) como solvente, sendo o segundo um composto mais seguro e mais barato perante o primeiro (POLAT; LINHARDT, 2001). A síntese de sucroésteres por meio da transesterificação em escala industrial envolve altas temperaturas, pressões reduzidas,

condições que proporcionam ausência de água e catalisadores mais caros (CRUCES et al., 2001).

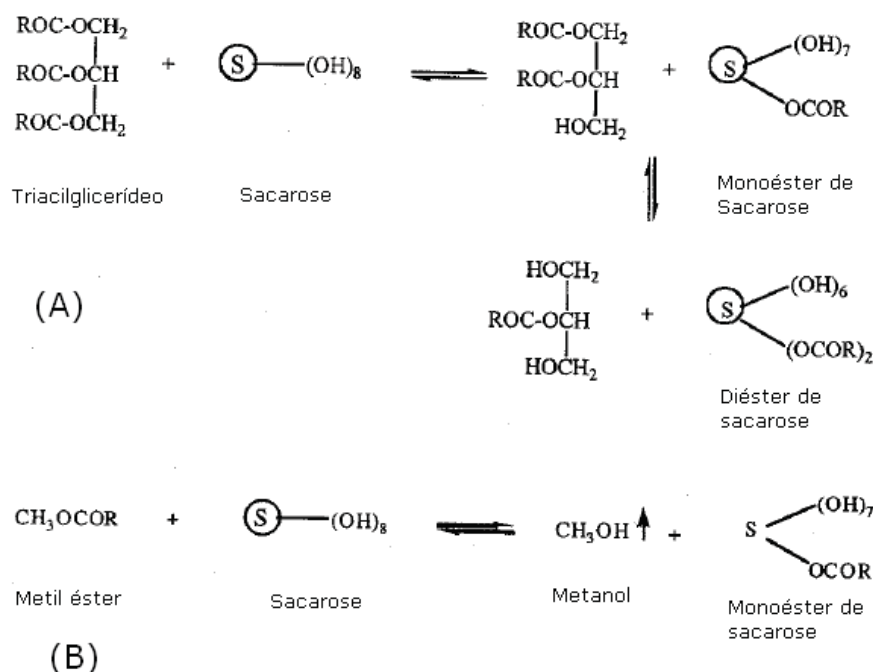


Figura 4. Modelo de reações de transesterificação objetivando a formação do sucroéster. Reação da sacarose com um triacilglicerídeo (A) e reação de um metil éster com a sacarose (B). Adaptado de Polat; Linhardt, 2001.

A utilização de compostos contendo cloretos de ácidos orgânicos visando a formação de ésteres de sacarose necessita de condições alcalinas no meio para neutralizar o HCl liberado na reação, e, conseqüentemente, evitar com que ocorra a inversão de sacarose. (BOSCOLO, 2003, DEVULAPALLE et al., 2004).

A síntese de sucroésteres pode também ser realizada biologicamente, por meio de catálise enzimática. Raku et al. (2003) sintetizaram um éster de sacarose a partir do ácido undecilênico utilizando proteases provenientes do microrganismo *Bacillus subtilis*. Ferrer et al. (2004) utilizaram uma mistura de lipases provenientes de *Thermomyces lanuginosus* e *Candida antarctica B* como o catalisador da síntese do laurato de sacarose. Os autores apontam ainda que a síntese enzimática de ésteres de açúcares, bem como a sacarose, apresenta melhor seletividade dos produtos que serão formados com relação à síntese quimicamente realizada. Para a utilização de enzimas na síntese dos chamados ésteres de açúcares, é importante ressaltar a escolha do solvente, já que os solventes que são normalmente utilizados nas vias químicas tradicionais, como o DMSO e a DMF na maioria

das vezes inibe a ação enzimática, além de serem incompatíveis para a indústria de alimentos (WALSH et al., 2009).

Como exemplificado acima, existem algumas vias tradicionais de formação de ésteres de sacarose, os quais podem também ser encontrados na natureza como substratos de plantas e microrganismos. O exemplo mais conhecido são os sucroésteres extraídos da superfície das folhas das plantas do gênero *Nicotiana* sp. e que apresentam potencial inseticida (SIMONOVSKA; SRBINOVSKA; VOVK, 2006).

Outro exemplo de fonte natural de sucroésteres é a *Bidens parviflora*, uma planta muito utilizada para fins medicinais na China, devido a atividade anti-inflamatória, anti-reumática e antipirética, propriedades estas atribuídas a sucroésteres derivados do ácido cumárico (WANG et al., 2003).

Sucroésteres derivados dos ácidos cumárico e ferúlico também foram extraídos por Takasaki et al. (2001) da planta *Polygonum lapathifolium*. Chortyk; Pomonis e Johnson (1997) descobriram que vegetais do gênero *Petunia* produziam um exsudato contendo ésteres de açúcares, dentre eles os de sacarose, que apresentavam toxicidade contra a mosca branca (*Bemisia tabaci*) que é considerada praga em plantações de batata-doce. Moser et al. (1999) identificaram quatro grupos de isômeros de ésteres de sacarose tetra acilados que apresentaram atividade moluscicida e antimicrobiana extraídos da planta *Petunia hybrida*. Ovenden et al. (2005) extraíram e caracterizaram ésteres de sacarose acilados proveniente da planta *Physalis viscosa*, nativa da América do Sul e América do Norte. Os autores ainda, afirmam que o composto derivado da sacarose extraído da planta pode ser utilizado como um substituinte de drogas antibacterianas.

2.2.1. Atividade Biológica de Ésteres de Sacarose

Uma propriedade dos ésteres de sacarose, ainda muito pouco explorada, é a atividade biológica destes compostos (bactericida, viricida, fungicida, moluscicida, acaricida e inseticida). Além dos sucroésteres naturais que são extraídos de plantas e daqueles sintetizados a partir de uma reação química, derivados de ésteres de ácidos graxos como substratos, existem muitos outros compostos químicos atóxicos que podem ser empregados como reagente de partida na síntese e que possam contribuir com seu potencial biológico. Alves et al. (2008) trabalharam sistematicamente na síntese e avaliação dos efeitos acaricida e inseticida de diferentes sucroésteres, tais como, o benzoato de sacarose, o octaacetato de

sacarose, dentre outros. Em um estudo realizado sobre a mosca branca *Bemisia tabaci*, uma das principais pragas do século XX. Esses demonstraram o grande potencial desta classe de compostos quanto à atividade biológica. Ésteres derivados de sacarose apresentam propriedades controladoras sobre bactérias mesofílicas e termofílicas formadoras de esporos, como *Clostridium perfringens*, em alimentos hermeticamente embalados (MARSHALL; BULLERMAN, 1994).

A partir da caracterização de sucroésteres extraídos das plantas, alguns autores visaram à síntese dos mesmos, ou de ésteres de sacarose com propriedades similares em laboratório podendo assim explorar melhor as propriedades dessas substâncias. Chortyk; Kays e Teng (1996) sintetizaram um sucroéster diacílico com propriedades similares ao produzido naturalmente pelas plantas do gênero *Nicotiana sp* com a finalidade de testar a atividade biológica contra moscas brancas e pulgões. Mckenzie e Puterka (2004) sintetizaram o octanoato de sacarose com o objetivo de estabelecer uma concentração pela qual esse composto seria mais eficaz contra *Diaphorina citri*, vetor do patógeno de plantas *Liberobacter asiaticum*.

Ésteres de sacarose obtidos a partir de ácidos graxos são os que apresentam o maior número de registros na literatura com relação à atividade biológica. Monkt e Beuchat (1995) estudaram o potencial de inibição de quatro sucroésteres de ácidos graxos (palmitato de sacarose, laurato de sacarose, estearato de sacarose e oleato de sacarose) no crescimento de *Listeria monocytogenes* em carne moída. Devullapalle et al. (2004) sintetizaram uma série de ésteres de açúcares, dentre eles o 6-O-laurato de sacarose, e estudaram a atividade antimicrobiana desses compostos no microrganismo *Streptococcus sobrinus*, responsável por causar cáries em seres humanos.

Há diversos outros relatos de que os ésteres de sacarose sintetizados a partir ácidos graxos influenciam negativamente no crescimento de bactérias Gram-positivas, bactérias Gram-negativas, bolores e leveduras (Tabela 1). Os mais estudados para essa finalidade são os compostos provenientes dos ácidos graxos de cadeia longa, assim como os ácidos oléico, linoléico, palmítico, esteárico, etc (MARSHALL; BULLERMAN, 1994).

Tabela 1. Susceptibilidade de micro-organismos à ésteres de sacarose derivados de ácidos graxos Adaptado de Marshall; Bullerman (1994)

<u>Microrganismo</u>	S	<u>Microrganismo</u>	S	<u>Microrganismo</u>	S
Bactérias Gram-positivas		<i>Sarcina lutea</i>	+	<i>Vibrio metschnikovii</i>	-
<i>Bacillus cereus</i>	v	<i>Staphylococcus sp.</i>	-	<i>V. tyrogenes</i>	-
<i>B. coagulans</i>	+	<i>S. aureus</i>	v	<i>V. parahaemolyticus</i>	+
<i>B. fichtia</i>	+	<i>S. epidermidis</i>	v	Leveduras	
<i>B. lactis immobilis</i>	+	<i>S. subgrupo II</i>	+	<i>Candida albicans</i>	+
<i>B. megaterium</i>	+	<i>Streptococcus cremoris</i>	-	<i>C. krusei</i>	+
<i>B. mesentericus</i>	+	<i>S. diacetylactis</i>	-	<i>C. utilis</i>	-
<i>B. natto</i>	+	<i>S. faecalis</i>	-	<i>Debaryomyces hansenii</i>	-
<i>B. stearothermophilus</i>	+	<i>S. lactis</i>	-	<i>D. kloecckeri</i>	-
<i>B. subtilis</i>	v	<i>S. pneumoniae</i>	+	<i>Pichia membranaefaciens</i>	+
<i>B. tumendaciens</i>	+	<i>S. pyogenes</i>	+	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	-
<i>Clostridium botulinum</i>	+	Bactérias Gram-negativas		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	v
<i>C. butyricum</i>	+	<i>Aeromonas proteolytica</i>	-	<i>S. rouxii</i>	+
<i>C. perfringens</i>	+	<i>Alteromonas communis</i>	+	<i>Torulopsis candida</i>	+
<i>C. sporogenes</i>	+	<i>A. macleodii</i>	-	Fungos	
<i>C. thermoaceticum</i>	+	<i>Beneckea campbelli</i>	-	<i>Alternaria sp.</i>	+
<i>C. thermosaccharolyticum</i>	+	<i>Desulfotomaculum nigrificans</i>	+	<i>Aspergillus flavus</i>	+
<i>Corynebacterium sp.</i>	+	<i>Escherichia coli</i>	v	<i>A. niger</i>	+
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	-	<i>Flavobacterium sp.</i>	+	<i>A. ochraceus</i>	+
<i>L. bifidus</i>	-	<i>F. uliginosum</i>	-	<i>A. oryzae</i>	+
<i>L. casei</i>	-	<i>Klebsiella-Enterobacter sp.</i>	-	<i>A. parasiticus</i>	+
<i>L. lactis</i>	-	<i>Moraxella sp.</i>	-	<i>Cladosporium sp.</i>	+
<i>L. plantarum</i>	-	<i>P. mirabilis</i>	-	<i>Microsporium audouinii</i>	+
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	<i>P. rettgeri</i>	-	<i>Penicillium chrysogenum</i>	+
<i>Micrococcus sp.</i>	+	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	<i>P. citrinum</i>	+
<i>M. lysodeikticus</i>	+	<i>P. fluorescens</i>	-	<i>P. crustosum</i>	+
<i>M. perflavus</i>	-	<i>P. putida</i>	-	<i>P. cyclopium</i>	+
<i>M. roseus</i>	-	<i>Salmonella enteritidis</i>	-	<i>P. patulum</i>	+
<i>M. rubens</i>	-	<i>S. typhimurium</i>	-	<i>P. vermiculatum</i>	+
<i>Nocardia asteroides</i>	+	<i>Serratia marcescens</i>	-	<i>Trichophyton menttagrophytes</i>	+

+ Susceptível; - Não susceptível; v Variado

O estudo da atividade antimicrobiana dos sucroésteres pode ser de extrema importância em diversas áreas nas quais esses compostos são aplicados, como na indústria de

alimentos, cosméticos, na área médica, na agricultura, na indústria farmacêutica, etc. (RAKU et al., 2003).

O mecanismo de ação antimicrobiana dos ésteres de sacarose ainda não está completamente elucidado. Há relatos de que esses compostos interagem e induzem a autólise de células bacterianas e essa ação autolítica pode ser causada devido a um estímulo enzimático, mas nada neste sentido está devidamente comprovado. Há registros também de que essa classe de compostos interfere na esporulação de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, atuando como um agente biostático.

Apesar dos ésteres de sacarose apresentar resultados satisfatórios com relação à inibição do crescimento de fungos, ainda não foi apresentado um mecanismo de ação que explique a interação desses sucroésteres com as células fúngicas (MARSHALL; BULLERMAN, 1994). Ainda sobre a Tabela 1, todos os fungos testados com relação aos sucroésteres derivados de ácidos graxos foram afetados pela ação dos sucroésteres, o que abre um leque muito interessante na área de fitossanidade, pois inúmeras doenças agrícolas são de origem fúngica.

A atividade antimicrobiana dos ésteres de sacarose se mostrou mais eficiente em bactérias Gram-positivas em comparação com as Gram-negativas. Esse fato pode ser explicado pela maior facilidade da interação dos sucroésteres com a parede celular das bactérias Gram-positivas devido à ausência da membrana externa. Para aumentar o espectro inibitório dos ésteres de sacarose em bactérias Gram-negativas, por exemplo, podem-se utilizar sucroésteres com outros compostos que possuam algum potencial antimicrobiano. Por um efeito sinérgico, a toxicidade da combinação dessas substâncias pode ser maior do que a soma de suas atividades antibióticas isoladamente, como no caso do EDTA (ácido etilenodiaminotetraacético) e BHA (butilhidroxianisol) (MARSHALL; BULLERMAN, 1994). Hathcox e Beuchat (1996) estudaram o efeito inibitório do monolaurato de sacarose em *Escherichia coli* O157:H7 em carne moída e cortada em postas. Além disso, os autores estudaram um possível efeito sinérgico do efeito antimicrobiano entre o monolaurato de sacarose e o EDTA e entre ácidos orgânicos, assim como o ácido láctico, acético e o cítrico.

Atualmente, nosso grupo de pesquisa está estudando a síntese e a atividade biológica de uma nova classe de sucroésteres piridínicos (nicotinato, isonicotinato e picolinato de sacarose), dos quais não encontramos referências de que já tenham sido sintetizados e estudados quanto às suas atividades biológicas.

2.3. Compostos piridínicos

Os compostos piridínicos, segundo a literatura, possuem potencial antimicrobiano. No presente projeto, foram empregados ésteres derivados de ácidos piridínicos, tais como, o ácido nicotínico, o ácido isonicotínico e o ácido picolínico. Esses compostos possuem a mesma massa molar, porém, se diferem por isomeria de posição. A Figura 5 apresenta as estruturas dos ácidos piridínicos citados.

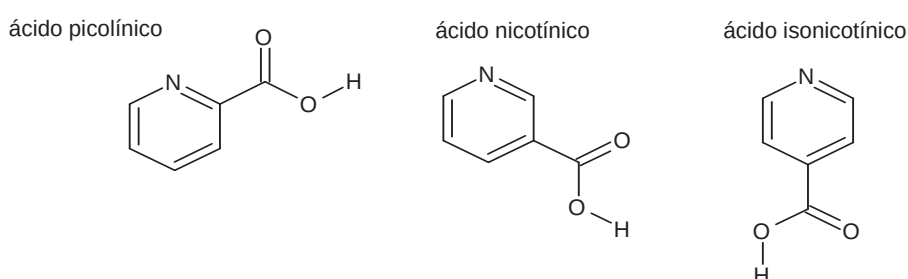


Figura 5. Compostos piridínicos que estão sendo utilizados como reagente de partida no presente trabalho

2.3.1. Ácido nicotínico e derivados

O ácido nicotínico ou ácido 3-piridinocarboxílico possui um grande potencial anti-inflamatório sendo estudado para uso em tratamentos de doenças cardíacas (KAMANNA; KASHYAP, 2008). O ácido nicotínico também conhecido como niacina ou vitamina B3 é uma substância hidrossolúvel e que possui um papel importante para o corpo humano. É importante para a manutenção do equilíbrio da pele e sistema nervoso. Possui também importância relevante ao bom funcionamento do sistema digestório. A deficiência de niacina no corpo humano causa a pelagra, cujos sintomas são: manchas escuras na pele, dermatites, diarreia e demência. Esse composto é encontrado em diversos alimentos como fígado, ovos, em carne vermelha, em alguns legumes, frutas e verduras, etc. (BOGAN; BRENNER, 2008). O ácido nicotínico contido no café foi apontado como um agente antimicrobiano contra a bactéria *Staphylococcus aureus* em experimento realizado por Daglia e colaboradores (1994).

2.3.2. Ácido isonicotínico e derivados

O ácido 4-piridinocarboxílico, ou ácido isonicotínico é um isômero de posição do ácido nicotínico. Compostos derivados do ácido isonicotínico também são avaliados quanto às suas atividades antimicrobianas. Wchter et al. (1998), relataram que os ésteres derivados do ácido isonicotínico possuem uma potencial atividade contra o micro-organismo causador da tuberculose, o *Mycobacterium tuberculosis*. Lourenço et al. (2008) sintetizaram um composto contendo isonicotinohidrazida, derivados do ácido isonicotínico, que também apresentaram atividade biológica contra o *Mycobacterium tuberculosis*. Bordoloi et al. (2001) extraíram um éster derivado do ácido isonicotínico a partir do micro-organismo *Streptomyces* sp. 201 que possui atividade antibacteriana e antifúngica. Esse composto posteriormente foi identificado como o isonicotinato de 2-metil-heptila (Figura 6).

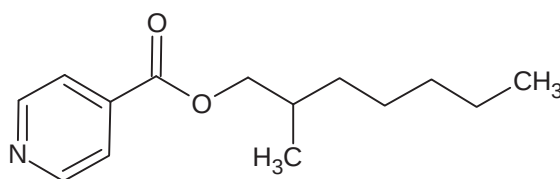


Figura 6. Estrutura do isonicotinato de 2-metil-heptila, composto que possui atividade antimicrobiana

2.3.3. Ácido picolínico e derivados

O ácido 2-piridinocarboxílico, ou ácido picolínico é um isômero de posição do ácido nicotínico e isonicotínico. Esse composto é formado a partir da degradação enzimática do triptofano, é apontado como uma droga de baixo custo e segura (TOMIOKA; SHIMIZU; TATANO, 2007). Esse composto e seus derivados, também apresentam registros de atividade biológica. Mucci et al. (2003) estudaram o efeito sinérgico de um macrófago com o ácido picolínico em fungos. Foi realizado um teste prévio avaliando a atividade biológica do ácido picolínico isoladamente, e foi comprovado que esse composto apresenta atividade antifúngica contra os fungos *Cryptococcus neoformans* e *Cândida albicans*. Tomioka, Shimizu e Tatano (2007) registram que o ácido picolínico possui atividade antimicrobiana contra *Mycobacterium avium*, e essa atividade é potencializada quando é juntamente utilizado claritromicina e rifampicina.

2.4. Estudo da sensibilidade microbiana utilizando a técnica do antibiograma de disco de difusão em meio sólido

O estudo de sensibilidade a antibióticos em bactérias isoladas de diferentes amostras biológicas tem dois objetivos fundamentais: a de orientar o clínico na escolha do melhor tratamento individual, e acompanhar a evolução da resistência bacteriana a partir da revisão do espectro de antimicrobianos. Isto é feito através do antibiograma, que mede a sensibilidade de diferentes antibióticos ou compostos que possam apresentar propriedades antibióticas contra bactérias *in vitro*, e, a partir destes resultados, viabilizarem a aplicação, visando obter boa eficácia *in vivo* (MORENO, 2003).

A metodologia comumente escolhida para avaliação da bioatividade de compostos sobre microrganismos foi o da difusão em meio sólido. Por este método, inicialmente prepara-se uma placa com o meio de cultura adequado e inoculado com o microrganismo de interesse, sobre o qual se depositam discos de papel esterilizados impregnados com o composto a ser avaliado (Figura 7). Em seguida, é processada a incubação das placas em estufa em uma temperatura que o microrganismo em questão se desenvolva bem (geralmente 37°C para a maioria das bactérias e leveduras), depois de 16 horas, quando se procede à leitura dos resultados com a medição dos halos de inibição. Caso o procedimento padrão seja feito adequadamente e se o microrganismo for semeado corretamente na placa, esses halos de inibição serão uniformemente circulares, e haverá um tapete confluyente de crescimento.

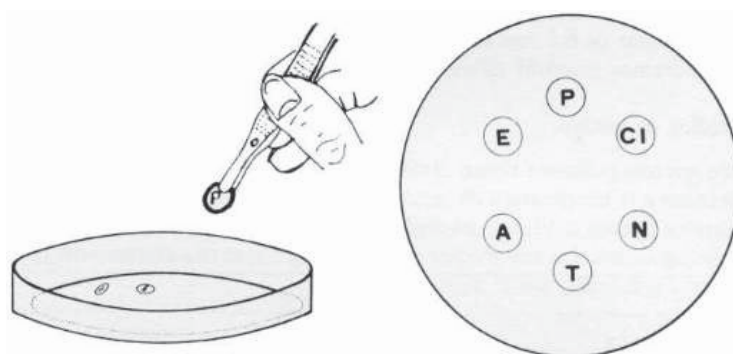


Figura 7. Introdução dos discos de papel nas placas com o meio de cultura, com microrganismos previamente inoculados. As letras nos círculos apenas representam substâncias diferentes sem especificação

Segundo a NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards), testes de sensibilidade são indicados para qualquer organismo responsável por um processo infeccioso que exija terapia antimicrobiana, quando é impossível prever a sensibilidade desse organismo, mesmo conhecendo a sua identificação. Os testes de sensibilidade são indicados, com maior frequência, quando se acredita que o organismo causador pertence a uma espécie capaz de apresentar resistência aos agentes antimicrobianos normalmente usados.

De acordo com a norma M2-A8 da NCCLS, que padroniza os experimentos de disco-difusão, a quantificação do tamanho do halo de inibição pode ser realizada por meio de uma régua ou um paquímetro, na parte de trás da placa de Petri, poucas polegadas acima de um fundo não refletor, iluminando-a com luz refletida. Mede-se o diâmetro do halo de inibição incluindo o diâmetro do disco, adotando-se a medida em milímetros. O halo é caracterizado pela área pela qual a olho nu, não se detecta crescimento (Figura 8). O surgimento de pequenas colônias, detectável apenas com lente de aumento, na margem do halo de inibição do crescimento deve ser ignorado.

Os resultados devem ser interpretados de acordo com o tamanho do halo de inibição, classificando os organismos, nos relatórios, como sensíveis, intermediários, ou resistentes aos agentes testados. Para antibióticos, os testes de disco-difusão baseados apenas na presença ou ausência de um halo de inibição, sem consideração do tamanho do halo, não são aceitáveis. Só podem ser obtidos resultados confiáveis com testes de disco-difusão que usam o princípio de metodologia padronizada e medidas do diâmetro do halo de inibição correlacionadas às concentrações inibitórias mínimas (CIMs) com cepas reconhecidamente sensíveis e resistentes a diversos agentes antimicrobianos.



Figura 8. Exemplo de halo de inibição em um teste de difusão em meio sólido. Fonte: Torres e Cercenado (2010)

O antibiograma foi a metodologia utilizada para avaliar a atividade antimicrobiana dos sucroésteres sintetizados a partir dos metilésteres derivados da piridina, como o nicotinato de metila, o isonicotinato de metila e o picolinato de metila. A título de ilustração, a Figura 9 representa um exemplo de sucroéster derivado do ácido nicotínico que pode ser formado na reação de transesterificação entre a sacarose e o nicotinato de metila (1'-O-nicotinato de sacarose).

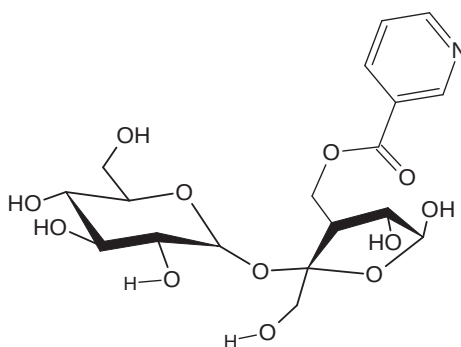


Figura 9. Possível isômero de nicotinato de sacarose formado no processo de transesterificação entre a sacarose e o nicotinato de metila (1'-O-nicotinato de sacarose)

3. OBJETIVOS

3.1. *Objetivo geral*

Realizar sínteses de ésteres de sacarose a partir dos ésteres metílicos do ácido nicotínico e de seus regioisômeros como o ácido isonicotínico e o ácido picolínico e estudar suas respectivas atividades biológicas.

3.2. *Objetivos específicos*

- Realizar a síntese e a separação cromatográfica dos sucroésteres derivados dos ésteres metílicos dos ácidos piridínicos.
- Estudar a atividade antimicrobiana dos produtos de síntese, previamente separados, em bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e leveduras, sendo eles: Bactérias Gram+ *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*; Bactérias Gram- *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Azotobacter vinelandii* *Zymomonas mobilis*; Leveduras *Rhodotorula rubra*, *Saccharomyces cerevisiae*.
- Comparar o poder antimicrobiano dos sucroésteres com os de antibióticos comerciais das séries Gram-positivas e Gram-negativas.
- Estudar um possível efeito sinérgico da combinação dos sucroésteres sintetizados com outros compostos freqüentemente usados em alimentos, mas de baixo poder antimicrobiano como o EDTA.
- Caracterizar quimicamente a estrutura dos sucroésteres isolados cromatograficamente que apresentarem atividade biológica contra os microrganismos testados.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. *Síntese de sucroésteres*

As sínteses dos sucroésteres objetivados foram realizadas por reações de transesterificação da sacarose grau analítico (Vetec) com nicotinato de metila (Acros), isonicotinato de metila (Acros) e picolinato de metila (Sigma-Aldrich) em solvente dimetilsulfóxido (DMSO) (Vetec) e catalisadas por carbonato de potássio (Vetec). Foram adicionados à 6,0 g de sacarose (18 mmoles) e o correspondente molar em éster metílico, 11 mL de DMSO, e 0,55 g de carbonato de potássio (4 mmoles) e as reações foram processadas à 80°C com controle eletrônico de temperatura em uma manta de aquecimento por 24 h. Normalmente as sínteses que envolvem sacarose desenvolvem alta viscosidade e por isto foi empregada a agitação mecânica em sistema aberto, podendo-se assim eliminar o metanol, subproduto das sínteses, de forma a deslocar o equilíbrio para os produtos.

4.2. *Separação dos sucroésteres*

A mistura reacional da síntese de picolinato de sacarose foi separada por HPLC no modo semi-preparativo usando um sistema cromatográfico Dionex composto de uma bomba binária P-680 e um detector de arranjo de diodos UVD-340U com faixa de leitura espectral de 200 a 590 nm acoplado a uma coluna C₁₈ Shimadzu (2,5 cm x 25 cm) com partículas de 10 micrômetros e alça de injeção de 800 µL. Fluxo do solvente (água/metanol) de 8,0 mL/min operando em gradiente água/metanol variando de 0 a 60 % com a seguinte programação: 0-5 min (100% H₂O) alcançando 60 % de metanol em 120 min e permanecendo assim por 10 min. As frações cromatográficas coletadas foram evaporadas a securo em pressão reduzida para a medição da massa e diluídas em água destilada.

4.3. *Estudo da sensibilidade microbiana utilizando a técnica do antibiograma de disco de difusão em meio sólido.*

Os experimentos de atividade antimicrobiana dos sucroésteres foram realizados de acordo com a norma M2-A8 da NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards), que padronizam todos os testes de antibiograma de disco-difusão em meio sólido.

4.3.1. *Microrganismos empregados nos testes*

Os microrganismos *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Azotobacter vinelandii*, *Zymomonas mobilis*, *Rhodotorula rubra*, *Saccharomyces cerevisiae*, utilizados nos testes biológicos, foram cedidos pelo Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia-Cruz, pertencente ao Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos (DETA) do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas (IBILCE-UNESP) de São José do Rio Preto. Os microrganismos foram mantidos em tubo inclinado com meio ágar padrão para contagem (PCA) e ágar nutriente (AN) para bactérias e meio de cultura batata dextrose ágar (PDA) para leveduras.

4.3.2. *Preparo do inóculo para o plaqueamento*

Algumas células dos microrganismos que estavam sendo cultivadas em tubos inclinados foram transferidas para tubos de ensaio com 7 mL de um meio nutriente na forma de caldo, sendo eles, o caldo nutriente no caso de bactérias e o caldo Sabouraud para leveduras, previamente esterilizados. Após o inóculo, os tubos de ensaio contendo o respectivo caldo juntamente com as células microbianas foram encaminhados para uma estufa, à temperatura de 37°C por 24 horas. Após esse período, uma alíquota do inóculo foi adicionado à tubos de ensaio contendo 7mL de NaCl 0,85% (salina) até atingir a escala de turbidez de McFarland 0,5. Para padronizar a densidade do inóculo para um teste de sensibilidade, foi utilizado um controle de turbidez de BaSO₄, equivalente a uma solução padrão de McFarland 0,5 ou seu equivalente óptico. A densidade correta do controle de

turbidez foi verificada usando um espectrofotômetro com fonte de luz de 1-cm e cubeta apropriada para determinar a absorbância. A absorbância da solução padrão de McFarland 0,5 variou entre 0,08 a 0,10 utilizando um comprimento de onda de 625 nm. A escala de turbidez de McFarland 0,5 representa $1,5 \times 10^8$ UFC/mL para bactérias e $1,5 \times 10^6$ UFC/mL para leveduras.

4.3.3. *Plaqueamento dos microrganismos*

Após 15 minutos do tempo de ajuste de turbidez da suspensão do inóculo mergulhou-se uma haste de algodão previamente esterilizada (*swab*) na suspensão ajustada. O *swab* foi girado várias vezes e apertado firmemente contra a parede interna do tubo, acima do nível do líquido, para retirar o excesso. O *swab* umidecido com a suspensão ajustada foi esfregado em placas de Petri contendo meio de cultura em ágar, previamente esterilizadas (meio ágar de Mueller-Hinton, padrão para testes rotineiros de sensibilidade). O procedimento foi repetido esfregando outras duas vezes, girando a placa aproximadamente 60° cada vez, a fim de assegurar a distribuição uniforme do inóculo. Como passo final, passou-se o *swab* na margem da placa contendo o meio de cultura em ágar. Todo esse procedimento teve a finalidade de semear a placa de Petri uniformemente de maneira que toda a extensão da placa contivesse microrganismos.

4.3.4. *Preparo do disco de difusão para os testes de antibiograma*

Para a aplicação dos discos de difusão (CECON-Produtos para Diagnósticos Ltda) nas placas de Petri, contendo microrganismos, os discos ficaram imersos durante 24h nas soluções das frações dos sucroésteres, previamente esterilizadas e diluídas. A proporção utilizada nos experimentos variou de acordo com o avanço dos mesmos e os discos impregnados com as frações dos ésteres de sacarose foram colocados na superfície das placas de Petri já contendo microrganismos, que foram semeados com o auxílio do Swab. Cada disco foi pressionado de encontro à placa, de maneira a assegurar contato completo com a superfície.

Os discos foram coletados dos béqueres estéreis contendo soluções das frações dos sucroésteres com o auxílio de uma pinça esterilizada em chama proveniente de um bico de Bunsen e, os discos foram inseridos logo após os microrganismos serem semeados nas placas de Petri. Após o processo descrito, as placas foram vedadas e colocadas de modo invertido em uma estufa, a 35°C, em até 15 minutos após a aplicação dos discos.

Para o experimento realizado com o bruto das sínteses, foram realizadas diluições de 50; 100; 200 e 500 µL. Já no experimento com as frações cromatográficas separadas, as concentrações das frações dos sucroésteres sintetizados foram às seguintes: 150; 300; 450; 600; 750 e 900 ppm. Ambos os experimentos foram planejados em duplicata.

Para os testes de efeito sinérgico com EDTA, as concentrações do complexante adotadas para realizar a combinação com as frações dos sucroésteres selecionados para o experimento de sinergia foram de 250; 500 e 750 ppm, além do preparo de soluções contendo apenas o EDTA nas mesmas concentrações (controle).

Para todos os experimentos de antibiograma por disco-difusão em meio sólido, os métodos adotados foram exatamente aqueles descritos nos itens 4.3.2.; 4.3.3.e 4.3.4.

4.3.5. Leitura do resultado do antibiograma por disco-difusão

Após o período de incubação, as placas de Petri foram retiradas da estufa e, posteriormente, encaminhadas para a leitura. A leitura foi realizada após 18 h do momento da incubação, para bactérias, tanto Gram-positivas, quanto Gram-negativas. As leveduras por exigirem um tempo para o crescimento maior permaneceram por mais de 24 h incubadas. O halo de inibição foi medido com o auxílio de uma régua e, a eficácia da respectiva fração do sucroéster testado foi classificada de acordo com o tamanho do halo de inibição.

4.4. Caracterização das frações dos sucroésteres bioativos

A caracterização dos compostos isolados foi realizada por espectroscopia de massas, por espectrometria no infravermelho e ressonância magnética nuclear.

4.4.1. *Espectrometria de massas*

As frações que apresentaram atividade antimicrobiana foram selecionadas para caracterização. Uma alíquota das amostras secas foi coletada, diluída em água e centrifugada, e, após esse processo, tamponada a pH 4,50, utilizando tampão acetato de sódio/ácido acético 0,100 M. As amostras foram submetidas a análises por espectrometria de massas por eletronebulização (ESI-MS Bruker Esquire) com detector tipo *íon trap* pelo sistema de injeção direta. As condições do espectrômetro de massas foram: modo positivo, com fluxo de injeção de 750 $\mu\text{L/h}$, a voltagem do *spray* em 4 kV, vazão do gás de dessolvatação (N_2) em 5 L/min e temperatura do nebulizador em 300°C.

4.4.2. *Espectroscopia no infravermelho (FTIR)*

As amostras selecionadas para as análises por FTIR (Bomen MB102) foram previamente secas em evaporador rotativo com pressão reduzida a fim de eliminar todo o solvente contido nas frações, deixando os analitos em condições anidras. As amostras secas foram misturadas com brometo de potássio (KBr), trituradas e prensadas formando pastilhas translúcidas.

4.4.3. *Espectroscopia de ressonância magnética nuclear*

As posições das substituições nas hidroxilas foram determinadas de acordo com as análises de ^1H -RMN e ^{13}C -RMN (Bruker AC 200) nos compostos purificados que apresentaram melhores resultados com relação à atividade antimicrobiana. As frações selecionadas para as análises de ressonância magnética nuclear, que estavam secas, foram diluídas em água deuterada (D_2O) e transferidas para tubos de RMN de 5 mm de diâmetro exterior. As amostras foram então submetidas às análises por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono, no tempo de análise de aproximadamente 16h, sob radiofrequência de 100 MHz.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Síntese e separação dos sucroésteres

A síntese dos sucroésteres derivados dos metilésteres dos ácidos piridínicos foi realizada em condições anidras e os produtos foram separados por cromatografia líquida de alta eficiência com uma coluna C_{18} semi-preparativa. A partir de testes preliminares realizados em espectrofotômetro de UV-Vis, definimos o comprimento de onda de 225nm como padrão para leitura dos cromatogramas que estão representados nas Figuras 10, 11 e 12.

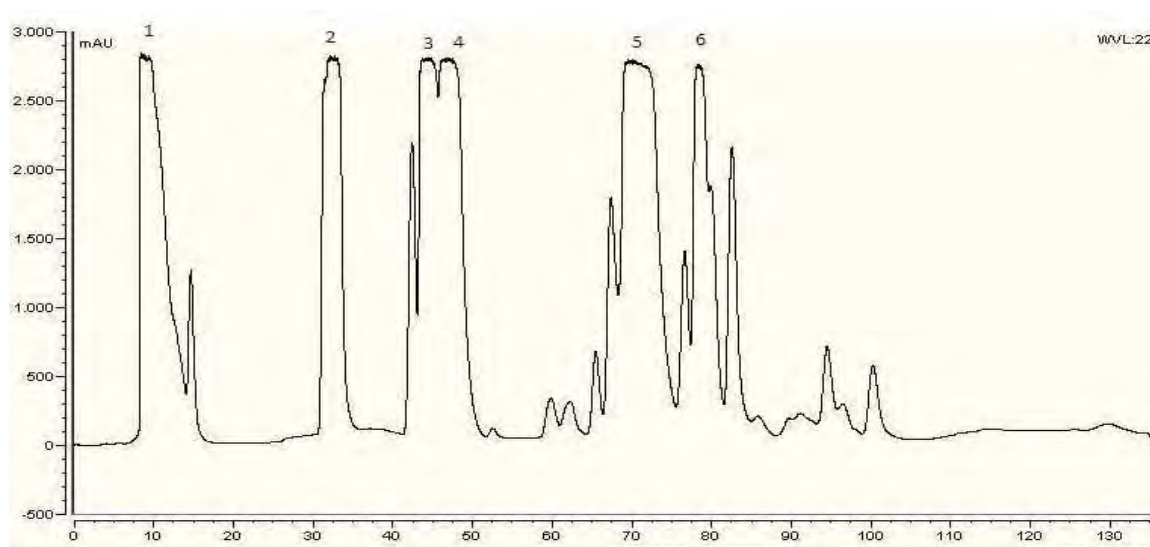


Figura 10. Separação cromatográfica do nicotinato de sacarose em coluna semi-preparativa C_{18} com detector de fotiodo, em 225 nm. Os números dos picos identificam as frações utilizadas nos experimentos de atividade biológica.

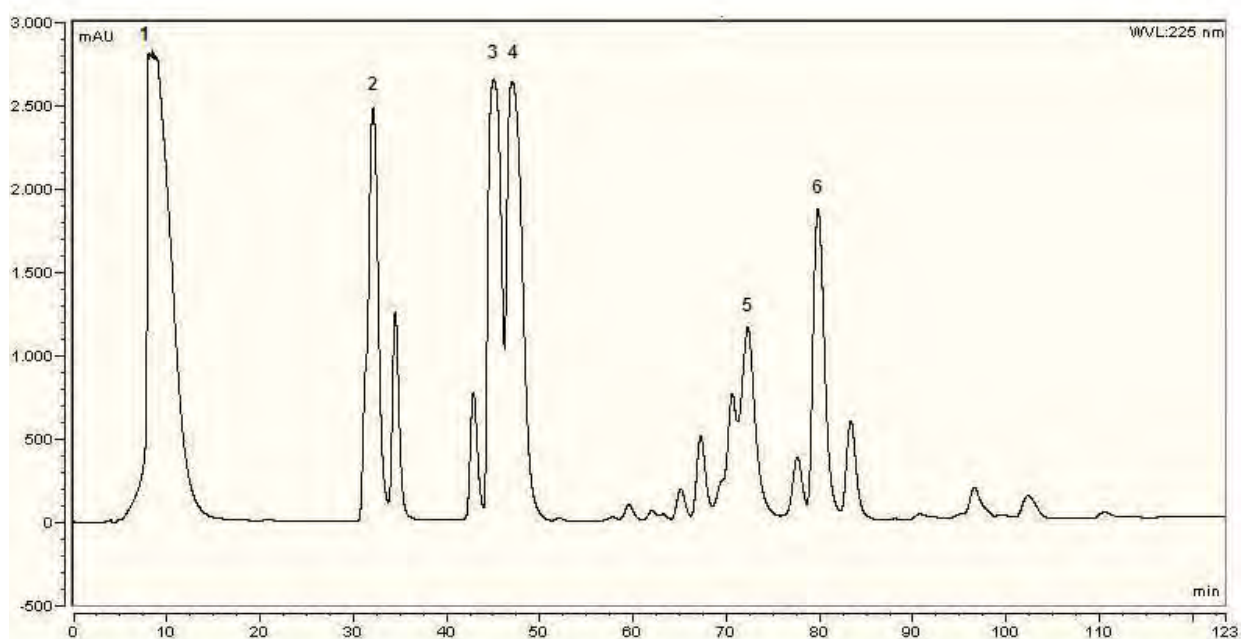


Figura 11. Separação cromatográfica do isonicotinato de sacarose em coluna semi-preparativa C₁₈ com detector de fotiodo, em 225 nm. Os números dos picos identificam as frações utilizadas nos experimentos de atividade biológica.

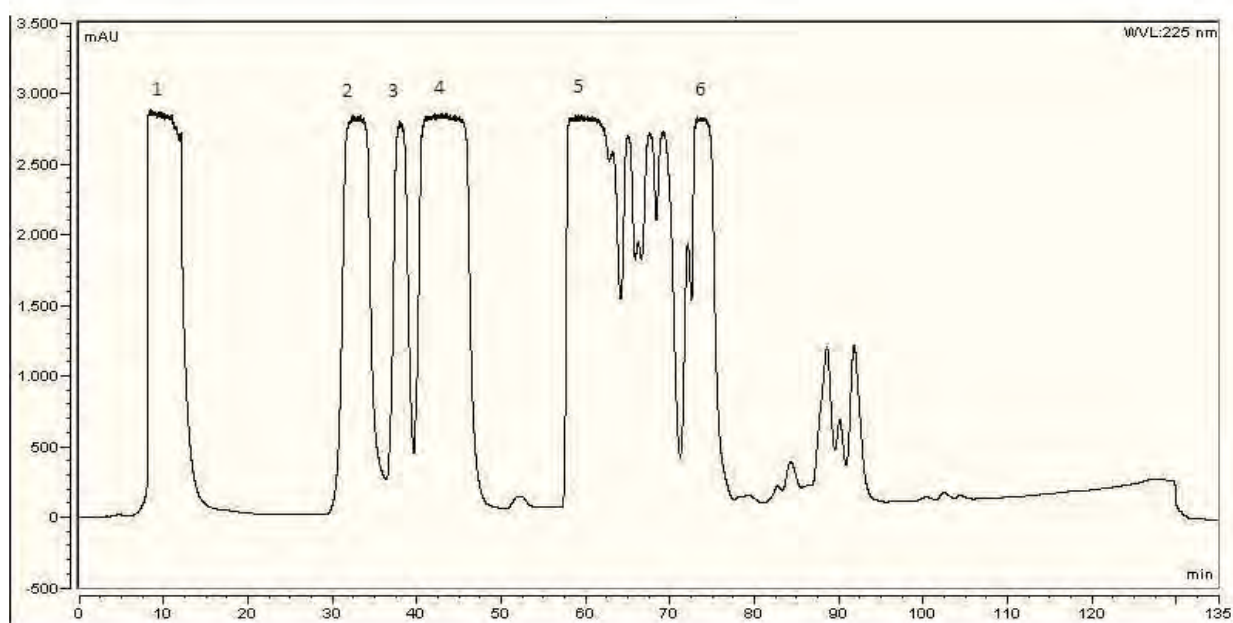


Figura 12. Separação cromatográfica do picolinato de sacarose em coluna semi-preparativa C₁₈ com detector de fotiodo, em 225 nm. Os números dos picos identificam as frações utilizadas nos experimentos de atividade biológica.

A partir dos cromatogramas dos sucroésteres, podemos observar que, por se tratar de uma separação em fase reversa, a ordem de eluição deve ser em termos da polaridade dos compostos formados, assim espera-se que os monoésteres sejam precedidos dos diésteres e assim sucessivamente até o octoéster de sacarose. A quantidade dos isômeros formados na síntese depende sobretudo da razão estequiométrica dos reagentes de partida. Como a reação de transesterificação foi realizada na proporção de 1:1 (sacarose:éster metílico), a probabilidade da formação de compostos com maiores graus de substituição (acima de 2) é bem reduzida.

É possível que as frações dos sucroésteres enumeradas possuam co-eluições, já que de acordo com Moh, Tang e Tan (2000), os métodos de separação envolvendo isômeros de posição em HPLC, assim como os ésteres de sacarose monossubsituídos e, principalmente os di e tri substituídos apresentam limitações na separação de isômeros com mesmo grau de substituição.

5.2. Testes microbiológicos

Antes dos testes de atividade antimicrobiana realizados, foram testados antibióticos convencionais a fim de estabelecer um elo comparativo com o poder antimicrobiano dos sucroésteres testados, tanto com a síntese bruta, quanto com as frações cromatográficas separadas e purificadas.

5.2.1. Testes de antibiograma com antibióticos convencionais

Esse experimento foi realizado apenas para efeito comparativo relacionado aos sucroésteres que serão apresentados após essa seção. Nesta etapa, foram utilizados diversos discos contendo antibióticos (para bactérias) e fungicidas (para leveduras) comerciais, a fim de possibilitar um efeito comparativo entre o poder antimicrobiano desses compostos, que são sintetizados e comercializados com essa finalidade com a síntese bruta dos sucroésteres, assim como as frações separadas e coletadas no cromatógrafo líquido de alta eficiência a partir dos

derivados piridínicos, que são compostos inéditos na literatura e que nunca foram estudadas suas atividades antimicrobianas. Os resultados estão apresentados nas Tabelas 2, 3 e 4.

Tabela 2. Testes com antibióticos convencionais em bactérias Gram-positivas. Resultados dos halos de inibição expressos em centímetros (cm)

Antibióticos / Bactérias G+	<i>B. subtilis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>B. Thurgiensis</i>	<i>S. aureus</i>
Tetraciclina (30 µg)	2,8	2,0	1,8	2,6
Cloranfenicol (30µg)	2,7	2,5	2,7	2,2
Ampicilina (10 µg)	1,2	0,9	0,8	3,3
Gentamicina (10 µg)	1,4	1,0	1,2	1,1
Amicacina (30 µg)	1,2	1,5	1,6	1,2
Sulfazotrim (25 µg)	-	-	-	2,5
- sem atividade				

Tabela 3. Testes com antibióticos convencionais em bactérias Gram-negativas. Resultados dos halos de inibição expressos em centímetros (cm)

Antibióticos / Bactérias G-	<i>S. enteritidis</i>	<i>Z. mobilis</i>	<i>A. vinelandii</i>	<i>E. coli</i>
Tetraciclina (30 µg)	2,3	1,6	1,6	1,5
Cloranfenicol (30µg)	-	2,1	2,1	-
Ampicilina (10 µg)	2,8	0,8	0,9	2,1
Gentamicina (10 µg)	1,2	1,1	1,2	1,1
Amicacina (30 µg)	1,5	1,5	1,5	-
Sulfazotrim (25 µg)	-	-	-	2,3
- sem atividade				

Tabela 4. Testes com antifúngicos convencionais em Leveduras. Resultados dos halos de inibição expressos em centímetros (cm)

Antifúngicos / Leveduras	<i>S. cerevisiae</i>	<i>R. rubra</i>
Fluconazol	2,4	-
Anfotericina B.	1,5	1,2

5.2.2. Testes de antibiograma com os produtos brutos das sínteses dos sucroésteres

Os testes microbiológicos envolvendo os produtos brutos das sínteses foram realizados a fim de observar a susceptibilidade dos microrganismos escolhidos para o projeto e definir, de acordo com a atividade antimicrobiana dos sucroésteres, os microrganismos que serão utilizados até a conclusão do projeto. As tabelas 5; 6 e 7 apresentam os resultados obtidos.

Tabela 5. Teste com a síntese bruta de nicotinato de sacarose nas proporções de 50; 100; 200 e 500 microlitros. Resultados dos halos de inibição expressos em centímetros (cm)

	Microrganismos	50 µL	100 µL	200 µL	500 µL
Gram-positivas	<i>B. subtilis</i>	1,00 ± 0,42	-	1,15 ± 0,21	1,20 ± 0,49
	<i>B. cereus</i>	-	1,20 ± 0,14	0,75 ± 0,21	0,85 ± 0,07
	<i>B. thurgiensis</i>	-	-	-	-
	<i>S. aureus</i>	-	-	-	-
Gram-negativas	<i>S. enteritidis</i>	-	-	-	1,25 ± 0,07
	<i>Z. mobilis</i>	-	-	-	-
	<i>A. vinelandii</i>	-	-	-	-
	<i>E. coli</i>	-	-	0,85 ± 0,07	0,95 ± 0,35
Leveduras	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
	<i>R. rubra</i>	-	-	-	-

- sem atividade

Tabela 6. Teste com a síntese bruta de isonicotinato de sacarose nas proporções de 50; 100; 200 e 500 microlitros. Resultados dos halos de inibição expressos em centímetros (cm)

	Microrganismos	50 µL	100 µL	200 µL	500 µL
Gram-positivas	<i>B. subtilis</i>	1,30 ± 0,42	1,25 ± 0,35	1,35 ± 0,21	0,90 ± 0,14
	<i>B. cereus</i>	0,65 ± 0,07	1,05 ± 0,21	0,95 ± 0,07	0,35 ± 0,49
	<i>B. thurgiensis</i>	-	-	-	-
	<i>S. aureus</i>	-	-	-	-
Gram-negativas	<i>S. enteritidis</i>	-	-	-	1,95 ± 0,63
	<i>Z. mobilis</i>	-	-	-	-
	<i>A. vinelandii</i>	-	-	-	-
	<i>E. coli</i>	-	1,05 ± 0,07	1,10 ± 0,42	0,90 ± 0,14
Leveduras	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
	<i>R. rubra</i>	-	-	-	-

- sem atividade

Tabela 7. Teste com a síntese bruta de picolinato de sacarose nas proporções de 50; 100; 200 e 500 microlitros. Resultados dos halos de inibição expressos em centímetros (cm).

	Microrganismos	50 µL	100 µL	200 µL	500 µL
Gram-positivas	<i>B. subtilis</i>	1,35 ± 0,49	-	-	2,05 ± 1,34
	<i>B. cereus</i>	0,65 ± 0,07	0,90 ± 0,42	0,70 ± 0,14	0,95 ± 0,21
	<i>B. thurgiensis</i>	-	-	-	-
	<i>S. aureus</i>	-	-	-	-
Gram-negativas	<i>S. enteritidis</i>	-	-	0,90 ± 0,28	1,95 ± 0,35
	<i>Z. mobilis</i>	-	-	-	-
	<i>A. vinelandii</i>	-	-	-	-
	<i>E. coli</i>	-	0,70 ± 0,14	1,05 ± 0,07	1,50 ± 0,28
Leveduras	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
	<i>R. rubra</i>	-	-	-	-

- sem atividade

Os testes de atividade antimicrobiana com misturas de regioisômeros de ésteres de sacarose é uma prática utilizada por diversos pesquisadores. Como exemplo, Monk; Bechaut (1995) avaliaram o potencial antimicrobiano de uma combinação de ésteres de sacarose de cadeia longa sintetizados a partir de ácidos graxos contra *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e micro-organismos deteriorantes psicrófilos. No trabalho destes autores, o laurato de sacarose utilizado era composto de aproximadamente 77,8 % de monoésteres; 15,0% de diésteres e 1,4% de triésteres. Já o palmitato de sacarose era composto de aproximadamente 77,3% de monoésteres, 18,3% de diésteres e 2,4% de triésteres.

As bactérias Gram-positivas *B. cereus* e *B. subtilis* e as bactérias Gram-negativas *E.coli* e *S. enteritidis* apresentaram algum grau de susceptibilidade aos sucroésteres piridínicos. O mesmo não ocorreu nas leveduras testadas e nem com as bactérias Gram-positivas *S. aureus* e *B. thurigiensis* e Gram-negativas *Z. mobilis* e *A. vinelandii*.

Embora a finalidade desse experimento fosse apenas a definição dos microrganismos a serem utilizados até o final do projeto, observou-se a presença de halos de inibição expressivos, podendo até ser comparados com halos provocados por antibióticos convencionais, que apresentaram menor poder antimicrobiano contra as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas testadas, assim como os agentes bactericidas Gentamicina e Amicacina.

Os ésteres piridínicos de sacarose sintetizados caracterizam-se por possuírem alta viscosidade. Por isso, em alguns casos, utilizando menores concentrações é possível se obter melhor difusão no meio de cultura, o que pode justificar a ocorrência de alguns halos de inibição maiores em soluções mais diluídas.

5.2.3. Testes de antibiograma com as frações dos sucroésteres

Os estudos da atividade antimicrobiana das frações dos sucroésteres foram realizados seguindo o protocolo do antibiograma. As bactérias testadas nesses experimentos foram: *B. cereus* e *B. subtilis* (Gram-positivas); *S. enteritidis* e *E. coli* (Gram-negativas) e os resultados estão apresentados nas Tabelas de 8 a 16.

Tabela 8. Resultados dos halos de inibição expressos em centímetros (cm) em *E. coli* das frações do nicotinato de sacarose nas concentrações de 150; 300; 450; 600; 750 e 900 ppm. F1N (fração 1 do nicotinato de sacarose)

Frações	150 ppm	300 ppm	450 ppm	600 ppm	750 ppm	900 ppm
F1N	-	-	-	-	-	-
F2N	-	-	-	-	0,75 ± 0,21	-
F3N	0,55 ± 0,07	0,65 ± 0,07	0,60 ± 0,00	0,65 ± 0,21	0,65 ± 0,07	0,85 ± 0,07
F4N	-	-	-	-	-	-
F5N	-	-	-	-	-	-
F6N	-	-	-	-	-	-

- sem atividade.

Tabela 9. Resultados dos halos de inibição expressos em centímetros (cm) em *S. enteritidis* das frações do nicotinato de sacarose nas concentrações de 150; 300; 450; 600; 750 e 900 ppm. F1N (fração 1 do nicotinato de sacarose)

Frações	150 ppm	300 ppm	450 ppm	600 ppm	750 ppm	900 ppm
F1N	-	-	-	-	-	-
F2N	-	-	-	-	-	-
F3N	-	-	-	-	0,60 ± 0,00	0,75 ± 0,07
F4N	-	-	-	-	-	-
F5N	-	-	-	-	-	-
F6N	-	-	-	-	-	-

- sem atividade

Tabela 10. Resultados dos halos de inibição expressos em centímetros (cm) em *B. cereus* das frações do nicotinato de sacarose nas concentrações de 150; 300; 450; 600; 750 e 900 ppm. F1N (fração 1 do nicotinato de sacarose)

Frações	150 ppm	300 ppm	450 ppm	600 ppm	750 ppm	900 ppm
F1N	-	-	-	-	-	-
F2N	0,65 ± 0,07	0,60 ± 0,00	0,65 ± 0,21	-	0,70 ± 0,14	0,60 ± 0,14
F3N	-	-	-	-	0,65 ± 0,07	0,70 ± 0,14
F4N	0,65 ± 0,07	0,70 ± 0,00	0,75 ± 0,07	0,65 ± 0,07	0,80 ± 0,14	0,60 ± 0,28
F5N	-	-	-	-	-	-
F6N	0,70 ± 0,14	0,70 ± 0,00	0,75 ± 0,07	0,60 ± 0,14	0,65 ± 0,07	0,65 ± 0,21

- sem atividade

De acordo com os resultados referentes aos testes de antibiograma exibidos nas Tabelas de 8 a 10, foi possível observar que, dentre as frações testadas, as que apresentaram resultados positivos contra as bactérias *E. coli*, *S. enteritidis* e *B. cereus* foram as frações 2, 3, 4 e 6 do nicotinato de sacarose (F2N, F3N, F4N e F6N). A bactéria *B. subtilis* não foi susceptível às frações separadas.

As concentrações inibitórias mínimas (CIM) nas condições dos testes realizados foram: 600 ppm para F2N e 150 ppm para F3N em *E.coli*; 750 ppm F3N em *S. enteritidis*; 300 ppm para F2N, 750 ppm para F3N, 150 ppm para F4N e 150 ppm para F6N em *B. cereus*. O menor valor da média referente ao tamanho dos halos de inibição, em centímetros, desconsiderando o desvio padrão, foi de 0,55 cm em *E.coli* e o maior valor das médias registrado foi de 0,80 cm em *B. cereus*.

A partir dos valores obtidos nos testes de atividade antimicrobiana das frações separadas do nicotinato de sacarose, foi possível observar uma maior susceptibilidade da bactéria Gram-positiva *B. cereus* perante as frações do sucroéster em questão. Portanto, pode-se afirmar que as frações do nicotinato de sacarose, em geral, foram mais eficientes em *B. cereus*, quando comparadas às bactérias Gram-negativas testadas.

Tabela 11. Resultados dos halos de inibição expressos em cm em *E. coli* das frações do isonicotinato de sacarose nas concentrações de 150; 300; 450; 600; 750 e 900 ppm. F1I (fração 1 do isonicotinato de sacarose)

Frações	150 ppm	300 ppm	450 ppm	600 ppm	750 ppm	900 ppm
F1I	-	-	-	-	-	-
F2I	-	-	-	-	-	-
F3I	0,60 ± 0,14	0,65 ± 0,21	0,70 ± 0,14	0,75 ± 0,07	0,65 ± 0,21	0,70 ± 0,00
F4I	-	0,70 ± 0,14	0,65 ± 0,07	0,85 ± 0,07	0,80 ± 0,14	-
F5I	-	-	-	-	-	-
F6I	0,55 ± 0,07	0,60 ± 0,14	0,70 ± 0,00	0,60 ± 0,00	-	-

- sem atividade

Tabela 12. Resultados dos halos de inibição, expressos em centímetros (cm) em *S. enteritidis* das frações do isonicotinato de sacarose nas concentrações de 150; 300; 450; 600; 750 e 900 ppm. F1I (fração 1 do isonicotinato de sacarose)

Frações	150 ppm	300 ppm	450 ppm	600 ppm	750 ppm	900 ppm
F1I	-	-	-	-	-	-
F2I	-	0,75 ± 0,07	0,55 ± 0,07	0,55 ± 0,21	-	-
F3I	0,60 ± 0,00	0,60 ± 0,00	0,65 ± 0,07	0,75 ± 0,07	-	-
F4I	0,75 ± 0,07	0,80 ± 0,00	0,90 ± 0,00	1,05 ± 0,07	0,60 ± 0,14	0,65 ± 0,07
F5I	-	-	-	-	-	-
F6I	0,55 ± 0,07	0,65 ± 0,21	0,80 ± 0,14	0,85 ± 0,21	0,65 ± 0,07	0,60 ± 0,14

- sem atividade

Tabela 13. Resultados dos halos de inibição expressos em centímetros (cm) em *B. cereus* das frações dos isonicotinato de sacarose nas concentrações de 150; 300; 450; 600; 750 e 900 ppm. F1I (fração 1 do isonicotinato de sacarose)

Frações	150 ppm	300 ppm	450 ppm	600 ppm	750 ppm	900 ppm
F1I	-	-	-	-	-	-
F2I	-	-	-	-	-	-
F3I	0,60 ± 0,14	0,55 ± 0,07	0,75 ± 0,07	0,65 ± 0,21	-	-
F4I	0,55 ± 0,07	0,55 ± 0,07	0,60 ± 0,14	0,55 ± 0,07	-	-
F5I	-	-	-	-	-	-
F6I	-	-	-	-	-	-

- sem atividade

Considerando os resultados do teste de antibiograma de disco-difusão apresentados pelas Tabelas de 11 a 13, o estudo da atividade antibacteriana das frações separadas do isonicotinato de sacarose, foi possível observar que, as frações 2, 3, 4 e 6 do sucroéster em questão (F2I, F3I, F4I e F6I) foram aquelas que apresentaram atividade antimicrobiana contra as bactérias Gram-negativas *E. coli* e *S. enteritidis* e a bactéria Gram-positiva *B. cereus*. A bactéria *B. subtilis* apresentou resistência contra todas as frações do sucroéster testado.

De acordo com os testes realizados, as concentrações inibitórias mínimas das frações do isonicotinato de sacarose foram: 150 ppm para F3I, 300 ppm para F4I e 150 ppm para F6I em *E.coli*; 300 ppm para F2I e 150 ppm para F3I, F4I e F6I em *S. enteritidis*; 150 ppm para F3I e F4I em *B. cereus*. O menor valor referente à média dos halos de inibição medidos, desconsiderando o desvio padrão do experimento, foi 0,55 cm em *E.coli*, *S. enteritidis* e *B. cereus* e o maior valor foi 1,05 cm em *S. enteritidis*.

Com base nos dados apresentados, a susceptibilidade apresentada pelas bactérias Gram-negativas *E.coli* e *S. enteritidis* às frações separadas do isonicotinato de sacarose foi maior, se comparada à bactéria *B.cereus*.

Tabela 14. Resultados dos halos de inibição expressos em centímetros (cm) em *E. coli* das frações do picolinato de sacarose nas concentrações de 150; 300; 450; 600; 750 e 900 ppm. F1P (fração 1 do picolinato de sacarose)

Frações	150 ppm	300 ppm	450 ppm	600 ppm	750 ppm	900 ppm
F1P	-	-	-	-	-	-
F2P	-	-	-	-	0,65 ± 0,07	0,65 ± 0,21
F3P	-	-	-	-	-	-
F4P	0,60 ± 0,14	0,70 ± 0,14	-	0,75 ± 0,21	0,75 ± 0,07	0,95 ± 0,07
F5P	-	-	-	-	-	-
F6P	-	0,70 ± 0,28	-	0,65 ± 0,21	-	0,60 ± 0,14

- sem atividade

Tabela 15. Resultados dos halos de inibição expressos em centímetros (cm) em *S. enteritidis* das frações do picolinato de sacarose nas concentrações de 150; 300; 450; 600; 750 e 900 ppm. F1P (fração 1 do picolinato de sacarose)

Frações	150 ppm	300 ppm	450 ppm	600 ppm	750 ppm	900 ppm
F1P	-	-	-	-	-	-
F2P	-	-	0,75 ± 0,35	-	0,75 ± 0,07	-
F3P	-	-	-	-	-	-
F4P	0,65 ± 0,21	-	-	0,60 ± 0,14	0,75 ± 0,07	0,85 ± 0,07
F5P	-	-	-	-	-	-
F6P	-	0,70 ± 0,00	0,70 ± 0,00	0,70 ± 0,14	0,65 ± 0,21	0,60 ± 0,14

- sem atividade

Tabela 16. Resultados dos halos de inibição expressos em centímetros (cm) em *B. cereus* das frações do picolinato de sacarose nas concentrações de 150; 300; 450; 600; 750 e 900 ppm. F1P (fração 1 do picolinato de sacarose)

Frações	150 ppm	300 ppm	450 ppm	600 ppm	750 ppm	900 ppm
F1P	-	-	-	-	-	-
F2P	-	-	-	-	0,70 ± 0,14	-
F3P	-	-	-	-	-	-
F4P	-	-	-	-	0,70 ± 0,14	0,75 ± 0,07
F5P	0,70 ± 0,14	0,65 ± 0,21	0,60 ± 0,14	-	-	-
F6P	-	-	-	-	-	-

- sem atividade

De acordo com os resultados apresentados nas Tabelas de 14 a 16, as frações 2, 4, 5, 6 do picolinato de sacarose (F2P, F4P, F5P e F6P) apresentaram respostas contra, *E. coli*, *S. enteritidis* e *B. cereus*. A bactéria *B. subtilis* apresentou resistência contra todas as frações separadas.

As concentrações inibitórias mínimas das frações do picolinato de sacarose foram: 750 ppm para F2P, 150 ppm para F4P e 300 ppm para F6P em *E. coli*; 450 ppm para F2P, 150 ppm para F4P e 300 ppm para F6P em *S. enteritidis*; 750 ppm para F2P e F4P e 150 ppm para F5P em *B. cereus*. O menor valor referente à média dos halos de inibição medidos, desconsiderando o desvio padrão do experimento, foi 0,60 cm em *E.coli*, *S. enteritidis* e *B. cereus* e o maior valor foi 0,95 cm em *E. coli* (Figura 13). Analisando os valores referentes aos halos de inibição formados, houve maior susceptibilidade nas bactérias Gram-negativas *E.coli* e *S. enteritidis* às frações, em comparação com à bactéria *B.cereus*.



Figura 13. Halo de inibição provocado por sucroéster piridínico em *E. coli*

As frações 1 e 5 do nicotinato de sacarose (F1N e F5N) e do isonicotinato de sacarose (F1I e F5I) e as frações 1 e 3 do picolinato de sacarose (F1P e F3P) não produziram halos de inibição em nenhuma bactéria testada nestes experimentos.

As frações de número 1 das 3 classes de sucroésteres testadas (F1N, F1I e F1P) não apresentaram atividade antimicrobiana. Embora não caracterizada posteriormente, devido ao desempenho negativo dessas frações, testes preliminares indicaram que existe grande possibilidade de que estas mesmas frações sejam relativas ao solvente empregado para a realização das sínteses, o dimetilsulfóxido (DMSO).

Em testes de antibiograma por disco-difusão com um potencial composto antibiótico dissolvido em DMSO, devido à intensa capacidade de penetração desse solvente em células, muitas substâncias quando associadas ao dimetilsulfóxido podem ser carreadas através das membranas, dessa forma apresentando uma melhor eficiência. Além disso, esse solvente tem a capacidade de interagir ou combinar com ácidos nucleicos, carboidratos, lipídeos, proteínas e muitas drogas sem alterar de forma irreversível a configuração molecular (SOJKA et al., 1990). Assim como no presente trabalho, Felipe e colaboradores (2008) constataram que o DMSO isoladamente não interferiu no crescimento de diversos microrganismos, dentre eles, a *E. coli* e *S. aureus*.

A bactéria Gram-positiva *B. subtilis* apresentou resistência perante todas as frações dos três tipos de sucroésteres testados (Figura 14). Esse fato pode ser explicado pela capacidade desse microrganismo se desenvolver em condições adversas, como em meios onde haja a competição por nutrientes e também se deve aos seus mecanismos de defesa contra

agentes estranhos. A *B. subtilis* é um bastonete aeróbio facultativo, não patogênico, produtor de ácido acético e formador de esporos. Por não causar enfermidades, esse bacilo é muito utilizado como um probiótico e é frequentemente aplicado em bacterioterapia oral e bacterioprophylaxia de desordens intestinais. A ingestão de quantidades significantes de *B. subtilis* restabelece a flora microbiana normal, principalmente após uso prolongado de antibióticos ou em condições de prevalência de diarreia (GARCIA, 2008). No trabalho realizado por Nobre; Horii e Alcarde (2007), a *B. subtilis* influenciou negativamente no crescimento da levedura *S. cerevisiae* se desenvolvendo em cultivo misto, reduzindo em 59,6% a viabilidade celular da levedura. Mesmo após tratamento térmico e por radiação, essa bactéria ainda foi capaz de inviabilizar o crescimento e o desenvolvimento de *S. cerevisiae*.



Figura 14. Exemplo de resistência contra sucroéster piridínico apresentada em *Bacillus subtilis*.

Embora o meio reacional bruto das sínteses dos sucroésteres piridínicos tenham apresentado resultados positivos com relação ao *B. subtilis*, o mesmo não se aplicou às suas frações isoladas. É possível que, em concentrações maiores de algumas dessas frações, se obtenha alguns halos de inibição perante a bactéria. Além disso, a presença do DMSO pode ter sido determinante para a penetração do composto nas células do bacilo. Nesse trabalho, foram utilizadas concentrações menores que 1000 ppm tendo em vista futuras aplicações desses compostos nas áreas alimentos e farmacêuticas.

As frações 2 (750 ppm), 3 (900 ppm) e 4 (750 ppm) do nicotinato de sacarose, as frações 3 (600 ppm), 4 (600 ppm) e 6 (450 ppm) do isonicotinato de sacarose e a fração 4 (900 ppm) do picolinato de sacarose, que apresentam melhores resultados contra as bactérias

testadas, foram selecionadas para o experimento de efeito sinérgico, utilizando juntamente às essas frações selecionadas o EDTA.

5.2.4 – Testes das frações dos sucroésteres selecionadas com EDTA

Os testes a seguir foram realizados a partir da seleção das concentrações das frações que apresentaram melhores resultados com relação à atividade biológica com concentrações conhecidas de EDTA. Os resultados estão apresentados nas Tabelas de 17 a 19.

Tabela 17. Resultados dos halos de inibição expressos em centímetros (cm) em *E. coli* nas concentrações específicas das frações dos sucroésteres selecionados com adição de EDTA (250; 500 e 750 ppm).

	Frações	EDTA 250 ppm	EDTA 500 ppm	EDTA 750 ppm
EDTA	Controle	0,60 ± 0,14	0,65 ± 0,07	0,60 ± 0,14
Nicotinato de Sacarose	F2N 750 ppm	0,85 ± 0,21	0,80 ± 0,14	0,95 ± 0,07
	F3N 900 ppm	0,75 ± 0,21	0,80 ± 0,14	0,70 ± 0,14
	F4N 750 ppm	0,60 ± 0,14	0,70 ± 0,14	0,65 ± 0,21
Isonicotinato de Sacarose	F3I 600 ppm	0,95 ± 0,07	1,00 ± 0,14	1,25 ± 0,07
	F4I 600 ppm	1,15 ± 0,07	0,90 ± 0,14	1,50 ± 0,14
	F6I 450 ppm	0,95 ± 0,07	0,70 ± 0,14	0,80 ± 0,14
Picolinato de Sacarose	F4P 900 ppm	0,65 ± 0,21	0,95 ± 0,07	1,55 ± 0,21

Tabela 18. Resultados dos halos de inibição expressos em centímetros (cm) em *S. enteritidis* nas concentrações específicas das frações dos sucroésteres selecionados com adição de EDTA (250; 500 e 750 ppm).

	Frações	EDTA 250 ppm	EDTA 500 ppm	EDTA 750 ppm
EDTA	Controle	0,60 ± 0,00	0,65 ± 0,07	0,65 ± 0,07
Nicotinato de Sacarose	F2N 750 ppm	0,70 ± 0,00	0,65 ± 0,07	0,60 ± 0,00
	F3N 900 ppm	0,60 ± 0,00	0,75 ± 0,21	0,65 ± 0,21
	F4N 750 ppm	0,65 ± 0,07	0,65 ± 0,07	0,70 ± 0,00
Isonicotinato de Sacarose	F3I 600 ppm	0,85 ± 0,07	0,90 ± 0,14	0,95 ± 0,07
	F4I 600 ppm	0,65 ± 0,07	0,90 ± 0,14	1,30 ± 0,14
	F6I 450 ppm	0,60 ± 0,00	0,80 ± 0,00	1,00 ± 0,14
Picolinato de Sacarose	F4P 900 ppm	0,90 ± 0,00	0,95 ± 0,07	1,25 ± 0,07

Tabela 19. Resultados dos halos de inibição expressos em centímetros (cm) em *B. cereus* nas concentrações específicas das frações dos sucroésteres selecionados com adição de EDTA (250; 500 e 750 ppm).

	Frações	EDTA 250 ppm	EDTA 500 ppm	EDTA 750 ppm
EDTA	Controle	0,60 ± 0,00	0,65 ± 0,07	0,65 ± 0,07
Nicotinato de Sacarose	F2N 750 ppm	0,85 ± 0,21	0,95 ± 0,21	0,75 ± 0,07
	F3N 900 ppm	0,70 ± 0,14	0,80 ± 0,14	0,85 ± 0,07
	F4N 750 ppm	0,80 ± 0,14	1,05 ± 0,07	0,75 ± 0,07
Isonicotinato de Sacarose	F3I 600 ppm	0,65 ± 0,07	0,70 ± 0,00	0,70 ± 0,00
	F4I 600 ppm	0,75 ± 0,07	0,75 ± 0,07	0,90 ± 0,14
	F6I 450 ppm	0,85 ± 0,07	0,85 ± 0,21	1,00 ± 0,14
Picolinato de Sacarose	F4P 900 ppm	0,75 ± 0,07	1,00 ± 0,28	1,40 ± 0,14

A partir dos experimentos realizados com a introdução do EDTA juntamente com as frações dos sucroésteres que apresentaram os melhores resultados, em geral, pode-se afirmar que foram obtidas melhoras desses resultados em comparação com o uso exclusivo das frações dos ésteres de sacarose piridínicos. O EDTA, aplicado juntamente com as frações selecionadas, testado em concentrações de 250; 500 e 750 ppm, na maioria dos testes realizados, contribuiu com a melhora dos resultados obtidos, em comparação com os testes com frações dos sucroésteres isoladas.

Embora o mecanismo de ação dos sucroésteres na inibição de bactérias não esteja totalmente elucidado, existem indícios de que, além de induzir autólise de células, esses compostos também podem causar mudanças na permeabilidade das membranas celulares bacterianas, além de provocar vazamentos de constituintes citoplasmáticos (IWAMI; SCHACHTELE; YAMADA, 1995).

A membrana externa das bactérias Gram-negativas contém glicerofosfolídeos (PL) em sua face interna, e, em sua face externa, moléculas de lipopolissacarídeo (LPS). O LPS é composto de uma parte lipídica e de um heteropolissacarídeo complexo, com caráter parcialmente aniônico. O LPS possui cargas negativas e superfície externa poliônica, une-se à superfície hidrofílica da parede celular, que é constituída de porinas (P), formando-se assim uma barreira para substâncias hidrofóbicas e macromoléculas. Essas cargas negativas da parte hidrofóbica da membrana externa são neutralizadas por cátions divalentes Mg^{2+} e Ca^{2+} (HANCOCK, 1997).

A presença de agentes quelantes, tal como o EDTA, altera a estrutura da membrana externa, pois estes compostos são capazes de seqüestrar íons metálicos divalentes a partir de sítios de ligação no LPS da membrana externa de bactérias Gram-negativas e formar complexos estáveis. Como consequência, ocorre alteração da permeabilidade dessa membrana, tornando a célula bacteriana sensível a determinados compostos, como agentes antibacterianos (HANCOCK, 1997; HELANDER; MATTILA-SANDHOLM, 2000).

Nos testes realizados, relacionando a combinação de sucroésteres com o EDTA, foi possível observar que, embora tenhamos obtido bons resultados dos compostos em *B. cereus* (Gram-positiva) obteve-se grande melhora nos resultados em *E. coli* e *S. enteritidis* (Gram-negativas), comprovando a eficiência do emprego do EDTA juntamente às frações dos sucroésteres. O esquema que representa o mecanismo de ação do EDTA nas células de bactérias Gram-negativas está representado na Figura 15.

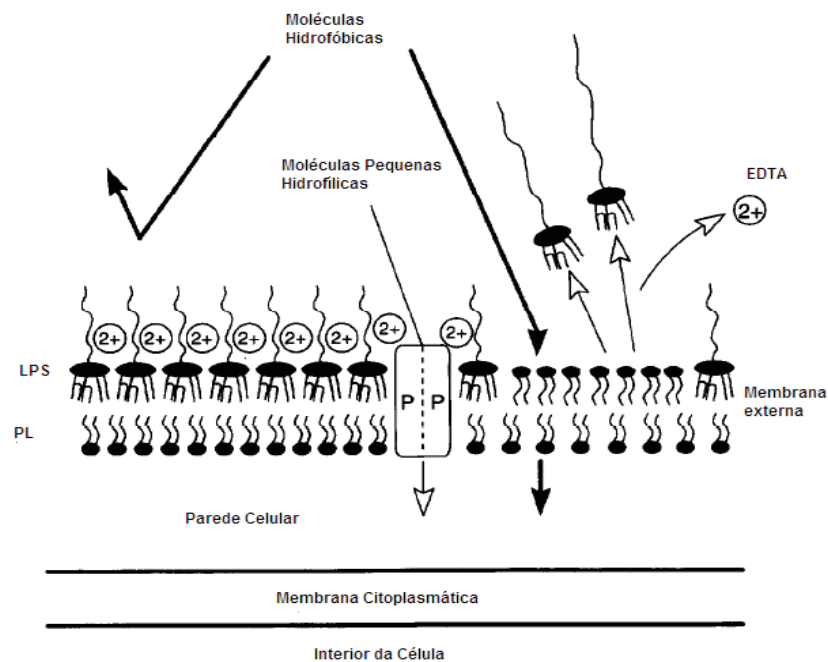


Figura 15. Esquema do mecanismo de ação do EDTA juntamente com um composto hidrofóbico. Adaptado de Helander et al, 1997

Em geral, a concentração de EDTA em 750 ppm foi mais eficiente com relação à inibição do crescimento e desenvolvimento dos microrganismos testados. Essa concentração aplicada é considerada alta em comparação com as concentrações do agente quelante que Hathcox e Beuchat (1996) utilizaram para obter melhores resultados com relação atividade antimicrobiana contra a bactéria *E. coli* O157:H7. Os pesquisadores testaram combinados de monolaurato de sacarose e EDTA, isoladamente e juntos, variando concentrações de ambos os compostos testados, e obtiveram melhores resultados na combinação de 300 ppm de EDTA, e 500 ou 1000 ppm de monolaurato de sacarose.

Os sucroésteres sintetizados a partir de ácidos graxos de cadeia longa apresentam mais afinidade com a camada hidrofóbica da membrana externa das bactérias Gram-negativas, e, conseqüentemente, a concentração de EDTA combinada, que apresentou melhor resultado no experimento realizado por Hathcox; Beuchat (1996) foi menor. Os sucroésteres piridínicos são menos apolares em comparação com o monolaurato de sacarose, apresentando uma menor afinidade com a parte hidrofóbica, e, por isso, obtivemos melhores resultados nos testes de sinergia utilizando EDTA em maior concentração.

As frações em que foram observados efeitos sinérgicos entre os sucroésteres isolados e o EDTA sobre a atividade antimicrobiana foram: fração 4 do isonicotinato de

sacarose (F4I) na concentração de 600 ppm em *E. coli* e a fração 4 do picolinato de sacarose (F4P) em 900 ppm em *E. coli* e *B. cereus* (Figura 16). A concentração de EDTA que contribuiu para a ocorrência do efeito sinérgico, em ambas as frações foi de 750 ppm.

Embora o efeito do agente quelante atue com mais eficácia em bactérias Gram-negativas, há registros na literatura apontando o uso do EDTA combinado com outros compostos com poder antimicrobiano que apresentaram bons resultados com relação à bactérias Gram-positivas. Garcia (2008) realizou testes sinérgicos envolvendo o emprego da bactéria *B. subtilis* para impedir o crescimento de bactérias patogênicas. A autora utilizou o EDTA em combinação com o microrganismo, e outra combinação do agente quelante com nisina para controlar a multiplicação do microrganismo *Clostridium perfringens*, uma bactéria Gram-positiva, anaeróbica, formadora de esporos, que pode causar enfermidades quando presentes em alimentos contaminados.



Figura 16. Halos de Inibição em *Bacillus cereus* com a introdução do EDTA juntamente dos sucroésteres.

O EDTA é aprovado como aditivo em alimentos principalmente como um conservante ou como um inibidor de descoloração por ser um agente sequestrante de cátions, principalmente Ca^{2+} e Mg^{2+} (HELANDER; VON WRIGHT; MATILLA-SANDHOLM, 1997).

5.3 - Caracterização dos Sucroésteres

As frações dos sucroésteres que apresentaram atividade antimicrobiana contra as bactérias testadas, posteriormente foram submetidas a análises de espectrometria de massas. Além disso, uma das frações de cada sucroéster (picolinato, nicotinato e isonicotinato) foi encaminhada para análises de espectroscopia por infravermelho (FTIR). As frações 4 do isonicotinato e do picolinato de sacarose, que apresentaram efeito sinérgico, quando associada ao EDTA, foram submetidas também a análises de espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN).

5.3.1 – Espectrometria de Massas

As Figuras de 17 a 28 representam os espectros de massa obtidos a partir das frações dos três grupos de sucroésteres testados, e que apresentaram resultados positivos em, pelo menos, uma bactéria testada. O gráfico do espectro de massas apresenta a intensidade do sinal em função da relação massa/carga (m/z) da fração do sucroéster em questão.

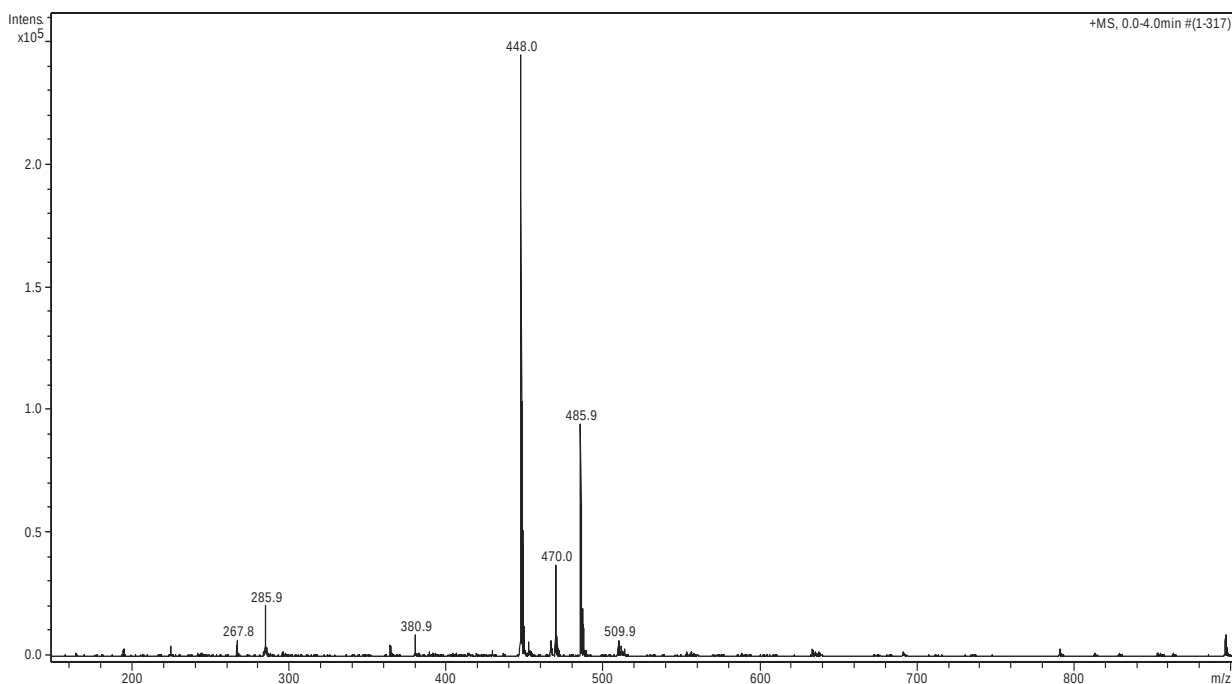


Figura 17. Espectro de massas obtido por ESI-MS da Fração 2 do nicotinato de sacarose

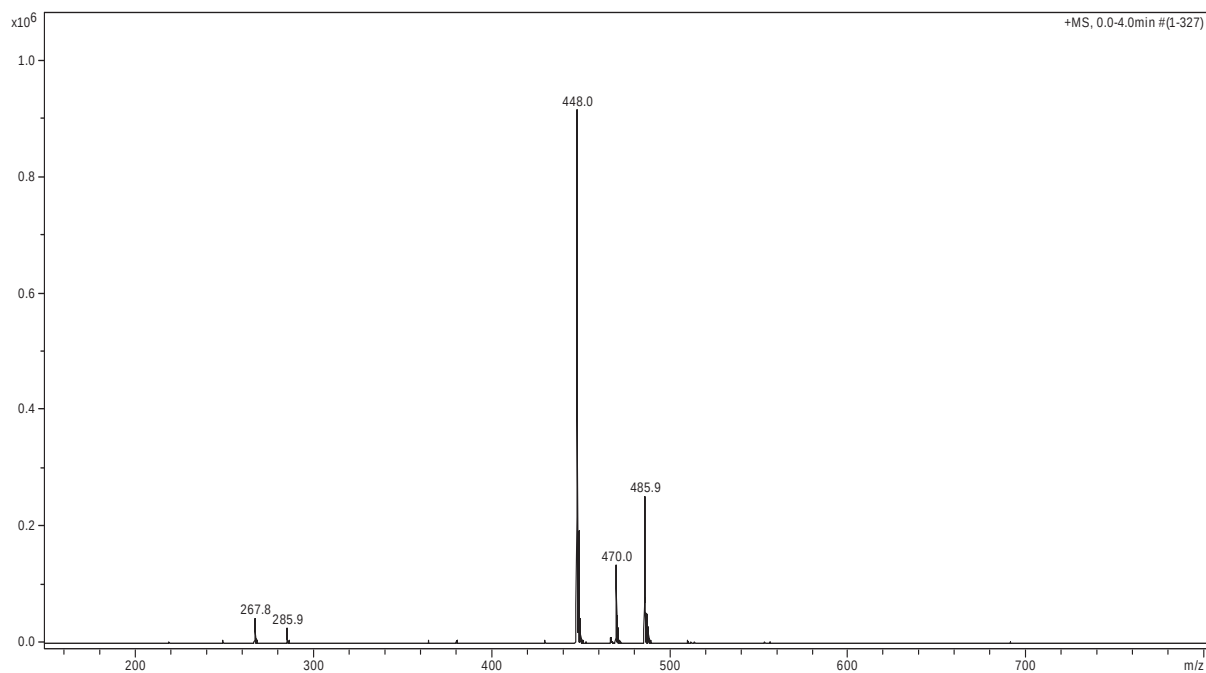


Figura 18. Espectro de massas obtido por ESI-MS da Fração 3 do nicotinato de sacarose

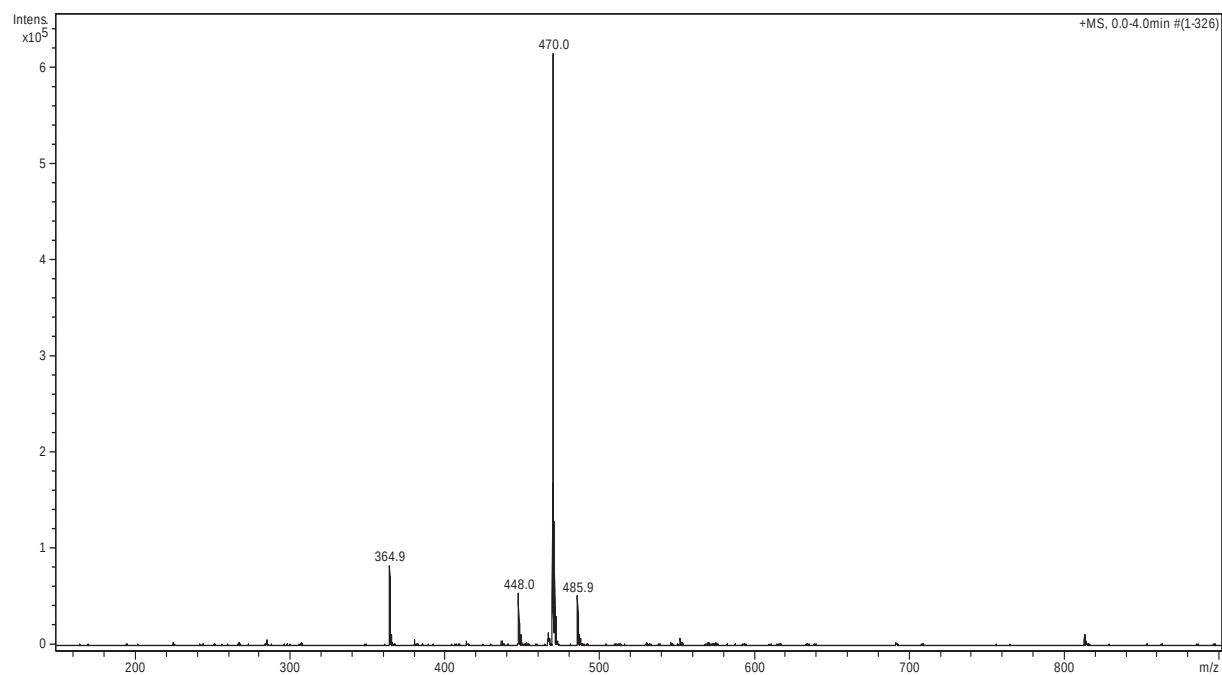


Figura 19. Espectro de massas obtido por ESI-MS da Fração 4 do nicotinato de sacarose

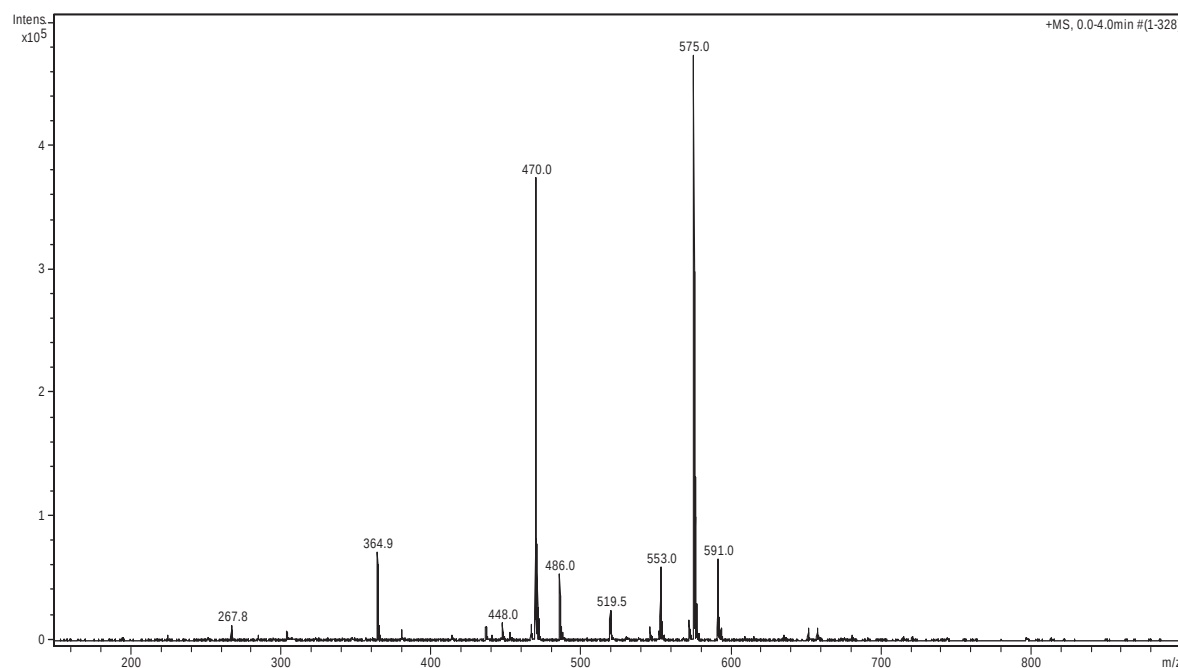


Figura 20. Espectro de massas obtido por ESI-MS da Fração 6 do nicotinato de sacarose

A massa molecular do nicotinato de sacarose monossustituído é de 447 e foram detectados no espectro de massas íons com m/z iguais a 448; 470 e 486, proveniente do íon $[M-H]^+$, do aduto de sódio $[M-Na]^+$, proveniente da solução tampão de acetato de sódio/ácido acético e aduto de potássio $[M-K]^+$ proveniente do K_2CO_3 utilizado como catalisador da síntese da reação de transesterificação que resultou na síntese dos ésteres de sacarose piridínicos. Na fração 6 do nicotinato de sacarose (F6N), além dos valores referentes à uma única substituição, foram obtidos valores referentes a duas substituições. A massa molecular do nicotinato de sacarose dissustituído é de 552 e os valores de m/z encontrados foram 553; 575 e 591, referentes respectivamente a $[M-H]^+$, $[M-Na]^+$ e $[M-K]^+$.

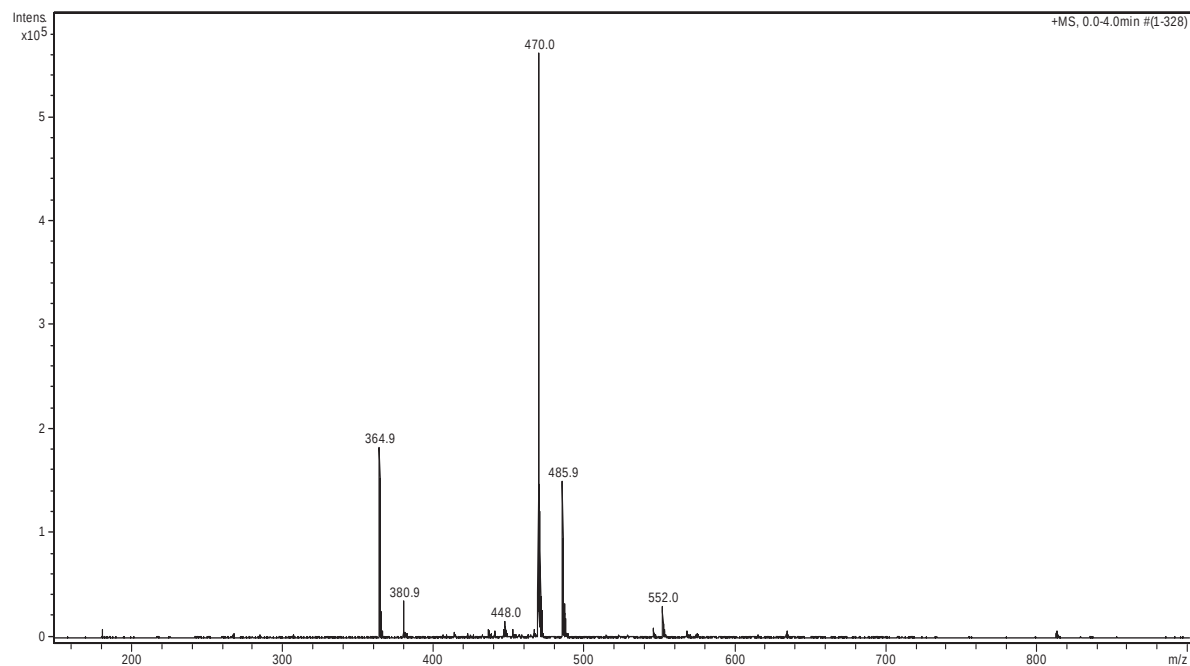


Figura 21. Espectro de massas obtido por ESI-MS da Fração 2 do isonicotinato de sacarose

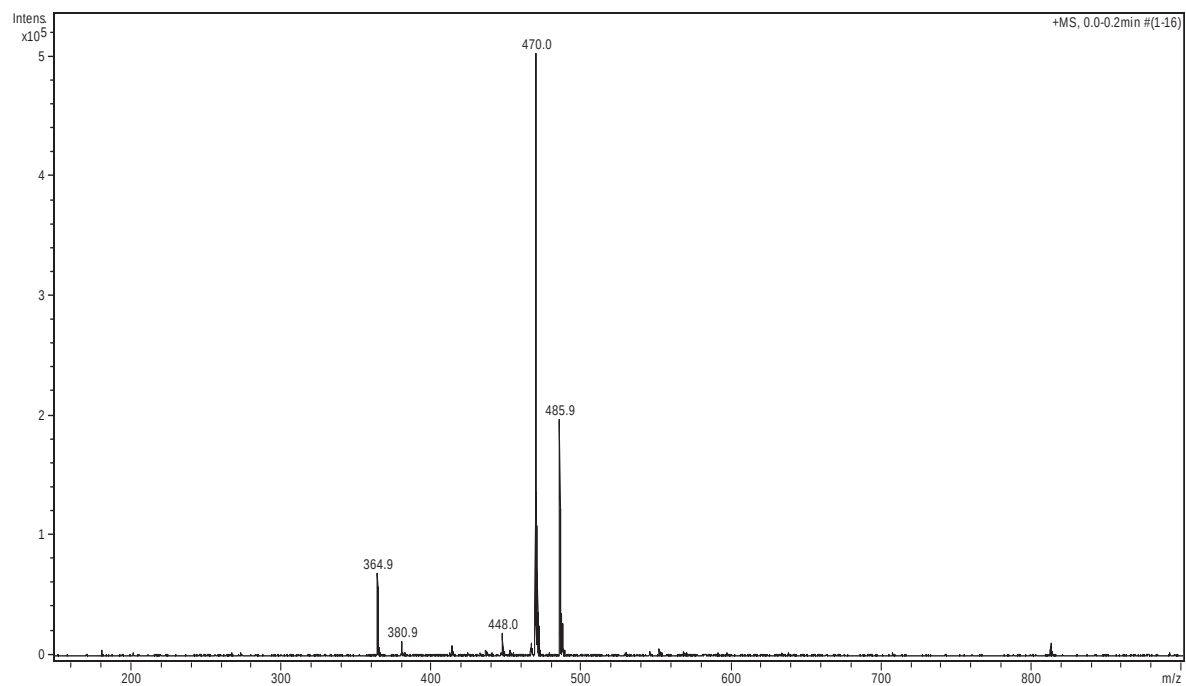


Figura 22. Espectro de massas obtido por ESI-MS da Fração 3 do isonicotinato de sacarose

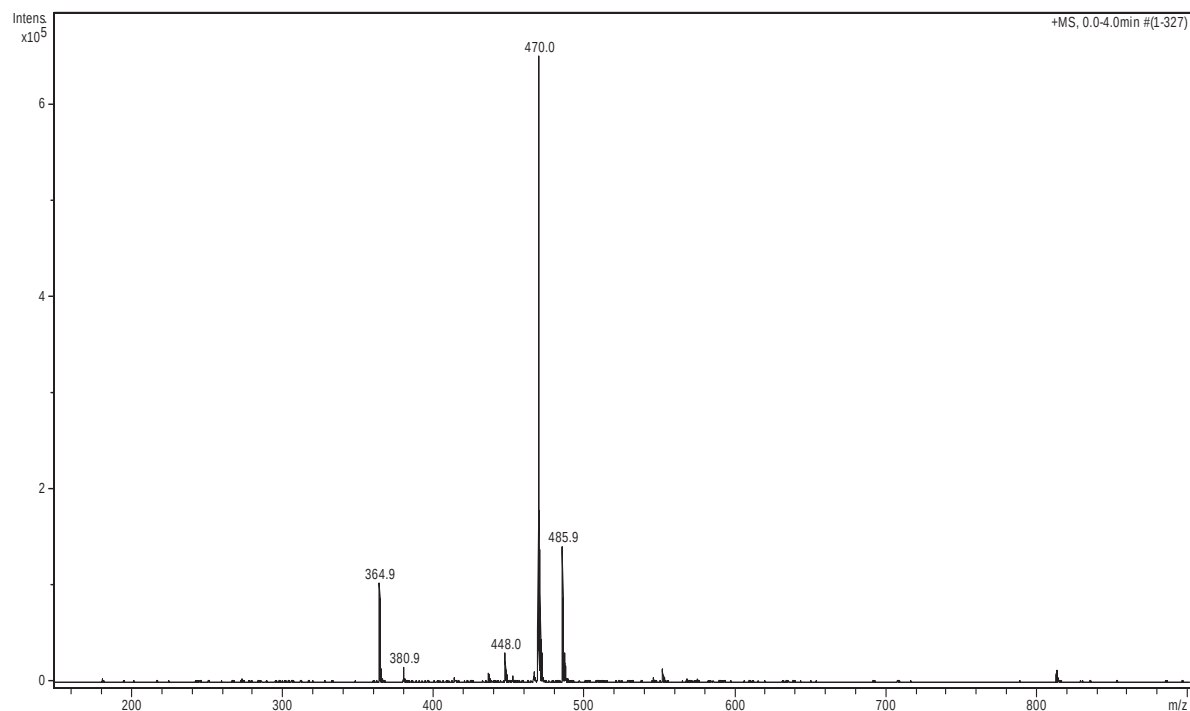


Figura 23. Espectro de massas obtido por ESI-MS da Fração 4 do isonicotinato de sacarose

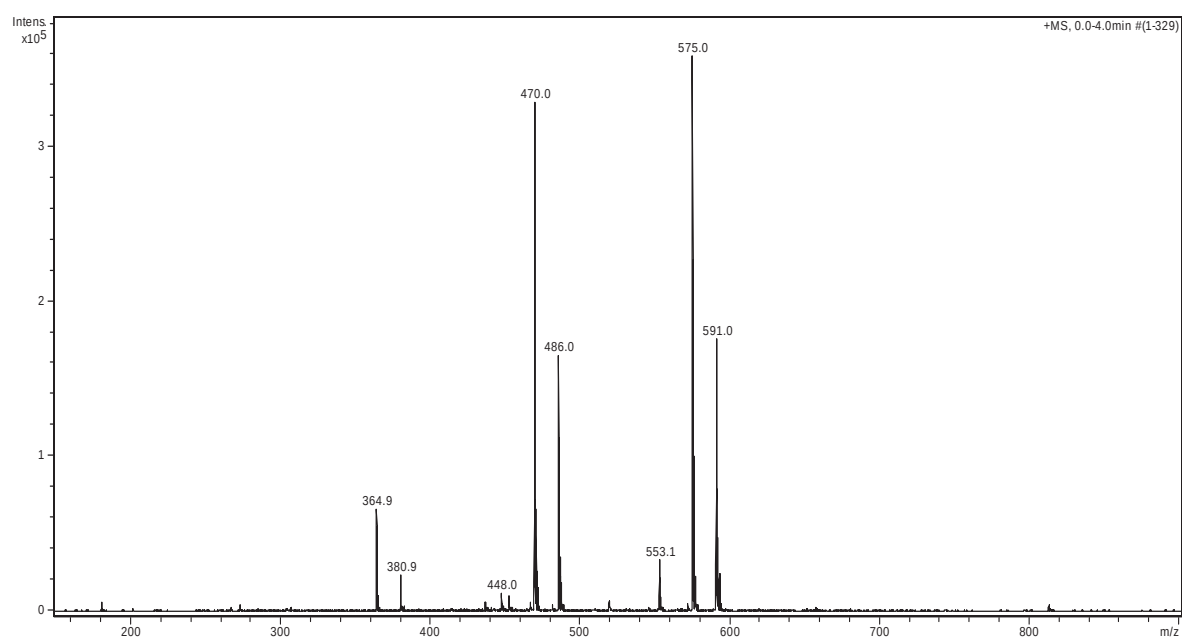


Figura 24. Espectro de massas obtido por ESI-MS da Fração 6 do isonicotinato de sacarose

Assim como nos espectros de massas do nicotinato de sacarose, os sinais evidenciados nos espectros de massas do isonicotinato de sacarose foram referentes às relações m/z : $[M-H]^+$ (448), $[M-Na]^+$ (470) e $[M-K]^+$ (486). A fração 6 isonicotinato de

sacarose (F6I), apresentou valores tanto do sucroéster monossubstituído, quanto do dissustituídos e a relação m/z encontrada foi: 553; 575 e 591, referentes a $[M-H]^+$; $[M-Na]^+$ e $[M-K]^+$, respectivamente.

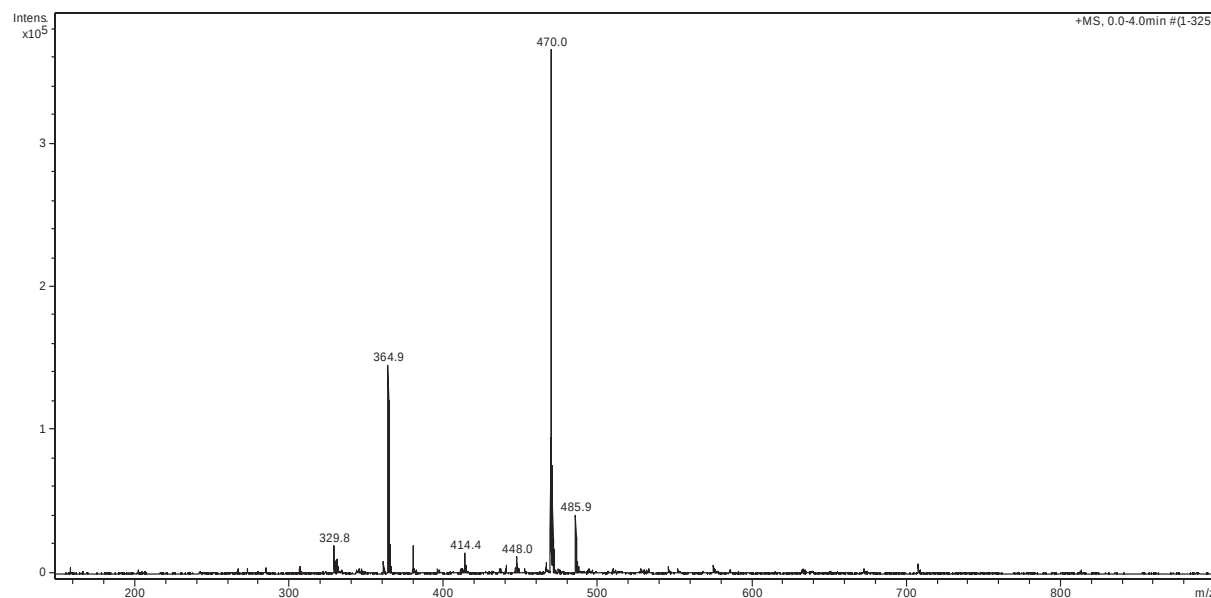


Figura 25. Espectro de massas obtido por ESI-MS da Fração 2 do picolinato de sacarose

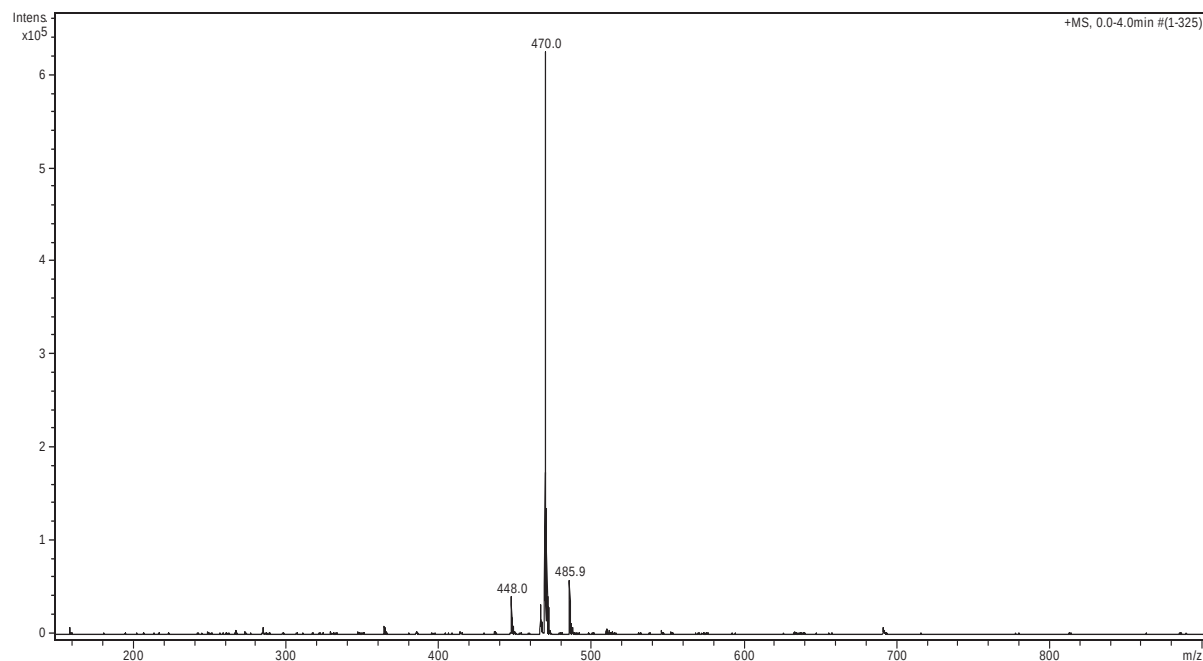


Figura 26. Espectro de massas obtido por ESI-MS da Fração 4 do picolinato de sacarose

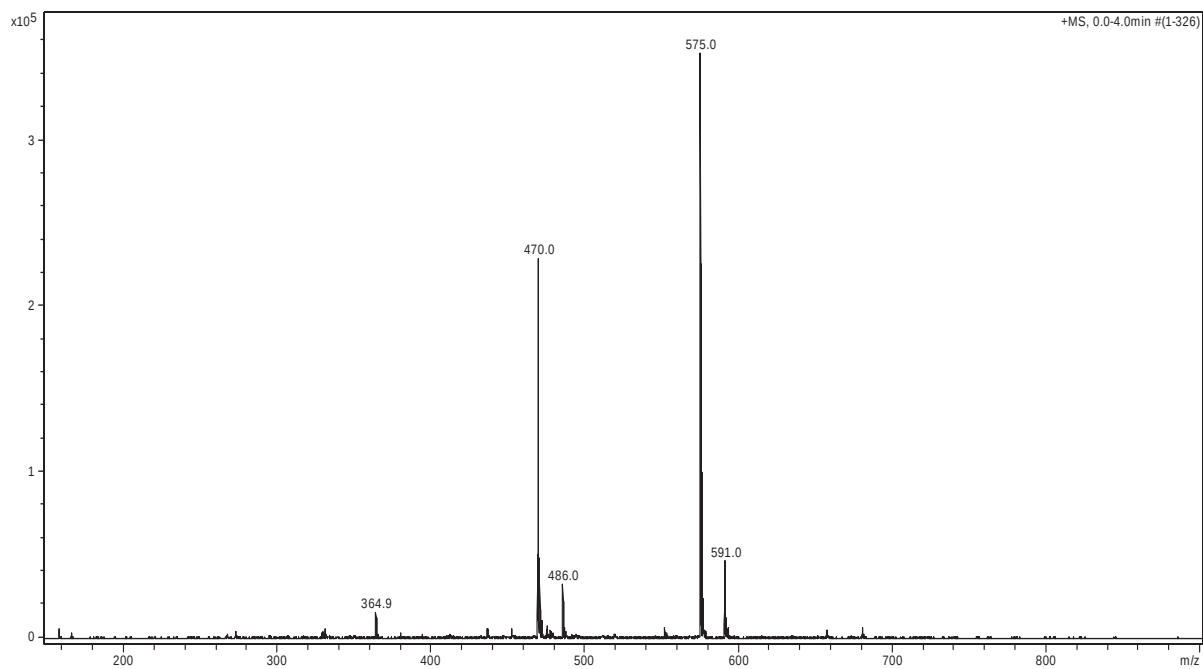


Figura 27. Espectro de massas obtido por ESI-MS da Fração 5 do picolinato de sacarose

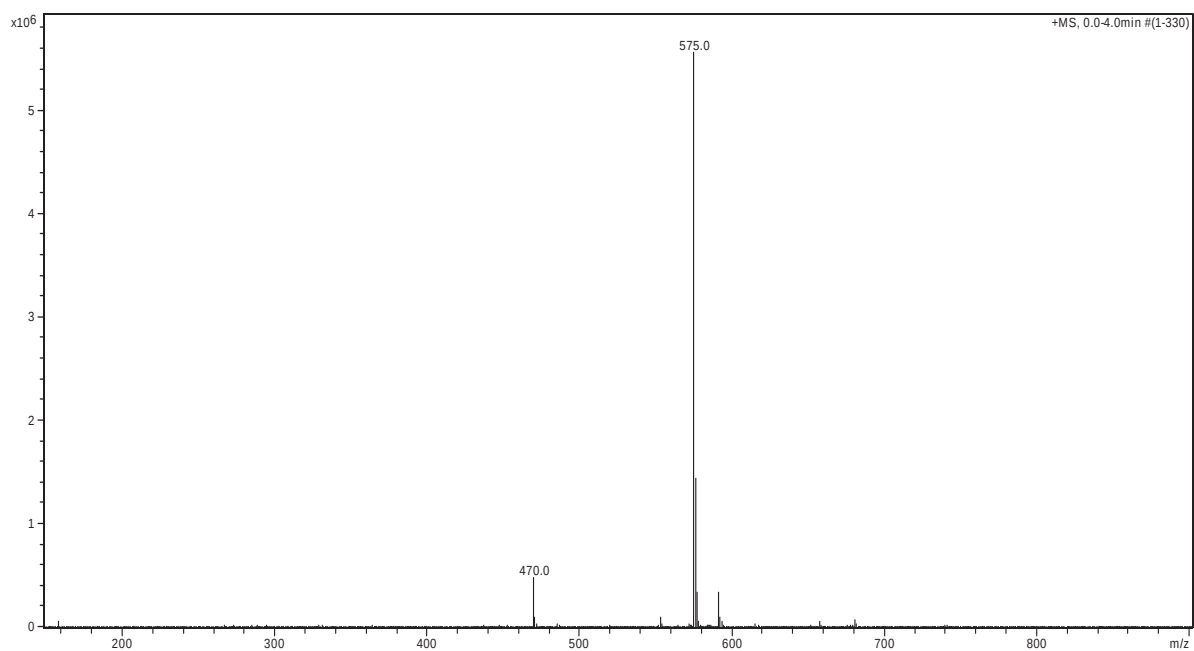


Figura 28. Espectro de massas obtido por ESI-MS da Fração 6 do picolinato de sacarose

De acordo com os espectros de massa apresentados nas Figuras de 25 a 28, pode-se afirmar que, assim como nos espectros de massa referentes às frações do nicotinato e do isonicotinato de sacarose, em todas as frações do picolinato de sacarose testados foram detectados sucroésteres com grau de substituição igual a um, cujos valores da relação entre massa e carga m/z foram 448; 470 e 486. Esses valores representam, respectivamente, o íon $[M-H]^+$, o aduto de sódio $[M-Na]^+$ e o aduto de potássio $[M-K]^+$. As frações 5 e 6 do picolinato de sacarose (F5P e F6P), além dos valores referentes à uma única substituição, foram obtidos sinais referentes a duas substituições em valores de m/z iguais a 553; 575 e 591. Os valores se referem a $[M-H]^+$; $[M-Na]^+$ e $[M-K]^+$, respectivamente.

5.3.2. Espectroscopia no infravermelho

As figuras 29; 30 e 31 referem-se aos espectros no infravermelho das frações 4 do nicotinato, isonicotinato e picolinato de sacarose (F4N, F4I e F4P). Os espectros estão representados pela porcentagem de transmitância em função do número de onda (cm^{-1}).

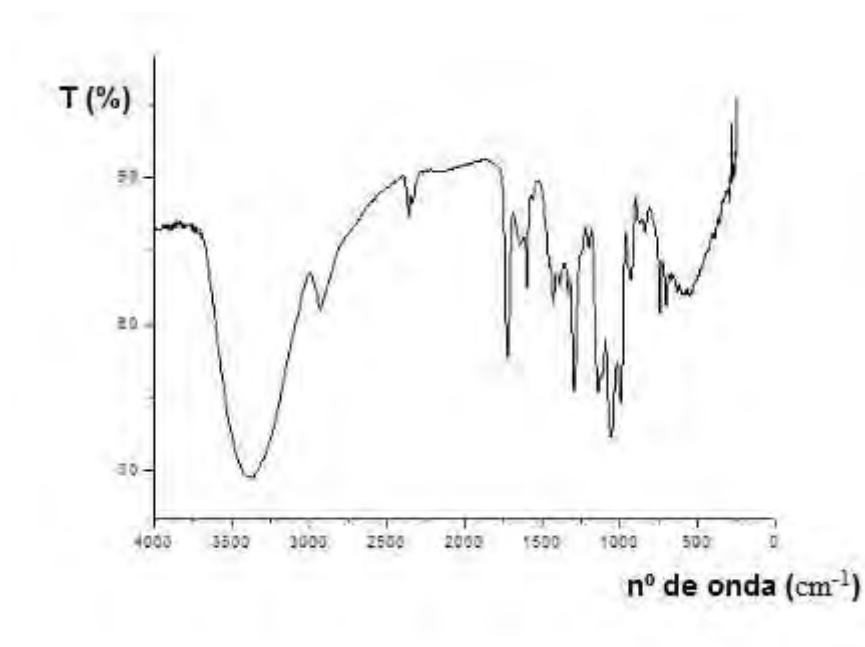


Figura 29. Espectro de infravermelho em modo transmitância da Fração 4 do nicotinato de sacarose (F4N)

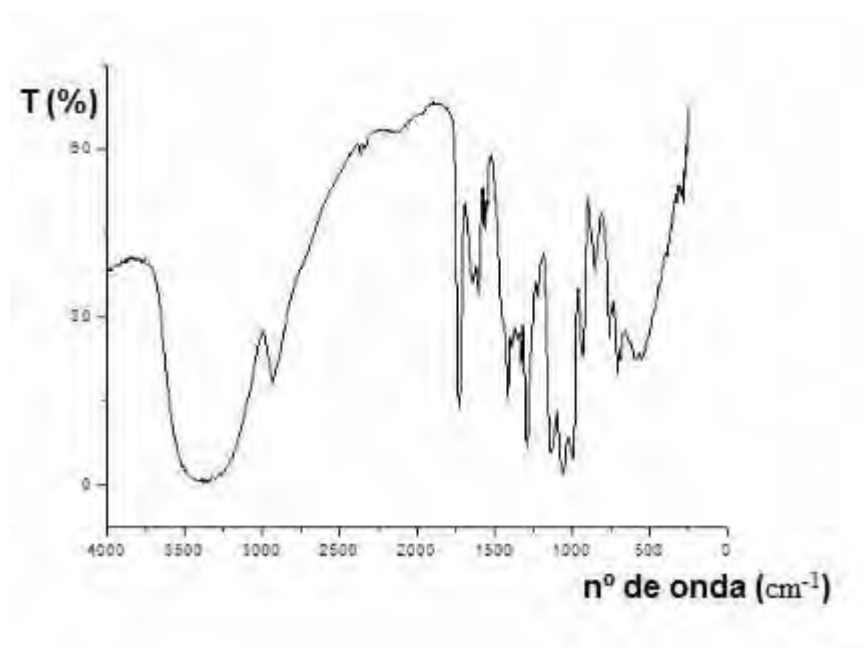


Figura 30. Espectro de infravermelho em modo transmitância da Fração 4 do isonicotinato de sacarose (F4I)

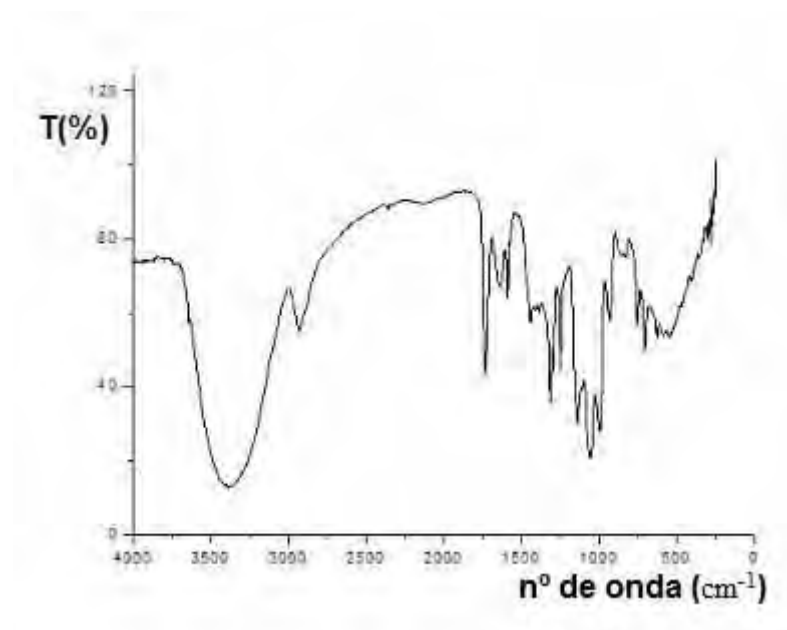


Figura 31. Espectro de infravermelho em modo transmitância da fração 4 do picolinato de sacarose (F4P)

Comparando os espectros de infravermelho das três frações dos sucroésteres, foi possível observar que há uma relativa similaridade nas frequências e na intensidade dos sinais emitidos. Isso se deve à semelhança dos grupos orgânicos presentes nas estruturas moleculares dos três sucroésteres piridínicos, principalmente o(s) grupo(s) éster, as hidroxilas presentes na molécula de sacarose e o(s) anel (is) aromático(s) piridínico(s).

Analizando as frequências de grupos nos espectros de infravermelho das frações dos ésteres de sacarose testados, podemos observar presença de uma deformação axial em $\nu_{\text{OH}} = 3400 \text{ cm}^{-1}$, dois sinais intensos, devido a vibrações de deformação axial em $\nu_{\text{C=O}} = 1750 \text{ cm}^{-1}$ e em $\nu_{\text{C-O}} = 1300 \text{ cm}^{-1}$, referentes ao grupo éster e um pico de média intensidade devido a deformação axial $\nu_{\text{C-C}} = 1500 \text{ cm}^{-1}$ do anel piridínico,

A partir das análises dos espectros de infravermelho, associado aos espectros de massas, podemos afirmar que as frações separadas das sínteses correspondem realmente a sucroésteres piridínicos, e, a técnica de espectroscopia no infravermelho foi determinante para essa confirmação.

5.3.3. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

Os espectros de ressonância magnética nuclear de carbono (^{13}C) e de hidrogênio (^1H) referentes às frações 4 do isonicotinato de sacarose e do picolinato de sacarose estão apresentados nas figuras 32, 33, 34 e 35.

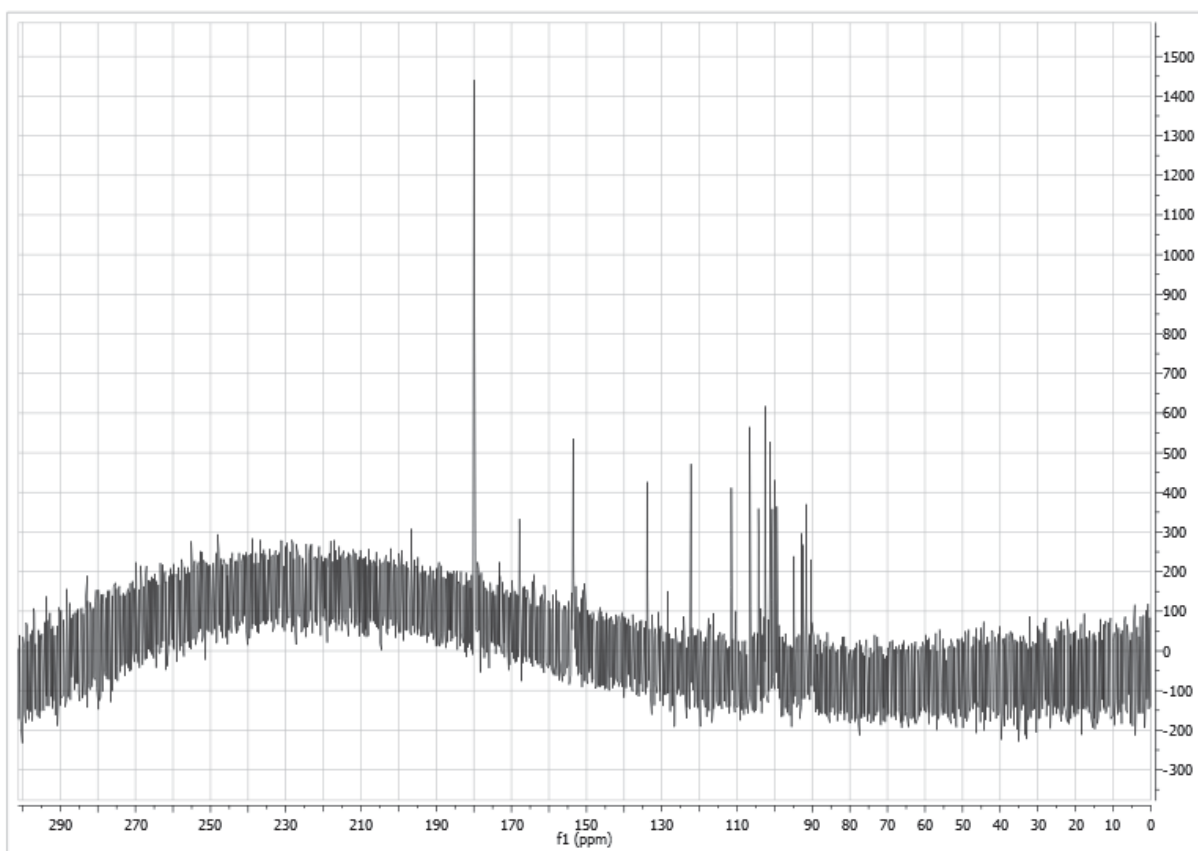


Figura 32. Espectro de ressonância magnética nuclear de ^{13}C da fração 4 do isonicotinato de sacarose

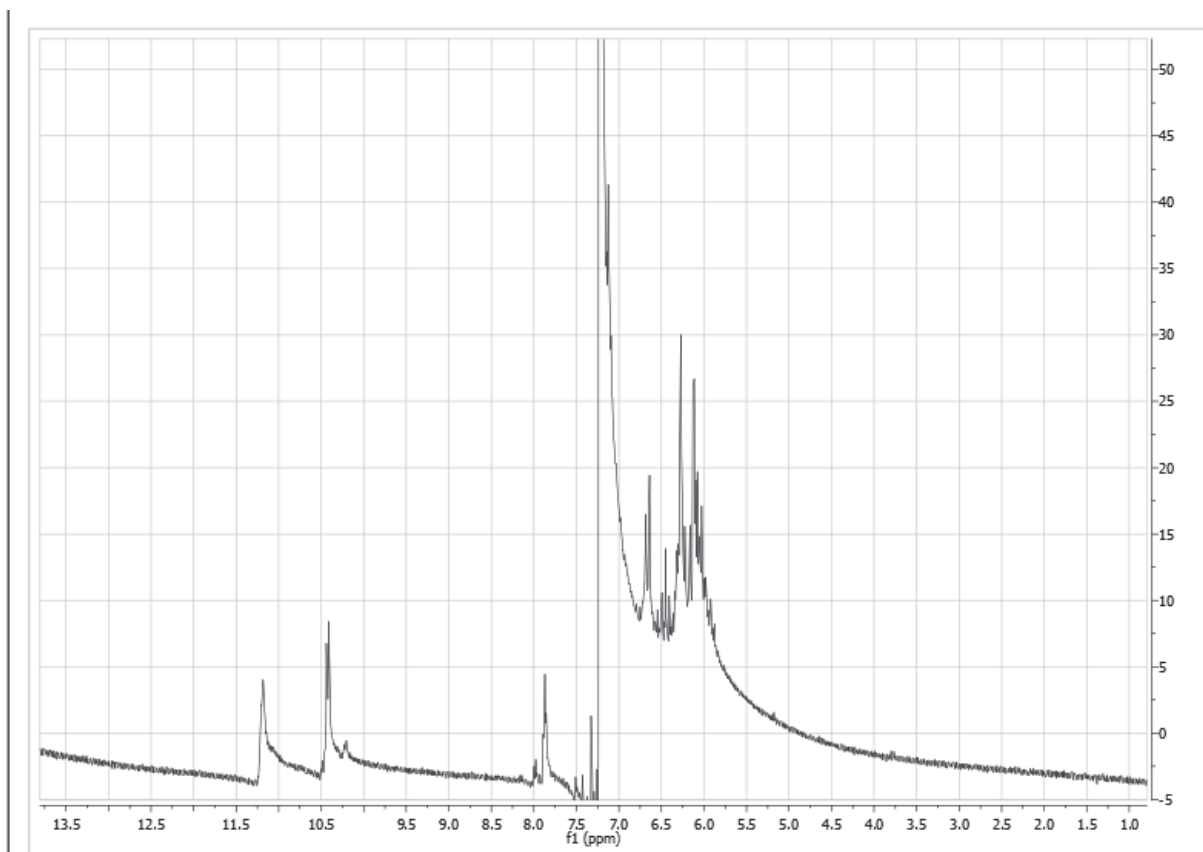


Figura 33. Espectro de ressonância magnética nuclear de ^1H da fração 4 do isonicotinato de sacarose

A partir dos deslocamentos químicos do espectro de RMN de ^{13}C , é possível apontar alguns sinais referentes aos carbonos do anel aromático em δ entre 130 e 170 ppm. O sinal intenso em δ por volta de 180 ppm, possivelmente refere-se ao grupo éster presente na molécula. De acordo com Bruyn e van Loo (1991), a molécula de sacarose apresenta sinais referentes aos carbonos do dissacarídeo nos seguintes deslocamentos químicos: 92,9 ppm; 71,9 ppm; 73,4 ppm; 70,0 ppm; 73,2 ppm e 61,0 ppm, nos carbonos de 1 a 6 do monômero de glicose, respectivamente e 62,5 ppm; 104,5 ppm; 77,8 ppm; 75,4 ppm; 82,2 ppm e 63,2 ppm nos carbonos de 1' a 6' do monômero de frutose, respectivamente. Huang et al. (2010) sintetizaram sucroésteres utilizando ésteres alifáticos como reagente de partida. As sínteses realizadas pelos autores foram por transesterificação, na proporção de sacarose:éster de 2:1, onde obtiveram uma alta seletividade no meio reacional, gerando substituições majoritariamente nos carbonos 6 e 6', comprovado a partir de espectrometria de RMN, com frequência de 400MHz. A variação no deslocamento químico referente aos carbonos 6 e 6' não substituídos foram em torno de 62,5 ppm e 63,9 ppm, respectivamente. Ainda, segundo os autores, as hidroxilas substituídas apresentaram deslocamento químico em torno de 64,6

ppm e 66,6 ppm, respectivamente. No espectro de ressonância magnética nuclear da fração 4 do isonicotinato de sacarose, não foram detectados sinais em deslocamentos químicos inferiores a 90,0 ppm.

Com relação ao espectro de ^1H , foi possível observar sinais em deslocamentos químicos δ a partir de 6,0 ppm. Esses sinais são, provavelmente, referentes aos prótons do anel aromático e do grupo éster da molécula do sucroéster sintetizado. Assim como observado no espectro de RMN de ^{13}C , não foram verificados sinais referentes aos prótons da molécula de sacarose. Segundo os autores Bruyn e van Loo (1991), os hidrogênios referentes à molécula de sacarose apresentariam sinais em 5,42; 3,57; 3,48 ppm para os hidrogênios 1, 2 e 3 do monômero de glicose e 4,25 e 4,06 ppm para os hidrogênios 3' e 4' do monômero de frutose. No espectro de RMN de ^1H da fração 4 do isonicotinato de sacarose, não foram identificados sinais em deslocamentos químicos inferiores a 6,0 ppm.

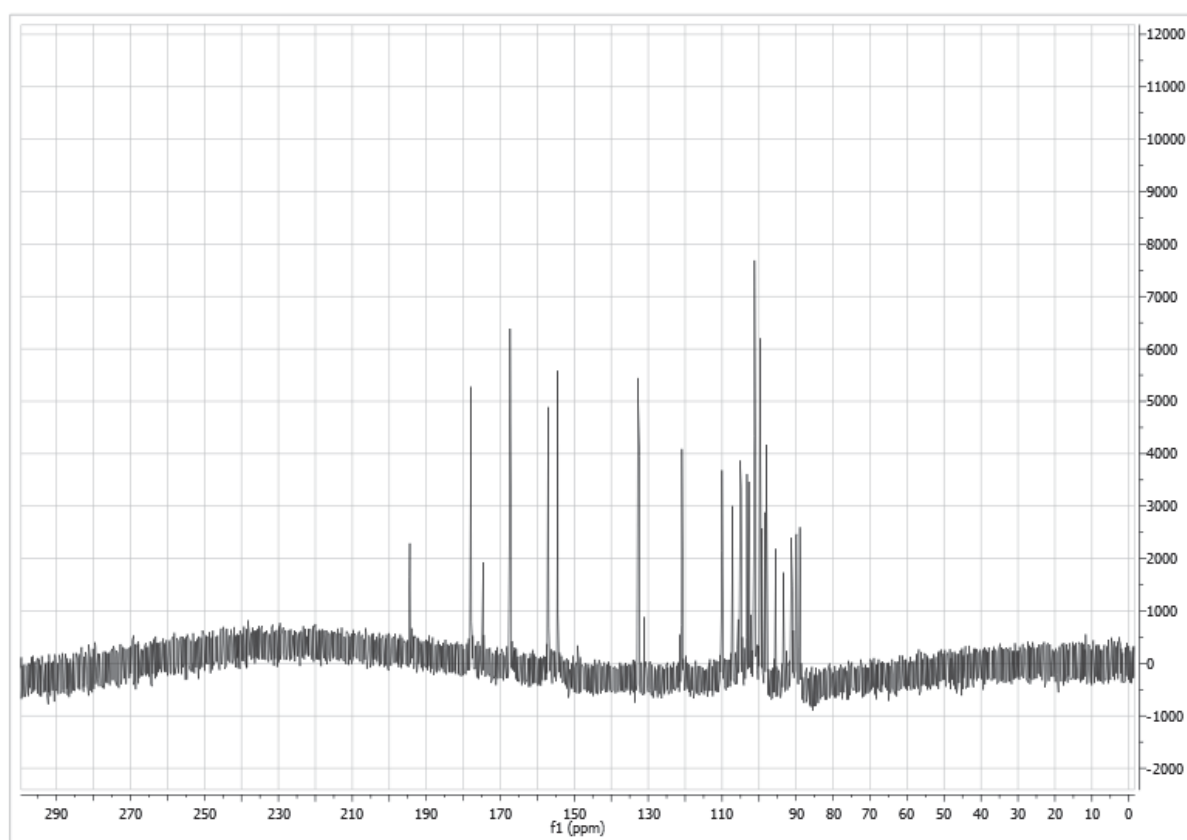


Figura 34. Espectro de ressonância magnética nuclear de ^{13}C da fração 4 do picolinato de sacarose

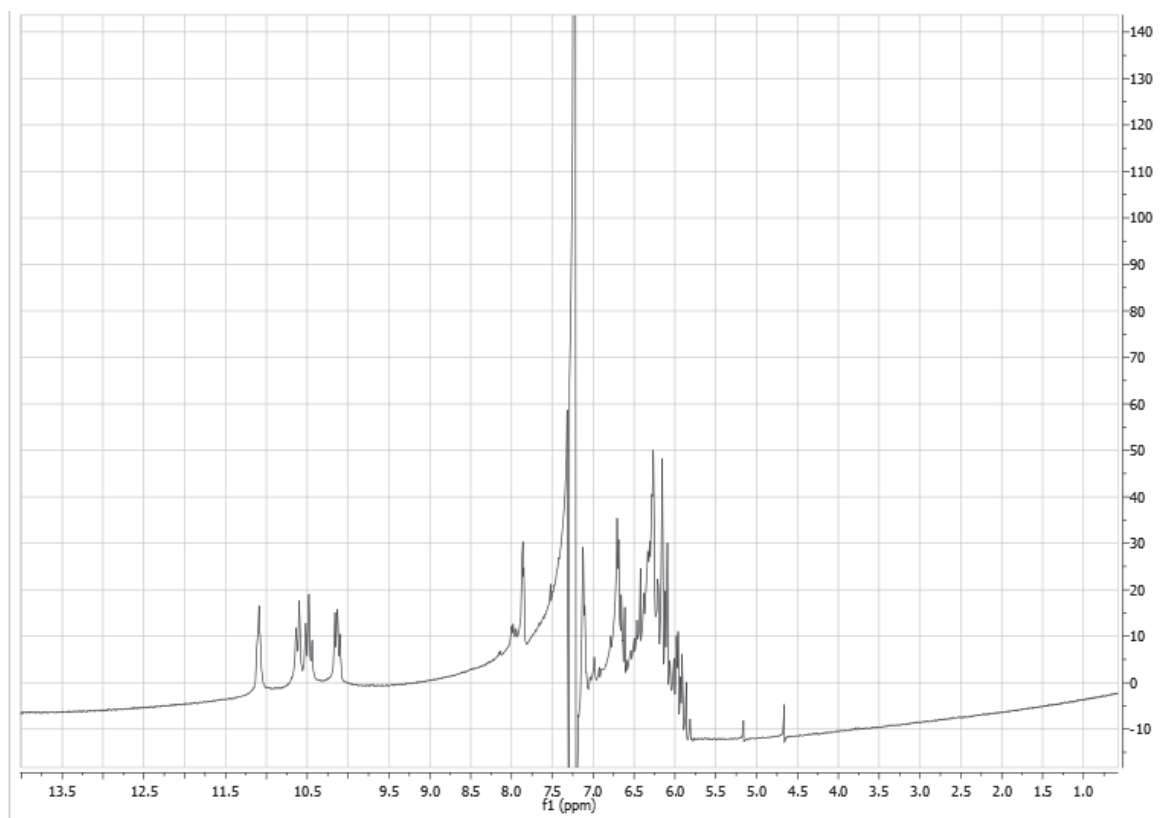


Figura 35. Espectro de ressonância magnética nuclear de ^1H da fração 4 do picolinato de sacarose

De acordo com os espectros de RMN de ^{13}C e de ^1H da fração 4 do picolinato de sacarose, assim como observado no espectro da fração do isonicotinato de sacarose, é possível observar sinais em deslocamentos químicos que podem ser atribuídos ao anel aromático e o grupo éster presente na molécula. Além disso, não foram observados sinais referentes aos carbonos e prótons da sacarose nos deslocamentos químicos descritos na literatura (BRUYN; VAN LOO, 1991, HUANG et al., 2010).

Embora tenhamos sinais referentes ao grupo aromático e ao grupo éster da molécula, não foi possível obter informações com relação à grande parte da molécula de sacarose, possivelmente pelo uso de uma frequência relativamente baixa (100 MHz) e pelo alto ruído do aparelho utilizado, já que a massa molar e a estrutura química da molécula proposta pelo nosso grupo de pesquisa foram elucidadas a partir dos espectros de massa e de infravermelho, respectivamente. O objetivo do uso da técnica de espectrometria de ressonância magnética nuclear para as frações dos sucroésteres que apresentaram boa atividade antimicrobiana foi elucidar a posição da substituição nucleofílica da hidroxila na molécula de sacarose. Como não foi possível encontrar os sinais referentes ao dissacarídeo, não foi possível afirmar a localização da substituição do monoéster em questão.

6. CONCLUSÃO

O presente trabalho apresentou resultados satisfatórios *in vitro*, utilizando a técnica do antibiograma de disco-difusão em placas de Petri e surge como uma alternativa para a aplicação desses compostos sintetizados em diversas áreas do conhecimento, principalmente a de alimentos, por serem produtos de baixo custo, baixo impacto ambiental e atóxicos. A nova classe de sucroésteres sintetizados, inéditos na literatura, apresentou potencial antimicrobiano contra quatro bactérias testadas, sendo elas duas Gram-positivas (*B. subtilis* e *B. cereus*) e duas Gram-negativas (*E. coli* e *S. enteritidis*).

Tanto a síntese bruta quanto as frações separadas dos sucroésteres piridínicos apresentaram poder antimicrobiano baixo e podem ser comparados a antibióticos de baixo espectro testados, como a Gentamicina e a Amicacina.

O aumento da atividade antimicrobiana dos sucroésteres piridínicos em combinação com o agente quelante foi observado tanto nas bactérias Gram-positivas quanto nas bactérias Gram-negativas testadas. O efeito da combinação, no entanto, foi mais eficaz contra bactérias Gram-negativas, devido à estrutura celular das mesmas.

A transesterificação não controlada dos sucroésteres, utilizando concentração de sacarose e éster metílico na proporção de 1:1 (mol:mol) gerou em suas frações, sucroésteres com uma ou duas substituições apenas, confirmado pela relação massa e carga dos monoésteres (m/z) igual a 448,0; 470,0 e 486,0, referentes ao $[M-H]^+$ ($M+1$), ao $[M-Na]^+$ ($M+23$) e o $[M-K]^+$ ($M+39$), respectivamente e a relação massa e carga dos diésteres 553,0; 575,0 e/ou 591,0, referentes ao $[M-H]^+$ ($M+1$), ao $[M-Na]^+$ ($M+23$) e o $[M-K]^+$ ($M+39$), respectivamente.

Os espectros de infravermelho das frações selecionadas apontaram as estruturas importantes presentes na molécula, como os sinais do anel aromático e o grupo éster. A espectroscopia de infravermelho em combinação com a espectrometria de massa foi suficiente para definir as frações testadas como sucroésteres piridínicos.

A espectrometria de ressonância magnética nuclear não foi eficiente para elucidar as posições das substituições nucleofílicas da reação da sacarose com os ésteres metílicos derivados da piridina, em virtude dos prótons e dos carbonos da molécula de sacarose não apresentarem sinais em determinados deslocamentos químicos. Desse modo, não foi possível localizar a hidroxila substituída.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKOH, C.C. Emulsification properties of polyesters and sucrose ester blends. Part I: Alkyl glycoside polyesters. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 69, p.9–13, 1992.

ALVES, M.; BOSCOLO, M.; FERNANDES, O. A.; NUNES, M. A. Mortality of *Bemisia tabaci* Biotype B (*Sternorrhyncha: Aleyrodidae*) Adults by aliphatic and aromatic synthetic sucrose esters. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.51, n°6, p.1115–1119, 2008.

BAUCHOT, A.D.; JOHN, P.; SORIA, Y.; RACASENS, I., Sucrose ester-based coatings formulated with food-compatible antioxidants in the prevention of superficial scald in stored apples. **Journal of American Society Horticultural Science**, v.120, n°3, p.491–496, 1995

BOGAN, K. L.; BRENNER, C. Nicotinic acid, nicotinamide, and nicotinamide riboside: A molecular evaluation of NAD⁺ precursor vitamins in human nutrition. **Annual Review of Nutrition**, v. 28, p.115–130, 2008.

BORDOLOI, G. N.; KUMARI, B.; GUHA, A.; BORDOLOI, M.; YADAV, R. N. S.; ROY, M. K.; BORA, T. C., Isolation and structure elucidation of a new antifungal and antibacterial antibiotic produced by *Streptomyces* sp. 201. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v.65, n°8, p.1856–1858, 2001.

BOSCOLO, M. Sucroquímica: Síntese e potencialidades de aplicações de alguns derivados químicos de sacarose. **Química Nova**, v.26, n°6, p 906–912, 2003.

BRUYN, A.; VAN LOO, J. The indentification by ¹H and ¹³C NMR spectroscopy of sucrose, 1-kestose, and neokestose in mixtures present in plant extracts. **Carbohydrate Research**, v.211, p.131-136, 1991.

CHORTYK, O. T.; KAYS, S. J.; TENG, Q. Characterization of insecticidal sugar esters of *Petunia* **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 45, p.270–275, 1997.

CHORTYK, O. T.; POMONIS, J. G.; JOHNSON, A. W. Syntheses and characterizations of insecticidal sucrose esters. **Journal of Agricultural Food Chemistry** ,v.44, p.1551–1557, 1996.

CRUCES, M. A.; PLOU; F. L.; FERRER, M.; BERNABÉ, M.; BALLESTEROS, A. Improved Synthesis of Sucrose Fatty Acid Monoesters. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.78, p.541–546, 2001.

DAGLIA, M.; CUZZONI, M. T.; DACARRO, C., Antibacterial activity of coffee: relationship between biological activity and chemical markers. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.42, p.2273–2277, 1994.

DEVULAPALLE, K. S.; de SEGURA, A.G.; FERRER, M.; ALCALDE, M.; MOOSER, G.; PLOU, F. J., Effect of carbohydrate fatty acid esters on *Streptococcus sobrinus* and glucosyltransferase activity. **Carbohydrate Research**, v.339, p.1029–1034, 2004

FAVIER, G. I.; ESCUDERO, M. E.; GUZMÁN, A. M. S. Inhibitory effects of sucrose fatty acid esters on survival of *Yersinia enterocolitica* on eggshell surface and use of blue lake as indicator of bacterial penetration into eggs. **Journal of Applied Microbiology**, v.106, p.774–783, 2009.

FELIPE, C.; SILVA, R.; MIRANDA, A.; OLIVEIRA, A. P.; SILVA, B. M.; SOUSA, J. C.; CERQUEIRA, F. Estudo preliminar da actividade antimicrobiana das folhas de *Cydonia oblonga* Miller. **Revista da Faculdade de Ciências da Saúde**, v.5 p.174–181, 2008.

FERREIRA, V. F.; DA ROCHA, D. R.; DA SILVA, F. C. Potencialidades e oportunidades na química da sacarose e outros açúcares. **Química Nova**, v.32, nº3, p.623–638, 2009.

FERRER, M.; SOLIVERI, J.; PLOU, F. J.; LÓPEZ-CORTÉS, N.; REYES-DUARTE, D.; CHISTENSEN, M.; COPA-PATIÑO, J. L.; BALLESTEROS, A., Synthesis of sugar esters in solvent mixtures by lipases From *Thermomyces lanuginosus* and *Candida antarctica* B, and their antimicrobial properties. **Enzyme and Microbial Technology**, v.36, p.391–398, 2005.

GARCIA, C. R. **Caracterização microbiológica e avaliação de uma cepa de *Bacillus subtilis* no desempenho de bezerros da raça holandesa**, 2008, 57p. Dissertação de (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) – Faculdade de Ciências Agrária e Veterinárias Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, 2008.

GARTI, N.; FANUN, A.A., Non-ionic sucrose esters microemulsions for food applications. I. Water Solubilization. Coll. Surf. **Physicochemical Engineering Aspects**, v.164, p.27–38, 2000.

HANCOCK, R. E. W. Antibacterial peptides and the outer membranes of gram-negative *bacilli*. **Journal Medical Microbiology**, v.6 p.1–3, 1997.

HATHCOX, A. K.; BEUCHAT, L. R. Inhibitory effects of sucrose fatty acid esters, alone and in combination with ethylenediaminetetraacetic acid and other organic acids, on viability of *Escherichia coli* O157:H7 **Food Microbiology**, v.13, p.213–225, 1996.

HELANDER, I. M.; WRIGHT, A. V.; MATTILA-SANDHOLM, T. Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against gram-negative bacteria. **Trends Food Science Technology**, v.8, p.146–150, 1997.

HELANDER, I. M.; MATTILA-SANDHOLM, T. Fluometric assessment of gram-negative bacterial permeabilization. **Journal of Applied Microbiology**, v.88, p.213–219, 2000.

HUANG, D.; JIANG, X.; ZHU, H.; FU, X.; ZHONG, K.; GAO W. Improved synthesis of sucrose fatty acid monoesters under ultrasonic irradiation. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.17, p.352–355, 2010.

HUSBAND, F.A.; SARNEY, D.B.; BARNARD, M.J.; WILDE P.J. Comparison of foaming and interfacial properties of pure sucrose monolaurates, dilaurate and commercial preparations **Food Hydrocolloids**, v.12, p.237–244, 1998.

IWAMI, Y; SCHACHTELE, C. F.; YAMADA, T. Effect of sucrose monolaurate on acid production, levels of glycolytic-intermediates, and enzyme-activities of *Streptococcus mutants* NCTC-10449. **Journal of Dental Research**, v.74, p.1613-1617, 1995.

KAMANNA, V. S.; KASHYAP, M. L. Mechanism of action of niacin. **The American Journal of Cardiology**, v.101 n°8A, p 20–26. 2008.

KHAN, R. Sucrose: Properties and Applications. In: MATHLOUTHI, M. ;RAISER, P. (Ed.) **Blackie Academic & Professional** , cap 11, 1995.

LIU, X.; GONG, L.; XIN, M.; LIU, J. The synthesis of sucrose ester and selection of its catalyst. **Journal of Molecular Catalyzes**, v.147, p.37–40, 1999.

LOURENÇO, M. C. S.; FERREIRA, M. L., DE SOUZA, M. V. N.; PERALTA, M. A.; VASCONCELOS, T. R. A.; HENRIQUES, M. G. M. O. Synthesis and anti-mycobacterial activity of (E)-N'-(monosubstituted-benzylidene) isonicotinohydrazide derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.43, p.1344–1347, 2008.

MACINDOE, W. M.; WILLIAMS, A.; KHAN R., Tin (IV) -Functionalised polymer supports; non-toxic and practical reagents for regioselective acetylation of sucrose. **Carbohydrate Research**, v.283, p.17–25, 1996.

MARSHALL, D.L.; BULLERMAN, L.B., **Carbohydrate polyesters as fat substitutes**. AKOH, C.C.; SWANSON, B.G. eds.; Marcel Dekker, Inc: New York, cap. 8, 1994.

MCKENZIE, C. L.; PUTERKA, G. J. Effect of sucrose octanoate on survival of nymphal and adult *Diaphorina citri* (Homoptera: *Psyllidae*) **Journal of Economic Entomology**, v.97 p. 970 – 975, 2004.

MOH, M. H.; TANG, T. S.; TAN, G. H., Improved separation of sucrose ester isomers using gradient high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection. **Food Chemistry**, v.69, p.105–110, 2000.

MONKT, J. D. BEUCHAT, L. R., Viability of *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and psychotrophic spoilage micro-organisms in refrigerated ground beef supplemented with sucrose esters of fatty acids. **Food Microbiology**, v.12 , p.397–404, 1995.

MORENO, R. C. Interpretación del antibiograma en la elección del antibiótico y vía de administración **Revista Clinica Espanhola**, v.203, p.608–611, 2003.

MOSER, D.; KLAIBER, I.; VOGLER, B.; KRAUS, W.; Molluscicidal and antibacterial compounds from *Petunia hybrida*. **Pesticide Science**, v.55, p.336–339, 1999.

MUCCI, A.; VARESEO, L.; NEGLIA, R.; COLOMBARI, B.; PASTORINO, S.; BLASI, E., Antifungal activity of macrophages engineered to produce IFN γ : inducibility by picolinic acid. **Medical Microbiology and Immunology**, v.192, p.71–78, 2003.

NAVIA, J. L.; ROBERTS, R. A.; WINGARD, R. E. Study on the selectivity of benzylation of metal-chelates of sucrose. **Journal of Carbohydrates Chemistry**, v.14 4-5, p.465–480, 1995.

NCCLS - National Comitee for Clinical Laboratory Standards **Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão: Norma Aprovada – Oitava Edição**. M2-A8 ISBN 1-56238-485-6 ISSN 0273-3099, 2008.

NOBRE, T. P.; HORII, J.; ALCARDE, A. R. Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em associação com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. **Ciência Tecnologia de Alimentos, Campinas**, v. 27 p.20–25, 2007.

OVENDEN, S. P. B.; YU, J.; BERNAYS, J.; WAN, S. S.; CHRISTOPHIDIS, L. J.; SBERNA, G.; TAIT, R. M.; WILDMAN, H. G.; LEBELLER, D.; LOWTHER, J.; WALSH, N. G.; MEURER-GRIMES, B. M. Physaloside A, an acylated sucrose ester from *Physalis viscosa*. **Journal of Natural Products**, v.68, p 282–284, 2005.

PANDEY, N. K.; GOLLAKOTA, K. G. Effect of ethyl picolinate on germination, growth and sporulation of *Bacillus* spp. **Journal of Applied Bacteriology**, v.45, p.365–372, 1978.

PARKER, K. J., **Sugar Derivatives, Encyclopedia of Chemical Technology**. 3rd. John Wiley & Sons. New York.,1981

POLAT, T.; LINHARDT, R. J. Syntheses and applications of sucrose-Based esters. **Journal of Surfactants and Detergents**, v.4, nº4, p.415–421, 2001.

RAKU, T.; KITAGAWA, M.; SHIMAKAWA, H.; TOKIWA, Y., Enzymatic synthesis of hydrophilic undecylenic acid sugar esters and their biodegradability. **Biotechnology Letters**, v.161, p. 161–166, 2003.

SIMONOVSKA, B.; SRBINOSKA, M.; VOVK, I. Analysis of sucrose esters – insecticides from the surface of tobacco plant leaves. **Journal of Chromatography A**, v.1127, p.273–277, 2006.

SOJKA, J. E.; BRISSON-KIMMICK, S. V.; CARLSON, G. P.; COPPOC, G. L. Dimethyl sulfoxide update - New applications and dosing methods. **Proceedings of the annual convention of the American Association of Equine Practitioners**, p.683 – 690, 1990.

TAKASAKI, M.; KUROKI, S.; KOZUKA, M.; KONOSHIMA, T. New phenylpropanoid esters of sucrose from *Polygonum lapathifolium*. **Journal of Natural Products**, v.64, p. 1305–1308, 2001.

THEVENET, S.; WERNICKE, A.; BELNIAK, S.; DESCOTES, G.; BOUCHU, A.; QUENEAU, Y., Esterification of unprotected sucrose with acids chlorides in aqueous medium: kinetic reactivity versus acyl or alkyloxycarbonyl group migrations. **Carbohydrates Research**, v.318, p.52–66, 1999.

TOMIOKA, H.; SHIMIZU, T.; TATANO, Y. Effects of picolinic acid on the antimicrobial functions of host macrophages against *Mycobacterium avium* complex. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.29, p.460–464, 2007.

TORRES, C.; CERCENADO, E. Lectura interpretada del antibiograma de cocos gram positivos. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, 2010

UNICA – União da Indústria de Cana-de-Açúcar. Disponível em: [www.unica.com.br], acesso em 01/12/2011.

WALSH, M. K.; BOMBYKA, R. A.; WAGH, A.; BINGHAM, A.; BERREAU, L. M. Synthesis of lactose monolaurate as influenced by various lipases and solvents **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.60, p.171–177, 2009.

WANG, N.; YAO, X.; ISHII, R.; KITANAKA, S. Bioactive sucrose esters from *Bidens parviflora*. **Phytochemistry**, v.62, p.741–746, 2003.

WCHTER, G.A.; DAVIS, M.C.; MARTIN, A.R.; FRANZBLAU, S. G., Antimycobacterial activity of substituted isosteres of pyridine- and pyrazinecarboxylic acids. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.41, p.2436–2438, 1998.