

MODIFICAÇÕES ESTRUTURAIS NA MOLÉCULA DO EUGENOL E BIOENSAIOS TOXICOLÓGICOS FRENTE A LARVAS DE *ARTEMIA* *SALINA* LEACH

Carlos Eduardo Rodrigues Aguiar¹

Herbert Igor Rodrigues de Medeiros²

Bruna Barbosa Maia da Silva³

Tatiana de Almeida Silva⁴

Juliano Carlo Rufino Freitas⁵

RESUMO

Os produtos naturais são utilizados desde os primórdios da humanidade, na busca por cura ou alívio de doenças. Com o avanço da tecnologia foi possível isolar inúmeras substâncias, realizar modificações em suas estruturas, e elucidar seus mecanismos de ação. Um bom exemplo é o eugenol, uma substância bastante utilizada ao longo do tempo como analgésico e anti-séptico. O eugenol é extraído principalmente da *Eugenia caryophyllata* e vem sendo estudado por pesquisadores. Diante disto, o presente trabalho teve como objetivo, realizar modificações na estrutura do eugenol e avaliar a toxicidade desses derivados frente à larva de *Artemia salina* Leach. Para tanto, o eugenol foi submetido à reação de *O*-alquilação com dois brometos de alquilas levando aos *O*-alquileugenol em bons rendimentos após tempos reacionais que variaram de 60 a 100 minutos. Os *O*-alquileugenol apresentam elevada toxicidade com valores de concentração letal para matar 50% dos indivíduos de 43 e 55 µg/mL. Desse modo, é evidente que o potencial biológico do eugenol e que modificações realizadas em sua estrutura podem otimizar essas atividades, de forma a melhorar as interações com determinado alvo biológico, bem como fonte de novos compostos que venham a ser candidato a fármaco

Palavras-chaves: Síntese Orgânica, Atividade Toxicológica; Eugenol, *Artemia salina*.

¹Graduando do Curso de Farmácia, Universidade Federal de Campina Grande – UFCG, educarlos214@gmail.com

²Graduando do Curso de Farmácia, Universidade Federal de Campina Grande – UFCG, igorpls_15@hotmail.com

³Graduando do Curso de Farmácia, Universidade Federal de Campina Grande – UFCG, bruninhamaia5151@gmail.com

⁴Graduando do Curso de Licenciatura em Química, Universidade Federal de Campina Grande -UFCG, tatianalmeidasilva@hotmail.com

⁵Professor Orientador: Doutorado, Universidade Federal de Campina grande – UFCG, julianoocrf@gmail.com
(83) 3522.3222

INTRODUÇÃO

Os produtos naturais são utilizados desde os primórdios da humanidade, visando o alívio e cura de doenças pela ingestão de partes da planta. O uso de plantas no tratamento de enfermidades é uma prática muito antiga, que se tornou bastante comum, resultando no acúmulo milenar de conhecimentos empíricos sobre as ações dos vegetais, através de sucessivas gerações, sendo uma prática generalizada na medicina tradicional popular em todas as culturas desde as civilizações mais imemoriais (RIBEIRO, 2018). Com o passar dos anos e avanço da tecnologia, foi possível isolar princípios ativos, caracterizar quimicamente as substâncias ativas e desvendar o mecanismo de ação das mesmas (JAMSHIDI-KIA; LORIGOOINI; AMINI-KHOEI, 2018).

Uma substância natural bastante utilizada ao longo da história é o eugenol (2-metoxi-4-prop-2-enilfenol), o principal componente do óleo essencial do cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata*). A literatura relata diversas atividades farmacológicas interessantes do eugenol, tais como antibacteriana, antifúngica, antioxidante, anti-séptica, anti-inflamatória, anticonvulsivante, antitumoral, antimutagênica, repelente, atua na indigestão, inibição da agregação plaquetária, entre outras, indicando a relevância biológica desse composto (COSTA, 1999; KAMATOU; VERMAAK; VILJOEN, 2012).

O eugenol é um composto aromático, membro da classe dos fenilpropanóides e é encontrado em diversas espécies além do cravo-da-índia, a citar a noz-moscada, canela, manjeriço e folha de louro. Juntamente com o eugenol, nestas plantas, são encontrados outros fenilpropanóides, flavonoides e ácidos cumarínicos, porém, em menores concentrações (DOURADO, 2012; MARCHESE et al., 2017).

Vale destacar, que o eugenol foi isolado pela primeira vez em 1929, a partir de uma planta *Eugenia caryophyllata*, no entanto, sua síntese só foi realizada vários anos depois através da reação de alilação do guaiacol, composto aromático, utilizando cloreto de alila (MARCHESE et al., 2017).

Por ser um produto versátil, a *Food and Drug Administration* dos EUA, aprovou o uso do óleo do cravo-da-índia como substância aromatizante nas indústrias alimentar e de bebidas, como uma fragrância na indústria cosmética e na odontologia como analgésico natural e anti-séptico (MOHAMMADI NEJAD; ÖZGÜNEŞ; BAŞARAN, 2017). Mas vale ressaltar que a busca por agentes terapêuticos é uma tarefa bastante árdua e para que um

dessas substâncias chegue ao mercado farmacêutico, ela é submetida a diversos ensaios biológicos, a citar os ensaios toxicológicos.

A *Artemia salina*, é um microcrustáceo zooplânctônico encontrada principalmente em ambientes marinhos, devido a necessidade de água salgada para sobrevivência. Este é um importante elo na cadeia alimentar e possui, em particular, importância na aquicultura, fazendo parte da alimentação dos peixes, e isto é possível graças a sua grande distribuição geográfica e alta adaptabilidade (MEDEIROS et al., 2018). Meyer e colaboradores (1982) utilizou as artêmias em ensaios de toxicidade aguda para uma pesquisa preliminar de atividade biológica de extratos e frações obtidos a partir de produtos naturais.

Esses microcrustáceos podem ser utilizados no monitoramento da citotoxicidade de produtos, devido a semelhança estrutural com células humanas, além de ser um método barato, rápido, simples e sensível a substâncias tóxicas. Desse modo, os resultados com valores de Concentração Letal necessária para matar 50% dos indivíduos (CL_{50}) inferiores a 100 $\mu\text{g/mL}$ são considerados altamente tóxicas, valores entre 100 e 500 $\mu\text{g/mL}$ são moderadamente tóxicas, entre 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ são levemente tóxicas e acima de 1000 $\mu\text{g/mL}$ possuem baixa toxicidade (MERINO et al., 2015).

Muitos produtos de origem natural são estudados pela indústria farmacêutica e por químicos sintéticos (JÚNIOR; BOLZANI; BARREIRO, 2006). Estes buscam novos candidatos a fármacos, bem como na otimização das atividades, mecanismos de ação e melhorias nas propriedades físico-químicas, de forma a propiciar melhor absorção, distribuição, biodisponibilidade e metabolismo, isso graças a modificação estrutural de moléculas biologicamente ativas oriundas de fontes naturais (YAO et al., 2017).

Portanto, o objetivo do presente trabalho trata de realizar modificações estruturais no eugenol, através da reação de alquilação com o bromo acetato de etila e o bromo acetaldeído dietil acetal, além da realização de bioensaios toxicológicos dos produtos obtidos frente a larvas *Artemia salina* Leach.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Síntese Orgânica presente no Centro de Educação e Saúde da Universidade Federal de Campina Grande – Cuité/PB e constituiu-se na

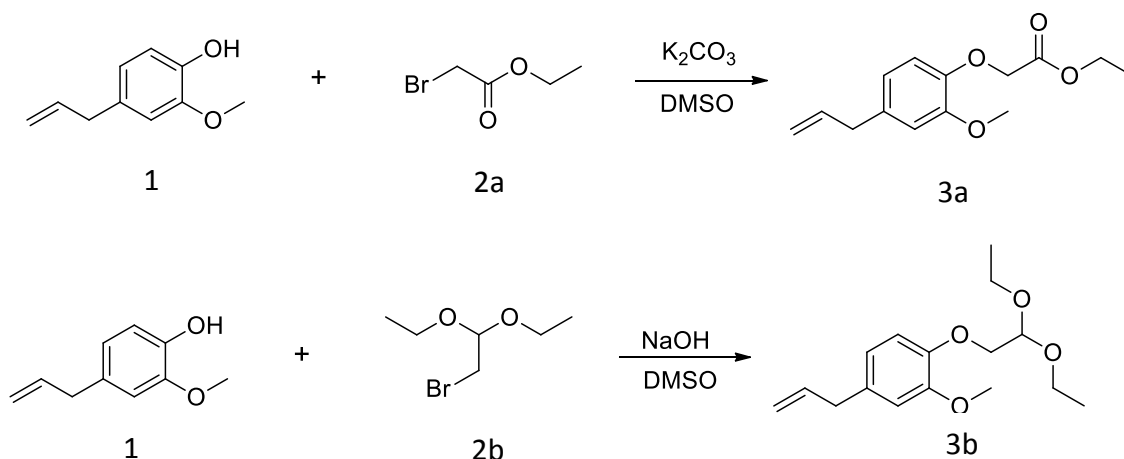
adição de uma função éster e outra acetal no oxigênio do grupo hidroxila, conectado ao anel aromático. O eugenol foi utilizado como reagente limitante, e o bromo acetato de etila e o bromo acetaldeído dietil acetal, foram utilizados como reagente em excesso.

Modificação estrutural

A reação de alquilação e formação de acetal, foram realizadas com interesse na síntese dos compostos 3a-b, estas com o substrato bromoacetato de etila (2a) em presença de carbonato de potássio (K_2CO_3) e como o bromo acetaldeído dietil acetal (2b) em presença de hidróxido de sódio (NaOH), entretanto ambos utilizaram dimetilsulfóxido (DMSO) como solvente, como pode ser observado no Esquema 01.

Para a síntese do composto 3a, foram pesados 5,0 mmols (0,82g) do substrato 1 e transferidos para um balão de fundo redondo contendo 10 mL de DMSO. Sequentemente adicionou-se ao balão 5,0 mmols (0,691g) de K_2CO_3 em pó. À mistura reacional foram adicionados rapidamente 5,5 mmols (0,92g) de 2a. A reação foi submetida a agitação, em uma chapa agitadora, à temperatura ambiente durante o tempo requerido, que foi verificado por cromatografia de camada delgada (CCD). Com relação ao composto 2b, foi-se pesado 5,5 mmol (1,08g) e 8mmol de NaOH (0,32g), e efetuado o mesmo procedimento já mencionado.

Esquema 01: Reação dos compostos 2a-b com o eugenol



Fonte: Próprios autores, 2019.

Após o termino das reações os produtos foram submetidos a separação de fases, que consiste na separação da fase aquosa da fase orgânica. A mistura reacional foi transferida do

balão para um funil de separação e foram adicionados 25 mL de solução supersaturada de NH_4Cl . A fase orgânica foi separada com acetato de etila (3 x 25 mL). Posteriormente à separação, foi adicionado sulfato de sódio anidro na fase orgânica para retirar qualquer resquício de água, e em seguida a mesma fase foi filtrada o solvente foi removido em evaporador rotativo à pressão reduzida para obtenção do produto seco. O produto final foi purificado por cromatografia líquida em coluna de sílica utilizando 15 cm (altura da quantidade da fase estacionária) de sílica-gel 60, hexano e acetato de etila como solventes da fase móvel. Os solventes utilizados na purificação foram destilados conforme a metodologia de Armarego e Perrin (1996).

Bioensaios toxicológicos com *Artemia salina* Leach

A partir da interpretação dos dados da caracterização e respectiva confirmação das estruturas dos produtos objetivados, realizou-se o ensaio biológico dos mesmos frente a *Artemia salina* Leach baseado no estudo de Meyer e colaboradores (1982). Para cada composto testado, utilizou-se 20 mg e foi adicionado 50 μL de dimetilsulfóxido (DMSO). Posteriormente, a solução foi homogeneizada e o volume completado para 20 mL com água salinizada filtrada (preparada a partir de 38 g de sal marinho Marinex® em 1 L de água destilada) em pH = 8,0. Desta solução serão retiradas alíquotas de 125, 250, 500, 750, 1000, 1125 1250 e 1875 μL e transferidas para tubos de ensaios de 5 mL e os volumes completados com o mesmo solvente, obtendo-se as concentrações de 50, 100, 200, 300, 400, 450, 500 e 750 $\mu\text{g/mL}$ para a solução da amostra. O teste foi acompanhado por controle positivo, com dicromato de potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) e controle negativo com água salinizada e DMSO. Os cistos da *Artemia salina* (20 mg) foram incubados sob iluminação artificial por 48 horas para que houvesse a eclosão das larvas e estas foram separadas em dez grupos com 10 artêmias cada. O primeiro e o segundo grupo receberam a solução controle positivo e controle negativo e as oito seguintes receberam a solução aquosa do composto em diferentes concentrações. As amostras ficaram submetidas à iluminação artificial durante 24 horas. Após este período, contabilizou-se as larvas vivas e mortas. O experimento foi realizado em triplicata para cada substância-teste.

DENSENVOLVIMENTO

Devido à ampla diversidade estrutural e funcional dos produtos naturais, muitos compostos de origem natural são usados como princípio ativo no tratamento de diversas enfermidades. Durante anos, a maioria dos fármacos disponíveis no mercado eram produtos naturais ou mesmo análogos inspirados neles, contudo, a necessidade de novos fármacos estimulou pesquisadores à realizarem modificações estruturais em produtos naturais (CRAGG; NEWMAN, 2013). Desde então algumas substâncias naturais que se consagraram ativos eficazes, até os dias atuais, a citar como exemplo a morfina, a cânfora, a quinina e a cocaína (MONTANARI; BOLZANI, 2001).

O Eugenol, que é o principal constituinte possuindo um anel aromático do óleo essencial do cravo-da-índia. Este além de ser um anestésico e antimicrobiano natural, ele é empregado como *synthon*, uma parte de uma molécula a ser sintetizada que é considerada como a base de um procedimento sintético, na preparação de uma grande diversidade de biomoléculas, como o obovatol, um produto natural com atividade antitumoral e anti-inflamatória (KAUFMAN, 2015).

Nos últimos anos, verificou-se que os derivados sintetizados a partir de produtos naturais possuem enormes atividades biológicas. Eugenol é um monoterpene fenólico interessante de ocorrência natural, com ações versáteis contra bactérias, patógenos e outros microorganismos nocivos ao organismo. Atualmente, organizações de renome mundial têm se interessado pela descoberta de drogas, em particular as de origem natural (BENDER et al., 2016).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Após o início das reações, foi analisado o tempo em que cada substrato levou para completar a reação com o eugenol. Essa análise foi realizada com o auxílio da Cromatografia em Camada Delgada (CCD) para verificar o término da reação. Após o término da reação, cada produto foi purificado e posteriormente é pesado, afim de determinar o rendimento reacional. Os valores obtidos do tempo e rendimento são mostrados na Tabela 01.

Em experimento realizado por Medeiros e colaboradores (2018), os quais sintetizaram a molécula 3a utilizando os mesmos componentes, com exceção do solvente, que ao invés de usarem o DMSO, realizaram a síntese com *N,N*-dimetilformamida (DFM). O presente estudo obteve rendimento superior ao deste trabalho, o qual obtiveram 60%, e o tempo de mistura reacional foi de 1080 minutos, muito superior ao encontrado no estudo de apenas 60 minutos.

Tabela 01: Parâmetros analisados de tempo, rendimento e aspecto físico

SUBSTRATO	TEMPO (MIN)	RENDIMENTOS (%)	ASPECTO FÍSICO
BROMO ACETATO DE ETILA	60 min	86,84 %	Oleoso
BROMO ACETALDEÍDO DIETIL ACETAL	100 min	93,16 %	Oleoso

Fonte: Próprios autores, 2019.

Um produto que deriva do eugenol e que apresenta atividade farmacológica, é o obovatol. Este composto segundo Choi e colaboradores (2012), foi extraído da *Magnolia sp.* e apresentou potente atividade anti-inflamatória.

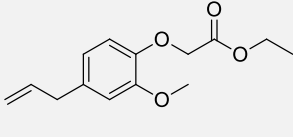
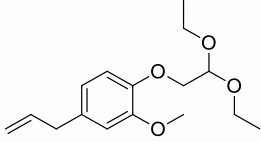
O obovatol também pode ser sintetizado em laboratório. Kaufman, em 2015, relatou sua síntese após 4 etapas reacionais, a primeira é a *orto*-bromação seletiva do fenol, seguida da metilação, posteriormente acoplado ao composto um *para*-alilfenol e por último foi realizado a desmetilação no produto final. Este produto além de ser anti-inflamatório, tem como atividade farmacológica a antitumoral.

Os testes de toxicidade dos compostos 3a-b foram realizados frente a larvas de *A. salina* Leach, no qual o valor da taxa de mortalidade das soluções contendo 3a e 3b variou entre 0 e 100 %, planejando determinar a concentração letal para matar metade da população de larvas (CL₅₀) conforme a Tabela 02. Deste modo, a CL₅₀ foi encontrada através do *software* POLO-PC, com 95% de confiança. Portanto, de acordo com Merino e colaboradores

(2015), valores de CL_{50} inferiores a 100 $\mu\text{g/mL}$ são considerados altamente tóxicas, mostrando potencial para atividade biológica.

Rabelo, em 2010, realizou teste com a molécula do eugenol e o óleo essencial do cravo-da-índia, o qual encontrou as CL_{50} igual a 18,53 e 1 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Rabelo (2010) associou a maior toxicidade do óleo ao possível efeito sinérgico entre os outros compostos do óleo essencial e o eugenol.

Tabela 02: Valores de CL_{50} dos compostos.

COMPOSTOS	CL_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
	55
	43

Fonte: Próprios autores, 2019.

Leite e colaboradores (2009), também avaliaram a atividade moluscicida e larvicida de alguns óleos essenciais e fitoconstituintes de plantas medicinais. E entre esses fitoconstituintes estava o eugenol, que constatou-se que a CL_{50} é de 47,16 $\mu\text{g/mL}$, o qual mostrou comportamento tóxico frente as larvas de *A. salina*.

Silva e colaboradores (2010), realizaram estudo de toxicidade frente a larva *A. salina* com o óleo essencial das inflorescências de *Ocimum gratissimum*, que possuía como componente majoritário o eugenol (81,94%), no qual obtiveram como resultado de CL_{50} = 233,8 $\mu\text{g/mL}$ com desvio padrão (DP) de $200,7 \pm 272,0$ $\mu\text{g/mL}$. Estes testes foram realizados com etanol (1mL) ao invés de DMSO, obtendo-se CL_{50} superior ao do presente estudo.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em suma, os produtos derivados do eugenol foram obtidos a partir das reações de alquilação em bons rendimentos e curtos tempos reacionais, demonstrando a robustez do método de *O*-alquilação. Os ensaios toxicológicos dos derivados do eugenol frente à *Artemia salina*, revelou que ambos os compostos apresentam elevada toxicidade, o que fomenta mais estudos que visem dar continuidade à descoberta das atividades que esta molécula e seus derivados possam expressar.

O trabalho demonstra a importância dos produtos naturais, como fontes de novos compostos bioativos, seja por extração ou por modificação na estrutura. A citar o eugenol, um produto natural que apresenta uma gama de possibilidades de modificações em sua estrutura, visando obter um novo candidato a fármaco.

REFERÊNCIA

ARMAREGO, W. L. F.; PERRIN, D. D. *Purification of Laboratory Chemicals*: 4^a ed., Oxford: Butterworth-Heinemann, 1996.

COSTA, P. R. R. Safrol e eugenol: estudo da reatividade química e uso em síntese de produtos naturais biologicamente ativos e seus derivados. **Química Nova**. v. 23, n. 3, p. 357-369, 1999.

CHOI, D. Y.; LEE, J. W.; LIN, G.; LEE, Y. K.; LEE, Y. H.; CHOI, I. S.; HAN, S. B.; JUNG, J. K.; KIM, Y. H.; KIM, K. H.; OH, K. W.; HONG, J. T.; LEE, M. S. Obovatol attenuates LPS-induced memory impairments in mice via inhibition of NF- κ B signaling pathway. **Neurochemistry International**. v. 60, n. 1, p. 68-77, 2012.

DOURADO, K. M. C. *Potencial terapêutico do eugenol em modelo experimental de alergia respiratória*. 2012. 65f. Dissertação (Mestrado em Imunologia). Universidade Federal da Bahia (UFBA) - instituto de ciências da saúde. Salvador, 2012.

JAMSHIDI-KIA, F.; LORIGOOINI, Z.; AMINI-KHOEI, H. Medicinal plants: Past history and future perspective. **Journal of Herbmmed Pharmacology**. v. 7, n. 1, p. 1-7, 2018.

JÚNIOR, C. V.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**. v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

KAMATOU, G. P.; VERMAAK, I.; VILJOEN, A. M. Eugenol—From the Remote Maluku Islands to the International Market Place: A Review of a Remarkable and Versatile Molecule. **Molecules**. v. 17, p. 6953-6981, 2012.

KAUFMAN, T. S. The Multiple Faces of Eugenol. A Versatile Starting Material and Building Block for Organic and Bio-Organic Synthesis and a Convenient Precursor Toward Bio-Based Fine Chemicals. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 26, n. 6, p. 1055-1085, 2015.

LEITE, A. M.; LIMA, E. O.; SOUZA, E. L.; DINIZ, M. FFM; LEITE, S. P.; XAVIER, A. L.; MEDEIROS, I. A. Preliminary study of the molluscicidal and larvicidal properties of some essential oils and phytochemicals from medicinal plants. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 19, n. 4, p. 842 - 846, 2009.

MARCHESE, A.; BARBIERI, R.; COPPO, E.; ORHAN, I.E.; DAGLIA, M.; NABAVI, S.F.; IZADI, M.; ABDOLLAHI, M.; NABAVI, S.M.; AJAMI, M. Antimicrobial activity of eugenol and essential oils containing eugenol: A mechanistic viewpoint. **Critical Reviews Microbiology**, v. 43, n. 6, p. 668–689, 2017.

MEDEIROS, H. I. R.; FARIAS, L. S.; OLIVEIRA, R. J.; LIMA, J. A. C.; FREITAS, J. C. R. Modificação estrutural no eugenol: síntese, caracterização e atividade toxicológica frente à *Artemia salina* leach. In: Congresso Brasileiro de Ciências da Saúde, 1., 2018, Campina Grande. *Anais*. Campina Grande: Realize, 2018.

MERINO, F.; OLIVEIRA, V.; PAULA, C.; CANSIAN, F.; SOUZA, A.; ZUCHETTO, M.; HIROTA, B.; DUARTE A.; KULIK J.; MIGUEL M.; MIGUEL O. Análise fitoquímica, potencial antioxidante e toxicidade do extrato bruto etanólico e das frações da espécie *Senecio westermanii* Dusén frente à *Artemia salina*. **Revista brasileira de plantas medicinais**, v. 17, n. 4, p. 1031-1040, 2015.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine Shrimp: A convenient general bioassays for active plant constituents. **Planta Médica**, v.45, n.1, p.31-34, 1982.

MOHAMMADI NEJAD, S.; ÖZGÜNEŞ, H.; BAŞARAN, N. Pharmacological and Toxicological Properties of Eugenol. **Turk Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 14, n. 2, p. 201-206, 2017.

RABELO, W.F. *Caracterização química, toxicidade e avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial do Cravo da Índia (Syzygium aromaticum)*. 2010. 79f. Dissertação (Mestrado em química) – Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2010.

RIBEIRO, S. S. L. *Estudo etnobotânico de plantas medicinais em uma área de caatinga na Paraíba*. 2018. 45f. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização - Gestão em Recursos Ambientais do Semiárido – GRAS). Instituto Federal de Educação Tecnológica da Paraíba (IFPB). Picuí, 2018.

SILVA, L. L.; HELDWEIN, C. G.; REETZ, L. G. B.; HÖRNER, R.; MALLMANN, C. A.; HEINZMANN, B. M. Composição química, atividade antibacteriana *in vitro* e toxicidade em *Artemia salina* do óleo essencial das inflorescências de *Ocimum gratissimum* L., Lamiaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 20, n. 5, p. 700 – 705, 2010.

YAO, H.; LIU, J.; XU, S.; ZHU, Z.; XU, J. The structural modification of natural products for novel drug discovery. **Expert Opinion Drug Discovery**. v. 12, n. 2, p. 121-140, 2017.