

MODIFICAÇÃO ESTRUTURAL NO EUGENOL: SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE TOXICOLÓGICA FRENTE À *ARTEMIA SALINA* LEACH

Herbert Igor Rodrigues de Medeiros (1); Liviani da Silva Farias (1); Romário Jonas de Oliveira (2); Josefa Aqueline da Cunha Lima (3) Juliano Carlo Rufino de Freitas (4)

1 Universidade Federal de Campina Grande, igorpls_15@hotmail.com

1 Universidade Federal de Campina Grande, liviane25@hotmail.com

2 Universidade Federal Rural de Pernambuco, romario.jonas@live.com

3 Universidade Federal Rural de Pernambuco, akelinecunha@gmail.com

4 Universidade Federal de Campina Grande, julianoocrf@gmail.com

Resumo: O óleo do cravo-da-índia é muito utilizado como agente antiespasmódico, antibacteriano e antiparasitário. Este, possui como componente majoritário o eugenol (4-alil-2-metoxifenol), um composto orgânico volátil com fórmula molecular $C_{10}H_{12}O_2$. O eugenol é muito utilizado na odontologia, por possuir propriedades bactericidas, servindo como antisséptico bucal, além de ser utilizado como anestésico, antifúngico, dentre outras aplicações. Com base em suas propriedades, o trabalho apresentou como objetivo sintetizar um novo composto a partir do eugenol, e avaliar a sua toxicidade frente a larvas da *Artemia salina* Leach. O composto 2-(4-alil-2-metoxifenoxi) acetato de etila foi sintetizado a partir da reação de alquilação do eugenol com bromoacetato de etila, posteriormente foi purificado, caracterizado por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e de Carbono (RMN 1H e RMN ^{13}C), enquanto que a CL_{50} das artêmias foi determinada através do *software* POLO-PC. Como resultado, o 2-(4-alil-2-metoxifenoxi) acetato de etila foi obtido em bom rendimento, na forma de um óleo parcialmente turvo, caracterizado e a CL_{50} encontrada através do *software* POLO-PC, com 95% de confiança, foi de 290,774 $\mu g/mL$, considerada uma toxicidade moderada. Assim, é evidente que o potencial biológico do eugenol é muito promissor e que modificações em sua estrutura podem otimizar essas atividades, de forma a melhorar as interações com determinado alvo biológico, bem como contribuir na busca de um novo candidato a fármaco.

Palavras-chave: Cravo-da-índia, Eugenol, Artêmia, Toxicidade.

Introdução

A *Artemia salina*, é um pequeno crustáceo zooplancctônico encontrado em água salgada, ou seja, nos ambientes marinhos. Este é utilizado na alimentação de peixes aquarianos, uma vez que possui uma grande distribuição geográfica e uma alta adaptabilidade (ATES et al., 2016; RAJABI et al., 2015). Os cistos da *A. salina* podem ser adquiridos no comércio por um preço acessível, e estes se mantem viáveis por anos em armazenamento seco (POMPILHO, MARCONDES & OLIVEIRA, 2014).

O bioensaio envolvendo a *Artemia salina* é considerado um método simples, de fácil manuseio e baixo custo, pois não é necessário a utilização de equipamentos especiais, e acomoda facilmente um alto número de náuplios (larva), amparando a validação estatística garantindo a confiabilidade do método. Portanto, atende as principais necessidades rotineiras de triagem de toxicidade, requeridos pelo

monitoramento industrial ou para fins regulatórios (RAJABI et al., 2015).

Outra vantagem deste bioensaio com *A. salina* é devido o mesmo não requer soro animal e, portanto, pode substituir os experimentos científicos empregado ratos e camundongos, além de ser um método rápido, simples e sensível a substâncias tóxicas (RAJABI et al., 2015). Este bioensaio é amplamente utilizado para avaliar a atividade citotóxica (CHOHAN et al., 2010), larvicida (LUNA et al., 2005), fototoxicidade (OJALA et al., 1999), fungicida (NINO; CORREA; MOSQUERA, 2006), antioxidante (SARAIVA et al., 2011), anticonvulsivante (BAGHERI et al., 2010), dentre outros.

Adicionalmente, os bioensaios de letalidade frente à *A. salina*, utilizam como indicador de toxicidade a CL_{50} , ou seja, a concentração necessária para matar 50% dos indivíduos, considerado parâmetro de avaliação da ação biológica. Amostras com valores de 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).

O bioensaio envolvendo a *A. salina* é bastante utilizado também como indicador de toxicidade aguda, se tornando essencial para estudos de substâncias que possam indicar uma possível atividade biológica, como em extratos e frações advindos de produtos naturais, sendo constantemente aplicado na verificação da segurança do uso de plantas na medicina popular, facilitando o direcionamento de estudos na descoberta de novos fármacos (POMPILHO; MARCONDES & OLIVEIRA, 2014). Dentre os produtos naturais com uso mais frequente na medicina popular merece destaque o Eugenol, que por muito tempo foi utilizado pela população no tratamento de ferimentos e alívio de dores.

No âmbito científico o eugenol (4-alil-2-metoxifenol) é um composto orgânico volátil do tipo fenilpropanóide com fórmula molecular $C_{10}H_{12}O_2$, possui massa molecular 164,2 g mol^{-1} , dissolve-se em solventes orgânicos e é um ácido de Lewis fraco, obtido na forma de um óleo amarelado extraído principalmente do óleo essencial de cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata*), noz-moscada, canela, manjerição e louro, sendo o componente majoritário (70 a 80%) da extração do óleo do cravo-da-índia onde, o odor agradável do mesmo, deriva do eugenol (MOHAMMADI NEJAD; ÖZGÜNEŞ; BAŞARAN, 2016; MARCHESE et al, 2017).

O óleo do cravo-da-índia tem sido usado na medicina tradicional chinesa a mais de 2000 anos, para diversos fins como, por exemplo, agente antiespasmódico, antibacteriano e antiparasitário (KAMATOU; VILJOEN, 2012). Estudos sobre o óleo de *Eugenia caryophyllata* e o eugenol, seu principal componente,

relataram atividades farmacológicas interessantes, tais como ações anestésicas e analgésicas, sendo relatado também atividades do tipo antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória, anticonvulsivante, antitumoral, antimutagênica, repelente, entre outras (ZHENG; LAM, 1992; HARBORNE; BAXTER, 1993; MIYAZAWA; HISAMA, 2001; OGENDO et al., 2008). Adicionalmente, o eugenol também é muito utilizado para fins ortodônticos, como antisséptico na higiene bucal, devido ao seu efeito bactericida (KAPLAN, et al., 1999).

Diante do exposto é evidente que o potencial biológico do eugenol é muito promissor e modificações em sua estrutura podem otimizar essas atividades, de forma a melhorar as interações com determinado alvo biológico, bem como contribuir na busca de um novo candidato a fármaco. À vista disso, o presente estudo tem por objetivo realizar uma modificação estrutural no 4-alil-2-metoxifenol, caracterizar o composto modificado e verificar sua atividade tóxica frente a *Artemia salina* Leach.

Metodologia

Equipamentos e análise dos dados

As análises de ressonância magnética nuclear (RMN) foram realizadas em um espectrômetro VARIAN® modelo *Unity Plus-300* utilizando como solvente o clorofórmio deuterado (CDCl₃). Este espectrômetro foi calibrado usando tetrametilsilano (0,00 ppm) como referência interna para os núcleos de ¹H e ¹³C, e todas as constantes de acoplamento (*J*) foram descritas em hertz (Hz). A chapa de agitação com aquecimento e a manta aquecedora foram da marca Visaton modelo 754A e 102E, respectivamente. O solvente foi removido utilizando um evaporador rotativo da Büchi Rotavapor modelo R-114 conectado a uma bomba de vácuo modelo KNF Neuberger, e o solvente remanescente foi removido utilizando uma bomba de alto vácuo da Edwards modelo RV3. As estruturas dos compostos foram geradas através do software ChemBioUltra® versão 12.0.

Materiais, solventes e reagentes

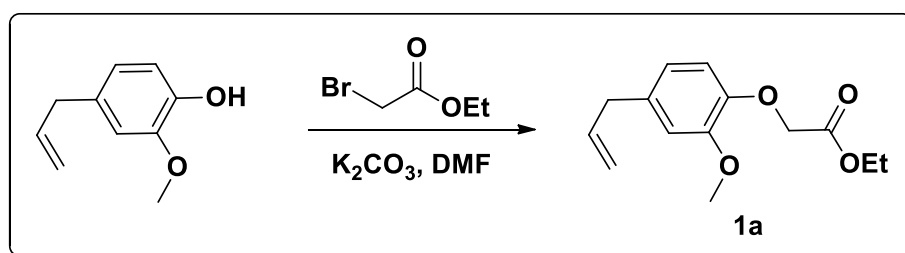
O monitoramento da reação foi realizado através da cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando placas de sílica-gel contendo indicador fluorescente F₂₅₄ da Merck. Para visualização das placas, as mesmas foram colocadas em solução básica de permanganato. A purificação foi realizada através da cromatografia líquida em coluna utilizando sílica-gel 60 (Merck, 70-230 mesh) como fase estacionária e sistemas hexano:acetato de etila como fase móvel numa coluna de vidro em diferentes proporções. Os solventes comerciais foram purificados de acordo com os protocolos descritos por

Perrin e Amarego (1996). O hexano e o acetato de etila foram destilados com coluna de *vigreux*. O reagente bromoacetato de etila foi adquirido da empresa Sigma Aldrich.

Alquilação do Eugenol

A primeira etapa do estudo foi realizada no laboratório de Síntese Orgânica do Centro de Educação e Saúde da Universidade Federal de Campina Grande – Cuité/PB e constituiu-se na adição de uma função éster no oxigênio do grupo hidroxila, conectado na posição orto em relação ao grupamento metoxi no anel aromático do eugenol, através de uma reação de alquilação com bromoacetato de etila para obtenção do composto **1a**.

A alquilação do eugenol foi baseada no protocolo reacional descrito por Spurg e Waldvogel (2008), com algumas modificações, onde em um balão de fundo redondo de 125 mL foram adicionados o eugenol (4,65 mL; 30 mmol), carbonato de potássio (6,22g; 45 mmol) e N,N-dimetilformamida (80 mL). Logo após foi adicionado bromoacetato de etila (3,70 mL; 33,3 mmol) e a mistura reacional foi agitada durante 18 h à temperatura ambiente. Depois foi adicionado H₂O (100 mL) e ao sistema bifásico formado foi adicionado acetato de etila (2 x 130 mL). A camada orgânica combinada foi lavada com H₂O (3 x 65 mL) e salmoura (2 x 30 mL), seca com sulfato de magnésio e concentrada sob pressão reduzida. A purificação do composto foi realizada por cromatografia líquida. O esquema 01 mostra as condições reacionais para a reação de alquilação do eugenol.



Esquema 01. Reação de alquilação do 4-allyl-2-methoxyphenol.

Caracterização

Uma vez obtido o produto, sendo o final da reação verificado por meio de Cromatografia de Camada Delgada (CCD), o mesmo foi caracterizado na Central Analítica da Universidade Federal de Pernambuco – Recife/PE, através da técnica de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e de Carbono (RMN ¹H e RMN ¹³C) com um equipamento models Unitty Plus (400 MHz, 100 MHz e 128 MHz) utilizando trimetilsilano (TMS) como

padrão interno e clorofórmio deuterado (CDCl_3) como solvente.

Toxicidade Frente a Larvas de *Artemia salina* Leach

Com o produto obtido e caracterizado foi realizado, na Universidade Federal de Campina Grande, foi feito o ensaio toxicológico com *Artemia salina* Leach, baseado no protocolo descrito por Meyer e colaboradores (1982). Foram utilizados 40 mg da amostra com a adição de 50 μL de dimetilsulfóxido. Posteriormente, a solução foi homogeneizada e o volume completado para 20 mL com água salinizada filtrada (água salina artificial preparada a partir de 38 g de sal marinho Marinex® em 1 L de água destilada) em $\text{pH} = 8,0$. Desta solução foram retiradas alíquotas de 125, 250, 500, 750, 1000, 1125, 1250 e 1875 μL que foram transferidas para outros balões volumétricos de 5 mL e os volumes completados com o mesmo solvente, obtendo-se 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, onde utilizou-se o dicromato de potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) e controle negativo utilizando apenas água marinha artificial e dimetilsulfóxido. Os cistos da *Artemia salina* (20 mg) foram incubados sob iluminação artificial por 48 horas para que houvesse a eclosão das larvas (metanúplios), e estas, separadas em nove grupos com 10 artêmias cada.

O primeiro e o segundo grupo receberam a solução controle positivo (solvente e dicromato de potássio) e controle negativo (solvente e dimetilsulfóxido) e as oito seguintes receberam a solução aquosa do composto em diferentes concentrações. As amostras foram submetidas à iluminação artificial durante 24 horas. Após este período, foram contabilizadas as larvas vivas e mortas. O experimento foi realizado em triplicata para cada concentração.

Análise Estatística

Para obtenção dos valores da concentração letal para matar 50% das larvas (CL_{50}), foi utilizada a análise através do software POLO-PC (Copyright LeOra Software 1987).

Resultados e Discussão

O composto 2-(4-alil-2-metoxifenoxi) acetato de etila (**1a**), foi obtido na forma de um óleo parcialmente turvo com rendimento de 60%. Os dados espectroscópicos de RMN ^1H e RMN ^{13}C corroboram com os valores encontrados na literatura Labarrios e colaboradores (1999), com RMN ^1H (CDCl_3) δ 6,80 – 6,67 (m, 3H, ArH), 6,02 – 5,88 (m, 1H, $\text{ArCH}_2\text{CH}=\text{}$), 5,12 – 5,05 (m, 2H, $\text{ArCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 4,65 (s, 2H, OCH_2), 4,26 (q, $J = 6,0$ Hz, 2H, CO_2CH_2), 3,87 (s, 3H, OCH_3), 3,34 (d, $J = 9,0$ Hz, 2H, ArCH_2),

1,29 (t, J = 6,0 Hz, 3H, CO₂CH₂CH₃) e RMN ¹³C (CDCl₃) δ 14,1 (C-11), 39,8 (C-12), 55,8 (C-7), 61,1 (C-10), 66,8 (C-8), 112,5 (C-3), 114,6 (C-6), 115,7 (C-14), 120,3 (C-5), 134,4 (C-4), 137,4 (C-13), 145,6 (C-1), 149,6 (C-2), 169,1 (C-9). As Figuras 01 e 02 mostram a representação dos espectros de ¹H e RMN ¹³C respectivamente.

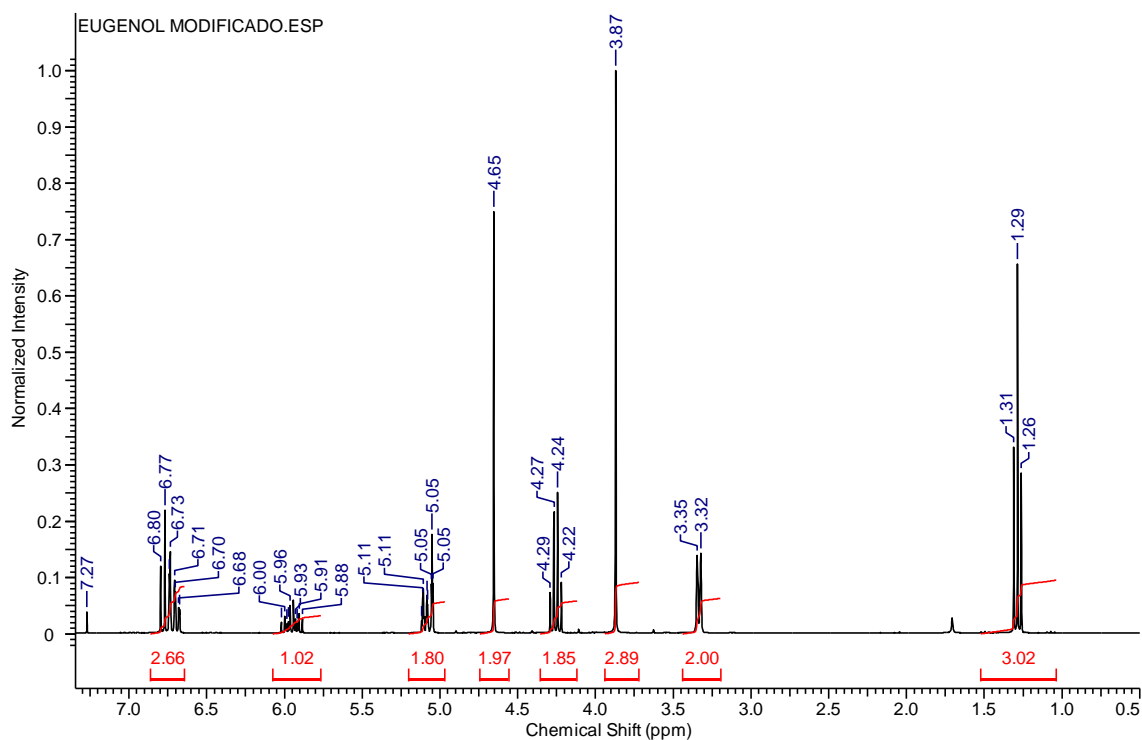


Figura 01. Espectro de RMN ¹H do composto **1a**.

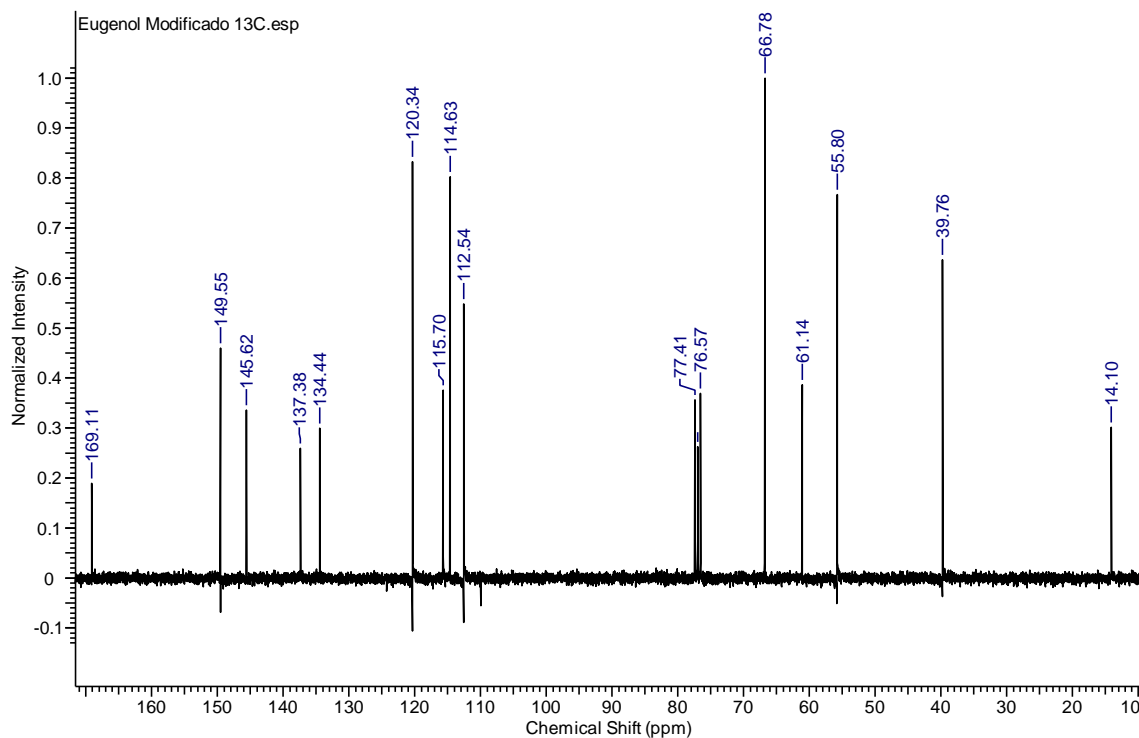
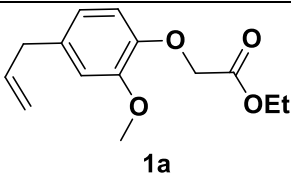
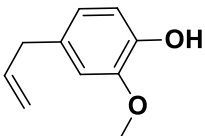


Figura 02. Espectro de RMN ^{13}C do composto **1a**.

A adição da porção éster foi planejada de modo que a toxicidade do eugenol fosse atenuada, uma vez que na literatura, há histórico de fármacos que possuem uma porção éster, como por exemplo o ácido acetilsalicílico (AAS), que quando comparado ao ácido salicílico, seu precursor que não possui a função éster, é menos tóxico e menos irritante (JEFFREYS, 2008).

A avaliação da toxicidade do composto foi realizada frente ao microcrustáceo *Artemia salina* Leach, no qual o valor da taxa de mortalidade da solução variou entre 0 e 100 %, visando determinar a concentração letal para matar 50% das larvas (CL_{50}) conforme a Tabela 1. Deste modo, a CL_{50} encontrada através do software POLO-PC, com 95% de confiança, foi de 290,774 $\mu\text{g/mL}$ com intervalo de confiança nos limites 239,404 a 340,749 $\mu\text{g/mL}$. De acordo com Merino et al. (2015), o valor da CL_{50} igual a 290,774 $\mu\text{g/mL}$ implica que o composto **1a** apresenta uma toxicidade moderada. Rabelo (2010) encontrou para o eugenol uma CL_{50} igual a 18,53 $\mu\text{g/mL}$, onde diante disto, confirma que a introdução do grupo éster atenuou a toxicidade do eugenol, corroborando com o esperado. Assim, este resultado servirá como motivação para futuros estudos de atividade biológica ou farmacológica e em modificações na sua estrutura, de forma a melhorar seu potencial terapêutico e então contribuir na busca de um novo candidato a fármaco.

Tabela 1 – Resultado do teste de toxicidade frente à *Artemia salina*.

Experimento	Composto	CL ₅₀ (µg/mL)
1	 1a	290,774
2		18,53 ^a

^aValor descrito por Rabelo (2010).

Conclusão

O 2-(4-alil-2-metoxifenoxi) acetato de etila foi obtido na forma de um óleo amarelado com rendimento de 60%, utilizando o protocolo modificado de Spurg e Waldvogel. Este composto foi caracterizado por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e de Carbono e os dados obtidos estão de acordo com os descritos na literatura. Os resultados do teste com *Artemia salina* do 2-(4-alil-2-metoxifenoxi) acetato de etila (**1a**) indicou que este composto foi moderadamente tóxico, com uma CL₅₀ igual a 290,774 µg/ML. Com isto, a introdução da porção éster no eugenol confirma que, este grupamento atenuou a sua toxicidade frente a larvas de *Artemia salina* Leach e fornece subsídios para continuar modificando a estrutura do eugenol a fim de obter um composto mais eficiente e menos tóxico.

Agradecimentos

Ao CNPq e a CAPES pelas bolsas de estudo concedidas e a Central Analítica da UFPE – Recife pelas análises de Ressonância Magnética Nuclear.

Referências

ATES, M.; DEMIR, V.; ARSLAN, Z.; CAMAS, M.; CELIK, F. Toxicity of engineered nickel oxide and cobalt oxide nanoparticles to *Artemia salina* in seawater. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 227, n. 3, p. 70, 2016.

BAGHERI, S.; SAHEBKAR, A.; GOHARI, A.; SAEIDNIA, S.; MALMIR, M.; IRANSHAHI, M. Evaluation of cytotoxicity and

anticonvulsant activity of some Iranian medicinal Ferula species. **Pharmaceutical Biology**, v. 48, n. 3, p. 242-246, 2010.

CHOHAN, Z.; SUMRRA, S.; YOUSOUFI, M.; HADDA, T. Metal based biologically active compounds: Design, synthesis, and antibacterial/antifungal/cytotoxic properties of triazole-derived Schiff bases and their oxovanadium(IV) complexes. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 7, p. 2739-2747, 2010

HARBORNE, J.B.; BAXTER, H. **Phytochemical Dictionary**; Taylor and Francis: London, UK, 1993.

JEFFREYS, D. Aspirin: The Remarkable Story of a Wonder Drug. Bloomsbury Publishing USA, Dec 1, p. 46-48, 2008.

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.

KAPLAN, A.E.; PICCA, M.; GONZALEZ, M.I.; MACCHI, R.L.; MOLGATINI, S.L. Antimicrobial effect of six endodontic sealers: an *in vitro* evaluation. **Endodontics and Dental Traumatology**, v.15, p. 42-45, 1999.

LABARRIOS, F.; GARDUÑO, L.; VIDAL, M. D. R.; GARCIA, R.; SALAZAR, M.; MARTINEZ, E.; DIAZ, F.; CHAMORRO, G.; TAMARIZ, J. Synthesis and Hypolipidaemic Evaluation of a Series of α -Asarone Analogues Related to Clofibrate in Mice, **J. Pharm. Pharmacol**, v. 51, p.1-7, 1999.

LUNA, J.; DOS SANTOS, A.; DE LIMA, M.; DE OMENA, M.; DE MENDONCA, F.; BIEBER, L.; et al. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 2, p. 199-206, 2005.

MARCHESE, A.; BARBIERI, R.; COPPO, E.; ORHAN, I. E.; DAGLIA, M.; NABAVI, S. F.; IZADI, M.; MOHAMMAD ABDOLLAHI; MOHAMMAD NABAVI, S.; AJAMI, M. Antimicrobial activity of eugenol and essential oils containing eugenol: A mechanistic viewpoint. *Critical Reviews In Microbiology*, **Taylor & Francis Group**, 2017.

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 supl 3, p. 1031-1040, 2015.

MEYER, B. N.; FERRIGNI N. R.; PUTNAM, L. B.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Journal of Medicinal Plants Research*, v. 45, p. 31-34, 1982.

MIYAZAWA, M.; HISAMA, M. Suppression of chemical mutagen-induced SOS response by alkylphenols from clove (*Syzygium aromaticum*) in *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002 umu test. **J. Agric. Food Chem**, v. 49, p. 4019–4025, 2001.

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

NINO, J.; CORREA, Y.; MOSQUERA, O. Antibacterial, antifungal, and cytotoxic activities of 11 Solanaceae plants from Colombian biodiversity. **Pharmaceutical Biology**, v. 44, n. 1, p. 14-18, 2006.

OGENDO, J.O.; KOSTYUKOVSKY, M.; RAVID, U.; MATASYOH, J.C.; DENG, A.L.; OMOLO, E.O.; KARIUKI, S.T.; SHAAYA, E. Bioactivity of *Ocimum gratissimum* L. oil and two of its constituents against five insect pests attacking stored food products. **J. Stored Prod. Res**, v. 44, p. 328–334, 2008.

OJALA, T.; VUORELA, P.; KIVIRANTA, J.; VUORELA, H.; HILTUNEN, R. A bioassay using *Artemia salina* for detecting phototoxicity of plant coumarins. **Planta Medica**, v. 65, n. 8, p. 715-718, 1999.

POMPILHO, W. M.; MARCONDES, H. C.; OLIVEIRA, T. T. Bioatividade de três espécies vegetais nativas da Floresta Atlântica brasileira frente ao microcrustáceo *Artemia salina*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 16, n. 3, p. 473-480, 2014.

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

RAJABI, S.; RAMAZANI, A.; HAMIDI M.; NAJI T. *Artemia salina* as a model organism in toxicity assessment of nanoparticles. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 23, n. 1, p. 20, 2015.

SARAIVA, A.; CASTRO, R.; CORDEIRO, R.; SOBRINHO, T.; CASTRO, V.; AMORIM, E.; et al. In vitro evaluation of antioxidant, antimicrobial and toxicity properties of extracts of *Schinopsis brasiliensis* Engl. (Anacardiaceae). **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 5, n. 14, p. 1724-1731, 2011.

SPURG, A.; WALDVOGEL, S. R. High-Yelding Cleavage of (Aryloxy) acetates. FULL PAPER, **Eur. J. Org. Chem.** 2008, p. 337-342.

ZHENG, G.Q.; KENNEY, P.M.; LAM, L.K.T. Sesquiterpenes from clove (*Eugenia caryophyllata*). **J. Nat. Prod.**, v. 55, p. 999–1003, 1992.