

MODIFICAÇÃO ESTRUTURAL DO EUGENOL VISANDO A OBTENÇÃO DE UM NOVO PROTÓTIPO: SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA

José T. de M. Cavalcanti Júnior¹; Karolynni L. L. de Andrade¹; Cláudia L. A. Almeida²; Wilson P. da Silva²; Filipe M. C. Santos²; Tonny C. C. Leite¹; Amanda R. de Sena¹; José V. P. Barbosa³; Izaqueu R. da Silva¹; Jonh A. M. Santos¹

¹Instituto Federal de Pernambuco – Campus Barreiros (IFPE)

²Departamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco (DQF-UFPE)

³Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Palavras-Chave: Antibiótico, ADME, Produto Natural.

Introdução

Estudos apontam que as doenças infecciosas têm sido uma das principais razões de mortalidade em populações de países em desenvolvimento ao longo da história (Baker et al., 2022), e que a resistência bacteriana a antibióticos é atualmente um dos grandes problemas de saúde pública, uma vez que muitas bactérias que anteriormente foram inibidas por antibióticos comumente utilizados, acabam perdendo a resposta a esses mesmos agentes (Loureiro et al., 2016). Esse fato traz à tona, que existe uma busca por novos compostos com atividade antimicrobiana, especialmente diante da crescente preocupação com a resistência microbiana e o aumento das infecções hospitalares (Terreni; Tacani; Pregnotato, 2021).

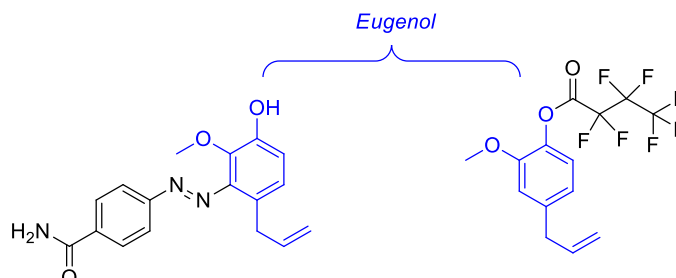
Ao longo dos milênios, os seres humanos têm usado as plantas e animais como agentes terapêuticos para prevenir e tratar doenças, demonstrando uma estreita relação entre o uso das plantas e sua própria evolução. Esse legado histórico ressalta a importância da preservação e do estudo da biodiversidade para o desenvolvimento de novos tratamentos e medicamentos. Nos últimos anos, uma atenção crescente tem sido dada a busca de novos medicamentos baseados em produtos naturais, uma vez que estes compostos representam uma alta diversidade estrutural e de bioatividade (Nasim; Sandeep; Mohanty, 2022).

O eugenol, também denominado como 4-alil-2-metoxifenol de acordo a IUPAC, é um composto aromático que está presente em diversas plantas, como folhas de canela (*Cinnamomum verum*), folhas de louro (*Laurus nobilis*), entre outros, porém esse composto é encontrado em maior quantidade no cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*). Devido suas propriedades, fácil obtenção, baixo custo e segurança, este composto tem sido amplamente empregado na indústria farmacêutica, alimentícia, agrícola e cosmética (Silva *et al.*, 2018). As propriedades biológicas do eugenol incluem as atividades anti-inflamatória, antioxidante, analgésica, anti-hiperglicêmica, antiplaquetária, antitumoral e leishmanicida (Ulanowska; Olas, 2021).

Além disso, o eugenol exibe ação antimicrobiana contra diversos patógenos humanos, incluindo um amplo grupo de bactérias e fungos Gram-positivos e Gram-negativos e uma série de parasitas. Investigações sobre o mecanismo antibacteriano do eugenol tem demonstrado que este composto atua danificando a membrana e a parede celular de bactérias, resultando no vazamento de componentes intracelulares (Jeyakumar; Lawrence, 2021). Tais propriedades do eugenol tem impulsionado a síntese e avaliação antimicrobiana de novos

derivados desse produto natural, como os estudos relatados por Dandge et al., (2024) e Trejo-Carbajal (2023) (Figura 1).

Figura 1. Derivados do eugenol com ação antimicrobiana relatados recentemente.



Dessa forma, realizamos a síntese, avaliação antimicrobiana e estudo ADME (Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção) *in silico* de um derivado do eugenol visando a obtenção de um novo fármaco com ação antibiótica.

Material e Métodos

Extração do eugenol

O eugenol foi obtido a partir da hidrodestilação do cravo da índia seguida da extração ácido base do óleo essencial obtido. Foram adicionados em um balão de destilação 25 g de cravo e adicionou-se 100 mL de água destilada. A destilação seguiu até ser recolhido, no erlenmeyer, 50 mL da mistura óleo/água. A mistura foi então extraída com 20 mL de CH_2Cl_2 . A fase orgânica foi extraída com uma solução aquosa de NaOH 5% (20 mL). A fase aquosa foi acidificada com uma solução aquosa de HCl diluído até pH = 2, em seguida a fase aquosa foi extraída novamente com CH_2Cl_2 (20 mL). A fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 anidro, filtrada e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida.

Síntese do derivado cloroacetil eugenol

Uma mistura de eugenol (1 mmol, 164,2 mg) e trietilamina (1 mmol, 101,1 mg, 0,726 g/mL, 0,14 mL) em diclorometano anidro (15 mL) foi resfriada em uma temperatura de 0 a -5 °C. O Cloreto de cloroacetil (1 mmol, 112,9 mg; 1,42 g/mL, 0,079 mL) em diclorometano seco (5 mL) foi adicionado gota a gota a esta mistura de reação com agitação constante durante um período de 1 hora, mantendo uma temperatura constante. A mistura de reação foi então agitada à temperatura ambiente por mais 5 horas e depois lavada com HCl a 5% e solução de hidróxido de sódio a 5%. A camada orgânica foi lavada com NaCl aquoso saturado, seca com sulfato de magnésio anidro e filtrada. O solvente foi então removido sob pressão reduzida. O produto bruto foi purificado por uma coluna de sílica gel para gerar o correspondente derivado de eugenol cloroacetil.

Avaliação da atividade antimicrobiana

O ensaio de susceptibilidade foi realizado pela metodologia da microdiluição em caldo para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) segundo o *National Committee for Clinical Laboratory Standards-NCCLS* (2002; 2003). A determinação da CIM foi feita em placas de 96 poços estéreis, próprias para microdiluição. Todos os ensaios foram realizados em duplicata e os mesmos repetidos duas vezes. As linhagens de bactérias foram obtidas da Coleção de Microrganismos do Departamento de Antibióticos da

Universidade Federal de Pernambuco (UFPEDA). Para este ensaio foram utilizadas três bactérias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* (UFPEDA 01), *Enterococcus faecalis* (UFPEDA 138) *S. Pyogenese* (ATCC 19615).

Estudo das propriedades ADME

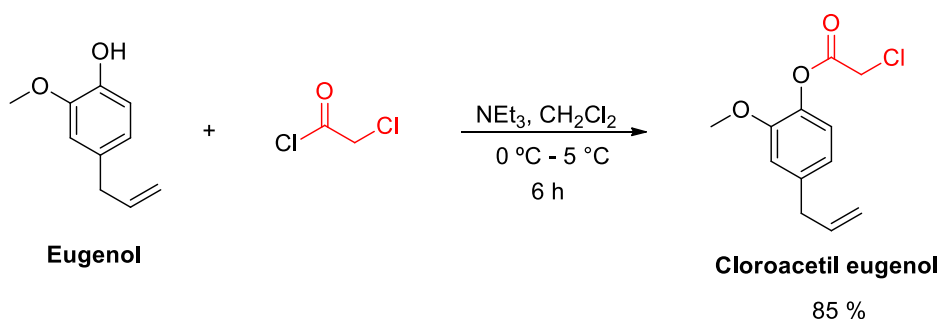
As propriedades de adme foram calculadas através do servidor online ADMETlab 2.0 e *SwissADME*, disponível em <https://admetmesh.scbdd.com/service/evaluation/index> e <http://www.swissadme.ch>, respectivamente. Estes softwares possibilitam o cálculo de importantes propriedades físico-químicas da molécula. Estes parâmetros foram utilizados para avaliar o padrão de biodisponibilidade teórica do composto, baseando-se na “Regra dos Cinco” desenvolvida por Lipinski.

Resultados e Discussão

A extração do eugenol foi realizada a partir do cravo-da-índia por meio do método de hidrodestilação, seguindo o protocolo de GAZOLLA *et al.* (2018) com algumas modificações. Na hidrodestilação, o cravo da índia a ser destilado fica em contato direto com a água, e quando esta entra em ebulição, arrasta os compostos voláteis consigo inclusive o óleo, e quando condensa, forma uma mistura heterogênea, com duas fases, devido à diferença de polaridade e densidade entre a água e o óleo. O eugenol foi obtido na forma de um óleo viscoso incolor em um rendimento de 5% a partir de 20g de cravo da índia. A caracterização do composto foi realizada a partir de RMN de ^1H e ^{13}C e os dados estão de acordo com os dados da literatura (KHALIL *et al.*, 2017).

Uma vez realizado a obtenção do eugenol, a próxima etapa do trabalho foi realizar a síntese do cloroacetil eugenol. Este composto foi obtido através da reação de substituição nucleofílica acílica entre o eugenol e o cloreto de 2-cloro-etanoíla. A reação foi realizada em meio básico empregando a trietilamina e solubilizada em diclorometano, de acordo com o método de Ali *et al.* relatado em 2016 (Esquema 1).

Esquema 1. Modificação do eugenol visando a produção de um novo derivado com potencial atividade antimicrobiana.

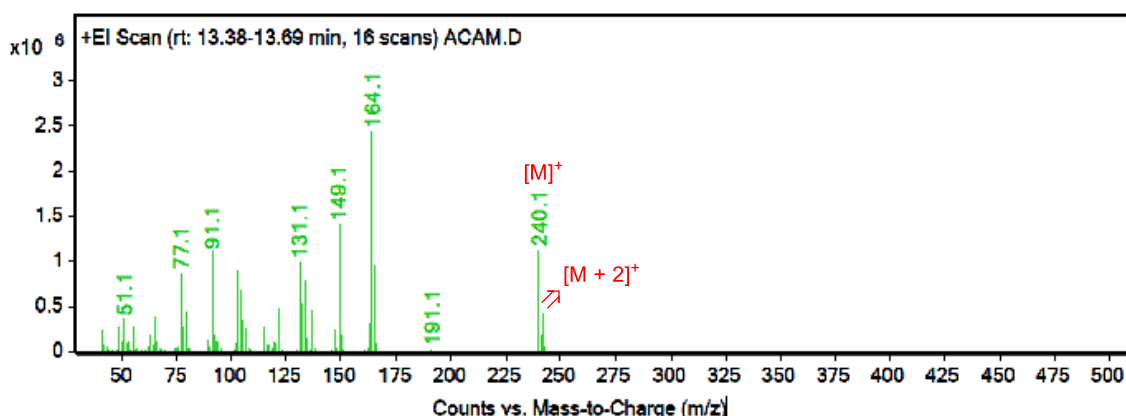


Como mostrado no esquema 1, o cloroacetil eugenol foi obtido na forma de um óleo viscoso amarelo em um tempo de 6,0 h e com um bom rendimento (85%).

A estrutura do cloroacetil eugenol foi elucidada através de diferentes técnicas espectrais. Preliminarmente, o composto formado foi analisado através da técnica de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria massas (GC-MS). O cromatograma apresentou apenas um pico com um tempo de retenção de 13,42 min, constatando a pureza do composto.

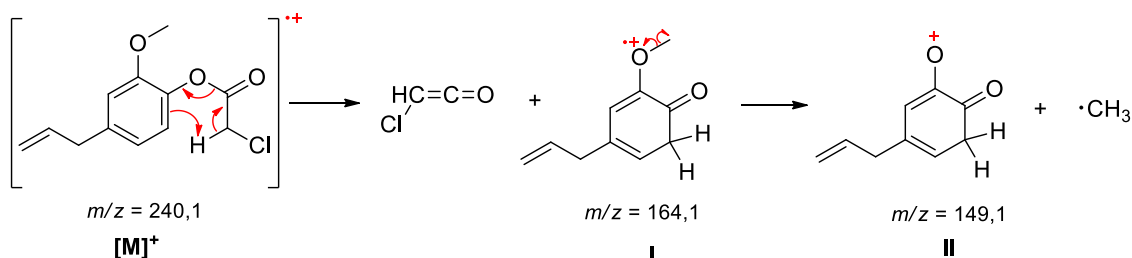
O espectro de massa do cloroacetil eugenol (Figura 2) foi obtido pelo método de ionização por elétrons (EI-MS) com feixe padrão de 70 eV. O EI-MS mostra o pico do íon molecular $[M]^+$ com $m/z = 240,1$, que corresponde ao peso molecular do cloroacetil eugenol ($PM = 240,06 \text{ g/mol}$). Um outro dado do espectro de massa que corrobora a formação do cloroacetil eugenol é a presença do pico $[M + 2]^+$ com valor de $m/z = 242,1$. Como o cloro contém dois isótopos naturais, o ^{35}Cl e o ^{37}Cl . A abundância na natureza desses dois isótopos é de aproximadamente 75% do ^{35}Cl e 25% para o ^{37}Cl , e dessa forma, os espectros de massas de substâncias contendo um átomo de cloro apresenta um pico $[M + 2]^+$ com uma intensidade que é de um terço do pico $[M]^+$, como mostrado no espectro do cloroacetil eugenol na figura 2.

Figura 2. Espectro de massa do cloroacetil eugenol.



A análise do EI-MS mostrou a fragmentação esperada para o cloroacetil eugenol, de acordo com a proposta apresentada na figura 3. Para explicar a formação do cátion radical **I** com $m/z = 164,1$ (pico base) sugerimos que após a formação do pico íon molecular $[M]^+$, este sofre um rearranjo de McLafferty levando a perda da molécula Cl-CH=C=O . Assumimos que na estrutura **I** ocorre uma quebra hemolítica da ligação O-C com liberação do radical metila ($\cdot\text{CH}_3$) levando ao íon **II** com $m/z = 149,1$.

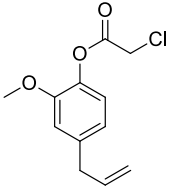
Figura 3. Fragmentação proposta para o cloroacetil eugenol.



Uma vez sintetizado o cloroacetil eugenol, deu-se início ao estudo das atividades antibacterianas, utilizando as bactérias *S. aureus*, *S. pyogenese*, *E. faecalis* e *E. coli* empregando método de microdiluição em caldo visando a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) de um antimicrobiano para uma cepa específica implica identificar a menor dose do fármaco que consegue inibir o crescimento da bactéria em análise. Em outras palavras, é realizado um teste

quantitativo para avaliar a suscetibilidade. De forma geral, quanto menor a CIM, maior a eficácia do antimicrobiano, e quanto mais potente for o antimicrobiano, menores serão as chances de selecionar células bacterianas resistentes (Ferreira, et al 2020). Os resultados desses experimentos são importantes para comparações com valores de atividade outros antibióticos. Na tabela 1 podem ser analisados os resultados dos ensaios.

Tabela 1. Avaliação da atividade antibacteriana do o cloroacetil eugenol por meio da determinação do CIM ($\mu\text{g/mL}$).

Composto	Bactérias			
	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. pyogenese</i>	<i>E. coli</i>
	500	250	500	500





De acordo com a tabela 1, o cloroacetil eugenol obteve bons resultados de CIM para todas as bactérias testadas, de acordo com a literatura uma boa atividade antimicrobiana tem valores entre 50-500 $\mu\text{g/mL}$, uma atividade moderada de 500-1500 $\mu\text{g/mL}$ e baixas atividades acima de 1500 $\mu\text{g/mL}$.




A predição de propriedades farmacocinéticas como absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME) é uma das etapas mais importante no processo de descoberta de novos medicamentos, uma vez pode fornecer uma oportunidade para prever o desempenho de determinado composto em um ambiente *in vivo* (Daina; Michielin; Zoete, 2017). Neste estudo, o software online ADMETlab 2.0 foi empregado para prever as características físico-químicas do cloroacetil eugenol, um derivado do produto natural eugenol.

Os dados teóricos obtidos, incluindo peso molecular (MM), área de superfície polar topológica (TPSA), coeficiente de partição (log P), volume (Vol), número de doadores de hidrogênio (nDLH), número de aceptadores de hidrogênio (nALH), número de ligações rotativas (nRot) são apresentadas na tabela 2.

De acordo com a regra de cinco de Lipinski, um bom candidato a fármaco não deve violar mais do que um dos seguintes critérios: (I) peso molecular menor que 500 Daltons; (ii) número máximo de cinco grupos doadores de ligação hidrogênio; (iii) número máximo de cinco grupos aceptadores de ligação hidrogênio; (iv) o coeficiente de partição inferior a 5; (v) e uma área de superfície polar total (TPSA) que não deve ser superior a 140. A absorção prevista foi de 96,7%, calculada através da equação $\%ABS = 109 - (0.345 \times TPSA)$, sugerindo uma forte biodisponibilidade oral para o cloroacetil eugenol. Conforme mostrado na tabela 2, o cloroacetil eugenol é compatível com estas regras. Estes resultados revelam que o composto pode apresentar propriedades físico-químicas adequadas o que aumenta a sua importância farmacológica.

Tabela 2. Análise das propriedades ADME e de toxicidade do cloroacetil eugenol.

Parâmetros Físico-Químicos, Solubilidade e Absorção								
MM	TPSA	LogP	Vol	nDLH	nALH	nRot	%ABS	vLip
240,06	35,54	2,705	235,951	0	3	6	96,7	0
Farmacocinética								
AGI	BBB	CYP1A2	CYP2C19	CYP2C9	CYP2D6	CYP3A4	P-gp	LoKp (cm/s)
alto	sim	sim	sim	não	não	não	não	-5,69
Toxicidade								
Hepatotoxicidade		Carcinogenicidade		Irritação nos olhos		Toxicidade respiratória		
								

MM = massa molar; TPSA = Área de superfície polar topológica; LogP = coeficiente de partição; Vol = volume; nDLH = número de doadores de ligações de hidrogênio; nALH = número de aceptadores de ligações de hidrogênio; nRot = número de ligações rotativas; %ABS = absorção; vLip: violações de Lipinski; AGI = absorção gastrointestinal; BBB = *Barreira hematoencefálica*; CYP = *enzimas citocromo P450*;  altamente tóxico;  pouco tóxico;  não tóxico

Do ponto de vista farmacocinético, o cloroacetil eugenol inibe as enzimas CYP1A2 e CYP2C19, enquanto que para as enzimas CYP2D6, CYP2D6 e CYP3A4, não foi previsto a inibição, de acordo com os cálculos obtidos através do *SwissADME*. O citocromo P450 (CYP) são importantes enzimas hepáticas responsáveis pelo metabolismo de vários medicamentos. Por outro lado, o composto apresentou alta absorção gastrointestinal (AGI), que é um fator importante para medicamentos orais eficazes, e boa permeação da barreira hematoencefálica. A toxicidade do cloroacetil eugenol também foi avaliada por meio do ADMETlab 2.0. Um dos principais fatores que inviabiliza que compostos bioativos recém-sintetizados se tornem medicamentos é a identificação *in vivo* da sua toxicidade. As previsões de toxicidade por meio de estudos *in silico* podem fornecer uma estimativa precoce da margem de segurança dos compostos bioativos. De acordo com a tabela 2, os resultados da predição da toxicidade indicaram que a cloroacetil eugenol é seguro no que diz respeito a hepatotoxicidade e apresenta baixa carcinogenicidade, embora tenha apresentado alta irritação nos olhos e toxicidade respiratória.

Conclusões

Com base nos resultados apresentados, podemos concluir que a extração bem sucedida do eugenol a partir do cravo-da-índia, a síntese do derivado do eugenol alcançada com bom rendimento, aliada à conformidade do composto avaliado com os critérios da regra de cinco de Lipinski, sugere que o cloroacetil eugenol têm um potencial promissor para apresentar um perfil, sintético e farmacológico favorável. Além disso, a determinar a concentração inibitória mínima (CIM) reforça sua relevância na pesquisa farmacêutica, evidenciando sua eficácia contra os patógenos *S. aureus*, *S. pyogenese*, *E. faecalis* e *E. coli*. Isso destaca não apenas a viabilidade da síntese desse derivado sintético do eugenol para possíveis aplicações

terapêuticas, mas também sua importância no desenvolvimento de novas opções antimicrobianas.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao IFPE pela bolsa de iniciação científica e a UFPE pela caracterização dos compostos.

Referências

- ALI, A., ASHRAF, Z., KUMAR, N. *et al.* Influence of plasma-activated compounds on melanogenesis and tyrosinase activity. *Sci. Rep.*, 6, 21779, 2016.
- BAKER, R. E.; MAHMUD, A. S.; MILLER, I. F.; RAJEEV, M.; RASAMBAINARIVO, F.; RICE, B. L.; TAKAHASHI, S.; TATEM, A. J.; WAGNER, C. E.; WANG, L. F.; WESOLOWSKI, A.; METCALF, C. J. E. Infectious disease in an era of global change. *Nat Rev Microbiol*, 20(4), 193-205, 2022.
- DAINA, A., MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci Rep*, 7, 42717, 2017.
- DANDGE, S. V.; NIKUME, S. R.; BENDRE, R. S. An efficient synthesis, characterization, antimicrobial and anticancer activities of azo dyes derived from eugenol. *Synthetic Communications*, 54(4), 282–292, 2023.
- FERREIRA, R. D.; SOARES, R. D. A.; CARVALHO, L. A.; SILVA, G. A.; OLIVEIRA, C. A.; SILVA, G. A. E. Determinação da concentração inibitória mínima de conservantes alimentares para o controle de salmonella typhimurium. *Holos*, 4, 1–14, 2020.
- GAZOLLA, P., TEIXEIRA, R., SILVA, A., VAZ, B., VASCONCELOS, G., SIQUEIRA, R., GONÇALVES, V., PEREIRA, H., BRESSAN, G. Síntese e Avaliação da Atividade Citotóxica de Derivados do Eugenol Contendo Núcleos 1,2,3-Triazólicos. *Química Nova*, 41(5), 497-506, 2018.
- JEYAKUMAR, G. E.; LAWRENCE, R. Mechanisms of bactericidal action of Eugenol against *Escherichia coli*. *Journal of Herbal Medicine*, 26 (100406), 1-6, 2020.
- KHALIL, A. A.; RAHMAN, U. U. R.; KHAN, M. R.; SAHAR, A.; MEHMOOD, T.; KHAN, M. Essential oil eugenol: sources, extraction techniques and nutraceutical perspectives. *RSC Advances*, 7(52), 32669-32681, 2017.
- LOUREIRO, R. J.; ROQUE, F.; RODRIGUES, A. T.; HERDEIRO, M. T.; RAMALHEIRA, R. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas breves notas sobre a sua evolução. *Rev. Port. Saúde Públi*, 34, 1, 2016.
- NASIM, N.; SANDEEP, I. S.; MOHANTY, S. Plant-derived natural products for drug discovery: current approaches and prospects. *Nucleus (Calcutta)*, 65(3), 399-411, 2022.
- TERRENI, M.; TACCANI, M.; PREGNOLATO M. New Antibiotics for Multidrug-Resistant Bacterial Strains: Latest Research Developments and Future Perspectives. *Molecules*, 26(9), 2671, 2021.
- TREJO-CARBAJAL, N.; SUAREZ, C. E. C.; REYES-ANGELES, M. C.; HERRERA-GONZÁLEZ, A. M. Evaluation of eugenol-derived monomers as antimicrobial agents in dental resin composites. *Journal of Applied Polymer Science*, 140(31), 2023.
- ULANOWSKA, M.; OLAS, B. Biological Properties and Prospects for the Application of Eugenol - A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22 (7), 1-13. 2021.



63º Congresso Brasileiro de Química
05 a 08 de novembro de 2024
Salvador - BA