

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
CENTRO DE CIÊNCIAS QUÍMICAS, FARMACÊUTICAS E DE ALIMENTOS
MESTRADO EM BIOQUÍMICA E BIOPROSPECÇÃO



Dissertação

Avaliação da atividade antioxidante de derivados semi-sintéticos do eugenol

Marília Davila Farias

Pelotas, 2013

MARÍLIA DAVILA FARIAS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE DERIVADOS SEMI-
SINTÉTICOS DO EUGENOL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (Bioquímica e Bioprospecção).

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Alethéa Gatto Barschak

Co-orientador: Prof. Dr. Claiton Leoneti Lencina

Pelotas, 2013

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
CENTRO DE CIÊNCIAS QUÍMICAS, FARMACÊUTICAS E DE ALIMENTOS
MESTRADO EM BIOQUÍMICA E BIOPROSPECÇÃO

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a
Dissertação de Mestrado

Avaliação da atividade antioxidante de derivados semi-sintéticos do eugenol

elaborada por
Marília Davila Farias

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Ciências (Bioquímica e Bioprospecção)

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof^a. Dr^a. Francieli Moro Stefanello (UFPeI)

Prof. Dr. Claiton Leoneti Lencina (UFPeI)

Prof^a. Dr^a. Manuella Pinto Kaster (UCPeI)

Prof. Dr. Wilson João Cunico Filho (UFPeI)

Pelotas, 2013

Agradecimentos

Ao meu marido por todo amor, paciência e dedicação. Obrigada pelo sorriso de cada manhã e pelas doces palavras quando eu precisei.

À minha família, pela preocupação, atenção e apoio em cada decisão tomada. Por me proporcionar condições de estudar e trabalhar. Obrigada pelo amor e pelo carinho.

À minha orientadora Prof^a. Alethéa Gatto Barschak pela oportunidade, por todo o conhecimento e dedicação. Obrigada pelo desenvolvimento profissional e pessoal.

Aos meus co-orientadores Prof. Claiton Leoneti Lencina e Prof^a. Francieli Moro Stefanello pelos conhecimentos repassados, pela disposição, pela energia durante cada momento. Obrigada por orientar e acreditar neste trabalho.

Ao Prof. Claudio M. P. de Pereira, por abrir as portas a novos conhecimentos, por disponibilizar seu laboratório, ajudar no meu desenvolvimento, nos experimentos e nos novos projetos. Obrigada pelo carinho, pela atenção e por me falar aquela palavra amiga quando eu mais precisei.

Aos meus amigos, Marina Ritter e Filipe Dutra, pela amizade, disposição, incentivo e pelas aulas de química. Obrigada.

Aos mestrandos e bolsistas de iniciação científica dos Laboratórios de Biomarcadores e do Laboratório de Heterociclos Bioativos e Bioprospecção, por toda ajuda, pelos momentos de estudo, conhecimento, parceria e amizade. Obrigada por todo o apoio e o comprometimento.

Agradeço aos auxílios financeiros recebidos para a execução deste trabalho.

PARTE I

Resumo

FARIAS, Marília Davila. **Avaliação da atividade antioxidante de derivados semi-sintéticos do eugenol**. 2013. 59f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O eugenol, obtido a partir de óleo de cravo (*Eugenia caryophyllata*), apresenta várias atividades biológicas comprovadas, tais como anti-inflamatória, analgésica, anestésica, antipirética, antiplaquetária, anticonvulsivante, antioxidante, antibacteriana, antidepressiva, antifúngica e antiviral. O eugenol é um derivado fenólico, que apresenta capacidade de neutralizar radicais livres pela transferência de um único elétron. A atividade antioxidante do eugenol já foi comprovada, nesse panorama, o teste de uma série de derivados estruturais planejados do eugenol pode favorecer o avanço na busca da otimização e consequente aumento da potência desta atividade. Na procura por aumentar a variabilidade estrutural, dezesseis compostos foram sintetizados por O-acilação e O-alquilação de hidroxila fenólica. A avaliação da atividade antioxidante baseou-se na capacidade de captura dos radicais DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) e ABTS (2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico)). Além disso, avaliou-se a capacidade antioxidante desses compostos em sistemas biológicos, utilizando a medida de espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS), conteúdo de tióis totais e conteúdo de carbonilas. Observou-se que mudanças na posição 1 do eugenol são importantes, as diferenças no tamanho e as características da cadeia de carbono (alifático ou aromático) pode permitir conhecer as características requeridas para aumentar a atividade. Quatro derivados apresentaram uma concentração eficiente para diminuir 50% do radical DPPH (EC_{50}) < 100 μ M, e três desses também reduziram o radical ABTS, o que demonstra o bom potencial antioxidante dessas moléculas. Os efeitos antioxidantes dos derivados de eugenol sobre a peroxidação lipídica, conteúdo total de tióis e carbonilação de proteínas foram eficazes em córtex cerebral, porém, em fígado, os derivados não foram tão efetivos. Os nossos resultados sugerem que essas moléculas são promissores agentes antioxidantes.

Palavras-chave: Eugenol. Atividade antioxidante. Compostos fenólicos. Derivados do eugenol.

Abstract

FARIAS, Marília Davila. **Avaliação da atividade antioxidante de derivados semi-sintéticos do eugenol**. 2013. 59f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Eugenol, obtained from clove oil (*Eugenia caryophyllata*), possess several biological activities. It is anti-inflammatory, analgesic, anesthetic, antipyretic, anti-platelet, anticonvulsant, antioxidant, antibacterial, antidepressant, antifungal and antiviral. Phenolic derivatives, as eugenol, are a major class of natural compounds with antioxidant activity, and they have the ability to neutralize free radicals by transfer of a single electron. The antioxidant activities of eugenol have already been proven. From this perspective testing a series of planned structural derivatives of eugenol helped advance the search for optimization and consequent increase of the potency of these biological activities. In an attempt to increase structural variability, sixteen compounds were synthesized by *O*-acylation and *O*-alkylation of the phenolic hydroxyl group. Antioxidant activity capacity was based on the capture of DPPH radical (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl), ABTS radical 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid), besides evaluated the antioxidant capacity of these compounds in biological systems using of TBARS (thiobarbituric acid-reactive species), total sulfhydryl and carbonyl content. Changes at position 1 of the eugenol are important, differences in size and features of the carbon chain (aliphatic or aromatic) could provide information on the required characteristics to increase activity. Four derivatives presented an efficient concentration able to decrease 50% of the DPPH radical (EC_{50}) < 100 μ M, which has a good potential antioxidant as a free radical scavenger. Three of these compounds also showed reduction of ABTS radical. Eugenol derivatives reduce lipid peroxidation, protein oxidative damage by carbonyl formation and preserves total thiol content in cerebral cortex. But in liver, they were less effective. Our results suggest that these molecules are promising antioxidants agents.

Keywords: Eugenol. Antioxidant activity. Phenolic compounds. Eugenol derivative

Lista de Figuras

Figura 1 – Estrutura do eugenol	17
Figura 2 – Visão geral da geração de espécies reativas de oxigênio e os danos causados	20
Figura 3 – Reação da atividade antioxidante onde ArOH representa um fenol e ArO o seu radical fenoxila	21

Lista de Abreviaturas e Siglas

ABIFISA	– Associação Brasileira das Empresas do Setor Fitoterápico, Suplemento Alimentar e de Promoção da Saúde
ABTS	– 2,2'-azino-bis(3-etilbenzenotiazolina-6-ácido sulfônico)
ADN	– Ácido Desoxirribonucleico
AIDS	– Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
CAT	– Catalase
CUPRAC	– Poder de Redução Antioxidante do Íon Cúprico
DPPH	– 2,2-difenil-1-picril-hidrazil
EC ₅₀	– Concentração eficiente para reduzir 50% de um radical
ER	– Espécies Reativas
ERO	– Espécies Reativas de Oxigênio
FDA	– <i>Food and Drug Administration</i>
GPx	– Glutathione Peroxidase
HO [•]	– Radical Hidroxila
LDH	– Lactato Desidrogenase
LDL	– Lipoproteína de Baixa Densidade
O ₂ ^{•-}	– Ânion Superóxido
ROO [•]	– Radical Peroxila
SOD	– Superóxido Dismutase
TBARS	– Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TGO	– Transaminase Glutâmico Oxalacética
TGP	– Transaminase Glutâmico Pirúvica

Sumário

PARTE I	4
Resumo	5
Abstract	6
Lista de figuras	7
Lista de abreviaturas e siglas	8
 PARTE II	 10
1 Introdução	11
2 Objetivos	13
2.1 Objetivo geral	13
2.2 Objetivos específicos	13
3 Revisão de literatura	14
3.1 Produtos naturais	14
3.2 Compostos fenólicos	15
3.3 Eugenol	16
3.4 Radicais livres e antioxidantes	18
3.5 Eugenol e atividade antioxidante	20
 PARTE III	 23
Artigo científico	24
 PARTE IV	 50
Conclusão	51
Referências	53
Anexo	58

PARTE II

1 Introdução

O eugenol é um composto obtido do óleo de cravo (*Eugenia caryophyllata*), que vem sendo muito empregado como matéria-prima na obtenção de produtos farmacêuticos, possuindo relatos de diversas atividades biológicas, tais como: analgésica (LEE et al., 2007), antidepressiva (IRIE; KEUNG, 2004), antioxidante (OGATA et al., 2000; GULÇIN, 2011), anti-inflamatória (LEE et al., 2007), antiviral (XIANG; PEN; WANG, 2008), antibacteriana (ALEM; DOUGLAS, 2009), entre outras (ANUJ et al., 2010).

Diversos estudos demonstraram a capacidade antioxidante do eugenol e dos seus derivados em inibir a peroxidação lipídica induzida por espécies reativas de oxigênio. Um estudo de estrutura-atividade do eugenol revelou que, além do anel fenólico, a cadeia lateral tem um papel importante na atividade antioxidante (ITO; MARUKAMI; YOSHINO, 2005; TANGERINO, 2006).

Os antioxidantes são substâncias endógenas ou exógenas, que reduzem a formação de espécies reativas ou reagem, promovendo sua inativação. Essas espécies podem causar dano celular, assim, para que isso seja evitado, o organismo possui defesas antioxidantes que controlam os níveis de espécies reativas, permitindo que essas desempenhem seu papel dentro do metabolismo normal (HALLIWELL, 2001; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

A formação de radicais livres *in vivo* ocorre via ação catalítica de enzimas durante os processos de transferência de elétrons que ocorrem no metabolismo celular, assim como pela exposição a fatores exógenos. Quando ocorre desequilíbrio entre a formação de moléculas oxidantes e as defesas antioxidantes, ocorre o que chamamos de estresse oxidativo. A ocorrência de um estresse oxidativo moderado, frequentemente é acompanhada pelo aumento das defesas antioxidantes

enzimáticas, mas a produção de uma grande quantidade de espécies reativas pode causar danos e morte celular (PIENIZ et al., 2009)

Os vegetais possuem diversos compostos com atividade antioxidante, dentre esses, encontram-se os compostos fenólicos. As propriedades benéficas desses compostos podem ser atribuídas a sua capacidade de sequestrar os radicais livres. Dessa forma, os compostos fenólicos podem inibir os processos da oxidação em certos sistemas, muito embora não protegendo todos os tipos de danos oxidativos (OLIVEIRA et al., 2009).

Pesquisas biológicas voltadas para antioxidantes e radicais livres têm produzido resultados promissores no que se refere a novas abordagens terapêuticas. Conhecendo que o estresse oxidativo contribui para a gênese de uma vasta gama de desequilíbrios fisiológicos, que estão na origem de muitas patologias, as terapias antioxidantes têm surgido como alternativas para prevenção e o tratamento de doenças, com destaque para as degenerativas crônicas, incluindo câncer, inflamação, doenças cardiovasculares e doenças neurodegenerativas (doença de Parkinson e Alzheimer, esclerose múltipla, entre outras). Ainda, demonstrou-se que as espécies reativas de oxigênio (ERO) podem estar envolvidas nas rotas de sinalização e na resposta celular. Também é importante ressaltar que muitos agentes anti-inflamatórios apresentam atividade antioxidante (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; GACCHE et al., 2008).

A atividade antioxidante do eugenol já foi comprovada (OGATA et al., 2000). Assim, para a obtenção dos derivados do eugenol foram realizadas reações simples de acilação e alquilação da hidroxila fenólica. Essas alterações almejam a obtenção de compostos com características físico-químicas variadas, na presença de grupamentos químicos potencialmente geradores de interações entre a molécula e o seu sítio alvo. Assim, diferenças no tamanho da cadeia carbônica e na sua natureza alifática ou aromática poderão auxiliar na suposição do tamanho e da natureza estérica do sítio. Além disso, poderão igualmente fornecer potenciais indícios de algumas possíveis interações necessárias, visto que grupamentos doadores e aceptores de ligação hidrogênio, assim como grupamentos possíveis de estabelecer interações iônicas foram projetados. Por outro lado, a essencialidade da ocorrência da hidroxila fenólica para atividade antioxidante será verificada.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi projetar e realizar modificações estruturais no eugenol, buscando a obtenção de análogos bioativos com características físico-químicas adequadas e balanço lipofilia/hidrofilia apropriado, visando otimizar sua solubilidade e permeabilidade através de membranas biológicas e posteriormente, avaliar os compostos obtidos quanto à sua atividade antioxidante.

2.2 Objetivos específicos

Obter análogos estruturais na posição 1 do eugenol, realizando reações de O-acilação e O-alquilação da hidroxila fenólica;

Avaliar a capacidade antioxidante *in vitro* dos derivados do eugenol frente ao radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH[•]);

Avaliar a capacidade antioxidante *in vitro* dos derivados do eugenol frente ao radical 2,2'-azino-bis(3-etilbenzenotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS^{•+});

Caracterizar *ex vivo* a capacidade antioxidante de diferentes derivados do eugenol em córtex cerebral e fígado de ratos Wistar de 30 dias de vida através dos seguintes parâmetros:

- Determinação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS);
- Medida do conteúdo de carbonilas;
- Medida do conteúdo tiólico total.

3 Revisão de literatura

3.1 Produtos naturais

O Brasil apresenta uma grande biodiversidade de espécies vegetais que constitui uma de suas principais riquezas. Em consequência, vem se destacando como fonte para a obtenção de novas substâncias com finalidade terapêutica (KORDALI et al., 2008). Segundo a Associação Brasileira das Empresas do Setor Fitoterápico, Suplemento Alimentar e de Promoção da Saúde (ABIFISA), 80% da população mundial utiliza medicamentos originados de plantas medicinais (ABIFISA, 2007).

Nas últimas duas décadas, o interesse da humanidade por plantas medicinais e de seus respectivos produtos, tornou a aumentar, promovendo a abertura dos mercados nacionais e mundiais na área de fitoterápicos e de plantas bioativas.

As plantas são modelos para a síntese de importantes fármacos, já que são fontes de compostos biologicamente ativos (LIMA et al., 2007; MAGALHÃES, 2009). As plantas fornecem compostos com grande importância farmacológica, inspiradores da humanidade na descoberta de novos fármacos. Os produtos naturais são de suma importância em três grandes pilares à obtenção de medicamentos: fornecedoras de fitofármacos, fornecedoras de precursores para semi-síntese ou como protótipos para síntese de análogos, fornecedoras de extratos padronizados para a obtenção de medicamentos fitoterápicos. Atualmente, sabe-se da importância da independência das fontes naturais para a geração de compostos terapeuticamente importantes. Consequentemente, a síntese torna-se uma ferramenta essencial para manter o equilíbrio entre produção em larga escala e preservação ambiental, além de diminuir a forte influência das condições edafoclimáticas na obtenção de um arsenal terapêutico adequado.

Muitas vezes, os compostos de ação terapêutica nas plantas medicinais se apresentam na forma de óleos essenciais, mistura de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas, também podendo ser chamados de óleos voláteis. Essa denominação deriva de suas características físico-químicas, como por exemplo, apresentarem-se geralmente na forma líquida, de aparência oleosa à temperatura ambiente, advindo a designação de óleo, por possuírem baixo ponto de ebulição, geralmente com aroma agradável e intenso, sendo chamados de essências (MAGALHÃES, 2009).

Devido às inúmeras vantagens, os compostos obtidos a partir de plantas medicinais têm sido amplamente utilizados na medicina tradicional. Podemos citar como exemplos, produtos originados de planta medicinal muito utilizados na terapêutica, a morfina extraída de *Papaver somniferum*, a efedrina de *Ephedra vulgaris*, a atropina de *Atropa beladonna*, e o Taxol extraído de *Taxus brevifolia* entre outros (PRAKASH; GUPTA, 2005).

As plantas medicinais são ricas em metabólitos secundários, potenciais fontes de compostos com atividade biológica de possível importância na terapêutica (PRAKASH; GUPTA, 2005). Uma ampla variedade de metabólitos secundários é produzida pelos vegetais superiores, dentre esses, podem-se encontrar alcalóides, aminas biológicas, glicosídeos cianogênicos, terpenóides, saponinas, flavonóides, taninos, ácidos fenólicos, lignanas, ligninas, entre outros (RÊGO-JUNIOR et al., 2011).

3.2 Compostos fenólicos

Fenóis são compostos que apresentam em sua estrutura, um núcleo aromático com, no mínimo, uma hidroxila. Há relatos sobre a ocorrência na natureza dessa classe de compostos, atingindo a ordem de mais de 8.000 compostos (GULÇIN, 2011).

Os compostos fenólicos são a principal classe de compostos naturais com atividade antioxidante, uma vez que possuem a capacidade de neutralizar radicais livres pela transferência de um único elétron. Nos últimos anos, vem crescendo o interesse em produtos naturais com atividade antioxidante para o uso industrial em alimentos, bebidas, cosméticos e na geração de fármacos. Diversos estudos relataram a atividade antioxidante de extratos de plantas e sua relação com compostos fenólicos (HIRANO et al., 2001; AABY; HVATTUM; SKREDE, 2004;

MOREIRA; MANCINI-FILHO, 2004; SILVA et al., 2005; SUN; HO, 2005; SINGH et al., 2007; SCHERER; GODOY, 2009).

Como citado anteriormente, esses compostos apresentam atividade antioxidante comprovada, podendo agir como doadores de átomos de hidrogênio. Ademais, podem quelar íons metálicos, os quais, quando em estado livre, catalisam reações oxidativas como a reação de Fenton e Haber-Weiss (GULÇIN, 2011). Os compostos fenólicos podem reagir “neutralizando” radicais livres, como o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e o radical hidroxila ($HO^{\cdot}$), inibindo assim, a oxidação de componentes celulares (FUJISAWA et al., 2002). A principal característica estrutural responsável pela atividade antioxidante de derivados fenólicos é a presença da hidroxila fenólica, pois são capazes de doar o átomo de hidrogênio para as espécies reativas, impedindo assim, a propagação em cadeia durante o processo de oxidação (HIDALGO et al., 2009).

A doação do hidrogênio da hidroxila fenólica ocorre através da conversão em radical fenoxila, que é estável devido à deslocalização ou dimerização de elétrons dentro do anel benzênico adjacente. Assim, o radical fenoxila, por possuir baixa reatividade, não reage com muitas macromoléculas, evitando a ocorrência de dano. As propriedades antioxidantes do grupo fenólico são dependentes da facilidade com que ele pode perder elétrons para eliminar um radical (NAGABABU et al., 2010).

Os derivados fenólicos formam o grupo de antioxidantes que mais tem sido estudado, tais como o ácido cafeico e seus análogos, que são conhecidos por terem atividade antiviral, anti-inflamatória e propriedades antiateroscleróticas (FINDIK; CEYLAN; ELMASTAS, 2011). Além disso, diversos estudos mostram que compostos fenólicos são eficazes na redução da incidência de vários tipos de carcinomas, matando as células cancerosas e vários microrganismos (FUJISAWA et al., 2002; HIDALGO et al., 2009).

3.3 Eugenol

O eugenol (4-alil-2-metoxifenol) é um composto muito utilizado como especiaria devido ao seu odor forte e como antisséptico dental devido ao seu efeito detergente (GULÇIN, 2011; ITO; MAARUKAMI; YOSHINO, 2005). O eugenol (Figura 1) é uma substância aromática natural, farmacologicamente ativa, presente em óleos essenciais vegetais. Dentre as plantas produtoras, destacam-se: *Eugenia*

caryophyllata, “cravo-da-índia”; *Dicopelium caryophyllatum*, “craveiro do Maranhão ou cravinho”; *Ocimum gratissimum*, “alfavaca-cravo”; e o *Croton zenhntneri*, “canela-de-cunha”; entre outras. Também conhecido como ácido eugênico ou cariofílico, o eugenol é popularmente denominado de essência de cravo (ESCOBAR, 2002; MAGALHÃES, 2009; NAGABABU et al., 2010). A primeira atividade biológica relatada do eugenol foi ação antibacteriana (BARTELS, 1947). Posteriormente, estudos demonstraram os efeitos do eugenol sobre o sistema imunológico, reprodutivo, cardiovascular, gastrointestinal, nervoso e urinário (YAO et al., 2012). O óleo volátil contendo eugenol é obtido através da destilação por arraste a vapor dos botões e pedúnculos florais de *E. caryophyllata* da família das mirtáceas (COSTA, 2000).

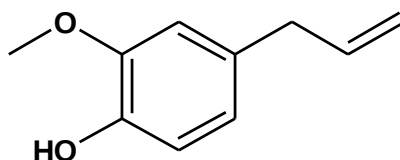


Figura 1 - Estrutura do eugenol

O eugenol possui diversas atividades farmacológicas comprovadas, sendo utilizado em práticas odontológicas como antisséptico tópico, analgésico e anestésico local (ESCOBAR, 2002; ROJO et al., 2008; BASKARAN; PERIYASAMY; CARANI, 2010). Possui atividade antifúngica (RAKOTONIRAINY; LAVÉDRINE, 2005), antiviral (TRAGOOLPUA; JATISATIENR, 2007), efeito anti-edematogênico local (BASKARAN; PERIYASAMY; CARANI, 2010) e anti-inflamatório (GULCIN, 2011). Na medicina tradicional, como acontece com outras plantas, o eugenol é utilizado com propósitos diferentes, como no tratamento de flatulência, diarreia crônica, cólicas, entre outros (BASKARAN; PERIYASAMY; CARANI, 2010).

Foi comprovado, igualmente, que o eugenol retarda o crescimento de alguns tumores, reduzindo a proliferação celular e aumentando a apoptose (YAO et al., 2012). Por outro lado, apontando o amplo leque de atividades relatadas para esse composto, há ensaios mostrando que o eugenol reduz os níveis plasmáticos de glicose, triacilgliceróis, colesterol e das enzimas lactato desidrogenase (LDH), transaminase glutâmico pirúvica (TGP), transaminase glutâmico oxalacética (TGO) e fosfatase alcalina, demonstrando seu potencial terapêutico como antidiabético, cardioprotetor, hipolipemiante e agente hepatoprotetor (PRAKASH; GUPTA, 2005). Em estudos com coelhos, o eugenol mostrou ter ação vasorelaxante sobre o tecido

arterial, indicando sua importância terapêutica como um vasodilatador. Além disso, esse composto vem sendo usado no tratamento de distúrbios imunológicos (PRAKASH; GUPTA, 2005). Além de apresentar diversas atividades comprovadas, o eugenol é considerado não mutagênico e não cancerígeno (AWASTHI et al., 2008), sendo reconhecido como seguro pela *Food and Drug Administration* (FDA) (EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES, 1982) (FUJISAWA et al., 2002; GULÇIN, 2011; BASKARAN; PERIYASAMY; CARANI, 2010).

Apesar das diversas atividades biológicas comprovadas e atribuídas ao eugenol, o número de estudos da otimização de sua atividade em um dado alvo terapêutico é ainda reduzido. Para avançar nessa área de estudos, é imprescindível que se conheça o mecanismo de ação da molécula, e consequentemente, os alvos terapêuticos envolvidos, além do grupamento farmacofórico dos compostos. Nesse panorama, os ensaios de uma gama de derivados estruturais planejados do eugenol gerarão dados que poderão auxiliar no seu avanço.

3.4 Radicais livres e antioxidantes

Radicaís livres são moléculas que contêm um ou mais elétrons desemparelhados, o que as torna instáveis e altamente reativas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Na década de 1950, Harman propôs "a teoria dos radicais", postulando que os danos a macromoléculas celulares, através da produção de radicais livres em organismos aeróbios, é um determinante importante ao tempo de vida (HARMAN, 2001). Posteriormente, foi identificado que muitos agentes causadores de danos oxidativos a macromoléculas não são radicais livres, mas sim, espécies reativas (ER), pois não possuem elétrons desemparelhados. Assim, uma versão mais moderna desse princípio é a "teoria do estresse oxidativo", a qual sustenta que o aumento de ER acompanha o envelhecimento, levando a alterações funcionais, condições patológicas e até mesmo, à morte (HAGEN, 2003; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; KREGEL; ZHANG, 2007).

Em geral, as ER são formadas como subprodutos do metabolismo celular, tanto produzidas acidentalmente quanto de forma proposital. As principais ER geradas nos sistemas biológicos são as espécies reativas de oxigênio (ERO), que incluem o radical superóxido, peróxido de hidrogênio e oxigênio singlete. Essas ERO podem ser geradas por diversos fatores internos e externos. Podem ser produzidas por fontes endógenas: respiração aeróbia, inflamação e enzimas do citocromo P450;

ou por fontes exógenas: ozônio, radiações gama e ultravioleta, medicamentos, produtos da dieta e cigarro. As ERO podem causar danos oxidativos a lipídios, proteínas e ácidos nucleicos em células vivas (YILDIRIM; MAVI; KARA, 2001; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; GULÇIN, 2011; NAGABABU et al., 2010). Contudo, os danos oxidativos aos sistemas biológicos ocorrem apenas quando os níveis de ER superaram os sistemas de defesa antioxidantes protetores das células (Figura 2) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; PENZ et al., 2009; ROBERTS; SINDHU, 2009).

Antioxidantes são substâncias endógenas ou exógenas que reduzem a formação de radicais livres ou reagem, promovendo sua inativação, evitando assim, o dano celular causado pela presença de espécies reativas. O organismo possui defesas antioxidantes enzimáticas, como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPX) e não enzimáticas, como vitamina C, vitamina E, β -caroteno, entre outros (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; HUANG et al., 2012).

As ER têm sido relacionadas com as doenças cardiovasculares e inflamatórias, e apresentam um papel importante no envelhecimento. Os esforços para combater os danos causados por essas espécies estão ganhando aceitação, como base para novas abordagens terapêuticas (FINDIK; CEYLAN; ELMASTAS, 2011). Foi descoberto que uma série de doenças, entre as quais, câncer, aterosclerose, diabetes, artrite, malária, síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), possuem alguma relação com ERO, seja na sua gênese, no seu agravamento, ou mesmo, na predisposição do organismo (BRENNAN; PAGLIARINI, 2001; YILDIRIM; MAVI; KARA, 2001; GULÇIN, 2011; HUANG et al., 2012).

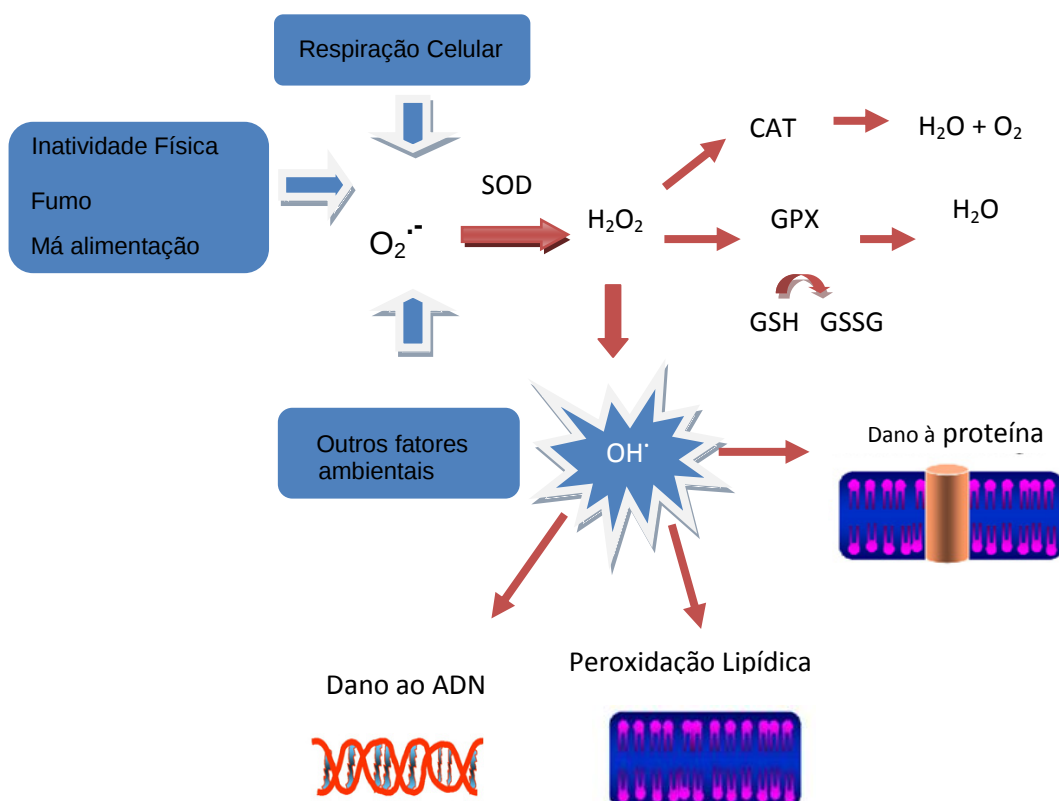


Figura 2 - Visão geral da geração de espécies reativas de oxigênio e os danos causados (adaptado de ROBERTS; SINDHU, 2009)

$O_2^{\bullet -}$ - Anion Superóxido; **SOD** - Superóxido dismutase; H_2O_2 - Peróxido de Hidrogênio; **CAT** - Catalase; **GPX** - Glutathione Peroxidase; **GSH** - Glutathione reduzida; **GSSG** - Glutathione oxidada; $OH^{\bullet}$ - Radical Hidroxila.

A utilização de substâncias com capacidade antioxidante pode ser de grande relevância na prevenção e na terapêutica de doenças relacionadas com a ocorrência do estresse oxidativo. Dessa forma, os compostos fenólicos, como o eugenol, podem apresentar uma imensa importância terapêutica (BRENNAN; PAGLIARINI, 2001; YILDIRIM; MAVI; KARA, 2001; DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004).

3.5 Eugenol e a atividade antioxidante

A atividade do eugenol é atribuída à capacidade de doar o átomo de hidrogênio fenólico, e assim, estabilizar o radical peroxila ($ROO^{\bullet}$) (Figura 3), o que ocorre de forma mais rápida, em comparação ao ataque do radical peroxila no substrato orgânico (FUJISAWA et al., 2002).

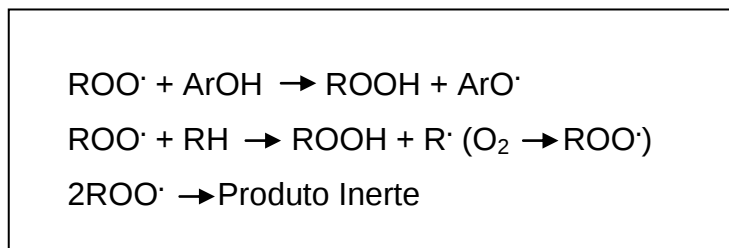


Figura 3 - Reação da atividade antioxidante onde ArOH representa um fenol e ArO o seu radical fenoxila (Adaptado de FUJISAWA et al., 2002)

O principal mecanismo de ação dos antioxidantes fenólicos é a eliminação de radicais livres, ainda que outros mecanismos possam estar envolvidos. A atividade de eliminação de radical de compostos fenólicos depende das características estruturais, que favorecem a doação de hidrogênio e a estabilidade do radical fenoxila resultante. Além disso, a extensão de conjugação com a cadeia de carbono é uma característica molecular que requer alguma atenção, pois pode participar por ressonância na estabilização do radical fenoxila (GULÇIN, 2011).

As hidroxilas exercem dois efeitos farmacológicos principais: alterações das propriedades físicas e modificação da reatividade química. Em certos compostos poli-hidroxiados, as hidroxilas concorrem para a fixação do fármaco em seu receptor, através de ligação de hidrogênio. Assim, a eterificação e a esterificação dessas, podem modificar suas respectivas atividade (MAGALHÃES, 2009).

O eugenol é oxidado de forma enzimática ou não enzimática, por meio de um único elétron via radical fenoxila e pode ligar-se covalentemente a grupos tióis em proteínas. As ligações duplas são responsáveis por eliminar o radical peroxi-alquila e o radical superóxido, devido à diferença de potencial de redução entre o radical e o fenol (FUJISAWA et al., 2002). Além disso, Boonstra e Post (2004) demonstraram que a produção de ERO, em conjunto a baixas concentrações de eugenol, pode ter efeitos sobre o ciclo celular e na transdução de sinal (ATSUMI et al., 2005).

Vários métodos têm sido propostos para avaliar a atividade antioxidante dos compostos puros e dos extratos de plantas. Em um estudo de Fujisawa et al (2002), sugere-se que o eugenol sofre reações de dimerização ou acoplamento entre seu radical e o radical do DPPH.

Gulçin (2011) investigou as seguintes capacidades do eugenol: inibição da peroxidação lipídica, poder de redução antioxidante do íon férrico, poder de redução

antioxidante do íon cúprico (CUPRAC); atividade frente aos radicais DPPH e ABTS e potencial *scavenger* de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio, obtendo resultados satisfatórios em todos os testes. Ito, Marukami e Yoshino (2005) mostraram que os compostos derivados do eugenol inibiram a peroxidação lipídica, mediada por ferro e a oxidação da LDL (lipoproteína de baixa densidade). Em outro estudo, foi verificado que o eugenol tem um excelente poder redutor e exerce atividade antioxidante frente ao radical DPPH e peroxidação lipídica. Além disso, foi demonstrado que a oxidação do ADN exposto a reação de Fenton pode ser protegido por eugenol (NAM; KIM, 2013).

Vários estudos têm demonstrado a capacidade antioxidante do eugenol e dos compostos derivados (como isoeugenol), para inibir a peroxidação lipídica induzida pelas ERO. Ainda, tem sido mostrado que o eugenol e os seus derivados inibem a formação do radical superóxido no sistema xantina-xantina oxidase, podendo inibir a geração de radicais hidroxila, bem como, evitar a oxidação de Fe^{2+} na reação de Fenton que gera o radical (HIDALGO et al., 2009).

Portanto, esses resultados suportam que o eugenol pode ser um candidato a agente terapêutico na prevenção e no tratamento de doenças induzidas pelo estresse oxidativo, uma vez que atua como agente antioxidante. O eugenol pode apresentar efeito benéfico em diversas doenças como câncer, doenças coronárias, doenças inflamatórias, distúrbios e degeneração neurológicas (NAM; KIM, 2013). Os compostos derivados do eugenol podem ser antioxidantes mais potentes do que as vitaminas E e C e os carotenóides. Sua atividade antioxidante depende da estrutura química, mais especificamente, depende da capacidade de doar hidrogênio ou elétrons e deslocar o elétron não emparelhado na estrutura aromática. Suas propriedades antioxidantes também estão relacionadas com a proteção de moléculas biológicas contra a oxidação (VILLANO et al., 2005).

PARTE III

Capítulo 1

ARTIGO CIENTÍFICO

Todos os resultados dessa dissertação serão apresentados na forma de artigo científico, submetido ao periódico internacional, conforme Anexo 1.

Eugenol derivatives as potential antioxidants: is phenolic hydroxyl necessary to obtain an effect?

Marília d'Avila Farias¹, Pathise Souto Oliveira², Filipe S. Pereira Dutra², Thiely Jacobsen Fernandes², Claudio M. P. de Pereira², Simone Quintada de Oliveira³, Francieli Moro Stefanello¹, Claiton Leonetti Lencina², Alethéa Gatto Barschak^{1,4}

¹ Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, UFPel, Campus Universitário s/n, Capão do Leão, 96010-900, RS, Brazil

² Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário s/n, Capão do Leão, 96010-900, RS, Brazil

³ Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Farmacêuticas, UFSC, Campus Universitário, Trindade, 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil

⁴ Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Rua Sarmiento Leite, 254, Porto Alegre, 90050-170, RS, Brazil

Corresponding Author: Alethéa Gatto Barschak (aletheagatto@gmail.com), Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Rua Sarmiento Leite, 254, Porto Alegre, CEP: 90050-170, RS, Brazil, Phone: (55) / (51) 33038762 and Claiton Leonetti Lencina (claiton.lencina@ufpel.edu.br), Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário s/n, Capão do Leão, RS, Brazil, CEP: 96010-900, Phone: (55) / (53) 32757355

Abstract

Eugenol, obtained from clove oil (*Eugenia caryophyllata*), possess several biological activities. It is anti-inflammatory, analgesic, anesthetic, antipyretic, anti-platelet, anti-anaphylactic, anticonvulsant, antioxidant, antibacterial, antidepressant, antifungal and antiviral. The antioxidant activities of eugenol have already been proven. From this perspective testing a series of planned structural derivatives of eugenol might the search for optimization and consequent increase of the potency of these biological activities. In an attempt to increase structural variability, sixteen compounds were synthesized by acylation and *O*-alkylation of the phenolic hydroxyl group. Antioxidant activity capacity was based on the capture of DPPH radical (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), ABTS radical 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid), measure of TBARS (thiobarbituric acid-reactive species), total sulfhydryl and carbonyl content. Four derivatives presented an efficient concentration to decrease 50% of the DPPH radical (EC_{50}) $<100\ \mu\text{M}$, which has a good potential as a free radical scavenger. Three of these compounds also showed reduction of ABTS radical. Eugenol derivatives were effective in reduce lipid peroxidation, protein oxidative damage by carbonyl formation and increase total thiol content in cerebral cortex homogenates. In liver, the eugenol derivatives evaluated had no effective. Our results suggest that these molecules are promising antioxidants agents.

Keywords: Eugenol. Antioxidant activity. Phenolic compounds. Eugenol derivatives.

Introduction

Eugenol (4-allyl-2-methoxy-phenol) is a phenolic compound and the main component of clove oil (*Eugenia caryophyllata*)^{1,2}. Eugenol is a natural pharmacologically active aromatic substance present in essential oils of several plants³ and known for its aroma and medicinal values⁴. Currently the most common way to obtain this product is extraction by vapor drag of flower buttons and floral stems of some plants belonging to the family *Myrtaceae*^{5,6}.

Eugenol already has several proven biological activities. They include anti-inflammatory^{1,7-11}, analgesic^{1,10,12}, anesthetic¹³, antipyretic^{8,10}, anti-platelet¹⁰, anti-anaphylactic¹⁰, anticonvulsant¹, antioxidant^{1,5,9,11,12}, antibacterial^{1,5,8,11,12}, antidepressant¹², antifungal^{1,6} and antiviral⁶ activities. In traditional medicine, eugenol has been used as an antispasmodic in gastrointestinal disorders^{6,8,9} without mutagenic and carcinogenic effects^{1,9,12}. Furthermore, there is evidence of its hepatoprotective effect^{6,9}.

Eugenol can prevent lipid peroxidation in the early stages¹⁰. Several studies showed the antioxidant capacity of eugenol and its derivatives, such as isoeugenol to inhibit the lipid peroxidation induced by reactive oxygen species. It likewise inhibits the formation of the superoxide radical in the xanthine-xanthine oxidase system, the generation of hydroxyl radical, preventing the oxidation of Fe^{2+} in the Haber-Weiss and Fenton reaction^{14,15}. A study of eugenol structure-activity revealed that in addition to the phenolic ring, the side chain has an important role in antioxidant activity^{2,5}.

Normally, in healthy organisms there is a balance between the production of reactive species and antioxidant defenses. Antioxidants are endogenous or exogenous substances that reduce the formation of reactive species or react promoting their inactivation. In order to prevent cellular damage, which can be caused by the presence of these species, the organism has enzymatic and non-enzymatic antioxidant defenses^{16,17}.

Antioxidant therapies have emerged as alternatives for treating chronic degenerative diseases including cancer, inflammation, cardiovascular diseases and neurodegenerative diseases (such as Parkinson and Alzheimer, multiple sclerosis), and thus biological research aimed at antioxidants and free radicals have produced promising results with regard to new therapeutic approaches¹⁷. Furthermore, it has

been shown that antioxidants may be involved in signaling pathways and cellular responses and that many anti-inflammatory agents also present antioxidant activity¹⁸.

The technological advances that have contributed to the search for new compounds involve the discovery of new molecular tools and evolution of analytical techniques, purification and organic synthesis, resulting in more effective active and/or less toxic substances, which can be used as prototypes of drugs with pharmacological activities similar to or larger than the originals¹⁹.

The antioxidant activities of eugenol have been already confirmed. Thus the attempt at optimization and consequent increase in the biological activities of eugenol requires knowledge of its mechanism of action, its therapeutic targets and its pharmacophoric groups. Hence, testing a range of planned structural derivatives of eugenol helped increase this knowledge.

The aim of this study was to perform structural changes in eugenol to obtain compounds and evaluate their antioxidant capacity and radical scavenging effect. The radical scavenging activity was evaluated by DPPH and ABTS scavenging tests; antioxidant activity was assessed by TBARS (measure of lipid peroxidation) and carbonyl and thiol content (parameters of protein oxidation).

Materials and Methods

All the reagents were used as purchased from commercial suppliers without further purification and solvents were freshly distilled. ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded on a Bruker Advance III instrument (400 MHz) and AC200 (200 MHz). TMS was used as internal standard for ¹H NMR and CDCl₃ for ¹³C NMR. The progress of the reactions was monitored on a thin layer chromatography (TLC) and Shimadzu GC-MS-2010SE Gas Chromatograph equipped with an Rtx-Wax polyethylene glycol capillary column (0.25 mm × 30 m) and a Mass detector (Shimadzu®, Japan).

Chemistry

Chemical data on synthesized compounds

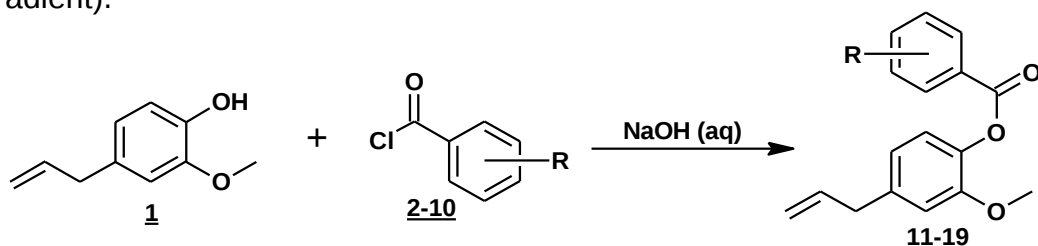
All Eugenol derivatives were prepared at the Laboratory of Bioactive Heterocycles and Bioprospection (LAHBBIO).

Synthesis of eugenol derivatives 11-19

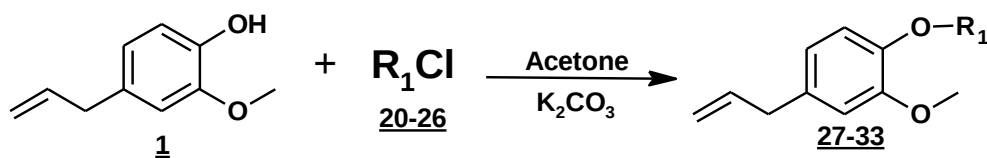
Eugenol (10 mmol) was dissolved in the solution of NaOH (12 mmol). The solution was placed in a flat-bottomed flask and the respective chloride derivative (10 mmol) was added. The mixture was stirred at room temperature on agitation for 30 min. After consumption of the starting material the reaction medium was extracted with dichloromethane (3×10 mL) and washed with Na₂CO₃ 5%. The solvent was dried with anhydrous Na₂SO₄ and evaporated under reduced pressure the pure products were obtained by recrystallization from ethanol.

Synthesis of eugenol derivatives 27-33

In one flask K₂CO₃ (20mmol) was added, dissolved dried acetone (40 mL) and eugenol (10 mmol), followed by the respective addition of alkyl chloride (10 mmol) and stirred at reflux for 2 hours. After complete consumption of the starting material (TLC) the reaction was cooled, filtered and washed with acetone (20 mL). The organic solvent was evaporated under vacuum. The final product was resuspended in dichloromethane (50 mL) and washed with H₂O (2×25 mL). The organic extract was dried under anhydrous Na₂SO₄ and the residual solvent was evaporated in vacuum. Pure product was obtained by column (*n*-Hexane: AcOEt gradient).



Scheme 1. Reaction of obtaining derivatives 11-19



Scheme 2. Reaction of obtaining derivatives 27-33

4'-allyl-2'-methoxyphenyl-benzoate (11): Chemical Formula: $C_{17}H_{16}O_3$; MS m/z : 268.11; NMR Data 1H NMR (400MHz): δ (ppm) 8.19 (2H, C_6H_5); 7.55 (1H, C_6H_5); 7.46 (2H, C_6H_5); 7.06 (1H, C_6H_3-O); 6.79 (2H, C_6H_3); 5.97 (1H, $CH_2=CH_2-CH_2$); 5.10 (2H, $CH_2=CH_2-CH_2$); 3.87 (3H, OCH_3); 3.38 (2H, $CH_2=CH_2-CH_2$), ^{13}C NMR (100MHz): 40.1 ($CH_2-CH_2-C_6H_5$); 56.0 ($O-CH_3$); 113.1 ($Cm-C_6H_3$); 116.0 ($CH_2=CH_2-CH_2$); 120.7 ($Co-C_6H_3$); 122.6 ($Cm-C_6H_3-O$); 128.6 ($O=C-Ci-C_6H_5$); 133.2 ($Cp-C_6H_5$); 137.0 ($CH_2-Cp-C_6H_5$); 138.4 ($O-Ci-C_6H_5$); 138.9 ($CH_2=CH_2-CH_2$); 151.4 ($Co - C_6H_3-OCH_3$); 164.8 ($C=O$); Yield= 86%; MP=57-58°C.

4'-allyl-2'-methoxyphenyl-2-fluorobenzoate (12): Chemical Formula: $C_{17}H_{15}FO_3$; MS m/z : 286.10; NMR Data 1H NMR (400MHz): δ (ppm) 8.22 (2H, C_6H_4-F); 7.22 (2H, C_6H_4-F); 7.16 (1H, C_6H_3); 6.83 (2H, C_6H_3); 5.98 (1H, $CH_2=CH_2-CH_2$); 5.11 (2H, $CH_2=CH_2-CH_2$); 3.78 (3H, OCH_3); 3.39 (2H, $CH_2=CH_2-CH_2$) ^{13}C NMR (100MHz): 39.9 ($CH_2-CH_2-C_6H_3$); 55.9 ($O-CH_3$); 113.2 ($Cm-C_6H_3-O$); 115.5 ($Cm-C_6H_4(2-F)-C=O$); 115.7 ($CH_2=CH_2-CH_2$); 116.1 ($Ci-C_6H_3-C=O$); 120.8 ($Co-C_6H_3-O$); 122.6 ($Cm-C_6H_3-O$); 125.9 ($Cm-C_6H_4-C=O$); 132.8 ($Co-C_6H_4-C=O$); 137.1 ($CH_2-Cp-C_6H_3$); 138.3 ($Cp - C_6H_4-C=O$); 139.2 ($Ci-C_6H_3-O$); 151.2 ($CH_2=CH_2-CH_2$); 163.8 ($CH_3O-Co-C_6H_3-O$); 164.8 ($F-Co-C_6H_4$); 167.4 ($C=O$); Yield= 67%; MP= 59-60°C.

4'-allyl-2'-methoxyphenyl-3-bromobenzoate (13): Chemical Formula: $C_{17}H_{15}BrO_3$; MS m/z : 346.02; NMR Data 1H NMR (400MHz): δ (ppm) 8.33 (1H, C_6H_4-Br); 8.11 (1H, C_6H_4-Br); 7.71 (1H, C_6H_4-Br); 7.34 (1H, C_6H_4-Br); 7.05 (1H, C_6H_3); 6.80 (2H, C_6H_3); 5.95 (1H, $CH_2=CH_2-CH_2$); 5.11 (2H, $CH_2=CH_2-CH_2$); 3.77 (3H, OCH_3); 3.38 (2H, $CH_2=CH_2-CH_2$), ^{13}C NMR (100MHz): 40.1 ($CH_2-CH_2-C_6H_3$); 55.9 ($O-CH_3$); 113.2 ($Cm-C_6H_3-O$); 116.1 ($CH_2=CH_2-CH_2$); 120.8 ($Cm-C_6H_3-O$); 122.6 ($Br-Cm-C_6H_4$); 122.5 ($Co-C_6H_3-O$); 128.7 ($Co-C_6H_4(3-Br)C=O$); 130.0 ($Cm-C_6H_4(3-Br)C=O$); 131.6 ($Ci-C_6H_4(3-Br)C=O$); 133.1 ($Cp-C_6H_3-O$); 136.2 ($Ci-C_6H_3-O$); 137.0 ($CH_2=CH_2-CH_2$); 138.2 ($Cp-C_6H_4(3-Br)-C=O$); 139.2 ($Co-C_6H_4-C(Br)$); 151.2 ($OCH_3-Co-C_6H_3-O$); 163.4 ($C=O$); Yield= 90%; MP= 54-56°C.

4'-allyl-2'-methoxyphenyl-4-methoxybenzoate (14): Chemical Formula: $C_{18}H_{18}O_4$; MS m/z : 298.12; NMR Data 1H NMR (400MHz): δ (ppm) 8.10 (2H, $C_6H_4-OCH_3$); 7.28 (2H, $C_6H_4-OCH_3$); 7.05 (1H, C_6H_3); 6.80 (2H, C_6H_3); 5.98 (1H, $CH_2=CH_2-CH_2$); 5.12 (2H, $CH_2=CH_2-CH_2$); 3.78 (3H, OCH_3); 3.38 (2H, $CH_2=CH_2-CH_2$), 2.42 (3H, OCH_3); ^{13}C NMR (100MHz): 21.8 ($CH_2-CH_2-C_6H_3$); 40.3 ($C_6H_3-O-CH_3$); 56.1 ($C_6H_4-O-CH_3$); 113.4 ($Cm-C_6H_3-O$); 116.1 ($CH_2=CH_2-CH_2$); 121.0 ($Co-C_6H_3-O$); 123.0 ($Cm-C_6H_3-O$); 127.1 ($Ci-C_6H_4(4OCH_3)-C=O$); 129.1 ($Cm-C_6H_4(4OCH_3)-C=O$); 130.3

(Co-C₆H₄-(4OCH₃)-C=O); 137.1 (Cp C₆H₃-O); 138.6 (Ci-C₆H₃-O); 139.0 (CH₂=CH₂-CH₂); 144.3 (OCH₃-Co-C₆H₃-O); 151.5 (Cp-C₆H₄ (4OCH₃)-C=O); 165.1 (C=O); Yield= 43% ; MP= 170-171°C.

4'-allyl-2'-methoxyphenyl-3-chlorobenzoate (15): Chemical Formula: C₁₇H₁₅ClO₃; MS *m/z*: 302.07; NMR Data ¹H NMR (400MHz): δ (ppm) 8.18 (1H, C₆H₄-Cl); 8.17 (1H, C₆H₄-Cl); 7.56 (1H, C₆H₄-Cl); 7.05 (1H, C₆H₃); 6.0(2H, C₆H₃); 5.97 (1H, CH₂=CH₂-CH₂); 5.12 (2H, CH₂=CH₂-CH₂); 3.78 (3H, OCH₃); 3.37 (2H, CH₂=CH₂-CH₂), ¹³C NMR (100MHz): 40.1 (CH₂-CH₂-C₆H₃); 56.0 (C₆H₃-O-CH₃); 113.2 (Cm-C₆H₃-O); 116.1 (CH₂=CH₂-CH₂); 120.8 (Cm-C₆H₃-O); 122.6 (Co-C₆H₃-O); 128.3 (Ci-C₆H₄(3Cl)-C=O); 129.7 (Co-C₆H₄(3Cl)-C=O); 130.2 (Cm-C₆H₄-(3Cl)-C=O); 131.5 (Co-C₆H₄ (3Cl)-C=O); 133.3 (Cp- C₆H₄(3Cl)-C=O); 134.7 (Cm-C₆H₄-Cl-(C=O)); 137.0 (Cp-C₆H₃-O); 128.2 (Ci-C₆H₃-O); 139.2 (CH₂=CH₂-CH₂); 151.2 (OCH₃-Co-C₆H₃-O); 163.6 (C=O); Yield= 31%; MP= 48-50°C.

4'-allyl-2'-methoxyphenyl-4-fluorobenzoate (16): Chemical Formula: C₁₇H₁₅FO₃; MS *m/z*: 286.10; NMR Data ¹H NMR (400MHz): δ (ppm) 8.21 (2H, C₆H₄-F); 7.12 (2H, C₆H₄-F); 7.05 (1H, C₆H₃); 6.8 (2H, C₆H₃); 5.98 (1H, CH₂=CH₂-CH₂); 5.11 (2H, CH₂=CH₂-CH₂); 3.78 (3H, OCH₃); 3.49 (2H, CH₂=CH₂-CH₂), ¹³C NMR (100MHz): 40.1 (CH₂-CH₂-C₆H₃); 56.0 (C₆H₃-O-CH₃); 113.2 (Cm-C₆H₃-O); 115.7 (Cm-C₆H₄-(4F)-C=O); 120.7 (CH₂=CH₂-CH₂); 122.6 (Co-C₆H₃-O); 125.9 (Cm-C₆H₃-O); 132.8 (Co-C₆H₄(4F)-C=O); 137.0 (Ci-C₆H₄(4F)-C=O); 138.3 (Cp-C₆H₃-O); 139.1 (Ci-C₆H₃-O); 151.2 (CH₂=CH₂-CH₂); 163.7 (OCH₃-Co-C₆H₃-O); 164.7 (C=O); 167.3 (Cp-C₆H₄(4F)-C=O); Yield= 64%; MP= 59-60°C.

4'-allyl-2'-methoxyphenyl-4-methylbenzoate (17): Chemical Formula: C₁₈H₁₈O₃; MS *m/z*: 282.13; NMR Data ¹H NMR (400MHz): δ (ppm) 8.07 (2H, C₆H₄-CH₃); 7.20 (2H, C₆H₄-CH₃); 7.03 (1H, C₆H₃); 6.77 (2H, C₆H₃); 5.92 (1H, CH₂=CH₂-CH₂); 5.06 (2H, CH₂=CH₂-CH₂); 3.76 (3H, OCH₃); 3.37 (2H, CH₂=CH₂-CH₂), 2.4 (3H, CH₃); ¹³C NMR (100MHz): 21.6 (CH₃); 40.1 (CH₂-CH₂-C₆H₃); 55.9 (C₆H₃-O-CH₃); 113.2 (Cm-C₆H₃-O); 115.9 (CH₂=CH₂-CH₂); 120.8 (Co-C₆H₃-O); 122.8 (Cm-C₆H₃-O); 126.7 (Ci-C₆H₄(4CH₃)-C=O); 129.2 (Cm-C₆H₄(4CH₃)-C=O); 130.3 (Co-C₆H₄-(4CH₃)-C=O); 137.1 (Cp-C₆H₃-O); 138.5 (Ci-C₆H₃-O); 144.4 (CH₂=CH₂-CH₂); 151.3 (Cp-C₆H₄-(4CH₃)-C=O); 164.8 (OCH₃-Co-C₆H₃-O); 171.5 (C=O); Yield= 64%; MP= 93-95°C.

4'-allyl-2'-methoxyphenyl-4-nitrobenzoate (18): Chemical Formula: C₁₇H₁₅NO₅; MS *m/z*: 313.10; NMR Data ¹H NMR (400MHz): δ (ppm) 8.11 (2H, C₆H₄-

CH₃); 7.26 (2H, C₆H₄-CH₃); 7.00 (1H, C₆H₃); 6.82 (2H, C₆H₃); 5.97 (1H, CH₂=CH₂-CH₂); 5.14 (2H, CH₂=CH₂-CH₂); 3.78 (3H, OCH₃); 3.39 (2H, CH₂=CH₂-CH₂), 2.40 (3H, CH₃); ¹³C NMR (100MHz): 21.6 (CH₃); 40.2 (CH₂-CH₂-C₆H₃); 55.9 (C₆H₃-O-CH₃); 113.1 (Cm-C₆H₃-O); 115.9 (CH₂=CH₂-CH₂); 120.8 (Co-C₆H₃-O); 122.8 (Cm-C₆H₃-O); 124.3 (Ci-C₆H₄(4NO₂)-C=O); 126.1 (Cm-C₆H₄(4NO₂)-C=O); 133.2 (Co-C₆H₄(4NO₂)-C=O); 137.1 (Cp-C₆H₃-O); 138.5 (Ci-C₆H₃-O); 144.2 (CH₂=CH₂-CH₂); 151.3 (Cp-C₆H₄(4CH₃)-C=O); 164.8 (OCH₃-Co-C₆H₃-O); 171.5 (C=O); Yield= 77%; MP=75-77°C .

4'-allyl-2'-methoxyphenyl-2-nitrobenzoate (19): Chemical Formula: C₁₇H₁₅NO₅; MS *m/z*: 313.10; NMR Data ¹H NMR (400MHz): δ (ppm) 8.10 (2H, C₆H₄-CH₃); 7.26 (2H, C₆H₄-CH₃); 7.02 (1H, C₆H₃); 6.82 (2H, C₆H₃); 5.97 (1H, CH₂=CH₂-CH₂); 5.11 (2H, CH₂=CH₂-CH₂); 3.78 (3H, OCH₃); 3.39 (2H, CH₂=CH₂-CH₂), 2.41 (3H, CH₃); ¹³C NMR (100MHz): 21.6 (CH₃); 40.1 (CH₂-CH₂-C₆H₃); 55.9 (C₆H₃-O-CH₃); 113.2 (Cm-C₆H₃-O); 115.9 (CH₂=CH₂-CH₂); 120.8 (Co-C₆H₃-O); 122.8 (Cm-C₆H₃-O); 126.9 (Ci-C₆H₄(4NO₂)-C=O); 129.2 (Cm-C₆H₄(4 NO₂)-C=O); 130.2 (Co-C₆H₄(4 NO₂)-C=O); 137.1 (Cp-C₆H₃-O); 138.5 (Ci-C₆H₃-O); 144.2 (CH₂=CH₂-CH₂); 151.3 (Cp-C₆H₄(4CH₃)-C=O); 164.8 (OCH₃-Co-C₆H₃-O); 171.5 (C=O); Yield= 81%; MP=57-58°C

1-(4'-allyl-2'-methoxyphenyl)-3-methylbutanoate (27): Chemical Formula: C₁₅H₂₀O₃; MS *m/z*: 248.14; NMR Data ¹H NMR (400MHz): δ (ppm) 6.89 (3H, C₆H₃); 5.9 (1H, CH₂=CH₂-CH₂); 5.10(2H, CH₂=CH₂-CH₂); 3.8(3H, OCH₃); 3.4 (2H, CH₂=CH₂-CH₂); 2.4 (2H, C-CH₂-CH); 2.3 (1H, CH₃-CH-CH₃); 1.10 (3H, CH₃-CH-CH₃); ¹³C NMR (100MHz): 22.4 (CH₃-CH-CH₃); 25.9 (CH₃-CH-CH₃); 40.1 (CH₃-CH-CH₃); 43.1 (CH₂-CH₂-C₆H₅); 55.7 (O-CH₃); 112.7 (Cm-C₆H₃); 116.1 (CH₂=CH-CH₂); 120.7 (Cm-C₆H₃-O); 122.5 (Co- C₆H₃); 137.1 (CH₂=CH-CH₂); 138.8 (CH₂-Cp-C₆H₅); 150.9 (O-Ci-C₆H₅); 171.2 (Co - C₆H₃-OCH₃); 191.74 (C=O); Yield= 61%; Oil.

1-(4'-allyl-2'-methoxyphenyl)-pentanoate (28): Chemical Formula: C₁₅H₂₀O₃; MS *m/z*: 248.14; NMR Data ¹H NMR (400MHz): δ (ppm) 6.89 (3H, C₆H₃); 5.9 (1H, CH₂=CH₂-CH₂); 5.10(2H, CH₂=CH₂-CH₂); 3.8(3H, OCH₃); 3.3(2H, CH₂=CH₂-CH₂); 2.6(2H, O-CH₂-CH₂); 1.8 (2H, O-CH₂-CH₂); 1.5 (2H, CH₂-CH₂-CH₃); 1.0 (3H, CH₂-CH₂-CH₃); ¹³C NMR (100MHz): 13.7 (CH₂-CH₃); 22.2 (CH₂-CH₃); 27.1 (CH₂-CH₂-CH₃); 33.8 (O-CH₂); 40.1 (CH₂-CH₂-C₆H₅); 55.8 (O-CH₃); 112.8 (CH₂=CH-CH₂); 116.1 (Cm-C₆H₃); 120.7 (Co- C₆H₃); 122.5 (Cm-C₆H₃-O); 137.1 (CH₂=CH-CH₂);

138.8 (CH₂-Cp-C₆H₅); 146.5 (O-Ci-C₆H₅); 150.9 (Co - C₆H₃-OCH₃); 172.0 (C=O); Yield= 43%; Oil .

4'-allyl-2'-methoxyphenyl-2-phenylacetate (29): Chemical Formula: C₁₇H₁₆O₃; MS *m/z*: 268.11; NMR Data ¹H NMR (400MHz): δ (ppm) 8.2- 7.5 (5H, C₆H₅); 7.10 (3H, C₆H₃); 5.9 (1H, CH₂=CH₂-CH₂); 5.10 (2H, CH₂=CH₂-CH₂); 3.8 (3H, OCH₃); 3.4(2H, CH₂=CH₂-CH₂); ¹³C NMR (100MHz): 40.1 (CH₂-CH₂-C₆H₅); 55.9 (O-CH₃); 112.9 (Cm-C₆H₃); 116.1 (CH₂=CH₂-CH₂); 120.8 (Cm-C₆H₃-O); 122.7 (Co-C₆H₃); 128.5-133.4 (C₆H₅); 137.1 (CH₂-Cp-C₆H₅); 138.3 (O-Ci-C₆H₅); 139.1 (CH₂=CH₂-CH₂); 151.2 (Co - C₆H₃-OCH₃); 164.9 (O=C-C₆H₅); Yield= 98%; Oil.

4-allyl-2-methoxy-1-phenethoxybenzene (30): Chemical Formula: C₁₆H₂₀O₂; MS *m/z*: 268.15; NMR Data ¹H NMR (400MHz): δ (ppm) 7.3 (5H, C₆H₅); 6.89 (3H, C₆H₃); 5.9 (1H, CH₂=CH₂-CH₂); 5.10 (2H, CH₂=CH₂-CH₂); 3.89 (3H, OCH₃); 3.7(2H, O-CH₂-CH₂); 3.3(2H, CH₂=CH₂-CH₂); 3.10 (2H, O-CH₂-CH₂); ¹³C NMR (100MHz): 38.2 (CH₂-CH₂-C₆H₅); 39.9 (CH₂-CH₂-C₆H₅); 46.0 (CH₂-CH₂-C₆H₅); 55.9 (O-CH₃); 111.2 (Cm-C₆H₃); 114.3 (Co- C₆H₃); 115.5 (Cm-C₆H₃-O); 121.2 (CH₂=CH₂-CH₂); 126.9 (CH₂-Cp-C₆H₅); 128.6- 137.9 (C₆H₅); 131.9 (CH₂=CH₂-CH₂); 138.1 (CH₂=CH₂-CH₂); 143.9 (O-Ci-C₆H₅); 146.5 (Co - C₆H₃-OCH₃); Yield= 70%; Oil.

4-allyl-2-methoxy-1-phenpropoxybenzene (31): Chemical Formula: C₁₉H₂₂O₂; MS *m/z*: 282.16; NMR Data ¹H NMR (400MHz): δ (ppm) 7.3 (5H, C₆H₅); 6.89 (3H, C₆H₃); 5.9 (1H, CH₂=CH₂-CH₂); 5.10 (2H, CH₂=CH₂-CH₂); 3.89 (3H, OCH₃); 3.5(2H, O-CH₂-CH₂); 3.3(2H, CH₂=CH₂-CH₂); 2.8(2H, CH₂-CH₂-CH₂); 2.1(2H, CH₂-CH₂-C₆H₅); ¹³C NMR (100MHz): 32.8 (CH₂-CH₂-CH₂); 34.0 (CH₂-CH₂-C₆H₅); 39.9 (CH₂-CH₂-C₆H₅); 44.2 (CH₂-CH₂-C₆H₅); 55.9 (O-CH₃); 111.1 (Cm-C₆H₃); 114.3 (Co-C₆H₃); 115.5 (Cm-C₆H₃-O); 121.2 (CH₂=CH₂-CH₂); 126.1- 126.5 (C₆H₅); 131.9 (CH₂-Cp-C₆H₅); 137.8 (CH₂=CH₂-CH₂); 143.9 (O-Ci-C₆H₅); 146.5 (Co - C₆H₃-OCH₃); Yield= 66%; Oil.

4-allyl-2-methoxy-1-propoxybenzene (32): Chemical Formula: C₁₃H₁₈O₂; MS *m/z*: 206.13; NMR Data ¹H NMR (400MHz): δ (ppm) 6.8 (3H, C₆H₃); 5.9 (1H, CH₂=CH₂-CH₂); 5.10 (2H, CH₂=CH₂-CH₂); 3.88 (2H, O-CH₂-CH₂); 3.82 (3H, OCH₃); 3.4 (2H, CH₂=CH₂-CH₂); 2.6 (2H, CH₂-CH₂-CH₃); 1.3(3H, CH₂-CH₂-CH₃); ¹³C NMR (100MHz): 9.2 (CH₂-CH₃); 27.4 (CH₂-CH₃); 40.1 (CH₂-CH₂-C₆H₅); 55.8 (O-CH₃); 112.8 (Cm-C₆H₃); 116.1 (Co- C₆H₃); 120.7 (CH₂=CH₂-CH₂); 122.5 (Cm-C₆H₃-O); 137.1 (CH₂-Cp-C₆H₅); 138.8 (CH₂=CH₂-CH₂); 150.9 (O-Ci-C₆H₅); 172.7 (Co - C₆H₃-OCH₃); Yield=54 %; Oil.

4-allyl-2-methoxy-1-butoxybenzene (33): Chemical Formula: $C_{14}H_{20}O_2$; MS m/z : 220.15; NMR Data 1H NMR (400MHz): δ (ppm) 7.27 (2H, Ar-O-CH₂); 6.8 (3H, C₆H₃); 5.9 (1H, CH₂=CH₂-CH₂); 5.10 (2H, CH₂=CH₂-CH₂); 3.86 (2H, O-CH₂-CH₂); 3.82 (3H, OCH₃); 3.4 (2H, CH₂=CH₂-CH₂); 2.55(2H, CH₂-CH₂-CH₃); 1.8 (2H, CH₂-CH₂-CH₃); 1.1(3H, CH₂-CH₂-CH₃); ^{13}C NMR (100MHz): 13.6 (CH₂-CH₃); 18.6 (CH₂-CH₃); 35.9 (O-CH₂-CH₂); 40.1 (CH₂-CH₂-C₆H₅); 55.8 (O-CH₃); 112.8 (O-CH₂-CH₂); 116.1 (Cm-C₆H₃); 120.7 (Co-C₆H₃); 122.5 (Cm-C₆H₃-O); 137.1 (CH₂-Cp-C₆H₅); 138.1 (CH₂=CH₂-CH₂); 138.8 (CH₂=CH₂-CH₂); 150.9 (O-Ci-C₆H₅); 171.9 (Co - C₆H₃-OCH₃; Yield= 93%; Oil.

Antioxidant Activity

DPPH and ABTS radical scavenging activity

The 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH) free radical-scavenging assay was performed in accordance with the procedure reported by Brand-Williams et al. (1995)²⁰ with some modifications. The antiradical activity was defined as the amount of antioxidant necessary to decrease the initial DPPH concentration by 50% (EC₅₀).

The 2,2-azinobis-3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) radical-scavenging activity was evaluated as described by Re et al. (1999)²¹ with some modifications. The percentage of radical scavenging was calculated as TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity).

Subjects and reagents

Male Wistar rats were obtained from the Central Animal House of Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS. The animals were maintained on a 12/12h light/dark cycle in an air-conditioned constant temperature (22 ± 1°C) colony room. Rats had free access to a 20% (w/w) protein commercial chow and water. The Guide for the Care and Use of Laboratory Animals²² was followed in all experiments. The study was approved by the Ethics Committee of Universidade Federal de Pelotas, Brazil (CEEA 10263). All chemicals were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA).

Tissue and homogenate preparation

Thirty-day-old Wistar rats were sacrificed by decapitation without anesthesia. The cerebral cortex and liver were immediately dissected out and homogenized in 10

volumes (1:10, w/v) of 20 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4 containing 140 mM KCl. Homogenates were centrifuged at $750 \times g$ for 10 min at 4°C, the pellet was discarded and the supernatant was immediately separated and used for the biochemical measurements.

Hydrogen peroxide (5 mM) and ferrous sulphate (20 μ M), which are responsible for inducing oxidative damage, were added to cerebral cortex and liver homogenates. Different concentrations of eugenol derivatives (final concentrations range from 50 to 200 μ M dissolved in distilled water) were added to the mixture and incubated for 1 h at 37°C with inducing damage.

Butylated hydroxytoluene (BHT) 25 μ M was used as standard antioxidant.

TBARS assay

Thiobarbituric acid-reactive species (TBARS), an index of lipid peroxidation, were determined according to the method described by Buege and Aust (1978)²³ with some modifications. Trichloroacetic acid and thiobarbituric acid were added to samples and incubated for 25 min at 100°C. A calibration curve was performed using 1,1,3,3-tetramethoxypropane following the same treatment as that of the samples. The absorbance was read at 535 nm, the results were reported as nmol TBARS/ mg protein.

Total Sulphydryl Content

Total thiol content was determined using the DTNB (5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid) method, as described by Aksenov and Markesbery (2001)²⁴ with some modifications. The amount of TNB formed was determined at 412 nm. The results were reported as nmol of TNB/ mg protein.

Carbonyl assay

Oxidatively modified proteins present an enhancement of carbonyl content (Stadtman and Levine, 2003)²⁵. In this study, protein carbonyl was assayed by the method of Reznick and Packer (1994)²⁶, which is based on the reaction of protein carbonyls with dinitrophenylhydrazine forming dinitrophenylhydrazone, a yellow compound, measured spectrophotometrically at 370 nm. Results were reported as nmol carbonyl/mg protein.

Protein determination

Protein was determined by the Lowry method (1951)²⁷ using bovine serum albumin as standard.

Statistical analysis

Data were expressed as mean $\pm$ standard deviation. The comparisons of means were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Duncan test when the F value was significant. A value of $P < 0.05$ was considered to be significant. Analyses were performed using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS).

Results

Good yields of the products were obtained after short reaction times using simple synthetic routes. At first, the antioxidant activity of sixteen eugenol derivatives was evaluated by DPPH and ABTS assay. The eugenol derivatives **28**, **30**, **31**, **32** showed an efficient concentration to decrease DPPH radical with values of EC_{50} of, 60 μ M, 43 μ M, 19 μ M and 59 μ M, respectively. Regarding the ABTS radical test, only compounds **28**, **30** and **31** showed a TEAC higher than 0.50 mM (Table 1).

These four compounds, **28**, **30**, **31** and **32**, were tested on lipid peroxidation in the brain and liver of rats. As shown in Figure 1, these eugenol derivatives were effective in protecting against lipid peroxidation induced by hydrogen peroxide and ferrous sulphate in cerebral cortex homogenate. All compounds reduce TBARS levels at concentrations from 50 to 200 μ M **28** [$F(5,26) = 103.39$; $P < 0.01$]; **30** [$F(5,30) = 89.99$; $P < 0.01$]; **31** [$F(5,46) = 168.54$; $P < 0.01$] and **32** [$F(5,44) = 37.87$; $P < 0.01$] compared to induced control. In liver (Table 2), **31** [$F(5,30) = 18.10$; $P < 0.001$] and **32** [$F(5,28) = 12.44$; $P < 0.001$] reduce lipid peroxidation at concentrations from 50 to 200 μ M, while **28** reduced TBARS at 100 μ M and 200 μ M [$F(5,30) = 20.64$; $P < 0.001$], compared to induced control.

We tested the effect of eugenol derivatives on total thiol content in the cerebral cortex and liver of rats. Figure 2 shows that the compounds **30** and **32** significantly modify sulfhydryl levels in the cerebral cortex of rats. Compound **30** [$F(5,27) = 9.86$; $P < 0.01$] increased at concentrations from 50 to 200 μ M while **32**

[F(5,26) = 10.80; P<0.01] increased thiol content at concentrations of 100 and 200 μ M, compared to induced control. In the liver of rats, tested compounds did not modify the total thiol content compared to induced control (Table 2).

We also evaluated the effect of eugenol derivatives on protein oxidative damage by carbonyl formation. The compounds reduced carbonyl content at concentrations from 50 to 200 μ M compared to induced control (Figure 3) **28** [F(5,34) = 7.15; P<0.01]; **30** [F(5,19) = 5.98; P<0.01] and **31** [F(5,33) = 4.96; P<0.01]. However, compound **32** reduced carbonyl content only at 200 μ M [F(5,30) = 7.54; P<0.01]. In liver (Table 2), compound **32** [F(5,23) = 10.37; P<0.001] significantly reduced carbonyl formation at concentrations from 50 to 200 μ M, compared to induced control.

Antioxidant and radical scavenging activities of the compounds were compared with BHT (standard antioxidant) as positive control.

Discussion

The main structural characteristic responsible for the antioxidant activity of phenolic derivatives, such as eugenol, is the presence of hydroxyl which can donate hydrogen atoms, interrupting chain propagation of the oxidative process^{4,7,28}. Thus, these compounds play an important role donating hydrogen atoms, suppressing ROS formation, acting as metal chelants (which catalyze the Fenton reaction), or also as enzyme inhibitors/ activators^{1,29,30}.

In this study we synthesized eugenol derivatives, attempting to find compounds with antioxidant action. Some of these compounds have already been tested for other activities such as 15-lipoxygenase inhibitors and herbicidal agents^{31,32}. Sixteen compounds were synthesized with different modifications in the hydroxyl group at 1-position of eugenol. The synthesis was divided into two blocks. These conferred different physical-chemical characteristics on the lateral chain of the compounds obtained.

There are important alterations in position 1 of the eugenol. Differences in size and in the nature of the carbon chain (aliphatic or aromatic) cause stereo-electronic variations that help identify characteristics needed to increment the activities of these molecules. It is known that the pharmacological activities of eugenol are related to its chemical and structural characteristics, since different substitutions of the ring can influence the biological activity². As to antioxidant

activity, eugenol has the property of neutralizing the alkyl radicals, peroxy and superoxide, due to the difference in the reduction potential between the radical and the phenol³³. Insaturations are very valuable for the eugenol activity toward free radicals.

There are studies proving that the phenolic compounds are more potent antioxidants than vitamins E, C and carotenoids. For a compound to be classified as an antioxidant, several methods have been used to evaluate the antioxidant activity *in vitro*³⁴.

The antioxidant capacity of the different eugenol derivatives was screened based on the capture of radical DPPH and of radical ABTS. The latter methods are widely used because they are simple, quick, sensitive methodologies³⁵.

Four compounds of the sixteen eugenol derivatives tested presented $EC_{50} < 100 \mu\text{M}$. Derivatives **28**, **30**, **31** and **32** were promising, since they presented a smaller EC_{50} than eugenol, and with an EC_{50} lower than standard antioxidants such as BHT ($EC_{50} = 60.25 \mu\text{M}$).

The DPPH test is an indirect method to determine antioxidant activity. This method is based on the measure of the reducing ability of antioxidants when dealing with the DPPH radical, usually expressed as EC_{50} . The lower the EC_{50} the greater the radical scavenging efficiency. One of the limitations of this methodology is that there is no DPPH and similar compounds in biological systems³⁶. Further, many antioxidant molecules that are capable of reacting with the peroxy radical could react slowly, or even be inert in the DPPH test^{33,34}. In order to complete the screening of the antioxidant activity, the TEAC was determined. This method is based on the compound capacity to neutralize the ABTS radical^{21,37}. In this test, **28**, **30**, **31**, presented $TEAC > 0.50$, but only **31** presented TEAC higher than eugenol.

Lipid peroxidation and protein oxidation are two important indicators of oxidative damage of macromolecules induced by ROS³⁸. Hence, the compounds that presented activity in the screening tests (**28**, **30**, **31**, **32**) were evaluated for their antioxidant capacity on TBARS and carbonyl and total thiol content in rat brain and liver. The eugenol derivatives obtained presented significant results in the TBARS test, proving similar to eugenol at the different concentrations tested (50 to 200 μM) in cerebral cortex of 30-day old rats, reducing the damaged provoked by the reactive species. In a study by Nam and Kim (2013)³⁹, eugenol also had an inhibitory effect on lipid peroxidation, and this was observed above 25 μM . On the other hand, the

concentration of 100 μ M inhibited 70% of the lipid peroxidation compared to the control group. But in the liver of these same animals, only a few compounds presented significant results in lipoperoxidation.

These results are due to the fact that the brain is a lipid rich organ with a low level of antioxidant defenses. Moreover, it has auto-oxidable neurotransmitters, a polyunsaturated fatty acid rich neuronal membrane, and a high level of iron⁴⁰. On the other hand, the liver resists damage caused by free radicals, since, besides having high antioxidant levels, it adapts easily to metabolic changes⁴¹.

The sulfhydryl content is inversely correlated with the oxidative damage to the proteins. Therefore, the reduction of protein thiol groups seen in the *in vitro* experiment supplies evidence of reduction of oxidative damage to the proteins. Thiol groups (SH) are recognized as being essential antioxidants that have the role of protecting the cellular and extracellular functions against oxidative stress. The mammal cells from different tissues, including the brain, have a system that regulates the redox state of thiol protecting the proteins from excessive oxidation⁴².

The carbonyl content is the main marker of oxidative damage to proteins⁴³. The carbonyls can present higher levels due to protein glycation by sugars, the linkage of aldehydes to proteins, or also due to direct oxidation of the lateral chains of amino acids caused by free radicals^{24,44}. The great majority of compounds tested, reduced, in the cerebral cortex, the carbonyl content at the concentrations tested, but in the liver only two compounds had satisfactory results.

Finally, sixteen compounds were synthesized based on structural modifications in the eugenol. Among these, compounds **28**, **30**, **31** and **32** presented radical scavenging activity in the DPPH and ABTS assets. These compounds also showed antioxidant activity, reducing the lipid peroxidation and protein oxidation in biological systems. The derivatives that presented promising activities have alkyl or aryl groups substituting the hydroxyl group of eugenol. They vary mainly the size of this lateral chain. Alkyl and linear characteristics appear to favor the activity. These results, even preliminary, show the possibility of the existence of other antioxidant mechanisms, besides the one that has been well demonstrated involving phenolic hydroxyl. The latter, widely cited as responsible for the antioxidant activity of eugenol, is replaced in the derivatives that presented more marked antioxidant activity than the afore mentioned compound, both in *in vitro* and *ex vivo*. Our results show signs that the presence of phenolic hydroxyl in position 1 of the eugenol is not essential for

antioxidant activity. This creates a possibility for the occurrence of mechanisms different from those that go through the donation of a proton or metal chelation.

Acknowledgements

This work was supported in part by grants from “Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul” (FAPERGS), “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior” (CAPES) and “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico” (CNPq), Brazil. The authors also thank Hedy Hoffmann for the corrections of the English version.

References

1. Gülçin I. Antioxidant Activity of Eugenol: A Structure–Activity Relationship Study. *J Med Food* 2011; 14(9): 975-985.
2. Ito M et al. Antioxidant action of eugenol compounds: role of metal ion in the inhibition of lipid peroxidation. *Food Chem Toxicol* 2005; 43: 461-466.
3. Escobar RG. Eugenol: [Propriedades farmacológicas y toxicológicas, Ventajas y desventajas de su uso.] *Rev Cubana Estomatol* 2002; 39(2): 139-156 [in Spanish].
4. Nagababu E et al. Assessment of antioxidant activities of eugenol by in vitro and in vivo methods. *Methods Mol Biol* 2010; 610:165-180.
5. Tangerino LMB. Estudo das propriedades antimicrobianas de copolímeros derivados do eugenol. Universidade Federal de Itajubá, 2006 (dissertation).
6. Prakash P, Gupta N. Therapeutic uses of *ocimum sanctum* linn (tulsi) with a note on eugenol and its pharmacological actions: a short review. *Indian J Physiol Pharmacol* 2005; 49 (2): 125-131.
7. Moreira AVB, Mancini-Filho J. [Influence of spices phenolic compounds on lipoperoxidation and lipid profile of rats tissues.] *Rev Nutr* 2004; 17(4): 411-424 [in Portuguese].
8. Sadeghian H et al. Design and synthesis of eugenol derivatives, as potent 15-lipoxygenase inhibitors. *Bioorg Med Chem* 2008; 16: 890-901.
9. Baskaran Y et al. Investigation of antioxidant, anti-inflammatory and DNA-protective properties of eugenol in thioacetamide-induced liver injury in rats. *Toxicology* 2010; 268: 204-212.

10. Rojo L et al. Eugenol functionalized poly(acrylic acid) derivatives in the formation of glass-ionomer cements. *Dental materials* 2008; 24: 1709-1716.
11. Carrasco HA et al. Eugenol and its Synthetic Analogues Inhibit Cell Growth of Human Cancer Cells (Part I). *J Braz Chem Soc* 2008; 19(3): 543-548.
12. Awasthi P et al. Eugenol Derivatives as Future Potential Drugs. *Journal of Pharmacy Research* 2008; 1(2): 215-220.
13. Magalhaes DV. Atividade antifúngica de derivados sintéticos do eugenol e timol frente a cepas de *Candida spp.* e *Microsporum canis*. Universidade Estadual do Ceará, 2009 (dissertation).
14. Hidalgo ME et al. Antioxidant capacity of eugenol derivatives. *Quim Nova* 2009; 32(6): 1467-1470.
15. Amber K et al. Induction of oxidative stress as a possible mechanism of the antifungal action of three phenylpropanoids. *Yeast Res* 2011; 11: 114-122.
16. Halliwell B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases. *Drug Aging* 2001; 18: 685-716.
17. Halliwell B, Gutteridge JM. *Free radicals in biology and medicine*, 4^{ed} New York: Oxford University Press, 2007.
18. Gacche R et al. Antioxidant and anti-inflammatory related activities of selected synthetic chalcones: structure-activity relationship studies using computational tools. *Chem Pharm Bull* 2008; 56: 897-901.
19. Rishton GM. Natural products as a robust source of new drugs and drug leads: past successes and presents day issues. *A J Card* 2008; 101(10A): S43-S49.
20. Brand-Williams W et al. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss Technol* 1995; 28: 25-30.
21. Re R et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Bio Med* 1999; 26: 1231-1237.
22. NIH- Guide for de care and use of laboratory animals, 8^oEdition, Washington, 1996.
23. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Meth Enzymol* 1978; 52: 302-309.
24. Aksenov MY, Markesbery WR. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes on the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 2001; 302: 141-145.

25. Stadtman ER, Levine RL. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids* 2003; 25: 207-218.
26. Reznick AZ, Packer L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Meth Enzymol* 1994; 233: 357-363.
27. Lowry OH et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
28. Findik, E et al. Isoeugenol-based novel potent antioxidants: Synthesis and reactivity. *Eur J Med Chem* 2011; 46: 4618-4624
29. Leopoldini M et al. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chem* 2011; 125: 288-306.
30. Degáspari CH, Waszczynskyj N. [Antioxidants properties of phenolic compounds.] *Visão Acadêmica – Curitiba* 2004; 5 (1): 33-40 [in Portuguese].
31. Cutler SJ et al. The synthesis and biological evaluation of eugenol derivatives as potential herbicidal agents. *Plant Growth Regulation Society of America* 2002, 29th: 93-98.
32. Sadeghian H et al. Design and synthesis of eugenol derivatives, as potent 15-lipoxygenase inhibitors. *Bioorg Med Chem* 2008; 16: 890-901.
33. Fujisawa S et al. Antioxidant and prooxidant action of eugenol-related compounds and their cytotoxicity. *Toxicology* 2002; 177: 39-54.
34. Villãno D et al. Comparison of antioxidant activity of wine phenolic compounds and metabolites in vitro. *Anal Chim Acta* 2005; 538: 391-398.
35. Huang W et al. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *J Agric Food Chem* 2005; 53: 1841-1856.
36. Gülçin I. Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Arch Toxicol* 2012; 86: 345-391.
37. Bortolomeazzi R et al. Formation of dehydrodiisoeugenol and dehydrodieugenol from the reaction of isoeugenol and eugenol with DPPH radical and their role in the radical scavenging activity. *Food Chem* 2010; 118: 256-265.
38. Nemmiche S et al. Cadmium chloride-induced oxidative stress and DNA damage in the human Jurkat T cell line is not linked to intracellular trace elements depletion. *Toxicol in Vitro* 2011; 25: 191-198.

39. Nam H, Kim M. Eugenol with antioxidant activity inhibits MMP-9 related to metastasis in human fibrosarcoma cells. *Food Chem Toxicol* 2013; 55: 106-112.
40. Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem* 2006; 97:1634-1658.
41. Genet S et al. Alterations in antioxidant enzymes and oxidative damage in experimental diabetic rat tissues: effect of vanadate and fenugreek (*Trigonella foenum graecum*). *Mol Cell Biochem* 2002; 236: 7-12.
42. Penz J et al. Effect of 3-butyl-1-phenyl-2-(phenyltelluro)oct-en-1-one on oxidative stress in cerebral cortex of rats. *Food and Chem Toxicol* 2009; 47: 745-751.
43. Levine RL. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radic Biol Med* 2002; 32: 790-796.
44. Dalle-Donne I et al. Protein Carbonylation in human diseases. *Trends Mol Med* 2003; 9:169-176.

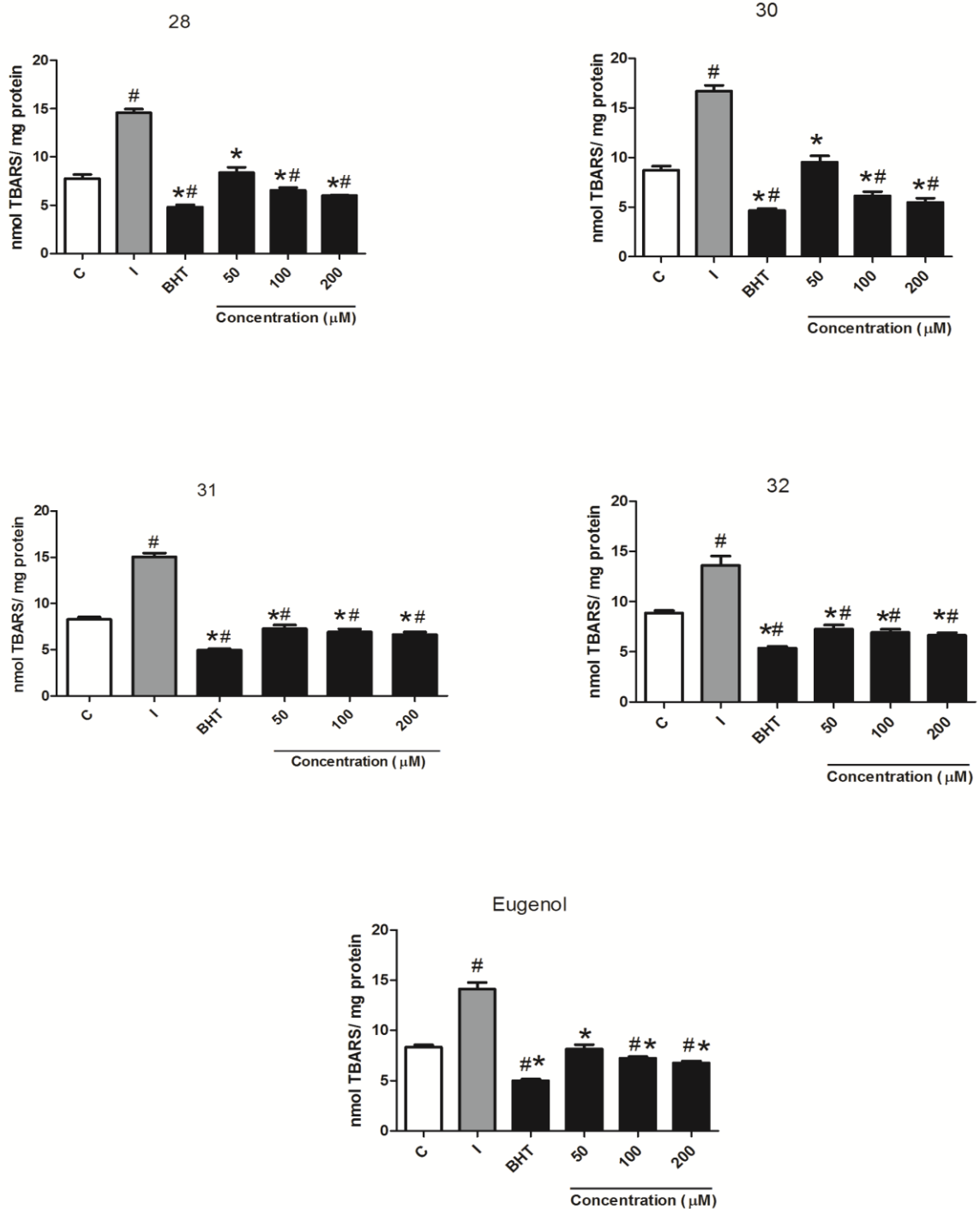


Figure 1 - Effect of eugenol derivatives on thiobarbituric acid reactive species (TBARS) in the cerebral cortex of rats. Data are expressed as mean $\pm$ S.D. (n = 6-15). The levels of TBARS were reported as nmol malonaldehyde per mg protein. #Significantly different from control (P<0.05). *Significantly different from induced control (P<0.05). Differences were determined by one-way ANOVA followed by Duncan's post hoc. C – Control; I – Induced Control; BHT – Butylated hydroxytoluene.

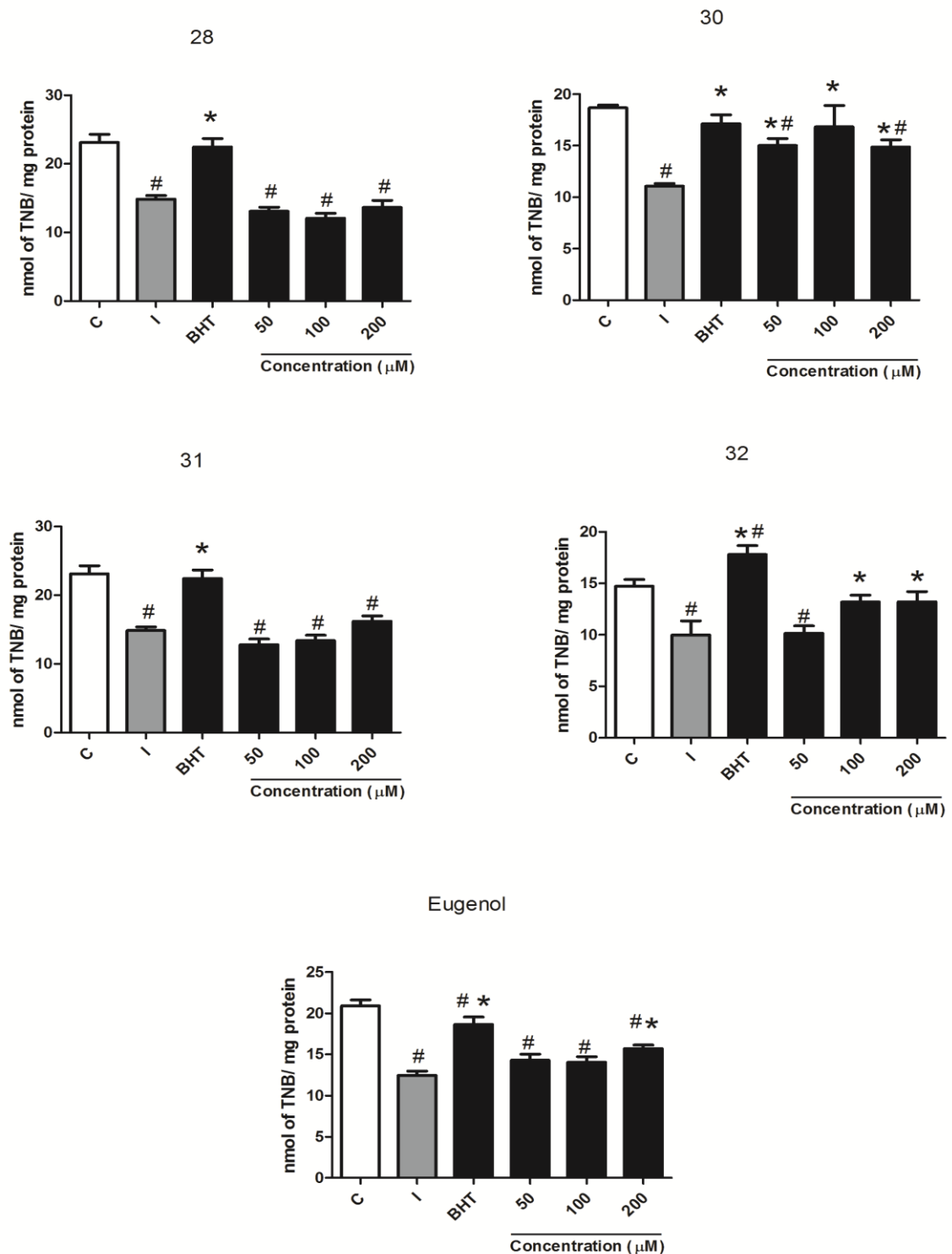


Figure 2 - Effect of eugenol derivatives on total thiol content in the cerebral cortex of rats. Data are expressed as mean $\pm$ S.D. ($n = 5-14$). The levels of thiol content were report as nmol TNB per mg protein. #Significantly different from control ($P < 0.05$). *Significantly different from induced control ($P < 0.05$). Differences were determined by one-way ANOVA followed by Duncan's post hoc. C – Control; I – Induced Control; BHT – Butylated hydroxytoluene.

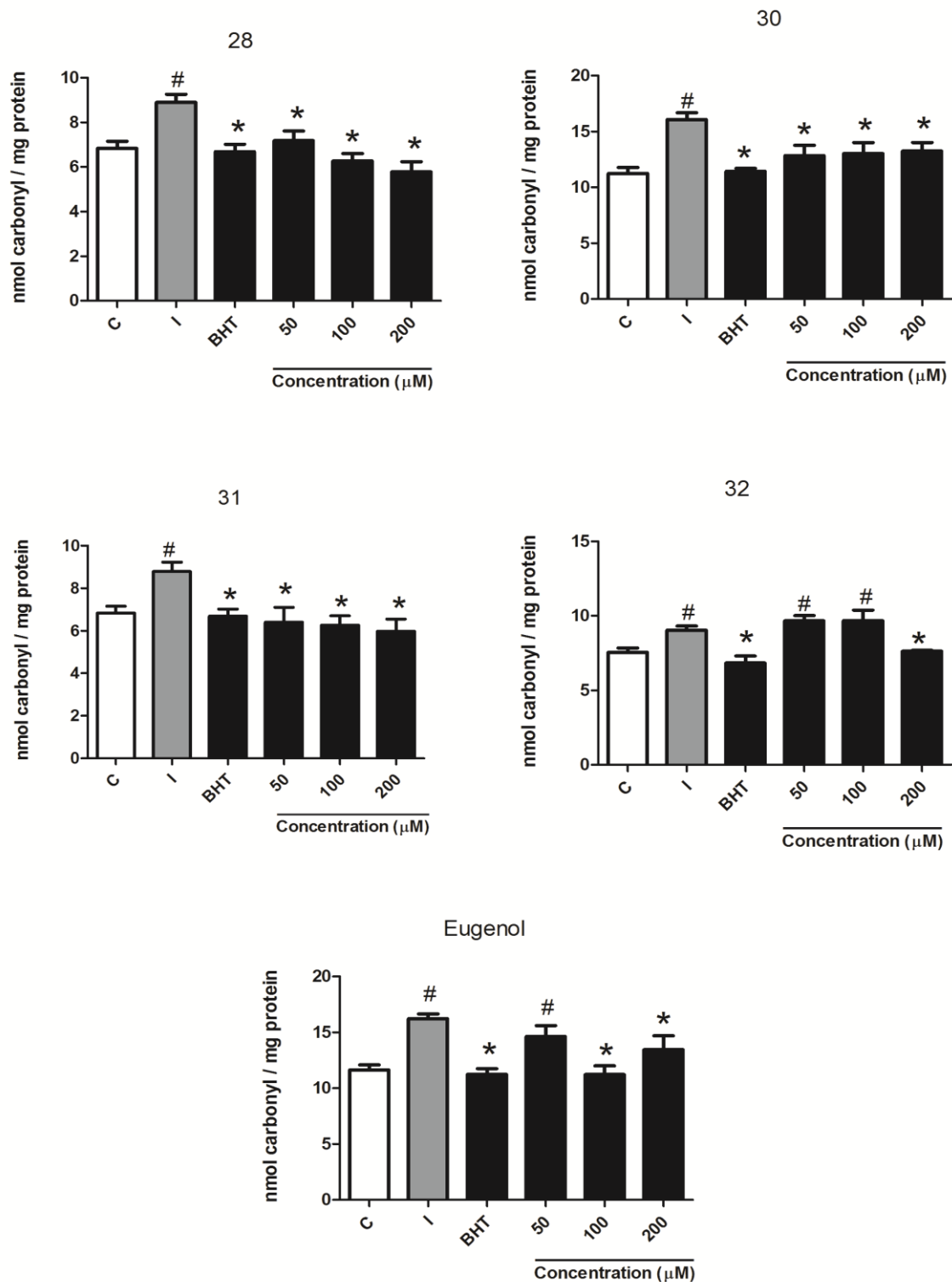
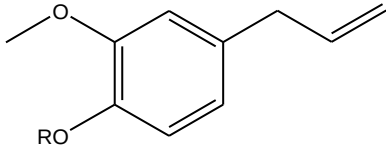
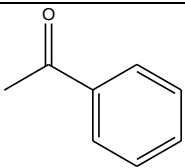
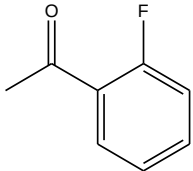
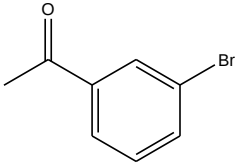
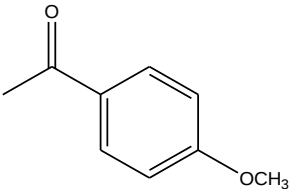
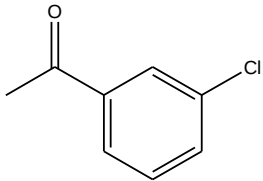
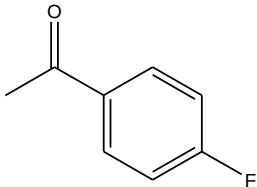
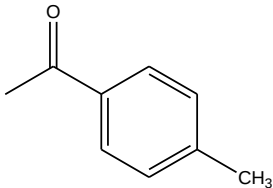


Figure 3 - Effect of eugenol derivatives on carbonyl content in the cerebral cortex of rats. Data are expressed as mean $\pm$ S.D. (n = 4-9). The levels of carbonyl content were report as nmol of carbonyl per mg protein. [#]Significantly different from control (P<0.05). ^{*}Significantly different from induced control (P<0.05). Differences were determined by one-way ANOVA followed by Duncan's post hoc. C – Control; I – Induced Control; BHT – Butylated hydroxytoluene.

Table 1 - Radical scavenging of eugenol derivatives

			
Compound	R	DPPH [•] EC ₅₀ (μM)	ABTS ^{•+} (TEAC)
Eugenol	H	72	6.8
<u>11</u>		>100	<0.50
<u>12</u>		>100	<0.50
<u>13</u>		>100	<0.50
<u>14</u>		>100	<0.50
<u>15</u>		>100	<0.50
<u>16</u>		>100	<0.50
<u>17</u>		>100	<0.50

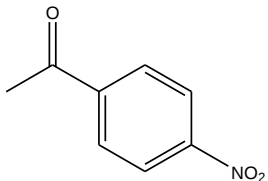
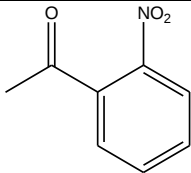
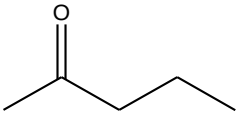
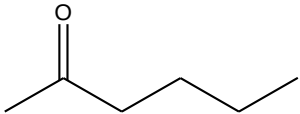
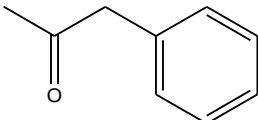
<u>18</u>		>100	<0.50
<u>19</u>		>100	<0.50
<u>27</u>		>100	<0.50
<u>28</u>		60	0.77
<u>29</u>		>100	<0.50
<u>30</u>	-CH ₂ CH ₂ Ph	43	2.10
<u>31</u>	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ Ph	19	12.44
<u>32</u>	-CH ₂ CH ₂ CH ₃	59	<0.50
<u>33</u>	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	>100	<0.50

Table 2 - Effect of eugenol derivatives on thiobarbituric acid reactive species (TBARS), carbonyl and total thiol content in liver of rats

		Concentration (μM)					
	Eugenol Derivatives	Control	Induced Control	BHT	50	100	200
TBARS	Eugenol	1.86 $\pm$ 0.11	2.33 $\pm$ 0.19 [#]	2.13 $\pm$ 0.17 ^{#*}	2.25 $\pm$ 0.13 [#]	2.21 $\pm$ 0.10 [#]	2.19 $\pm$ 0.13 ^{#*}
	<u>28</u>	1.93 $\pm$ 0.06	2.80 $\pm$ 0.26 [#]	2.51 $\pm$ 0.16 ^{#*}	2.62 $\pm$ 0.17 [#]	2.45 $\pm$ 0.09 ^{#*}	2.50 $\pm$ 0.12 ^{#*}
	<u>30</u>	1.85 $\pm$ 0.73	2.25 $\pm$ 0.14 [#]	2.07 $\pm$ 0.09 ^{#*}	2.50 $\pm$ 0.17 ^{#*}	2.48 $\pm$ 0.09 ^{#*}	2.46 $\pm$ 0.15 ^{#*}
	<u>31</u>	1.80 $\pm$ 0.06	2.71 $\pm$ 0.26 [#]	2.33 $\pm$ 0.16 ^{#*}	2.51 $\pm$ 0.13 ^{#*}	2.47 $\pm$ 0.15 ^{#*}	2.53 $\pm$ 0.16 ^{#*}
	<u>32</u>	1.68 $\pm$ 0.18	2.45 $\pm$ 0.25 [#]	2.06 $\pm$ 0.17 ^{#*}	2.12 $\pm$ 0.12 ^{#*}	1.84 $\pm$ 0.14 [*]	1.80 $\pm$ 0.18 [*]
Total Thiol	Eugenol	69.58 $\pm$ 16.0	44.60 $\pm$ 8.23 [#]	44.93 $\pm$ 9.04 [#]	49.00 $\pm$ 6.74 [#]	48.27 $\pm$ 8.98 [#]	44.68 $\pm$ 12.36 [#]
	<u>28</u>	58.69 $\pm$ 9.63	44.50 $\pm$ 9.63 [#]	50.91 $\pm$ 3.73 [#]	42.87 $\pm$ 6.16 [#]	43.24 $\pm$ 3.74 [#]	41.42 $\pm$ 3.96 [#]
	<u>30</u>	69.58 $\pm$ 16.0	44.40 $\pm$ 8.23 [#]	44.93 $\pm$ 9.04 [#]	40.90 $\pm$ 17.35 [#]	53.50 $\pm$ 15.33 [#]	50.92 $\pm$ 9.18 [#]
	<u>31</u>	58.69 $\pm$ 9.63	44.50 $\pm$ 3.79 [#]	50.91 $\pm$ 3.73	43.28 $\pm$ 9.28 [#]	41.75 $\pm$ 6.32 [#]	51.54 $\pm$ 4.84 [#]
	<u>32</u>	69.58 $\pm$ 16.0	44.40 $\pm$ 8.23 [#]	44.93 $\pm$ 9.04 [#]	42.31 $\pm$ 11.11 [#]	57.81 $\pm$ 12.08 [#]	51.95 $\pm$ 16.71 [#]
Carbonyl	Eugenol	5.27 $\pm$ 0.42	4.95 $\pm$ 0.94	4.92 $\pm$ 0.66	5.13 $\pm$ 0.65	5.10 $\pm$ 0.43	4.53 $\pm$ 0.50
	<u>28</u>	2.30 $\pm$ 0.10	2.52 $\pm$ 0.24	2.56 $\pm$ 0.23	2.44 $\pm$ 0.15	2.58 $\pm$ 0.22	2.67 $\pm$ 0.16 [#]
	<u>30</u>	3.16 $\pm$ 0.23	3.39 $\pm$ 0.19	3.33 $\pm$ 0.22	3.16 $\pm$ 0.36	3.19 $\pm$ 0.44	3.48 $\pm$ 0.48
	<u>31</u>	2.30 $\pm$ 0.10	2.52 $\pm$ 0.24	2.56 $\pm$ 0.23	2.65 $\pm$ 0.12 [#]	2.46 $\pm$ 0.10	2.72 $\pm$ 0.14 [#]
	<u>32</u>	5.27 $\pm$ 0.42	4.95 $\pm$ 0.94	4.92 $\pm$ 0.66	3.55 $\pm$ 0.54 ^{#*}	3.43 $\pm$ 0.21 ^{#*}	3.49 $\pm$ 0.39 ^{#*}

Data are expressed as mean $\pm$ S.D (n = 6-12). The levels of TBARS were reported as nmol malonaldehyde per mg protein, thiol content as nmol TNB per mg protein and carbonyl content as nmol of carbonyl per mg protein. [#]Significantly different from control (P<0.05). ^{*}Significantly different from induced control (P<0.05). Differences were determined by one-way ANOVA followed by Duncan's post hoc.

PARTE IV

Conclusão

Tendo em vista os resultados obtidos nessa dissertação, concluímos que:

- As modificações estruturais na posição 1 da molécula do eugenol foram de fácil execução, os compostos foram obtidos com bons rendimentos e de forma rápida.
- Quatro derivados do eugenol mostraram-se efetivos frente aos radicais DPPH e ABTS, alguns deles (28, 30, 31, 32), inclusive com resultados melhores que do próprio eugenol e do BHT, um antioxidante padrão.
- Os derivados do eugenol que se mostraram promissores frente aos radicais DPPH e ABTS, também mostraram resultados satisfatórios na caracterização *ex vivo* da capacidade antioxidante em córtex cerebral: diminuíram os níveis de TBARS, diminuíram a oxidação de proteínas e alteraram o conteúdo tiólico total frente ao estímulo oxidante.

Em conjunto, observamos que os derivados sintetizados apresentam uma potencial atividade antioxidante em córtex cerebral, porém, em fígado não foram obtidos resultados satisfatórios, visto que esse tecido possui resistência ao dano causado pelos radicais livres, pois além de possuir elevados níveis de antioxidantes, adapta-se facilmente às alterações metabólicas. Dessa forma, é necessário investigar novos métodos ou modificar as concentrações dos compostos, para tentar melhorar a atividade dos mesmos em fígado.

Enfim, 16 novos compostos foram sintetizados a partir de modificações estruturais na molécula do eugenol. Dentre esses, os compostos 28, 30, 31 e 32 apresentaram atividade antioxidante. Os derivados que apresentaram atividades promissoras possuem, substituídos à hidroxila 1 do eugenol, grupamentos alquílicos ou arílicos, variando, sobretudo, o tamanho dessa cadeia lateral. Características

alquílicas e lineares parecem favorecer a atividade. Esses resultados obtidos, mesmo que ainda preliminares, demonstram a possibilidade da existência de outros mecanismos antioxidantes, além daquele já bem demonstrado, envolvendo a hidroxila fenólica. Pois essa, amplamente citada como responsável pela atividade antioxidante do eugenol, encontra-se substituída nos derivados que apresentaram atividade mais pronunciada que o referido composto, tanto em testes *in vitro*, como em *ex vivo*. Por fim, os resultados encontrados trazem indícios de que a presença da hidroxila fenólica na posição 1 do eugenol não seja essencial para a atividade antioxidante, abrindo a possibilidade da ocorrência de mecanismos diferentes, daqueles que passam pela doação de um próton ou pela quelação de metais.

Referências

AABY, K.; HVATTUM, E.; SKREDE, G. Analysis of flavonoids and other phenolic compounds using high-performance liquid chromatography with coulometric array detection: Relationship to antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.4595-4603, 2004.

ABIFISA. Associação Brasileira das Empresas do Setor de Fitoterápicos, Suplemento Alimentar e de Promoção da Saúde. Introdução, 2007. Disponível em: <<http://www.abifisa.org.br>> Acesso em: 29 jun 2013.

ALEM, M. A.; DOUGLAS, L. J. Effects of aspirin and other nonsteroidal anti inflammatory drugs on biofilms and planktonic cells of *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.48, p.41-47, 2004.

ANUJ, G.; BHAVNA, G.; RAJIV, P.; SANJAY, S. Preparation and characterization of Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin inclusion complex of Eugenol: Differential pulse voltammetry and ^1H -NMR. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v.58, n.10, p.1313-1319, 2010.

ATSUMI, T.; FUJISAWA, S.; TONOSAKI, K. A comparative study of the antioxidant/prooxidant activities of eugenol and isoeugenol with various concentrations and oxidation conditions. **Toxicology in Vitro**, v.19, n.8, p.1025-1023, 2005.

AWASTHI, P.; DIXIT, S. C.; DIXIT, N.; SINHA, A. K. Eugenol derivatives as future potential drugs. **Journal of Pharmacy Research**, v.1, n.2, p.215-220, 2008.

BARTELS, H. A. The effect of eugenol and oil of cloves on the growth of microorganisms. **American Journal Orthodontics and Oral Surgery**, v.33, p.458-465, 1947.

BASKARAN, Y.; PERIYASAMY, V.; CARANI, V. A. Investigation of antioxidant, anti-inflammatory and DNA-protective properties of eugenol in thioacetamide-induced liver injury in rats. **Toxicology**, v.268, p.204-212, 2010.

BOONSTRA, J.; POST, J. A. Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells. **Gene**, v.337, p.1-13, 2004.

BRENNA, O. V.; PAGLIARINI, E. Multivariate analyses of antioxidant power and polyphenolic composition in red wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p.4841-4844, 2001.

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, 2000.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica, Curitiba**, v.5, n.1, p.33-40, 2004.

ESCOBAR, R. G. Eugenol: propiedades farmacológicas y toxicológicas, ventajas y desventajas de su uso. **Review Cubana Estomatology**, v.39, 2002.

FINDIK, E.; CEYLAN, M.; ELMASTAS, M. Isoeugenol-based novel potent antioxidants: Synthesis and reactivity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.46, p.4618-4624, 2011.

FUJISAWA, S.; ATSUMI, T.; KADOMA, Y.; SAKAGAMI, H. Antioxidant and prooxidant action of eugenol-related compounds and their cytotoxicity. **Toxicology**, v.177, p.39-54, 2002.

GACCHE, R.; KHSIRSAGAR, M.; KAMBLE. S.; BANDGAR. B.; DHOLE. N.; SHISODE, K.; CHAUDHARI, A. Antioxidant and anti-inflammatory related activities of selected synthetic chalcones: structure-activity relationship studies using computational tools. **Chemical e Pharmaceuticall Bulletin**, v.56, p.897-901, 2008.

GULÇIN, I. Antioxidant activity of eugenol: A structure-activity relationship study. **Journal of Medicinal Food**, v.14, n.9, p. 975-985, 2011.

HAGEN, T. M. Oxidative stress, redox imbalance, and the aging process. **Antioxidants e Redox Signaling**, v.5, p.503-506, 2003.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 4.ed. New York: Oxford UK, 2007.

HALLIWELL, B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases. **Drugs Aging**, v.18, p.685-716, 2001.

HARMAN, D. Aging: overview. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 928, p.1-21, 2001.

HIDALGO, M. E.; DE LA ROSA, C.; CARRASCO, H.; CARDONA, W.; GALLARDO, C.; ESPINOZA, L. Antioxidant capacity of eugenol derivatives. **Química Nova**, v.32, n.6, p.1467-1470, 2009.

HIRANO, R.; SASAMOTO, W.; MATSUMOTO, A.; ITAKURA, H.; IGARASHI, O.; KONDO, K. Antioxidant ability of various flavonoids against DPPH radicals and LDL oxidation. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v.47, p.357-362, 2001.

HUANG, W.; ZHANG, H.; LIU, W.; LI, C. Survey of antioxidant capacity and phenolic composition of blueberry, blackberry, and strawberry in Nanjing. **Biomedicine & Biotechnology**, v.13, n.2, p.94-102, 2012.

IRIE, Y.; KEUNG, W. Rhizoma acori graminei and its active principles protect PC-12 cells from the toxic effect of amyloid- β peptide. **Brain Research**, v.963, p.282-289, 2004.

ITO, M.; MARUKAMI, K.; YOSHINO M. Antioxidant action of eugenol compounds: role of metal ion in the inhibition of lipid peroxidation. **Food Chemistry and Toxicology**, v.43, p.461-466, 2005.

KORDALI, S.; CAKIR, A.; OZER, H.; CAKMAKCI, R.; KESDEK, M.; METE, E. Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from *Turkish Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and p-cymene. **Bioresource Technology**, 2008.

KREGEL, K.; ZHANG, H. J. An integrated view of oxidative stress in aging: basic mechanisms, functional effects, and pathological considerations. **American Journal of Physiology, Regulatory, Integrative and Comparative**, v. 292, p.18-36, 2007.

LEE, Y. Y.; HUNG, S. L.; PAI, S. F.; LEE, Y. H.; YANG, S. F. Eugenol suppresses the expression of lipopolysaccharide induce proinflammatory mediators in human macrophages. **Journal of Endodontics**, v.33, p.698-702, 2007.

LIMA, C. B. N.; BELLETTINI, M. T.; SILVA, A. S.; CHEIRUBIM, A. P.; JANANI, J. K.; VIEIRA, M. A. V.; AMADOR, T. S. Uso de plantas medicinais pela população da zona urbana de Bandeirantes-PR. **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, n.1, p.600-602, 2007.

MAGALHAES, D. V. **Atividade antifúngica de derivados sintéticos do eugenol e timol frente a cepas de *Candida* spp. e *Microsporum canis***. 2009. Dissertação (Mestrado)-Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza.

MOREIRA, A. V. B.; MANCINI-FILHO, J. Influence of spices phenolic compounds on lipoperoxidation and lipid profile of rats tissues. **Revista de Nutrição**, v.17, n.4, p.411-424, 2004.

NAGABABU, E.; RIFKIND, J. M.; SESIKERAN, B.; LAKSHMAIAH, N. Assessment of Antioxidant Activities of Eugenol by *in vitro* and *in vivo* Methods. **Methods in Molecular Biology**, v.610, p.165-180, 2010.

NAN, H.; KIM, M. Eugenol with antioxidant activity inhibits MMP-9 related to metastasis in human fibrosarcoma cells. **Food and Chemical Toxicology**, v.55, p.106-112, 2013.

OGATA, M.; HOSHI, M.; URANO, S.; ENDO, T. Antioxidant Activity of Eugenol and related monomeric and dimeric. **Chemical e Pharmaceutical Bulletin**, v.48, p.1467-1469, 2000.

OLIVEIRA, A. C.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; TREVISAN, M. T. S. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v.32, n.3, p.689-702, 2009.

PENZ, J.; GEMELLI, T.; CARVALHO, C. A. S.; GUERRA, R. B.; OLIBONI, L.; SALVADOR, M.; DANI, C.; ARAÚJO, A. S.; FUNCHAL, C. Effect of 3-butyl-1-phenyl-2-(phenyltelluro)oct-en-1-one on oxidative stress in cerebral cortex of rats. **Food and Chemical Toxicology**, v.47, p.745-751, 2009.

PIENIZ, S.; COLPO, E.; OLIVEIRA, V. R.; ESTEFANEL, V.; ANDREZZA, R. *In vitro* assessment of the antioxidant potential of fruits and vegetables. **Ciência e Agrotecnologia**, v.33, n.2, p.552-559, 2009.

PRAKASH, P.; GUPTA, N. Therapeutic uses of ocimum sanctum linn (tulsi) with a note on eugenol and its pharmacological actions: a short review. **Indian Journal of Physiology and Pharmacology**, v.49, n.2, p.125-131, 2005.

RAKOTONIRAINY, M. S.; LAVEDRINE, B. Screening for antifungal activity of essential oils and related compounds to control the biocontamination in libraries and archives storage areas. **International Biodeterioration e Biodegradation**, v.55, p.141-147, 2005.

RÊGO JÚNIOR, N. O.; FERNANDEZ, L. G.; CASTRO, R. D.; SILVA, L. C.; GUALBERTO, S. A.; PEREIRA, M. L. M.; SILVA, M. V. Bioactive compounds and antioxidant activity of crude extracts of brushwood vegetable species. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.15, n.1, p.50-57, 2011.

ROBERTS, C. K.; SINDHU, K. K. Oxidative stress and metabolic syndrome. **Life Sciences**, v.84, p.705-712, 2009.

ROJO, L.; VÁZQUEZ, B.; ROMÁN, S.; DEB, S. Eugenol functionalized poly(acrylic acid) derivatives in the formation of glass-ionomer cements. **Dental Materials**, v.24, p.1709-1716, 2008.

SCHERER, R.; GODOY, H. T. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. **Food Chemistry**, v.112, p.654-658, 2009.

SILVA, B. A.; FERRERES, F.; MALVA, J. O.; DIAS, A. C. P. Phytochemical and antioxidant characterization of hypericum perforatum alcoholic extracts. **Food Chemistry**, v.90, p.157-167, 2005.

SINGH, R.; SINGH, S.; KUMAR, S.; ARORA, S. Studies on antioxidant potential of methanol extract/fractions of Acacia auriculiformis A. Cunn. **Food Chemistry**, v.103, p.505-511, 2007.

SUN, T.; HO, C. T. Antioxidant activities of buckwheat extracts. **Food Chemistry**, v.90, p.743-749, 2005.

TANGERINO, L. M. B. **Estudo das propriedades antimicrobianas de copolímeros derivados do eugenol**. 2006. Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal de Itajubá, Itajubá.

TRAGOOLPUA, Y.; JATISATIENR, A. Anti- herpes simplex virus activities of *Eugenia caryophyllus* (Spreng) Bullock e S.G. Harrison and essential oil, eugenol. **Phytotherapy Research**, v.21, p.1153-1158, 2007.

VILLANO, M.; FERNANDEZ, P. M. S.; TRANCOSO, A. M.; GARCIA, P. Comparison of antioxidant activity of wine phenolic compounds and metabolites in vitro. **Analytica Chimica Acta**, v.538, p.391-398, 2005.

XIANG, Y.; PEI, Y.; WANG, Y. Current status of natural products from plants as Anti-herpes simplex virus 1 agents. **Virologicasinica**, v.23, n.5, p.303-314, 2008.

YAO, Z.; NAMKUNG, W.; KO, E. A.; PARK, J.; TRADTRANTIP, L.; VERKMAN, A. S. Fractionation of a Herbal Antidiarrheal Medicine Reveals Eugenol as an Inhibitor of Ca²⁺-Activated Cl₂ Channel TMEM16A. **Plos One**, v.7, n.5, p.1-7, 2012.

YILDIRIM, A.; MAVI, A.; KARA, A. A. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p.4083-4089, 2001.

Anexo

[Main Menu](#) → [Author Dashboard](#) → Submission Confirmation

You are logged in as Alethéa Barschak

Submission
Confirmation**DO NOT USE YOUR BROWSER BACK BUTTON. TO EXIT THIS PAGE, PLEASE CLOSE YOUR BROWSER WINDOW OR CLICK ON THE RETURN TO DASHBOARD BUTTON, IF AVAILABLE.**Thank you for submitting your manuscript to *Journal of Pharmacy and Pharmacology*.

Manuscript ID: JPP-13-0477

Title: Eugenol derivatives as potential antioxidants: is phenolic hydroxyl necessary to obtain an effect?

Authors: Farias, Marilla
Oliveira, Pathise
Dutra, Filipe
Fernandes, Thiely
de Pereira, Cláudio
Oliveira, Simone
Stefanello, Francieli
Lencina, Claiton
Barschak, Alethéa

Date Submitted: 13-Jul-2013



Print



Return to Dashboard

ScholarOne Manuscripts™ v4.12 (patent #7,257,767 and #7,263,655). © ScholarOne, Inc., 2013. All Rights Reserved.
ScholarOne Manuscripts is a trademark of ScholarOne, Inc. ScholarOne is a registered trademark of ScholarOne, Inc.



Follow ScholarOne on Twitter

[Terms and Conditions of Use](#) - [ScholarOne Privacy Policy](#) - [Get Help Now](#)