NANOCÁPSULAS DE ZEÍNA CARREGADAS COM EUGENOL OU ÓLEO DE CRAVO INDUZEM TOXICIDADE EM DROSOPHILA MELANOGASTER

João Marcos Fonseca M Sousa [1]

Daiana Muniz dos Santos [2]

Luiz Felipe Windberg Soares Junior [3]

Robson Luiz Puntel [4]

Marcelo Gomes de Gomes [5]

Matheus Chimelo Bianchini [6]

Resumo:

O eugenol (EU) é o principal constituinte do óleo essencial de cravo (OC) extraído de Syzygium aromaticum. Sendo o EU um composto fenólico, este apresenta propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antivirais, antifúngicas e antimicrobianas comprovadas, e exercem ação inseticida. Entre os efeitos farmacológicos do EU, podemos destacar sua ação em hepatotoxicidade, úlceras gástricas, doenças infecciosas, estando presentes em diversos fármacos. Contudo, tanto EU quanto OC apresentam toxicidade quando administrados via oral, além do caráter hidrofóbico, dificultando administrações por esta via. Visando contornar estes problemas farmacotécnicos enquanto as propriedades farmacológicas desses compostos são preservadas, a elaboração de nanocápsulas se torna cada vez mais frequente. A utilização de nanocápsulas poliméricas conferem vantagens na administração de fármacos, podendo aumentar sua miscibilidade, biodisponibilidade, preservar suas propriedades farmacológicas e até garantir que o princípio ativo chegue ao local de atuação em quantidades terapêuticas sem sofrer grandes degradações. De acordo com o estudo de SARAIVA et al., 2018, houve redução significativa das toxicidades do EU e OC livres a partir de suas respectivas nanoencapsulações em zeína, um biopolímero extraído de Zea mays, em Caenorhabditis elegans. Nesse estudo foi verificado que estas nanocápsulas apresentaram-se inócuas ao modelo. Diante do exposto, este estudo tem por finalidade avaliar os graus de toxicidade do EU e OC em suas formas livres e suas respectivas nanoformulações em zeína por via oral, e também seus efeitos comportamentais em modelo in vivo utilizando Drosophila melanogaster. Os resultados da sobrevivência mostraram que as nanoformulações de eugenol e de óleo de cravo aumentaram o perfil tóxico destes compostos em comparação às suas formas livres, reduzindo a longevidade das drosófilas; por outro lado, os grupos Controle DMSO, Controle Vazia e EU isolado não apresentaram toxicidade nas concentrações utilizadas. Os testes comportamentais de geotaxia mostraram déficit locomotores nos grupos Controle DMSO e EU nano. O teste do campo aberto mostrou déficit locomotor no grupo OC nano a partir do quarto dia de tratamento, e nos grupos Controle DMSO, Controle Vazia e EU nano a partir do sexto dia. A partir disso, conclui-se que as nanocápsulas de zeína carregadas com EU ou OC agravam o perfil tóxico desses compostos em suas respectivas formas livres, além de induzir alteração comportamental no modelo estudado; por outro lado, as nanocápsulas não-carregadas e o diluente utilizado (DMSO) não induziram mortalidade, mas provocaram alterações comportamentais. Ademais, são necessárias determinações bioquímicas para elucidar os efeitos toxicológicos dos compostos e nanoformulações causados no modelo experimental com drosófilas.

Palavras-chave: Eugenol, óleo essencial, cravo, Syzygium aromaticum, toxicidade, déficit, mortalidade, comportamento, zeína, nanoformulações, nanocápsulas

Modalidade de Participação: Iniciação Científica

NANOCÁPSULAS DE ZEÍNA CARREGADAS COM EUGENOL OU ÓLEO DE CRAVO INDUZEM TOXICIDADE EM DROSOPHILA MELANOGASTER

[1] Aluno de graduação. joaofpsmode@gmail.com. Autor principal

[2] Graduando em Ciências da Natureza. dmuniz969@gmail.com. Co-autor

[3] Graduando em Farmácia. luizjuniorwindberg1999@gmail.com. Co-autor

[4] Docente. robsonpuntel@unipampa.edu.br. Orientador

[5] Doutorando em Bioquímica. gomesdegomeslaftambio@gmail.com. Co-orientador

[6] PPG em Bioquímica. matheuscbianchini@gmail.com. Co-orientador

NANOCÁPSULAS DE ZEÍNA CARREGADAS COM EUGENOL OU ÓLEO DE CRAVO INDUZEM TOXICIDADE EM *Drosophila melanogaster*

1. INTRODUÇÃO

O eugenol (EU) é o principal constituinte do óleo essencial de cravo (OC) extraído de *Syzygium aromaticum*. Sendo o EU um composto fenólico, o mesmo apresenta propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antivirais, antifúngicas e antimicrobianas comprovadas, além de também exercer ação inseticida (MURAKAMI et al., 2003; SARAIVA et al., 2018). Entre os efeitos farmacológicos do EU, podemos destacar sua ação em hepatotoxicidade, leucemia, úlceras gástricas, doenças infecciosas além de estar presente em fármacos anestésicos e anti-inflamatórios (AZAMBUJA, 2015; BINU et al., 2018; MAGALHÃES et al., 2018). Contudo, tanto EU quanto OC apresentam toxicidade quando administrados via oral, além do caráter hidrofóbico, tornando impraticável a administração por esta via (SARAIVA et al., 2018).

Visando contornar estes problemas farmacotécnicos e ao mesmo tempo, preservar as propriedades farmacológicas desses compostos, a elaboração de nanocápsulas se torna cada vez mais frequente. A utilização de nanocápsulas poliméricas confere inúmeras vantagens na administração de fármacos, bem como aumentar sua miscibilidade, biodisponibilidade, preservar suas propriedades farmacológicas e em algumas situações, garantir que o princípio ativo chegue ao local de atuação em quantidades terapêuticas sem sofrer grandes degradações (NADIMI et al., 2018; ABU ABED et al., 2018; SOHAIL et al., 2018). De acordo com o estudo de SARAIVA et al., 2018, houve redução significativa das toxicidades do EU e OC livres a partir de suas respectivas nanoencapsulações em zeína, um biopolímero extraído do milho (*Zea mays*), em um modelo experimental utilizando *Caenorhabditis elegans*. Ainda, nesse mesmo estudo foi verificado que as nanocápsulas de zeína apresentaram-se inócuas ao modelo.

Diante do exposto, este estudo tem por finalidade avaliar os graus de toxicidade do EU e OC em suas formas livres e suas respectivas nanoformulações em zeína por via oral, e também seus efeitos comportamentais em modelo *in vivo* utilizando *Drosophila melanogaster*.

2. METODOLOGIA

As nanopartículas de zeína foram preparadas de acordo com o métodos de precipitação antissolvente. As formulações foram caracterizadas a partir de ultrafiltração e centrifugação para verificar a eficiência de encapsulação (89±2%); espalhamento dinâmico de luz para verificar a polidispersividade (0,197±0,016nm) e o tamanho médio (120±20nm); análise de rastreamento de nanopartículas para determinar a concentração ($1,1x10^{12}$ partículas/mL) e a distribuição de tamanho (98±5,9nm); microeletroforese para determinar o potencial zeta (19.9±0,9mV).

Para o tratamento foram utilizadas moscas de tipo selvagem de *Drosophila melanogaster* de ambos os sexos e idades entre 1 e 3 dias. As moscas foram separadas em em 7 grupos: Controle Água (água destilada), Controle Vazia (nanocápsulas de zeína não-carregadas $2,75x10^{11}$ partículas/mL) Controle DMSO (DMSO concentrado), EU isolado (eugenol isolado 0,55mg/mL), OC isolado (óleo de cravo isolado 0,55mg/mL), EU nano (nanoformulação de eugenol $2,75x10^{11}$ partículas/mL), OC nano (nanoformulação de óleo de cravo $2,75x10^{11}$ partículas/mL).

2.1. SOBREVIVÊNCIA

Neste teste foram utilizadas 50 moscas por grupo. As mesmas foram monitoradas diariamente por um período de 14 dias para avaliar a incidência de mortalidade. A contagem do número de moscas mortas foi realizada diariamente durante este período. Os dados foram posteriormente analisados e plotados como porcentagem de moscas vivas.

2.2. GEOTAXIA-NEGATIVA

A habilidade locomotora das moscas foi determinada por um ensaio de geotaxia como descrito por FEANY E BENDER, 2000. Para o teste, foram anestesiadas 10 moscas durante 2 minutos em gelo e, em seguida, as mesmas foram transferidas para um tubo falcon de aproximadamente 12 centímetros de comprimento. Todos os tubos foram marcados nos centímetros 6 e 8 para avaliar a escalada. Foi dado um tempo de latência de 20 minutos para que as moscas pudessem se recuperar do efeito causado pelo gelo. Em seguida, o tubo foi disposto na vertical e submetido a um leve impacto para que as moscas se encontrassem todas na base do tudo. No instante do último impacto, um cronômetro de 6 segundos foi acionado e o número de moscas que alcançaram as marcações neste intervalo de tempo foram contadas.

2.3. TESTE DO CAMPO ABERTO

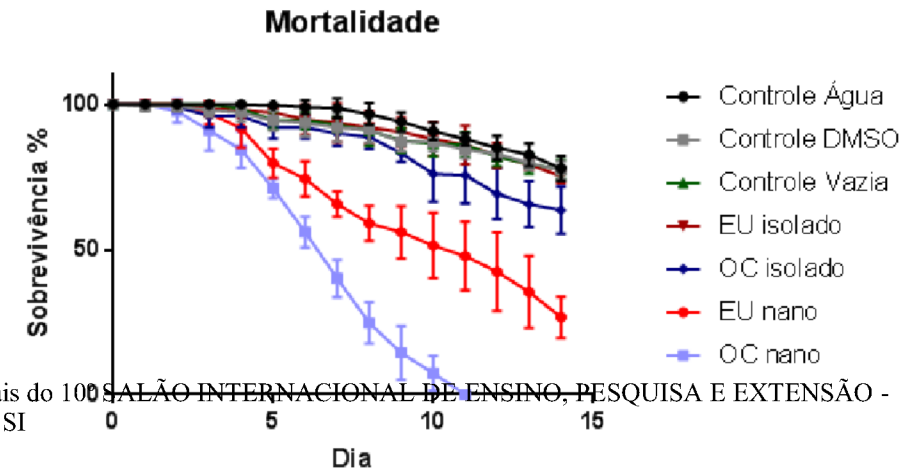
O teste do campo aberto foi realizado pelo método de HEITH, 2010. Este método avalia o deslocamento das moscas num determinado período de tempo. Foram utilizadas 10 moscas por grupo, e o teste foi feito em duplicata. As moscas foram anestesiadas em gelo e transferidas para suas respectivas placas de petri, a qual foram sobrepostas em papel quadriculado (cada quadrado possui 1cm de lado). Foi dado um tempo de latência de 20 minutos para total recuperação das moscas antes do início ao teste que durou 1 minuto. Neste método, os saltos também foram contabilizados.

2.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os testes comportamentais foram realizados em triplicata e os dados foram agrupados em médias e erro padrão, a estatística utilizada foi análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste de Newman-Keuls. Sendo, que para a determinação da sobrevivência foi utilizada ANOVA de uma via para medidas repetidas, valores com $p<0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

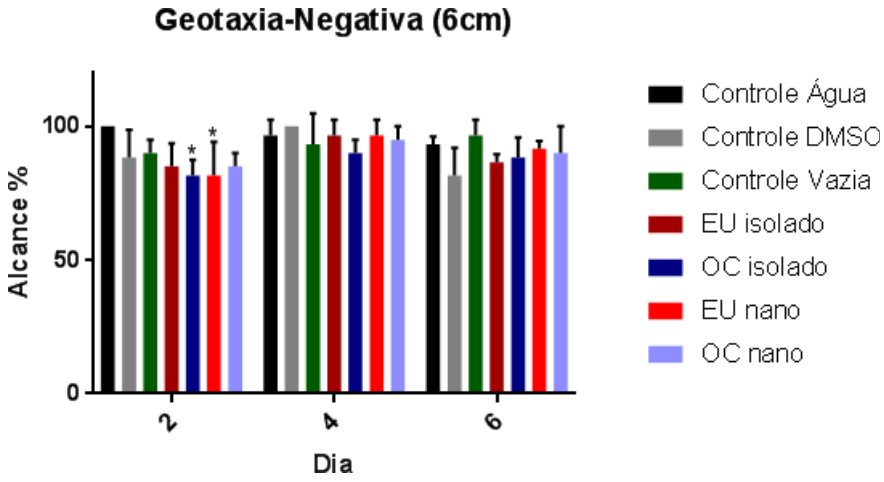
3. RESULTADOS e DISCUSSÃO

Gráfico 1



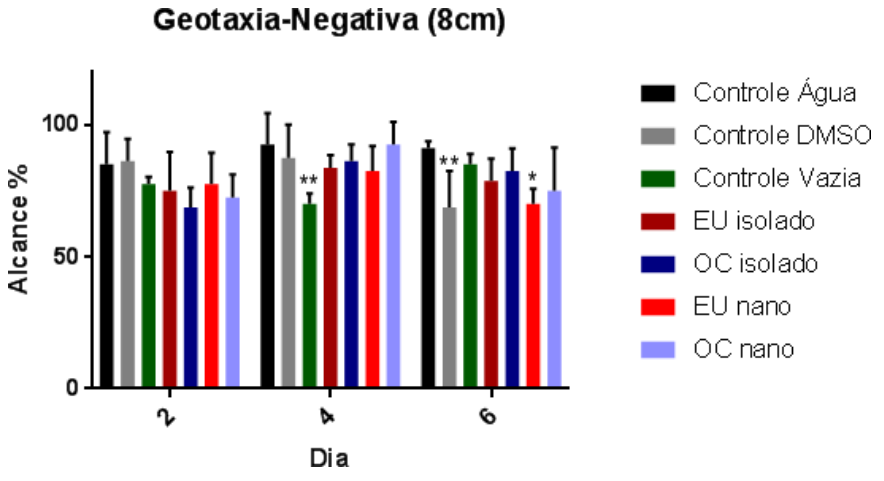
De acordo com o gráfico 1, os resultados mostraram que os grupos controles não apresentaram diferença significativa entre si. Sugerindo, que tanto o veículo utilizado (DMSO) quanto a nanocápsula de zeína vazia apresentam-se inócuos no modelo exposto. O EU na forma isolada também não apresentou aumento na mortalidade, na concentração testada. O OC na forma isolada apresentou um aumento significativo na mortalidade a partir do dia 10. As nanoformulações apresentaram-se um drástico aumento na mortalidade no teste de sobrevivência, sendo a nanoformulação com OC a forma mais letal, quando comparada a nanoformulação de EU. Este comportamento pode ser explicado por um aumento na biodisponibilidade do EU e OC por conta de suas nanoformulações. Vale lembrar que tanto EU quanto OC são compostos considerados inseticidas.

Gráfico 2



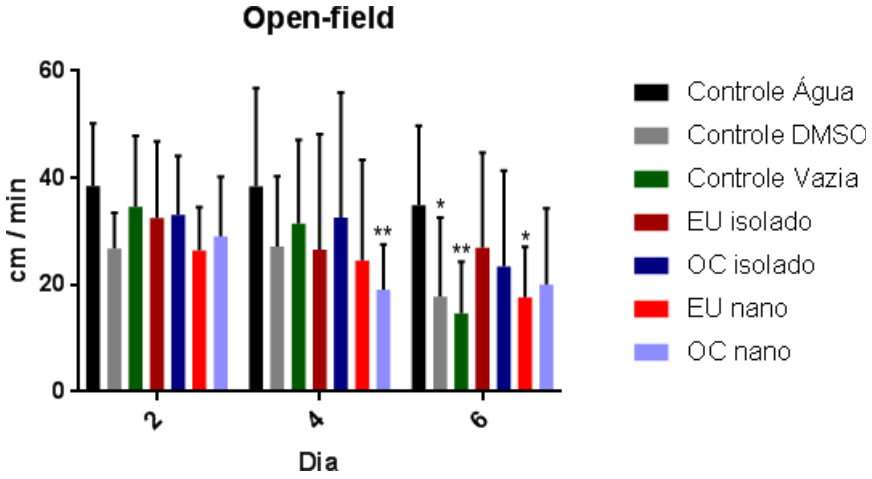
De acordo com o gráfico 2, houve diferença significativa sobre a habilidade de escalada das drosófilas dos grupos OC isolado e EU nano em comparação ao grupo Controle Água no 2º dia de tratamento. A discussão é apresentada na análise do gráfico 3.

Gráfico 3



De acordo com o gráfico 3, para 8cm de altura, o grupo Controle Vazia apresentou diferença significativa no 4º dia de tratamento em comparação ao Controle Água. No 6º dia de tratamento, tanto o grupo Controle DMSO quanto o grupo EU nano apresentaram diferença significativa. O DMSO é um solvente aprótico muito utilizado para solubilizar moléculas apolares e polares, porém, apresenta toxicidade em concentrações maiores que 10%, podendo induzir apoptose em células neuronais retinianas (GALVÃO, 2014), o que é um indício para a este déficit observado neste grupo.

Gráfico 4



De acordo com o gráfico 4, as drosófilas do grupo OC nano apresentaram diferença significativa na locomoção em comparação ao grupo Controle Água no 4º dia de tratamento, enquanto os grupos Controle DMSO, Controle Vazia e EU nano apresentaram diferença significativa no 6º dia. O eugenol é um constituinte do óleo de cravo, e a toxicidade induzida pelo mesmo pode provocar alterações sistêmicas e comportamentais. Um estudo feito por VALENTE, 2009 analisando o caráter tóxico do eugenol sobre roedores mostrou que este pode induzir diversos efeitos maléficos, dentre eles a redução da frequência respiratória e comportamento mais agitado. Isso explicaria a grande quantidade de saltos nos grupos OC nano e EU nano, respectivamente, nos dias 4 e 6 do tratamento. A toxicidade induzida por DMSO, como mostrado no estudo de YUAN, 2012, pode reduzir a velocidade locomotora em *Dugesia japonica*, fato que se repetiu no teste com drosófilas.

4.CONSIDERAÇÕES FINAIS

Portanto, diante do exposto as nanoformulações de zeína carregadas com EU ou OC apresentaram maior grau de toxicidade em relação aos compostos em suas formas isoladas, aumentando a letalidade nas drosófilas e reduzindo sua atividade locomotora. Além disso, apesar de não induzirem mortalidade nos 14 dias de tratamento, os grupos tratados com nanocápsulas de zeína e/ou DMSO apresentaram maiores déficit locomotores. Por conseguinte, são necessárias determinações bioquímicas para elucidar os efeitos toxicológicos dos compostos e nanoformulações causados no modelo experimental com drosófilas.

REFERÊNCIAS

FEANY, M. B.; BENDER, W. W. A Drosophila model of Parkinson's disease. **Nature**, v. 404, n. 6776, p. 394–398, 2000.

SOHAIL, M. F. et al. Polymeric nanocapsules embedded with ultra-small silver nanoclusters for synergistic pharmacology and improved oral delivery of Docetaxel. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 8, n. 1, 6 set. 2018. Springer Nature America, Inc. http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-30749-3.

MAGALHÃES, C. B. et al. The anti-inflammatory and anti-oxidative actions of eugenol improve lipopolysaccharide-induced lung injury. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, [s.l.], jul. 2018. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.resp.2018.07.001.

HWANG, E. et al. Clove attenuates UVB-induced photodamage and repairs skin barrier function in hairless mice. **Food & Function**, [s.l.], 2018. Royal Society of Chemistry (RSC). http://dx.doi.org/10.1039/c8fo00843d.

BINU, P. et al. Protective Effects of Eugenol against Hepatotoxicity Induced by Arsenic Trioxide: An Antileukemic Drug. **Iranian Journal Of Medical Sciences**, [s.l], v. 3, n. 43, p.305-312, 2018.

SHAO, Y. et al. Eugenol-chitosan nanoemulsions by ultrasound-mediated emulsification: Formulation, characterization and antimicrobial activity. **Carbohydrate Polymers**, [s.l.], v. 193, p.144-152, ago. 2018. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.03.101.

ABED, O. S. A. et al. Lysozyme and DNase I loaded poly (D, L lactide-co-caprolactone) nanocapsules as an oral delivery system. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 8, n. 1, 3 set. 2018. Springer Nature America, Inc. http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-31303-x.

NADIMI, A. E. et al. Nano-scale drug delivery systems for antiarrhythmic agents. European Journal Of Medicinal Chemistry, [s.l.], v. 157, p.1153-1163, set. 2018. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.08.080.

HIRTH, F. Drosophila melanogaster in the study of human neurodegeneration. **CNS Neurol Disord,** v. 9, n. 4, p. 504–523, 2010.

GALVAO, J. et al. Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. **The Faseb Journal**, [s.l.], v. 28, n. 3, p.1317-1330, mar. 2014. FASEB. http://dx.doi.org/10.1096/fj.13-235440.

VALENTE, R. O. H. et al. Estudo toxicológico pré-clínico (agudo) do extrato do Syzygium aromaticum (L) em roedores. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s.l.], v. 19, n. 2, p.557-560, jun. 2009. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1590/s0102-695x2009000400008.

YUAN, Z.; ZHAO, B.; ZHANG, Y. Effects of dimethylsulfoxide on behavior and antioxidant enzymes response of planarian Dugesia japonica. **Toxicology And Industrial Health**, [s.l.], v. 28, n. 5, p.449-457, 5 out. 2011. SAGE Publications.28, n. 5, p.449-457, 5 out. 2011. SAGE Publications. http://dx.doi.org/10.1177/0748233711414609.