

SÍNTESE DO METILEUGENOL E AÇÃO ANTICOLINESTERÁSICA

Victor B. Fernandes¹; Marcus V. F. da Silva²; Francisco F. S. Lopes¹; Lucas S. Frota³; Sara I. C. G. Barbosa¹; Maria V. S. Tavares⁴; Wildson M. B. da Silva⁵; Selene M. de Moraes^{1, 2, 3, 4}.

¹Universidade Estadual do Ceará, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Fortaleza, Ceará.

²Universidade Estadual do Ceará, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinária, Fortaleza, Ceará.

³Universidade Estadual do Ceará, Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais, Fortaleza, Ceará.

⁴Universidade Estadual do Ceará, Curso de Graduação em Química, Fortaleza, Ceará.

⁵Universidade Estadual Vale do Acaraú, Curso de Graduação em Química, Sobral, Ceará

Palavras-Chave: Alzheimer, Acetilcolinesterase, Metil-O-Eugenol.

Introdução

A perda de memória e declínio cognitivo são problemas sérios de saúde global, que afetam especialmente a população idosa. Essas questões exigem cuidados especiais, interferem nas atividades diárias e resultam em altos custos econômicos. O tipo mais comum é a doença de Alzheimer, que representa a maioria dos casos em escala mundial (XIONG et al., 2024).

Pacientes que sofrem de Alzheimer não possuem acetilcolina (ACh), um neurotransmissor essencial para a memória e a capacidade de aprendizagem. Aumentar os níveis de ACh por meio da inibição da acetilcolinesterase (AChE) pode reverter a deficiência de memória e aliviar os sintomas da doença. Por isso, os inibidores de AChE são considerados como alvos terapêuticos promissores na busca por tratamentos eficazes para essa condição (LOPES et al., 2024).

Atualmente, os profissionais da área estão cada vez mais focados em pesquisar substâncias naturais e seus potenciais derivados artificiais que tenham eficácia no tratamento da doença de Alzheimer e de outras doenças neurodegenerativas (NAGORI et al., 2023).

O eugenol, conhecido também como 4-alil-2-metoxifenol, é o componente principal encontrado no óleo essencial de cravo (*Syzygium aromaticum* L.) e pode ser encontrado em diversas outras plantas. Devido às suas múltiplas atividades biológicas, como propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, atribuídas à presença do grupo hidroxila, o eugenol desperta grande interesse na área farmacológica. Por suas características, este fenilpropanóide é utilizado na produção de diferentes compostos bioativos e co-fármacos com potencial promissor para o tratamento de diversas doenças (EL GHALLAB et al., 2024).

Diante das propriedades terapêuticas do eugenol, o objetivo desta pesquisa foi realizar alterações nesse composto e analisar seu potencial de inibição da enzima acetilcolinesterase, com o intuito de contribuir para o tratamento da doença de Alzheimer.

Material e Métodos

Na metilação, 0,05 mol de eugenol foi empregado. O eugenol foi dissolvido em 0,33 mol de NaOH em 81,25 mL de água. O sulfato de dimetila foi introduzido em duas etapas. A primeira parcela (0,12 mol) foi adicionada sob agitação a 30 °C. A segunda parcela (0,12 mol) foi adicionada sob agitação a 40 °C. A mistura resultante foi transferida para um funil de separação e o material foi extraído com 50 mL de clorofórmio. Posteriormente, a fração clorofórmica foi lavada com água gelada e seca com sulfato de sódio anidro (FONTENELLE et al., 2011).

Foi verificado o produto derivado e sua pureza por meio de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM), utilizando uma coluna capilar RTX-5MS (5% de difenil/ 95% de dimetilpolisiloxano) com dimensões de 30m x 0,25mm, 0,25 μ m. Foi injetado um volume de 1 μ L na concentração de 1 mg/mL, com temperaturas de injeção a 250 °C e modo split 1:100, temperatura da coluna variando de 35 a 180°C a uma taxa de 4°C por minuto e de 180 a 280°C a 17°C por minuto. O detector estava ajustado a 250 °C, com espectros de massa obtidos a 70 eV de impacto de elétrons (LOPES et al., 2024).

Para avaliar a capacidade de inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE), foi medido o nível de quebra da acetilcolina pela AChE, resultando na formação de tiocolina. Esta substância reagiu com o DTNB, originando o 5-tio-2-nitrobenzoato, um ânion de cor amarela que foi quantificado por meio de espectrofotometria. A análise foi conduzida em microplacas contendo 96 poços, com a amostra sendo diluída em diferentes concentrações (6,25-200 μ g/mL) e incubada com os reagentes por 25 minutos. As leituras foram feitas em um espectrofotômetro UV-Vis do tipo ELISA a 405 nm. A galantamina foi utilizada como controle positivo e todos os experimentos foram feitos em triplicata (TREVISAN *et al.*, 2003). A análise estatística foi feita por meio de ANOVA seguida pelo teste de Tukey, onde valores com letras diferentes indicam diferenças significativas ($P < 0,05$).

Resultados e Discussão

Em busca de substâncias mais eficazes no tratamento da doença de Alzheimer, o eugenol passaram por modificações químicas por meio da metilação. Como resultado, foi produzido o novo composto: metil-O-eugenol (Figura 1).

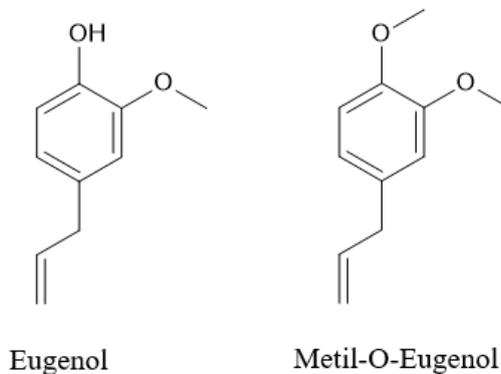


Figura 1 - Representação das estruturas químicas do eugenol e seu derivado

Na análise por CG-EM foi identificado pico predominante no tempo de retenção de 23,84 minutos, com pureza de 99,99%. As principais fragmentações moleculares na razão carga/massa foram de 178 (pico base), 163, 147 e 103 (Figura 2).

Em relação à inibição da acetilcolinesterase, o eugenol puro demonstrou uma concentração inibitória de 50% (CI_{50}) de 10,51 μ g/mL, enquanto o seu derivado, o metileugenol, obteve um resultado estatisticamente igual com 9,95 μ g/mL (Tabela 1). Portanto a metilação não altera a ação frente a AChE. Estes resultados mostraram uma alta capacidade de inibição da enzima AChE, de acordo com a classificação: $CI_{50} < 20$ μ g/mL (alta capacidade), $20 < CI_{50} < 200$ μ g/mL (capacidade moderada) e $CI_{50} > 200$ μ g/mL (baixa capacidade) (SANTOS *et al.*, 2018).

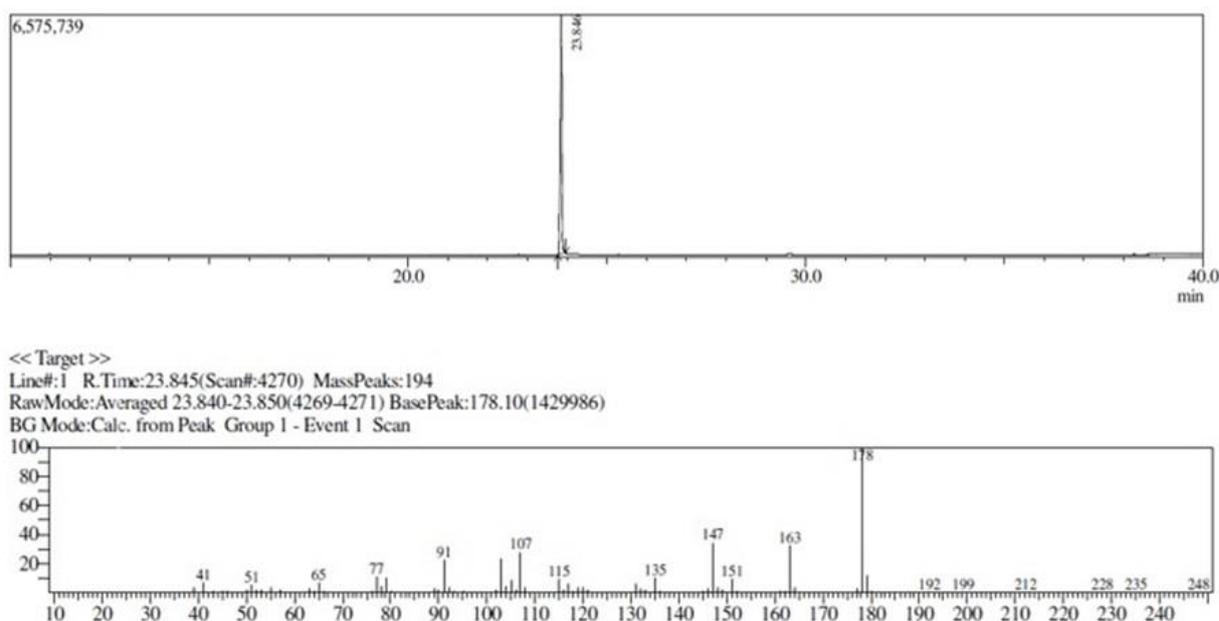


Figura 2 - Análise de pureza e formação do derivado do eugenol em cromatografia gasosa e seu espectro de massas

Dentre as características biológicas do metileugenol relatados na literatura, pode-se destacar sua capacidade de atuar como repelente (DU *et al.*, 2014), sua toxicidade por fumigação (LIU *et al.*, 2013), assim como seus efeitos prejudiciais em insetos adultos (HUANG *et al.*, 2002) e jovens (GAIRE *et al.*, 2017). Além de sua ação inseticida, pesquisas apontam que o metileugenol também apresenta propriedades farmacológicas, como efeitos relaxantes musculares (LIMA *et al.*, 2000), protetores gástricos (SANCHEZ-ME *et al.*, 2015) e atividades antidepressivas (NORTE; COSENTINO; LAZARINI, 2005).

Tabela 1 - Avaliação da ação inibitória da Acetilcolinesterase do eugenol e seu composto derivado.

Amostras	CI ₅₀ AChE (µg/mL)
Galantamina (Padrão)	5,82 ± 0,02 ^a
Eugenol	10,51 ± 0,83 ^b
Metil-eugenol	9,95 ± 0,75 ^b

Conclusões

Os resultados obtidos nesta pesquisa são extremamente importantes e apontam que o eugenol metilado mostra-se promissor como possível alvo para futuras pesquisas na criação de remédios para combater a doença de Alzheimer. No entanto, é fundamental destacar que ainda não há certeza sobre os efeitos que esse composto possa ter em seres humanos, sendo crucial a realização de mais estudos *in vivo* para obter dados mais específicos.

Agradecimentos

Agradeço aos alunos do LQPN da UECE pelo suporte no desenvolvimento deste trabalho e à FUNCAP pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

Referências

- Du, S. S.; Yang, K.; Wang, C. F.; You, C. X.; Geng, Z. F.; Guo, S. S.; Deng, Z. W.; Liu, Z. L. Chemical Constituents and Activities of the Essential Oil from *Myristica fragrans* against Cigarette Beetle *Lasioderma serricorne*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 11, n. 9, p. 1449–1456, set. 2014.
- El Ghallab, Y.; Aainouss, A.; El Messaoudi, M. D.; Derfoufi, S. Synthesis, biological activity and in silico study of alkyl eugenol derivatives as Mycobacterium tuberculosis inhibitors. **Chemical Physics Impact**, v. 8, p. 100508, jun. 2024.
- Fontenelle, R. O. S.; De Morais, S. M.; Brito, E. H. S.; Brilhante, R. S. N.; Cordeiro, R. A.; Lima, Y. C.; Brasil, N. V. G. P. S.; Monteiro, A. J.; Sidrim, J. J. C.; Rocha, M. F. G. Alkylphenol Activity against *Candida* spp. and *Microsporum canis*: A Focus on the Antifungal Activity of Thymol, Eugenol and O-Methyl Derivatives. **Molecules**, v. 16, n. 8, p. 6422–6431, 29 jul. 2011.
- Gaire, S.; O’Connell, M.; Holguin, F. O.; Amatya, A.; Bundy, S.; Romero, A. Insecticidal Properties of Essential Oils and Some of Their Constituents on the Turkestan Cockroach (Blattodea: Blattidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 110, n. 2, p. 584–592, abr. 2017.
- Huang, Y.; Ho, S. H.; Lee, H. C.; Yap, Y. L. Insecticidal properties of eugenol, isoeugenol and methyleugenol and their effects on nutrition of *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera: Curculionidae) and *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Journal of Stored Products Research**, v. 38, n. 5, p. 403–412, jan. 2002.
- Lima, C. C.; Criddle, D. N.; COELHO-DE-SOUZA, A. N.; MONTE, F. J. Q.; JAFFAR, M.; Leal-Cardoso, J. H. Relaxant and Antispasmodic Actions of Methyleugenol on Guinea-Pig Isolated Ileum. **Planta Medica**, v. 66, n. 5, p. 408–411, jun. 2000.
- Liu, X.; Zhou, L.; Liu, Z.; Du, S. Identification of Insecticidal Constituents of the Essential Oil of *Acorus calamus* Rhizomes against *Liposcelis bostrychophila* Badonnel. **Molecules**, v. 18, n. 5, p. 5684–5696, 15 maio 2013.
- Lopes, F. F. S.; Da Silva, J. L. E.; Eloi, N. M. P.; Rodrigues, A. L. M.; Da Silva, M. V. F.; Montes, R. A.; Barbosa, S. I. C. G.; Alves, D. R.; Frota, L. S.; De Morais, S. M. Chemical Characterization, Phenolic Compounds Quantification, and Assessment of Antioxidant and Anti-Acetylcholinesterase Activities of *Byrsonima sericea* DC fruits. **Chemistry & Biodiversity**, v. 21, n. 3, p. e202301760, mar. 2024.
- Nagori, K.; Nakhate, K. T.; Yadav, K.; Ajazuddin; Pradhan, M. Unlocking the Therapeutic Potential of Medicinal Plants for Alzheimer’s Disease: Preclinical to Clinical Trial Insights. **Future Pharmacology**, v. 3, n. 4, p. 877–907, 13 nov. 2023.
- Norte, M. C. B.; Cosentino, R. M.; Lazarini, C. A. Effects of methyl-eugenol administration on behavioral models related to depression and anxiety, in rats. **Phytomedicine**, v. 12, n. 4, p. 294–298, abr. 2005.
- Sanchez-Me, M. E.; Cruz-Anton, L.; Arrieta-Ba, D.; Olivares-C, I. M.; Rojas-Mart, R.; Martinez-C, D.; Arrieta, J. Gastroprotective Activity of Methyleugenol from *Peperomia hispidula* on Ethanol-Induced Gastric Lesions in Rats. **International Journal of Pharmacology**, v. 11, n. 7, p. 697–704, 15 set. 2015.
- Santos, T. C. D.; Gomes, T. M.; Pinto, B. A. S.; Camara, A. L.; Paes, A. M. A. Naturally Occurring Acetylcholinesterase Inhibitors and Their Potential Use for Alzheimer’s Disease Therapy. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, p. 1192, 18 out. 2018.
- Trevisan, M. T. S.; Macedo, F. V. V.; Meent, M. V. D.; Rhee, I. K.; Verpoorte, R. Seleção de plantas com atividade anticolinesterase para tratamento da doença de Alzheimer. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 301–304, maio 2003.
- Vargas-Méndez, L. Y.; Sanabria-Flórez, P. L.; SAAVEDRA-REYES, L. M.; Merchan-Arenas, D. R.; Kouznetsov, V. V. Bioactivity of semisynthetic eugenol derivatives against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae infesting maize in Colombia. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 26, n. 7, p. 1613–1620, nov. 2019.
- Xiong, Y.; Tvedt, J.; Åkerstedt, T.; Cadar, D.; Wang, H. X. Impact of sleep duration and sleep disturbances on the incidence of dementia and Alzheimer’s disease: A 10-year follow-up study. **Psychiatry Research**, v. 333, p. 115760, mar. 2024.