



SÍNTESE E AVALIAÇÃO DE CHALCONAS SOBRE OS MARCADORES DA DOENÇA DE ALZHEIMER

Palavras-Chave: CHALCONAS, ALZHEIMER, FARMACOLOGIA

Autores:

EDUARDO FERREIRA AZEVEDO, FCF – UNICAMP

Profa. Dra. WANDA PEREIRA ALMEIDA (orientadora), FCF - UNICAMP

INTRODUÇÃO:

A doença de Alzheimer (DA) consiste em um processo neurodegenerativo que compromete as funções cognitivas do indivíduo, como a memória, orientação, atenção e linguagem. Sua fisiopatologia é multifatorial e inclui déficit colinérgico e a formação de placas amiloides como principais hipóteses de sustentação, e isto permite o uso de substâncias que atuam sobre esses marcadores da doença de Alzheimer, dentre elas tem-se as chalconas.

Uma molécula que possui em sua estrutura geral dois anéis aromáticos conectados por um sistema carbonílico $\alpha\beta$ -insaturado, formado a partir de um aldeído e uma cetona pela condensação de Claisen-Schmidt. O projeto visa sintetizar e avaliar chalconas no que diz respeito a sua citotoxicidade e atuação sobre os marcadores da doença, além de investigar a interação de chalconas com nucleófilos biológicos uma das potenciais causas de toxicidade destes compostos.

OBJETIVOS:

Este projeto visa sintetizar e avaliar o efeito de chalconas sobre os marcadores da doença de Alzheimer. A síntese é realizada pela condensação de Claisen-Schmidt e os efeitos são avaliados sobre: a acetilcolinesterase e outros marcadores da doença, sobre a formação de adutos Chalconas-GSH e Chalconas-BN (Bases nitrogenadas).

METODOLOGIA:

As chalconas são obtidas pela condensação de Claisen-Schmidt [1] entre o aldeído aromático com o substituinte apropriado e a acetofenona substituída, na proporção de 1:1. A reação ocorre utilizando hidróxido de sódio (NaOH) e metanol (MeOH) como solvente.

A mistura é mantida sob agitação magnética até que seja observada a formação de um precipitado, a chalcona. O produto (precipitado) obtido é posteriormente filtrado à vácuo em um funil de Büchner. Uma vez coletado o material será seco à temperatura e pressão ambiente.

Uma vez sintetizados são caracterizados por Espectrometria de Massa, Espectroscopia de Infravermelho e Ressonância Magnética Nuclear.

Os ensaios de citotoxicidade são realizados com as linhagens celulares M059J (células tumorais gliais humanas), Vero (células de rim de macaco) e 3T3 (fibroblasto de camundongo), e

Hep2 (hepatócito), na densidade de 1×10^5 céls/mL, por poço, em meio RPMI 1640. O procedimento já foi estabelecido em estudos prévios de nosso grupo de pesquisa em parceria com o Labiotec da Faculdade de Ciência letal para 50% das células, as concentrações são transformadas em mM e plotadas com os correspondentes percentuais de inibição. O cálculo é realizado no programa Origin 8.1

Para avaliar a reatividade das chalconas frente à GSH, mantemos sob agitação, à temperatura ambiente, o nucleófilo (GSH ou base nitrogenada) e a chalcona em acetonitrila ou DMF, e a reação é monitorada por Espectrometria de Massas e HPLC. No caso da reação com GSH, a atmosfera deverá ser trocada e mantida sob nitrogênio.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

No período de pesquisa, foram sintetizadas 26 chalconas diferentes por uma reação de condensação entre um aldeído aromático e uma acetofenona substituída. Os substituintes foram selecionados a partir da predição de propriedades estruturais e físico-químicas, considerando filtros moleculares utilizados no desenvolvimento de fármacos. Das chalconas sintetizadas, 5 foram selecionadas inicialmente para o início dos testes de atividade biológicas, uma vez que se encontravam em alto grau de pureza e os rendimentos de sua obtenção foram mais elevados que as demais.

Em algumas sínteses foi difícil purificar o produto, havendo muita perda no processo de recristalização, o que requer ajustes no procedimento.

A caracterização dos compostos obtidos é realizada através de análise por Infravermelho (IR) e Espectroscopia de Ressonância Magnética (RMN), executada com auxílio dos profissionais do Instituto de Química da UNICAMP

A predição de propriedades físico-químicas foi realizada, assim como algumas propriedades farmacocinéticas. Das 26 chalconas, 8 foram preditas não atravessar a Barreira Hematoencefálica e algumas também não atendem aos parâmetros druglikeness, exigindo uma futura otimização da estrutura.

As chalconas planejadas foram obtidas em rendimentos variando de 10 a 89%. Porém, apenas as chalconas **3**, **4**, **11**, **17** e **25** (Figura 1) combinaram um bom rendimento e alta pureza, sendo assim encaminhadas para os primeiros ensaios.

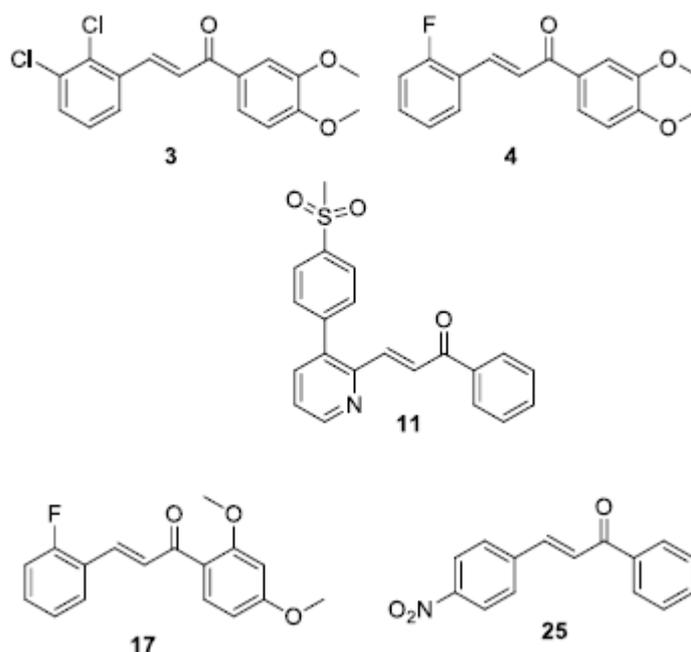


Figura 1. Estrutura das chalconas que apresentaram melhores resultados: 3 (85%); 4 (97%); 11 (32%); 17 (58%); 25 (82%).

No momento apenas três das chalconas foram avaliadas. Os percentuais de inibição obtidos, foram: chalcona **3** (79%); chalcona **4** (56%); chalcona **11** (não avaliada); chalcona **17** (81%) e chalcona **25** (>98%). A chalcona **25** teve o seu IC₅₀ calculado e foi encontrado o valor de 1,48 µM. O ensaio da chalcona **11** requerer a obtenção de mais material, pois a reação foi feita com pouca quantidade e foi utilizada para caracterização.

PREDIÇÃO DE PROPRIEDADES MOLECULARES, FÍSICO-QUÍMICAS E FARMACOCINÉTICAS

Em um primeiro momento, analisamos as propriedades moleculares que foram: fórmula molecular, peso molecular, número de ligações rotacionáveis (LR), número de aceptores e doadores de ligações de hidrogênio, refratividade molar (RM) e a área de superfície polar (TPSA). Também foram analisados os números de grupos aceptores e doadores de ligações de hidrogênio, logo porque muitas ligações de hidrogênio farão com que o fármaco não seja absorvido do intestino para o sangue. Uma exceção a esta regra são os açúcares e moléculas polares que atravessam membranas com o auxílio de transportadores.

A refratividade molar (RM) é uma propriedade ligada à polarizabilidade e estrutura tridimensional da molécula e seu encaixe no receptor [2]. Área de superfície polar (TPS) ou área de superfície polar topológica (TPSA) de uma molécula é a soma da superfície de todos os átomos ou moléculas polares, principalmente oxigênio e nitrogênio, incluindo também os átomos de hidrogênio ligados a eles. Esse parâmetro é importante na química medicinal, pois é utilizado para a otimização da capacidade de um fármaco de permear células. Moléculas com uma área superior a 140 Å² tendem a não serem bons candidatos.

O Log P e a solubilidade, que são parâmetros físico-químicos, também foram analisados. O Log P é uma medida da lipofilicidade da substância, é definido como a razão da concentração do mesmo, no

equilíbrio, após dissolução em um sistema de duas fases, formadas por dois solventes imiscíveis, exemplo: água e octanol [3]. O aumento do Log P é diretamente proporcional a uma maior interação da enzima com seu receptor, maior afinidade com enzimas metabólicas, melhor absorção por membranas e ligação às proteínas plasmáticas. Contudo, o aumento do valor do Log P é inversamente proporcional à solubilidade.

O parâmetro seguinte analisado foi a solubilidade. Embora seja O programa utilizou o Log S para interpretar os valores para a solubilidade de cada composto. Para os novos fármacos de uso oral, a primeira grande barreira a ser vencida é a biodisponibilidade, pois além de uma série de requisitos quanto aos fatores biológicos e físico-químicos, existem os parâmetros farmacocinéticos, como absorção, distribuição, metabolismo e excreção, que necessariamente precisam ser levados em consideração. Como condição para se ter uma boa absorção. Assim, características como as explicadas acima, como solubilidade e lipofilicidade, são extremamente importantes, assim como, ligação a proteínas e distribuição em diferentes tecidos, como o sistema nervoso central, que é o tecido alvo relacionado a este projeto [4].

Os resultados se encontram na tabela 1.

Lipinski e colaboradores desenvolveram a regra dos Cinco (Rule of Five), que ficou conhecida por fazer uma abordagem teórica dos parâmetros farmacocinéticos, identificando parâmetros que possam dificultar uma boa biodisponibilidade oral [5]. Outros filtros complementam o de Lipinski: Veber [6], Ghose [7], e Egan [8]. O apêndice A mostra estes parâmetros.

Os descritores totais neste trabalho foram: peso molecular ($200 \leq PM \leq 600$); Log P ($-2 \leq \text{Log P} \leq 5$); Área de superfície polar ($ASP \leq 150$); número de anéis (≤ 7); número de átomos de carbono (> 4); número de átomos de heteroátomos (> 1); número de ligações rotacionáveis ($NLR \leq 15$); número de aceptores de ligação de hidrogênio ($NALH \leq 10$); número de doadores de ligação de hidrogênio ($NDLH \leq 5$). Em resumo, esses parâmetros surgiram objetivando uma procura mais rápida e prática de possíveis fármacos com uma maior biodisponibilidade oral.

Compostos	PM (g/mol)	Lig. Rotacionáveis	HBA	HBD	RM	PSA	Log P (Consenso)
3	337,20	5	3	0	89,25	35,53	4,41
4	286,30	5	4	0	79,19	35,53	3,67
11	363,43	5	4	0	102,57	72,48	3,61
17	286,30	5	4	0	79,19	35,53	3,64
25	368,94	6	3	0	75,07	62,89	2,67

Tabela 1. Predição de Propriedades estruturais e físico-químicas dos compostos sintetizados

CONCLUSÕES:

Em relação à produção científica, o projeto precisa ser continuado por outro estudante face à minha dedicação aos estágios profissionais obrigatórios. Assim, os resultados obtidos até o momento

podem ser utilizados futuramente. Por fim, atesto que o projeto tem contribuído para meu desempenho acadêmico, seja em disciplinas que fazem uso do conteúdo utilizado no campo em que a pesquisa tem sido realizada, e no próprio meio acadêmico em si, permitindo que um maior entendimento e aprofundamento no meio científico e em seu funcionamento como um todo.

BIBLIOGRAFIA:

- [1] Claisen, L.; Claparède, A. Condensationen von Ketonen mit Aldehyden. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 1881, 14, 2460–2468. <https://doi.org/10.1002/cber.188101402192>.
- [2] Tavares, LC. QSAR: A Abordagem de Hansch. *Quim Nova* 2004, 27, 631-639. Doi <https://doi.org/10.1590/S0100-40422004000400018>
- [3] Bannan, CC., Calabró, G., Kyu, DY., Mobley, DL. Calculating partition coefficients of small molecules in octanol/water and cyclohexane/water. *J Chem Theo Comp* 2018, 12, 4015–4024. Doi <https://doi.org/10.1021/ct900214y>
- [4] Hou, T.; Wang, J.; Zhang, W.; Xu, X. ADME Evaluation in Drug Discovery. 7. Prediction of Oral Absorption by Correlation and Classification. *J Chem Inf Model* 2007, 47, 208-218. Doi [10.1021/ci600343x](https://doi.org/10.1021/ci600343x)
- [5] Lipinski, CA. Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discov Today: Technol* 2004, 1, 337-341. Doi [10.1016/j.ddtec.2004.11.007](https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2004.11.007)
- [6] Veber, DF; Johnson, RS; Cheng, H-Y; Smith, BR; Ward, KW; Kopple, KD. Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. *J Med Chem* 2002, 45, 2615-2623
- [7] Ghose, AK.; Viswanadhan, VN.; Wendoloski, JJ. A Knowledge-Based Approach in e. signing Combinatorial or Medicinal Chemistry Libraries for Drug Discovery. 1. A Qualitative and Quantitative Characterization of Known Drug Databases. *J Comb Chem* 1999, 1, 55-68. Doi [10.1021/jm020017n](https://doi.org/10.1021/jm020017n)
- [8] Egan, WJ; Merz, Jr., KM; Baldwin, JJ. Prediction of Drug Absorption Using Multivariate Statistics. *J Med Chem* 2000, 43, 3867-3877. Doi [10.1021/jm000292e](https://doi.org/10.1021/jm000292e)

APÊNDICE A:

1. Lipinski: PM (é necessário que seja menor que < 500 g/mol), Log P (< 5), a quantidade de doadores de H em interações de hidrogênio (IH) (< 5), a quantidade de aceptores de H em IH (< 10).
2. Ghose: $-0,4 \leq \log P \leq 5,6$, com um valor médio de 2,52; $160 \leq PM \leq 480$, com um valor médio de 357; $40 \leq RM \leq 130$, com um valor médio de 97; $20 \leq NTA \leq 70$, com um valor médio de 48.
3. Veber: o número de ligações rotacionáveis (≤ 10) e a área de superfície polar ($\leq 140 \text{ \AA}^2$)
4. Egan: Log P ($\leq 5,88$) e da área de superfície polar ($\leq 131,6$).