



# Reposicionamento de fármacos: efeito do Nebivolol sobre marcadores da Doença de Alzheimer

**Palavras-Chave:** Doença de Alzheimer, Reposicionamento de fármacos, Nebivolol

**Autores(as):**

**Beatriz Moura Oliveira, FCF – PUCCamp**

**Prof<sup>(a)</sup>. Dr<sup>(a)</sup>. Wanda Pereira Almeida (orientadora), FCF - UNICAMP**

---

## INTRODUÇÃO:

A Doença de Alzheimer é uma demência neurodegenerativa, que mais acomete a população idosa, sendo caracterizada pela perda progressiva de neurônios, o que por sua vez interfere no funcionamento normal do sistema nervoso [1]. Apesar da gravidade da doença, o arsenal terapêutico é bastante limitado e a necessidade de novos fármacos é premente [2].

O tempo necessário para a aprovação e colocação de um novo medicamento no mercado é bastante elevado, o que tem estimulado a pesquisa de fármacos que possam ser reposicionados para um novo uso. O reposicionamento passa pela seleção de um fármaco em uso, que sofrerá uma análise experimental, valendo-se de estudos *in silico*, como docking molecular frente a um alvo postulado, ou até mesmo uma triagem inicial. Essa análise também inclui a observação de efeitos colaterais do uso do medicamento [3]. Assim, essa estratégia é interessante para a identificação de candidatos a fármacos para o tratamento da Doença de Alzheimer [4].

Wang e colaboradores [5] realizaram estudos *in vivo*, mostrando que o nebivolol, um fármaco indicado no tratamento da hipertensão, é capaz de modular a neuropatologia amiloide em modelos de camundongos Tg2579, um modelo animal para estudo da doença de Alzheimer.

Estimulados por esta observação, propusemos estudar neste projeto, o efeito antioxidante e anticolinesterásico do nebivolol.

## METODOLOGIA:

### Método de isolamento do nebivolol:

O nebivolol foi adquirido em farmácia, na forma de comprimidos, na dose de 5 mg. Os comprimidos de nebivolol foram triturados, e para extração foi utilizando acetona, como solvente orgânico polar (Figura 1). A mistura foi submetida à agitação magnética a 700 rpm durante 30 minutos. Após esse procedimento, a mistura passou por um processo de filtração simples e remoção do solvente por evaporação em rotaevaporador. Após secagem à temperatura ambiente. O sólido obtido foi mantido em dessecador até o momento de uso.

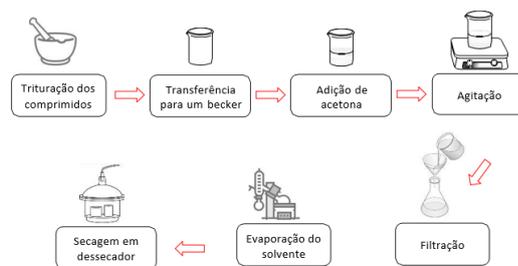


Figura 1 Etapas envolvidas na obtenção do neбиволол a partir do medicamento.

### **Método de avaliação da atividade antioxidante do neбиволол:**

A capacidade antioxidante do neбиволол foi analisada pelo método DPPH (hidrato de 2,2-difenil-2-picrihidrazil), o objetivo é avaliar a capacidade de um composto em sequestrar radicais livres. O DPPH é um radical de nitrogênio orgânico de cor violeta, quando na presença de um composto antioxidante, capaz de doar hidrogênio ou elétron, ocorrendo a redução do DPPH e por sua vez a mudança da cor violeta para amarelo claro (Figura 2) [6].

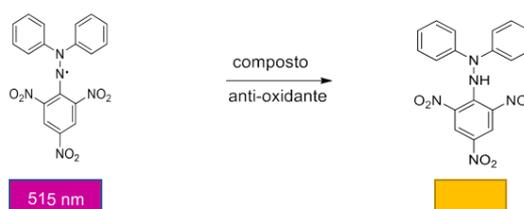


Figura 2 Redução do composto DPPH, por uma substância com atividade anti-oxidante.

A solução de DPPH foi preparada em etanol na concentração de 1.000  $\mu\text{M}$  e no dia do ensaio foi diluída a 60  $\mu\text{M}$ . Como controle positivo, foi preparada uma solução de ácido ascórbico em água Milli-Q na concentração 2.000  $\mu\text{M}$ .

O composto-teste corresponde ao neбиволол, que foi utilizado na concentração de 2.000  $\mu\text{M}$  em etanol. Após o preparo das soluções, elas foram adicionadas em uma placa de 96 poços transparente, e então analisadas em espectrofotômetro UV/Vis com leitor de placas. A leitura foi realizada no comprimento de onda de 515 nm em tempo 0 e 10 minutos (Figura 3).

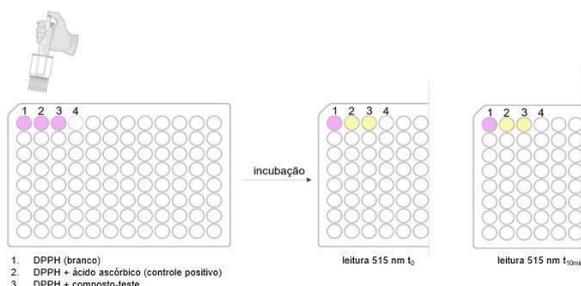


Figura 3 Esquema de preparo da placa de 96 poços para análise da atividade anti-oxidante.

### **Método de inibição da AChE:**

A inibição da AChE será analisada pelo método de Ellman, que é um método colorimétrico [7]. Esse método consiste em avaliar a atividade enzimática através da taxa de hidrólise da acetilcolina pela AChE, liberando tiocolina. Na presença do ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) ocorre uma reação com a tiocolina, gerando um ânion de coloração amarela que pode ser quantificada em espectrofotômetro em 415 nm (Figura 4) [3; 4]

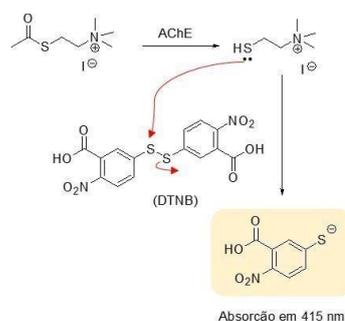


Figura 4. Esquema da reação entre o DTNB e o produto da hidrólise do iodeto de acetilcolina pela AChE, mostrando o produto em amarelo.

A enzima acetilcolinesterase, adquirida na Sigma Aldrich Brasil, e oriunda de peixe elétrico, foi ressuspensa utilizando tampão Tris/HCl pH 8,0 sendo diluída até uma concentração de 10 unidades/mL, e no dia do ensaio diluída a uma concentração de 1 unidade/mL. O DTNB, mais conhecido como reagente de Ellman, foi preparado utilizando do tampão fosfato de potássio pH 7,5; para obter a solução em concentração de 10 mM.

Como substrato, tem-se a solução de iodeto de acetilcolina (ATC), que foi preparada com água Milli-Q chegando à concentração de 36,64 mM.

Como controle positivo, foi utilizado a tacrina, que é um fármaco inibidor reversível da AChE, essa foi preparada com água Milli-Q, para se chegar à concentração de 0,25 mM. Além disso, é necessário o preparo do composto- teste, portanto, após a extração do neбиволol é necessário acrescentar etanol, para obter a concentração de 1 mM.

Após o preparo de cada uma das soluções, elas foram adicionadas em uma placa de 96 poços transparente com o auxílio de uma micropipeta (Figura 5), e então levada para análise em espectrofotômetro UV/Vis com leitor de placas. A leitura foi realizada no comprimento de onda de 415 nm em 0 e 5 minutos. A análise foi realizada em triplicata e os resultados expressos em porcentagem de inibição.

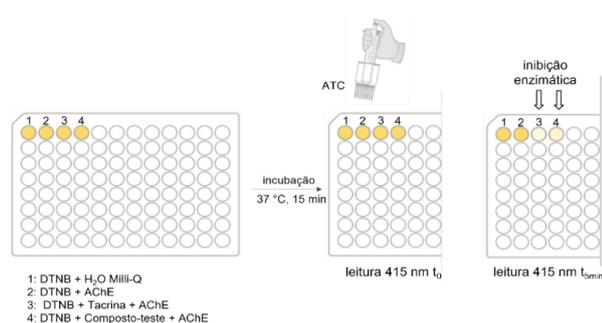


Figura 5 Esquema de preparo da placa de 96 poços para análise da inibição da AChE. Imagem cedida pelo Mestre Matheus Ziviani Pagnan, formado em nosso grupo de pesquisa, Instituto de Química, Unicamp – 2023.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO:

### Atividade antioxidante:

Os resultados obtidos pela análise no espectrofotômetro UV/Vis com leitor de placas no tempo 0, após incubação de 30 minutos:

Tabela 1 Absorbâncias no tempo 0

Amostra	Absorbância (nm)
Branco	0,642
Controle positivo	0,053
Composto-teste	0,594

Já no tempo 10 minutos:

Tabela 2 Absorbância no tempo 10 minutos

Amostra	Absorbância (nm)
Branco	0,600
Controle positivo	0,054
Composto-teste	0,592

Com os resultados obtidos foi possível realizar o cálculo da porcentagem de sequestro de radicais livres (%SRL) através da equação:

$$\%SRL = \frac{A_B - A_{Ct}}{A_B} \times 100$$

Onde:  $A_B$  = absorção inicial do branco – absorção final do branco

$A_{Ct}$  = absorção inicial do composto-teste – absorção final do composto-teste

Portanto, a %SRL para o controle positivo foi de 97,61% e para o composto-teste foi de 95,23%. Com isso, pode-se concluir que o nebilolol apresenta uma capacidade antioxidante significativa.

### **Inibição da AChE:**

A média dos resultados obtidos pela análise no espectrofotômetro UV/Vis com leitor de placas no tempo 0, após incubação de 15 minutos:

Amostra	Absorbância (nm)
Branco	1,704
Controle negativo	1,711
Controle positivo	1,701
Composto-teste	1,869

Já no tempo 5 minutos:

Amostra	Absorbância (nm)
Branco	1,711
Controle negativo	1,861
Controle positivo	1,749
Composto-teste	1,845

Com os resultados obtidos foi possível realizar o cálculo da porcentagem de inibição da AChE através da equação:

$$\frac{(\Delta_{\text{controle negativo}} - \Delta_{\text{composto-teste}})}{\Delta_{\text{controlenegativo}}} \times 100$$

Portanto, a % de inibição da AChE pelo neбиволол foi de 83,22%. Com isso, pode-se concluir que o neбиволол apresenta uma capacidade de inibição significativa.

## CONCLUSÕES:

Neste período foi possível obter o neбиволол a partir de comprimidos de 5 mg. Esta etapa foi muito demorada, pois tivemos muita dificuldade em selecionar o melhor solvente, sendo que água deionizada (pelo neбиволол ser um cloridrato), etanol, acetato de etila e acetona foram investigados. A acetona apresentou o melhor resultado, com cerca de 80% de neбиволол a partir da extração de um total de 10 comprimidos (por cartela).

Na sequência, foi avaliado frente à atividade anti-oxidante, e anticolinesterase. O neбиволол apresentou % SRL de aproximadamente 95%.

No ensaio de inibição da acetilcolinesterase, o neбиволол apresentou % de inibição da AChE de aproximadamente 83%, demonstrando uma capacidade de inibição da AChE.

---

## BIBLIOGRAFIA

- [1] Caetano, LA; Silva, O; Santos, F; Silveira, CAB. Alzheimer sintomas e grupos: uma revisão integrativa. Revista do Nesme, [S.L.], 2017, 14, 84-93, Disponível em: <http://pepsic.bvsalud.org/pdf/vinculo/v14n2/v14n2a10.pdf>.
- [2] Alzheimer's Association. Alzheimer's disease facts and figures. Alzheimer's Dement 18 (2022) 700-789. <http://www.10.1002/alz.12638>.
- [3] Cavalla, D. Predictive methods in drug repurposing: gold mine or just a bigger haystack? Drug Discovery Today, 2013, 18, 523-532. Doi: <http://www.0.1016/j.drudis.2012.12.009>.
- [4] Ballard, C.; et.al. Drug repositioning for Alzheimer's disease. Nat Rev Drug Discov 2012, 11, 833-846. Doi: <http://www.OI: 10.1038/nrd3869>.
- [5] Wang, J.; Wright, HM.; Vempati, P.; Li, H.; Wangsa, J.; Ho, L.; Knable, LA.; Dzhan, A.; Habbu, K.; Pasinetti, GM. Investigation of Nebivolol as a Novel Therapeutic Agent for the Treatment of Alzheimer's Disease. J Alzheimer Dis 2013, [S. I.], 33, 1147-1156. Doi: <10.3233/JAD-2012-120904>.
- [6] Bonda, DJ.; Wang, X; Perry, G; Nunomura, A; Tabaton, M.; Zhu, X.; Smith, MA. Oxidative stress in Alzheimer disease: A possibility for prevention. Neuropharmacology 2010, 59, 290-294. Doi: <10.1016/j.neuropharm.2010.04.005>.
- [7] Ellman, GL.; Courtney, KD.; Andre Jr., V.; Featherstone, RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, Biochemical Pharmacology, 1961, 7, 88-95. Doi: [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9).