

SÍNTESE DE SAIS DE AMÔNIO QUATERNÁRIO E AVALIAÇÃO DE SUAS ATIVIDADES INIBITÓRIAS SOBRE A ENZIMA ACETILCOLINESTERASE

Diesey Elen S. Perin^{1*}, Murilo K. A. Yonekawa², Giovanna F.C. de Azevedo³, Arthur dos S. Montanholi⁴, Jeandre A. S. Jaques⁵, Edson dos A. dos Santos⁶

1. Estudante da Fac. de C. Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição (FACFAN-UFMS)

2. Doutorando do Instituto de Química da UFMS

3. Estudante da Fac. de C. Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição (FACFAN-UFMS)

4. Mestrando do Instituto de Química da UFMS

5. Professor do INBIO-UFMS - Laboratório de Bioquímica

6. Professor do INBIO-UFMS - Laboratório de Bioquímica/Orientador

Resumo

A doença de Alzheimer (DA) é considerada a demência de maior ocorrência em todo o mundo em pessoas idosas. A DA leva a deficiência de neurotransmissores, principalmente a acetilcolina (ACh). Um dos alvos terapêuticos para o tratamento da DA são os inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE). No entanto, os fármacos atuais possuem problemas de toxicidade e de baixa biodisponibilidade. Considerando a importância de buscar novas estruturas para estudos sobre a inibição da AChE, realizamos a síntese de dois sais de amônio quaternários: os cloridratos de 2- (1c) e 4-[[[(dimetilcarbamoil)oxi]metil]-N,N,N-trimetilanilínio (2c), obtidos com rendimentos de 36 e 56 %, respectivamente. Os resultados da análise *in vitro* da atividade inibitória destes compostos sobre a AChE mostraram que ambos foram inativos. Estes resultados mostraram que apenas a inserção de uma carga positiva no grupo amino não foi suficiente para que os compostos exibissem uma atividade anticolinesterásica.

Autorização legal: O trabalho foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMS registrada com o nº 757/2016.

Palavras-chave: Doença de Alzheimer; neurotransmissores; acetilcolina.

Apoio financeiro: O presente trabalho foi realizado com apoio financeiro da FUNDECT-MS e do CNPq e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Introdução

A Doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa, considerada a demência de maior ocorrência em todo o mundo, levando ao progressivo declínio funcional, comportamental, mental e até mesmo da capacidade de realização de tarefas simples do cotidiano¹⁻³. Na DA ocorre a deficiência de neurotransmissores que são responsáveis pela transmissão dos estímulos nervosos de um neurônio a outro, principalmente a acetilcolina (ACh), envolvida diretamente nos processos motores, cognitivos e de memória. Apesar da DA não ter cura, o uso de inibidores da acetilcolinesterase (AChEis) proporciona um grande avanço no tratamento desta doença⁴. Os atuais AChEis utilizados no tratamento da DA impedem a degradação do neurotransmissor ACh e, assim, aumentam a neurotransmissão colinérgica nas regiões encefálicas⁴. Todos os inibidores da acetilcolinesterase (AChE) possuem problemas, como a baixa biodisponibilidade, curta duração da ação biológica, efeitos terapêuticos estreitos e a alta toxicidade².

Alguns sais de amônio quaternário possuem ação inibitória da AChE e são de grande importância na aplicação na medicina como compostos farmacologicamente ativos⁵. Destacando-se, a piridostigmina e a neostigmina (**Figura 1**), ambas possuem ação anticolinesterásica e são utilizados no tratamento da miastenia gravis, uma doença que causa distúrbios crônicos neuromusculares⁶. Características estruturais destes compostos com o neurotransmissor ACh (**Figura 1**), como o nitrogênio catiônico são importantes para a interação destes inibidores com resíduos de aminoácidos aniônicos do sítio catalítico da AChE⁷.

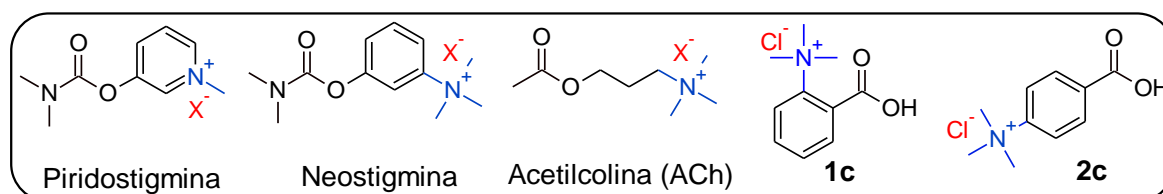


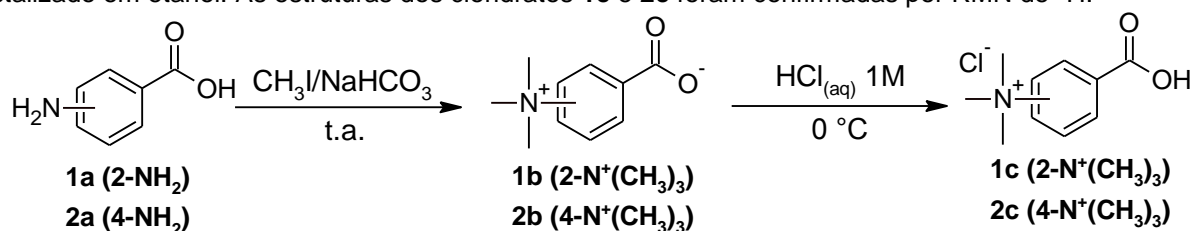
Figura 1. Estruturas da piridostigmina, neostigmina, acetilcolina (ACh), onde X⁻ representa um ânion e dos cloridratos de 2-[[[(dimetilcarbamoil)oxi]metil]-N,N,N-trimetilanilínio (1c) e 4-[[[(dimetilcarbamoil)oxi]metil]-N,N,N-trimetilanilínio (2c) com destaque o grupo sal de amônio quaternário (azul).

Tendo em vista a importância destes aspectos estruturais para a ação biológica destes compostos, a busca por novos inibidores da AChE é de grande importância para descoberta de novos fármacos. Assim, propomos a síntese e análise do potencial anticolinesterásico de dois sais de amônio quaternários, os compostos **1c** e **2c**, cujas atividades anticolinesterásicas são desconhecidas (**Figura 1**).

Metodologia

Os ácidos 2- e 4-aminobenzóicos foram obtidos comercialmente (Sigma-Aldrich®). Foram realizadas análises cromatográficas em camada delgada (CCD), utilizando cromatofolhas de alumínio sílica gel 60 F254 (Macharey-Nagel). As purificações dos produtos foram realizadas em CCD preparativa de sílica gel 60 F254. Os espectros de RMN de ^1H foram realizados em equipamento 300 e 75 MHz, aparelho da marca Bruker® AVANCE DPX-300. Os deslocamentos químicos (δ) foram registrados em ppm e as constantes de acoplamento em hertz (Hz), o tetrametilsilano (TMS) foi usado como padrão de referência interno para deslocamento químico (δ) em soluções de DMSO-d_6 .

Os cloridratos **1c** e **2c** foram sintetizados através das reações descritas no **Esquema 1**, onde iniciou-se com a reação de *N*-metilação das aminas **1a** e **2a** com CH_3I na presença de NaHCO_3 , a reação ocorreu a temperatura ambiente (t.a.) por 24 h, sendo acompanhada por CCD. A mistura foi filtrada e seca a pressão reduzida. Os produtos foram purificados por CCD preparativa. Em seguida, os produtos *N*-metilados foram submetidos à formação dos seus respectivos cloridratos, para isso utilizou-se uma solução aquosa de HCl 1 M, que foi gotejada na mistura reacional a 0°C até $\text{pH} = 3$. A mistura foi seca a pressão reduzida e o produto foi recristalizado em etanol. As estruturas dos cloridratos **1c** e **2c** foram confirmadas por RMN de ^1H .



Esquema 1. Reações para a obtenção dos cloridratos de 2- (**1c**) e 4-[[dimetilcarbamila]oxi]metil-N,N,N-trimetilanilínio (**2c**).

O trabalho foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMS registrada com o n° 757/2016. Os animais utilizados nos experimentos serão ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) adultos (150-200 g) provenientes do Biotério Central da UFMS. Utilizou-se 8 animais no total para a execução deste plano de trabalho. Para a eutanásia e o preparo das estruturas encefálicas foi seguido a metodologia descrita por Jaques e colaboradores (2012)⁸. Então, as estruturas encefálicas foram homogeneizadas em tampão Tris-HCl 10 mM (pH 7,2) e centrifugadas a 1000 g por 15 min, o sobrenadante foi utilizado para os ensaios de inibição da AChE. O material biológico não aproveitado foi desprezado de acordo com as normas de biossegurança.

Para o ensaio de inibição da atividade da AChE, utilizou-se o método de Ellman com modificações⁹. A atividade foi expressa em μmol de AcSCh/h/mg de proteína. O efeito do composto sobre a atividade da AChE do encéfalo foi investigado nas concentrações de 0,1, 1,0, 10 e 100, e 1.000 μM . Os resultados obtidos foram analisados através da análise de variância de uma via (one-way ANOVA) seguida pelo teste post hoc de Dunnett. Os resultados foram considerados significativos quando $P \leq 0,05$.

Resultados e Discussão

Os rendimentos obtidos dos cloridratos **1c** e **2c** após os processos de purificação foram de 36 e 56 %, respectivamente (**Tabela 1**). Acredita-se que o baixo rendimento dos produtos, se deve ao processo de metilação realizado anteriormente, devido ao efeito retirador de elétrons através de ressonância do grupo carboxila (*orto* ou *para*) que afeta a disponibilidade dos pares de elétrons do nitrogênio, fator importante para a reação de *N*-metilação¹⁰.

Tabela 1. Resultado das reações para obtenção dos cloridratos dos sais de amônio **1c** e **2c**.

Amina aromática	Cloridrato obtido	Rendimento do cloridrato
		36 %
		56 %

Os resultados obtidos para o ensaio *in vitro* de inibição da atividade de AChE dos cloridratos **1c** e **2c** são mostrados na **Figura 2**. Nas concentrações testadas, ambos os cloridratos não exibiram inibição da atividade da AChE quando comparadas ao ensaio controle (H₂O). Acreditamos que apenas a inserção de uma carga positiva no grupo amino não foi suficiente para que os compostos expressar uma atividade inibitória significativa, apesar de ser um importante grupo para interação com a cadeia lateral de resíduos de aminoácidos aniônicos presentes no sítio ativo da AChE¹¹. No entanto, sais de amônio quaternário exibem excelentes atividades anticolinesterásicas, como a própria neostigmina⁶. Porém, quando analisamos a estrutura da neostigmina (**Figura 1**), além da presença do sal de amônio quaternário, podemos observar a presença de um grupo carbamato, essencial para interação com os resíduos de aminoácidos responsáveis pela hidrólise da ACh no sítio catalítico, como a serina⁶.

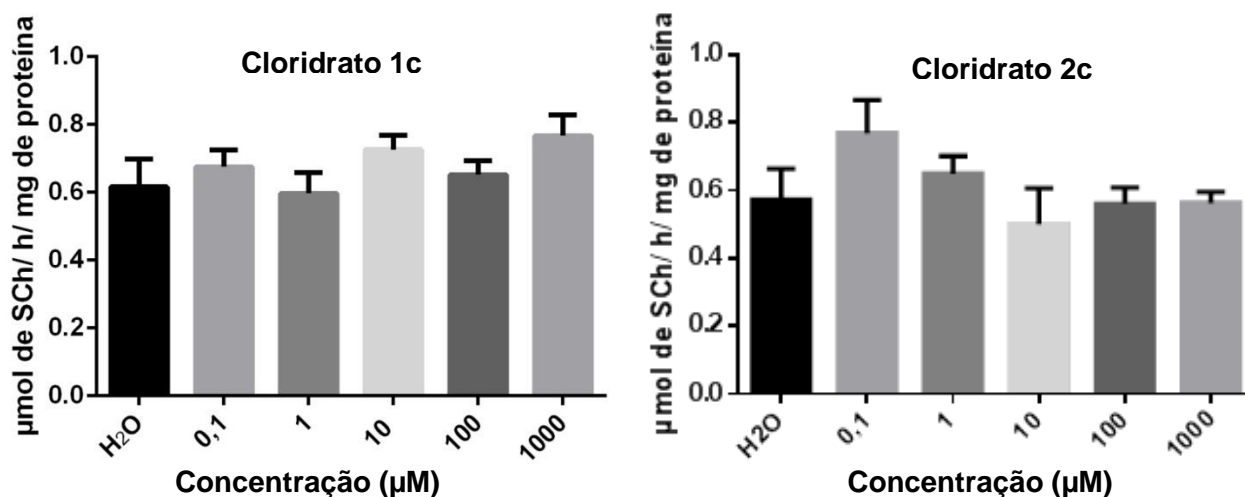


Figura 4. Resultado do ensaio *in vitro* de inibição da atividade de AChE na presença de diferentes concentrações dos cloridratos de 2- (**1c**) e 4-carboxi-*N,N,N*-trimetilaniônio (**2c**); (n = 4). As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Todos os dados foram expressos como média \pm S.E.M.

Conclusões

Foram obtidos os cloridratos de 2-[[dimetilcarbamoil]oxi]metil-*N,N,N*-trimetilaniônio (**1c**) e de 4-[[dimetilcarbamoil]oxi]metil-*N,N,N*-trimetilaniônio (**2c**), no entanto, estes compostos foram inativos quanto a inibição da AChE. Mostrando que a presença de uma carga positiva na molécula não foi suficiente para que os compostos exibissem atividade anticolinesterásica, sendo necessária talvez, a presença de grupos como o carbamato para auxiliar nesta atividade.

Referências bibliográficas

- Anand, R.; Gill, K. D.; Mahdi, A. A. Therapeutics of Alzheimer's disease: Past, present and future. **Neuropharmacology**, v. 76, p. 27–50, 2014.
- Kia, Y.; Osman, H.; Kumar, R. S.; Murugaiyah, V.; Basiri, A.; Perumal, S.; Wahab, H. A.; Bing, C. S. Synthesis and discovery of novel piperidone-grafted mono- and bis-spirooxindole-hexahydropyrrolizines as potent cholinesterase inhibitors. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 7, p. 1696–1707, 2013.
- Kumar, A.; Singh, A.; Ekavali. A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: An update. **Pharmacological Reports**, v. 67, n. 2, p. 195–203, 2015.
- Silva, T.; Reis, J.; Teixeira, J.; Borges, F.. Alzheimer's disease, enzyme targets and drug discovery struggles: From natural products to drug prototypes. **Ageing Research Reviews**, v. 15, n. 1, p. 116–145, 2014.
- Nair, V. P.; Hunter, J. M.; Chb, M. B. Anticholinesterases and anticholinergic drugs. **Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain**, v. 4, n. 5, p. 164–168, 2004.
- Yamazaki, D. A. S.; Cândido, A. A.; Bagatin, M. C.; Machinski Jr., M.; Mossini, S. A. G.; Pontes, R. M.; Rosa, F. A.; Bassoa, E. A.; Gauze, G. F. Cholinesterases Inhibition by Novel cis- and trans-3-Arylamino-cyclohexyl *N,N*-Dimethylcarbamates: Biological Evaluation and Molecular Modeling. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 9, p. 1616–1625, 2016.
- Soreq, H.; Seidman, S. Acetylcholinesterase — new roles for an old actor. **Nature**. v. 2, n. April, p. 294–302, 2001.

8. Jaques, J.A.S.; Rezer, J. F. P.; Carvalho, F. B.; Rosa, M. M.; Gutierrez, J. M.; Gonçalves, J. F.; Schmatz, R.; Bairros, A. V.; Mazzanti, C. M.; Rubin, M. A.; Schetinger, M. R. C.; Leal, D. B. R. **Physiology & Behavior**, v. 106, p. 664-669, 2012.
9. Dingova, D.; Leroy, J.; Check, A.; Garaj, V.; Krejci, E.; Hrabovska, A. Optimal detection of cholinesterase activity in biological samples: Modifications to the standard Ellman's assay. **Analytical Biochemistry**, v. 462, p. 67–75, 2014.
10. Clayden, J.; Greeves, N.; Warren, S. **Organic Chemistry**, 2nd. ed. Oxford University Press, Oxford, 2012.
11. Komloova, M.; Musilek, K.; Dolezal, M.; Gunn-Moore, F.; Kuca, K.. Structure-Activity Relationship of Quaternary Acetylcholinesterase Inhibitors –Outlook for Early Myasthenia Gravis Treatment. **Current Medicinal Chemistry**, V. 17, P. 1810-1824, 2010.