

SÍNTESE DE L-BETAÍNAS ESTERIFICADAS DERIVADAS DO L-TRIPTOFANO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INIBITÓRIA SOBRE ACETILCOLINESTERASE

Murilo K. A. Yonekawa^{1*}, Amanda Dal'Ongaro Rodrigues¹, Arthur S. Montanholi¹, Diesey E. S. Perin², Giovanna F. C. De Azevedo², Jeandre A. S. Jaques³, Edson dos A. dos Santos⁴,

1. Aluno do programa de Pós Graduação em Química - UFMS.
2. Estudante da Fac. de C. Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição (FACFAN) - UFMS.
3. Professor do Instituto de Biociências (INBIO) – UFMS.
4. Professor do Instituto de Biociências (INBIO) - UFMS – Orientador.

Resumo

A doença de Alzheimer (DA) é considerada a demência mais prevalente em todo o mundo nos idosos. O que torna a busca por alternativas terapêuticas importante. Nesse trabalho objetivou sintetizar betaínas esterificadas e investigar sua atividade inibitória sobre a acetilcolinesterase (AChE). Os ésteres foram obtidos através de reações de esterificação com álcoois de cadeias alquílicas, ramificadas, benzílica e cíclica na presença de cloreto de tionila, onde apresentaram rendimentos entre 52 a 77%. Estes ésteres foram submetidos à reação de *N*-metilação na presença de iodeto de metila em meio básico para obtenção das betaínas esterificadas, nas quais apresentaram rendimentos entre 30 a 49 %. Os ensaios da atividade inibitória da AChE foram realizados com amostras de encéfalo de ratos Wistar, onde apenas os ésteres etílico, *n*-butílico e isopropílico apresentaram atividade inibitória da AChE, já as betaínas esterificadas não apresentaram inibição sobre a AChE.

Autorização legal: O experimento científico com animais foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) da UFMS registrado sob o nº. 757/2016.

Palavras-chave: Doença de Alzheimer, Colinesterase, Hipaforina.

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

Doenças Neurodegenerativas (DN) causam destruição progressiva e irreversível de neurônios, presentes no sistema nervoso central (SNC). Uma das principais DN com maior incidência dentre os casos é a doença de Alzheimer (DA)¹. A DA leva a deficiência de neurotransmissores, como a acetilcolina (ACh), responsável por estímulos nervosos. Apesar de não haver a cura para a DA, são utilizados como tratamento inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE), que impedem a hidrólise da ACh, aumentando os níveis da neurotransmissão colinérgica no encéfalo. Os fármacos utilizados para o tratamento da doença apresentam baixa disponibilidade e muitos efeitos colaterais. Diante deste fato, existe uma busca por estruturas promissoras para o desenvolvimento de novos fármacos que sejam mais específicos e apresentem menores efeitos tóxicos^{2,3}.

Betaínas derivadas do aminoácido triptofano, como a L-hipaforina, um alcaloide indol natural encontrado em plantas do gênero *Erythrina* (Leguminosae), tem efeitos no sistema nervoso central. Onde, a L-hipaforina é capaz de inibir a atividade da AChE em regiões específicas do cérebro, como cerebelo⁴. Estudos envolvendo a esterificação de ácidos carboxílicos, relataram um aumento na atividade inibitória da AChE⁵. Observando a estrutura da L-hipaforina (**Figura 1**), podemos notar a presença de uma carboxila, e portanto, a inserção do grupamento éster, possibilitaria uma maior aproximação estrutural com as funções do substrato da AChE, ou seja, com a ACh (**Figura 1**). Neste trabalho sintetizamos ésteres do L-triptofano e L-betaínas esterificadas e avaliamos o potencial destes compostos quanto a inibição da AChE.

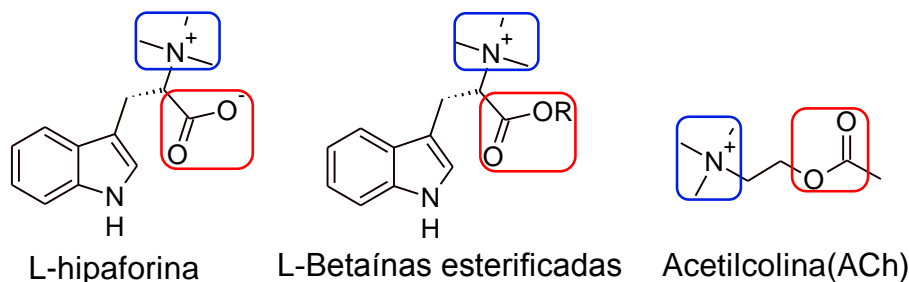
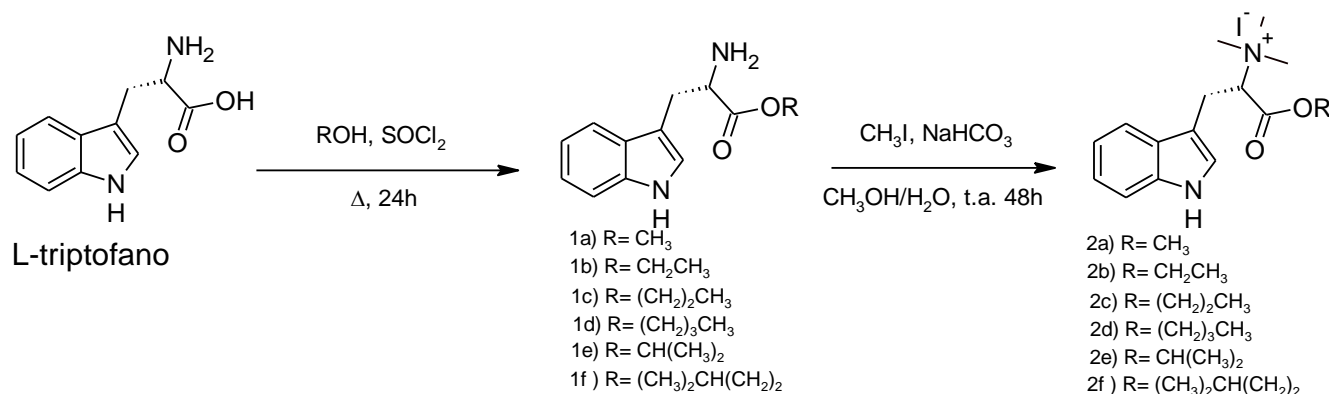


Figura 1. Semelhança estrutural de protótipos a inibidores da AChE com a ACh. Destaque em azul para o grupo sal de amônio quaternário e em vermelho para o grupo carboxila.

Metodologia

As esterificações do L-triptofano foram realizadas de acordo com a metodologia de SONG (2014)⁶ e HOSANGADI (1996)⁷, que consiste no refluxo do ácido carboxílico com os álcoois correspondentes, na presença de cloreto de tionila (**Esquema 1**). O L-triptofano foi adquirido comercialmente (Sigma-Aldrich ®) e os álcoois utilizados foram: metílico, etílico, isopropílico, n-butilico, propílico e isoamílico. Após o processo de esterificação em meio ácido, foi realizado o processo de *N*-metilação dos ésteres **1a** a **1f**. A *N*-metilação dos ésteres **1a-1f** foi realizada conforme metodologia já descrita na literatura⁸, que consiste em uma reação de substituição nucleofílica, utilizando iodo metano (CH₃I) em meio básico a temperatura ambiente (t.a.), na presença de água e metanol (**Esquema 1**).



Esquema 1. Reagentes e condições experimentais utilizadas para a preparação dos ésteres **1(a-f)** e das L-betainas esterificadas **2(a-f)**.

As reações foram acompanhadas através de cromatografia em camada delgada utilizando-se cromatofolhas de alumínio e sílica gel 60 F₂₅₄-Macherey-Negel Sil G/UV₂₅₄. A identificação estrutural dos compostos foi confirmada por RMN de ¹H e de ¹³C (Bruker® AVANCE DPX-300) e pela espectrometria de Massas de Alta Resolução (ESI-qTOF microTOF-Q III, BrukerDaltonics).

Os animais utilizados nos experimentos foram ratos Wistar adultos. A atividade da AChE foi investigada em homogenato do encéfalo total. O uso de animais nesses experimentos científicos foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) da UFMS registrado sob o n^o. 757/2016.

O ensaio de atividade da AChE foi determinado pelo método de Ellman (1961)⁹, com modificações recentemente descritas pelas concentrações de Dingova (2014)¹⁰, sendo a atividade da AChE expressa em μmol de acetilcolina hidrolisada/hora/miligramma de proteína.

Os compostos analisados foram testados nas concentrações de 0,1, 1,0, 10, 100 e 1000 μM. A análise estatística foi realizado pelo GraphPad Prism através da análise de variância de uma via (*one-way* ANOVA) seguida pelo teste de *post hoc* de Dunnett, ou testes não paramétricos equivalentes. Os resultados foram considerados significativos quando P ≤ 0,05.

Resultados e Discussão

Os ésteres que foram obtidos inicialmente (**Tabela 1**) tiveram rendimentos de 52 a 69 %. Estes compostos apresentaram com aspecto oleoso de coloração castanho escuro. Após o processo de esterificação em meio ácido, foi realizado o processo de *N*-metilação dos ésteres **1a** a **1f**. No entanto, na análise por RMN de ¹H dos produtos obtidos das reações com **1a**, **1b** e **1f**, constatou que houve a *N*-metilação, porém ocorreu a hidrólise do éster. Não formando os produtos desejados. As reações de *N*-metilação dos ésteres culminaram somente na obtenção dos compostos **2c**, **2d** e **2e** (**Tabela 1**) com rendimento de 42, 30 e 49 %, respectivamente.

Tabela 1. Rendimento das reações de esterificação do L-triptofano e de *N*-metilação dos ésteres obtidos.

Reação	Álcool	Produto (rendimento da esterificação em %)	Produto (rendimento da <i>N</i> -metilação em %)
1	CH ₃ OH	1a (52)	2a (não obtido)
2	CH ₃ CH ₂ OH	1b (64)	2b (não obtido)
3	CH ₃ (CH ₂) ₂ OH	1c (60)	2c (42)
4	CH ₃ (CH ₂) ₃ OH	1d (77)	2d (30)
5	(CH ₃) ₂ CHOH	1e (62)	2e (49)
6	(CH ₃) ₂ CH(CH ₂) ₂ OH	1f (69)	2f (não obtido)

Inicialmente, foram realizados os ensaios *in vitro* de inibição da atividade da AChE com os ésteres **1a-1f** e os resultados são mostrados na **Figura 2**. Os compostos **1a**, **1c** e **1f** não se mostraram ativos em nenhuma das concentrações testadas. Já os compostos **1b** e **1d** apresentaram inibição em todas as concentrações testadas e, o composto **1e** inibiu atividade da enzima somente na maior concentração (1000 μM).

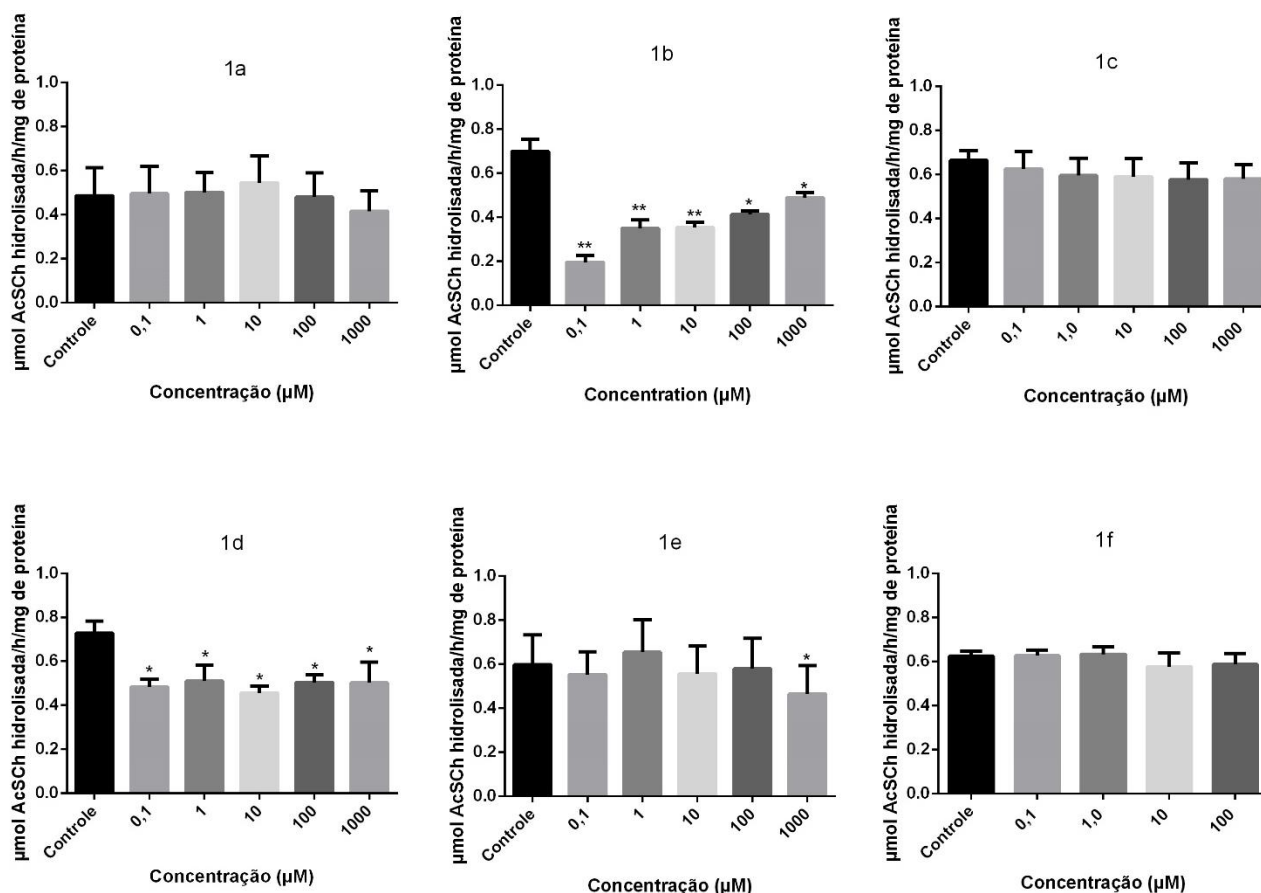


Figura 2. Resultado do ensaio *in vitro* de inibição da atividade da AChE na presença de diferentes concentrações dos compostos **1a–1f**; (n = 5). As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Todos os dados foram expressos como média \pm S.E.M (erro padrão da média).

Os resultados dos ensaios *in vitro* das L-betaínas esterificadas **2c–2e** e os resultados são mostrados na **Figura 3**. Os compostos **2c–2e** não foram capazes de inibir atividade da AChE nas concentrações testadas quando comparadas a amostra controle.

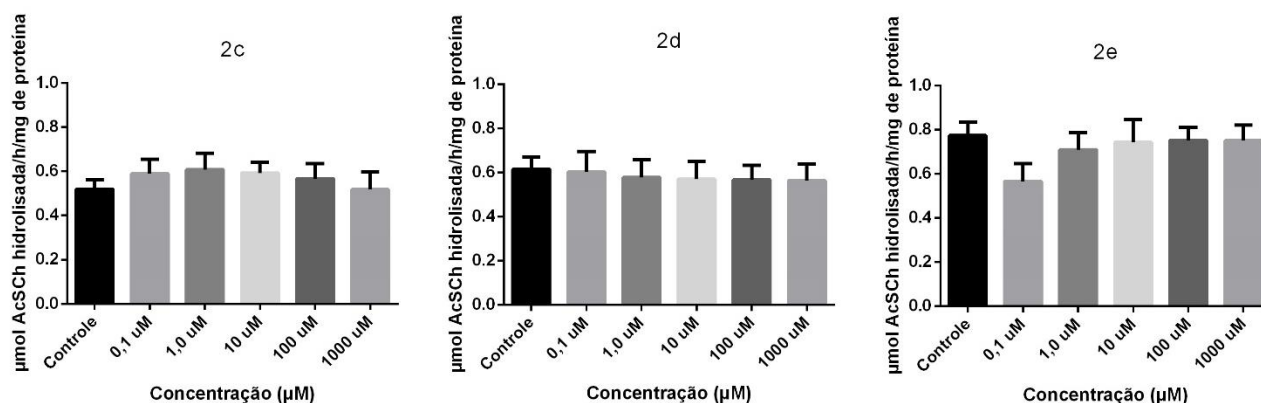


Figura 3. Resultado do ensaio *in vitro* de inibição da atividade da AChE na presença de diferentes concentrações dos compostos **2c–2e**; (n = 5). As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Todos os dados foram expressos como média \pm S.E.M (erro padrão da média).

Quando comparamos as atividades de inibição dos ésteres **1c** e **1e** com os seus derivados *N*-metilados **2c** e **2e**, verificamos que não houve alteração em relação à atividade, ou seja, a inserção de uma carga positiva no nitrogênio não contribuiu para o aumento e nem a diminuição da atividade nestes compostos. No entanto, quando realizamos a comparação entre os compostos **1d** e **2d**, podemos afirmar que a modificação do grupo NH_2 para um sal de amônio quaternário ($\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$) ocasionou na inativação do composto. Isso foi diferente do que esperávamos, já que a presença de uma carga positiva na molécula poderia auxiliar na interação do inibidor com o sítio ativo da enzima, através de um resíduo de aminoácido aniônico (Glu)¹¹.

Porém, a inserção de uma carga positiva no nitrogênio na forma de um sal de amônio quaternário pode

ter contribuído para a instabilidade da ligação éster das L-betaínas esterificadas, fazendo com essa hidrólise ocorresse antes da própria ligação do inibidor ao sítio ativo da enzima, já que estudos mostram que ésteres de betaínas que possuem um sal de amônio quaternário são mais facilmente hidrolisáveis quando comparados a ésteres sem a carga catiônica¹².

A atividade dos ésteres etílico (**1b**) e butílico (**1d**) pode ter uma relação estrutural, principalmente, devido ao mesmo número de carbonos destas funções, com os neurotransmissores ACh e BCh (butirilcolina), uma vez que isso permitiria uma melhor interação com o sítio ativo da enzima¹³. A BCh é um substrato sintético da butirilcolinesterase (BChE), enzima que também faz parte do sistema colinérgico e pode hidrolisar a ACh com uma menor especificidade¹⁴. As interações destes ésteres com o sítio ativo da enzima poderão ser melhor elucidadas através de estudos de *docking molecular*.

Conclusões

Foram obtidos 6 ésteres a partir do L-triptofano, com rendimentos que variaram entre 52 a 77 % e somente 3 ésteres *N*-metilados, provenientes dos álcoois isopropílico, *n*-butílico e propílico com rendimentos de 49, 30 e 42 %, respectivamente. Dentre os compostos submetidos aos ensaios de inibição da AChE, apenas os ésteres etílico (**1b**) e butílico (**1d**) foram ativos em todas as concentrações testadas. O mecanismo pelo qual ocorre a inibição ainda não pode ser elucidado, mas características estruturais relacionadas aos neurotransmissores ACh e BCh parecem ter papel fundamental para o efeito inibitório observado. Estes ésteres poderão servir como base para o estudo de novos inibidores da AChE.

Referências bibliográficas

1. Cotran, R. S.; Abbas, A. K.; Fausto, N.; Robbins, S. L.; Kumar, V. **“Robbins e Cotran: Patologia - Bases patológicas das doenças.”** 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p.1592, 2005.
2. 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, p. 116-145, 2014.
3. Kia Y.; Osman H.; Kumar R. S.; Murugaiyah V.; Basiri A.; Perumal S.; Wahab A. H.; Bing S. C. **“Synthesis and Discovery of Novel Piperidone-Grafted Mono- and Bis-Spirooxindole-Hexahydropyrrolizines as Potent Cholinesterase Inhibitors.”** Bioorganic and Medicinal Chemistry, v. 21, p. 1696–1707, 2013.
4. Yonekawa, K. A. M. **“Síntese da L-Hipaforina e D-Hipaforina e avaliação da atividade inibitória sobre acetilcolinesterase.”** Dissertação (Mestrado em Química). Instituto de Química, UFMS, Campo Grande, 2018.
5. Kratky, M; Štěpánková, S.; Vorcáková, K.; Vinšová, J. **“Synthesis and *in vitro* evaluation of novel rhodanine derivatives as potential cholinesterase inhibitors.”** Bioorganic Chemistry, v. 68, p. 23-29, 2016.
6. Song, H.; Liu, Y.; Liu, Y.; Huang, Y.; Li, Y.; Wang, Q. **“Design, synthesis, anti-TMV, fungicidal, and insecticidal activity evaluation of 1,2,3,4-tetrahydro- β -carbonile-3-carboxylic acid derivatives based on virus inhibitors of plant sources.”** Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, v. 24, p. 5228-5233, 2014.
7. Hosangadi, D. B.; Dave, R. H. **“An efficient general method for esterification of aromatic carboxylic acids.”** Tetrahedron Letters, v. 37, p. 6375-6378, 1996.
8. Chary, V.N.; Kumar, C.D.; Vairamani, M.; Prabhakar, S. **“Characterization of amino acid-derived betaines by electrospray ionization tandem mass spectrometry.”** Journal of Mass Spectrometry, v. 47, p. 79-88, 2011.
9. Ellman, G. L.; Courtney, K. D. **“A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity.”** Biochemical Pharmacology, v. 7, p. 88-95, 1961.
10. 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 modifications to the standard Ellman’s assay.”** Analytical Biochemistry, v. 462, p. 67-75, 2014.
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 Journal Name: Current Medicinal Chemistry, v. 17, 2010.
12. Stjern Dahl, M.; Lundberg, D.; Holmberg, K. **Cleavable Surfactants in: “Novel Surfactants: Preparation Applications And Biodegradability.”** Second Edition, Revised And Expanded, Editor: Holmberg, K. 2nd Edition, Editora: CRC Press, v. 114, 317-328, 2003.
13. Mehrotra, K. N.; Dauterman, W. C. **“The Specificity of Rat Brain Acetylcholinesterase for *N*-Alkyl Analogues of Acetylcholine.”** Journal of Neurochemistry, v. 10, p. 119–23, 1963.
14. Massouli, J.; Pezzementi, L.; Bon, S.; Krejci, E.; Vallette, M. F. **“Molecular and Cellular Biology of Cholinesterases.”** Progress in Neurobiology, v. 41, p. 31–91, 1993.