

SÍNTESE DO PRECURSOR DE AMINOÁCIDO NÃO NATURAL 2-*N*-ACETIL-3,5-DIFENIL-5-OXO-PENTANOATO DE ETILA E TESTE PARA INIBIÇÃO DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE

Francisco Furtado Tavares Lins* (Prof. Adjunto da FACEDI – Universidade Estadual do Ceará – UECE)

Antônio Mauricélio Teixeira Araújo (Graduado em Química na Universidade Estadual do Ceará – UECE)

Antônio Sávio Gomes Magalhães (Prof. Adjunto da FACEDI – Universidade Estadual do Ceará – UECE)

Petronio Augusto Simão de Sousa (Prof. Assistente da FACEDI – Universidade Estadual do Ceará – UECE)

Artur Ramon Tomé Oliveira; (Graduando em Química na Universidade Estadual do Ceará – UECE)

Bruno Peixoto de Oliveira (Prof. Assistente da Licenciatura Interdisciplinar em Ciências da Natureza e Matemática da Universidade Federal do Cariri – UFCA)

*furtadolins@yahoo.com.br

RESUMO

Os estudos sobre precursores de aminoácidos vem ganhando bastante destaque nos últimos anos. Isso ocorre devido ao fato de serem usados em diferentes áreas e terem várias aplicações. Suas aplicações vão desde o uso como material de partida na síntese de fármacos, cosméticos, herbicidas, pesticidas dentre outras aplicações e inibidores enzimáticos. O presente trabalho teve como objetivos a síntese do precursor de aminoácido 2-*N*-acetil-3-5-difenil-5-oxo-pentanoato de etila (NADPOPE) e verificação de sua atividade citotóxica frente ao *artemia salina* e de inibição enzimática da Acetilcolinesterase. A síntese do precursor em estudo ocorreu através da reação de Michael, que promove a ligação C-C, utilizando a metodologia de catálise de transferência de fase (CTF). Os procedimentos experimentais foram realizado em quatro etapas: reação entre o acetamidoacetato de etila com a chalcona sob condições de CTF, tratamento da mistura reacional, purificação e identificação do produto obtido por Ressonância Magnética Nuclear de ¹H. Posteriormente o produto foi submetido aos testes de toxicidade e de inibição da Acetilcolinesterase. Os resultados obtidos nos testes foram analisados e se mostraram muito significativos, demonstrando assim características muito promissoras do 2-*N*-acetil-3-5-difenil-5-oxo-pentanoato de etila como um potencial inibidor enzimático.

Palavras chaves: Catálise de Transferência de Fase; Aminoácidos não naturais; Inibição enzimática; Acetilcolinesterase.

1 – INTRODUÇÃO

No Brasil, o número da população idosa está cada vez maior, e como consequência, os problemas de saúde relacionados à idade também tem aumentado de maneira significativa ao longo dos anos. Como uma das causas do aumento da população pode-se destacar a baixa taxa de fecundidade aliada a um aumento da expectativa de vida da população (BRASIL, 2010). Dentre as doenças que mais atingem os idosos no Brasil e no mundo, destaca-se a doença de Alzheimer, considerada o tipo de demência mais comum em idosos com 65 anos ou mais. A doença de Alzheimer é caracterizada como uma doença mental complexa, que provoca alterações no comportamento, causa agitação, e distúrbios de memória. Em seu tratamento são utilizados medicamentos que inibem a enzima Acetilcolinesterase, chamados de anticolinesterásicos e atuam melhorando os sintomas provocados pela doença (REICHMAN, 2003).

Os fármacos utilizados no tratamento da doença de Alzheimer, proporcionam melhoras significativas para os portadores, porém todos apresentam efeitos colaterais desconfortáveis tais como: náuseas, problemas gastrointestinais, diarreia, perda de peso, diminuição cardíaca e insônia (DOWNEY, 2008). Mesmo existindo estes fármacos disponíveis no mercado, a pesquisa nesta área tem crescido muito ao longo dos anos e o interesse de pesquisadores por essa classe de compostos tem despertado a busca por novas metodologias que servirão de base para a produção de novas drogas inibidoras da Acetilcolinesterase, mais eficazes e com menores efeitos colaterais. Segundo Downey (2008) essas pesquisas baseiam-se na possibilidade de elevação dos níveis do neurotransmissor Acetilcolina, com a finalidade de melhorar os sintomas relacionados à memória, o que torna essa proposta muito promissora.

Existem relatos da utilização de compostos precursores de aminoácidos não naturais agindo como inibidores enzimáticos, que são formados a partir da modificação de resíduos da cadeia lateral de aminoácidos, o que influencia no papel estrutural e metabólico dos seres vivos (XIL; SCHULTZ, 2005; IEONG *et al.*, 2012). O interesse sintético nos aminoácidos não naturais ganhou força devido a sua possibilidade de utilização em diferentes áreas e finalidades. Existem diversas metodologias utilizadas na síntese de aminoácidos não naturais, assim como seus precursores. O uso dessas metodologias depende do tipo de síntese e das propriedades físicas e químicas dos reagentes envolvidos na reação (SUÁREZ, 2011).

A síntese do precursor de aminoácido não natural 2-*N*-acetil-3,5-difenil-5-oxo-pentanoato de etila (NADPOPE), envolve a utilização da metodologia de Catálise de Transferência de Fase, pois os reagentes que originam o precursor, ou seja o produto, no caso o acetamidoacetato de etila e chalcona, são imiscíveis entre si, o que dificulta o processo de síntese. Devido à dificuldade de reagir substâncias imiscíveis e de propiciar o devido contato entre os reagentes em fases diferentes, surge como alternativa de solucionar este problema a metodologia Catálise de Transferência de Fase – CTF, método introduzido em meados dos anos 60, pelos pesquisadores Makosza, Brandstön e Starks. Esse método ainda continua sendo utilizado quando se trabalha com reações de reagentes em diferentes fases (LUCCHESI, 2000).

Esse método consiste na facilitação do contato entre reagentes de diferentes fases em reação. Esse contato acontece por meio de um agente transferidor (catalisador de CTF), o qual pode ser de diversos tipos, mas consistem geralmente

em sais, denominados sais de ônio (Q^+X^-) que tem como função a transferência do reagente iônico na forma de par iônico de uma fase, geralmente aquosa ou sólida, para a fase orgânica onde ocorrerá a reação (DIEZ-BARRA *et al.*, 1998).

Este trabalho baseia-se na síntese de um precursor de aminoácido não natural, que segundo a literatura pode atuar como inibidor enzimático. A purificação do produto foi realizada em várias etapas, e o produto identificado por RMN de 1H . Ensaios foram propostos ao produto da síntese, o primeiro consistiu na verificação de sua toxicidade e outro na verificação de sua atividade como inibidor. O composto apresentou resultados significativos em ambos os testes.

2 – METODOLOGIA

2.1 – Síntese do 2-*N*-acetil-3,5-difenil-5-oxo-pentanoato de etila

A metodologia de síntese do NADPOPE pode ser considerada relativamente simples, esse método é basicamente constituído de quatro etapas: Reação entre os reagentes de partida acetamidoacetato de etila e chalcona, tratamento da mistura reacional, separação do produto por coluna cromatográfica de sílica e processo de recristalização.

Em um balão de fundo redondo de 25 mL aquecido em banho Maria e equipado com agitador mecânico, adicionou-se 1,5 mmol de acetamidoacetato de etila, 1,5 mmol de chalcona, 0,15 mmol do catalisador de CTF hidrogenossulfato de tetrabutilamônio, 0,15 mmol de KOH como base e 5 mL de tolueno como solvente. A reação ocorreu a uma temperatura constante de 60 °C sob agitação mecânica de 1700 RPM por um período de 2 horas. Após ocorrido o tempo de reação seguiu-se para o processo de tratamento. Primeiramente, dilui-se a mistura reacional em 30 mL de diclorometano, verteu-se para um funil de decantação, acrescentou-se 40 mL de água destilada e deixou-se em repouso por cerca de 5 minutos, até separação das fases orgânica e aquosa. Com as duas fases já bem definidas, coletou-se a fase orgânica utilizando-se de um Erlenmeyer e descartou-se a fase aquosa. Adicionou-se à fase orgânica cerca de 8 g Na_2SO_4 anidro, para retirar possíveis traços de água. Depois filtrou-se e evaporou-se o solvente utilizando um rotoevaporador à pressão reduzida. A mistura reacional foi submetida ao processo de separação por coluna cromatográfica utilizando sílica como adsorvente e iniciou-se a separação da mistura reacional lentamente usando diclorometano como eluente até a visível separação da chalcona de coloração amarelada da parte superior da coluna. Depois mudou-se o eluente para diclorometano/acetona nas proporções (9:1) para se obter uma melhor separação do produto reacional. As frações cromatográficas foram coletadas em pequenos frascos de vidros de 10 mL foram submetidas a testes analíticos em placas cromatografia de camada delgada (CCD) utilizando o eluente diclorometano/acetona (9:1) usando os materiais de partidas da síntese (acetamidoacetato de etila e chalcona) como padrões de referência e iodo como revelador. Após a análise realizada, juntou-se as frações onde se encontravam o produto da reação (NADPOPE). Depois realizou-se o processo de recristalização em hexano/água destilada, onde a água é adicionada pouco a pouco até a mistura mostrar-se totalmente turva. Em seguida, deixou-se a mistura sob refrigeração por 24 horas. Após esse procedimento o produto recristalizado foi filtrado, seco e pesado. O produto obtido foi submetido ao teste de identificação estrutural através de espectroscopia RMN de 1H .

2.2 - Teste Citotóxico usando o *Artemia Salina*

Realizou-se o teste citotóxico usando as larvas do microcrustáceos *Artemia Salina* Leach (ASL) através do método descrito por Meyer *et al* (1982) com pequenas adaptações. Em um aquário contendo 0,5 litros de água do mar, foram adicionados uma quantidade equivalente a uma ponta de espátula de cistos do ASL, em seguida adicionou-se um aerador para que a água recebesse oxigenação adequada e iluminou-se uma parte do aquário usando para isso uma lâmpada fluorescente. Os cistos permaneceram sob estas condições por um período de incubação de 48 horas e a temperatura ambiente local (28 °C), depois desta etapa iniciou-se a contagem das larvas para se dar início ao teste. Pesou-se 20 mg do NADPOPE, dissolveu-se em 2 mL de metanol. Desta solução preparou-se amostras nas seguintes concentrações 1000, 100, 10, 1 ppm e colocou-se em 4 recipientes de vidro de 10 mL. Depois evaporou-se o solvente utilizando uma chapa aquecedora a uma temperatura de 60 °C. Após esta etapa foram adicionados aos recipientes de vidro 5 mL de água do mar e 3 gotas de DMSO (dimetilsulfóxido). A cada recipiente foram adicionados 10 larvas de ASL, e deixado sobre iluminação por um período de 24 horas. Após esse período contou-se a quantidade de larvas mortas para se determinar a DL50, dose necessária para matar 50% de uma população em estudo. O teste foi feito em triplicata e como controle (Teste branco) utilizou-se 10 larvas, 5 mL de água do mar e 3 gotas de DMSO.

2.3 - Teste de Inibição da Enzima Acetilcolinesterase

Primeiramente, foram preparadas as seguintes soluções para dar início ao ensaio de inibição enzimática: Solução de 50 mM de Tris²/HCl pH 8, solução tampão; 50 mM de Tris/HCl pH 8 contendo 0,1% de albumina sérica bovina (ASB); Solução de 1 mM de ácido 5,5' -ditiobis-[2-nitrobenzóico] (DTNB ou reagente de Ellman) e 1 mM de iodeto de Acetilcolina (ATCI). A enzima AChE (sigma) previamente liofilizada foi dissolvida na solução tampão 50 mM de Tris/HCl pH 8 para fazer uma solução estoque de 1000 U/ml³. Em seguida, retirou-se alíquotas de 5 µL da amostra e estas foram aplicadas em placas de CCD comercial. Uma mistura de solução de Iodeto de Acetilcolina (AChI) e do reagente de Ellman foi borrifado sobre a placa. Após completa secagem da placa, borrifou-se uma solução de enzima AChE e esperou-se 5 minutos até o desenvolvimento de manchas brancas (halos) sob um fundo amarelo indicando a presença do potencial de inibição da enzima Acetilcolinesterase do composto. Como padrão usou-se a fisostigmina (RHEE *et al.*, 2001).

3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 - Síntese do 2-*N*-acetil-3,5-difenil-5-oxo-pentanoato de etila sob condições de CTF

Foram realizadas adições de Michael entre o acetamidoacetato de etila e a chalcona obtendo-se o aduto de Michael NADPOPE, um precursor de aminoácido não-natural (Figura 1). A referida reação foi realizada em triplicata e obteve-se um rendimento médio de 67% do produto. Dados do espectro de RMN ¹H - δ-ppm (500MHz) (CDCl₃): 0,93(t, 3H); 1,94(s, 3H); 3,4-3,6(dd, dd, 2H); 4,9(t, 1H); 7,1-7,8(m, 10H); 7,9(s, 1H, NH), confirmam a identificação do produto (Figura 2). Os dados apresentados

no espectro de RMN ^1H para NADPOE corrobora com os valores obtidos, para o mesmo composto, por Mattos (1996), o que comprova se tratar da mesma estrutura.

No presente trabalho empregou-se uma estratégia sintética semelhante à realizada por Mattos (1996) reagindo o acetamidoacetato de etila como doador de Michael, já possuindo em sua estrutura grupos característicos de aminoácidos, e a chalcona como aceptor de Michael. O acetamidoacetato de etila possui um átomo de hidrogênio relativamente ácido sendo facilmente abstraído por bases mais fracas, comumente empregadas na CTF. O valor do rendimento obtido pode ser atribuído a metodologia CTF, pois a mesma proporciona o contato adequado entre os reagentes de partida, que são poucos miscíveis entre si. Segundo Mattos (1996), a ausência de catalizadores de CTF neste tipo de reação, produzem os adutos de Michael em baixíssimo rendimento (<20%) devido a imiscibilidade dos reagentes.

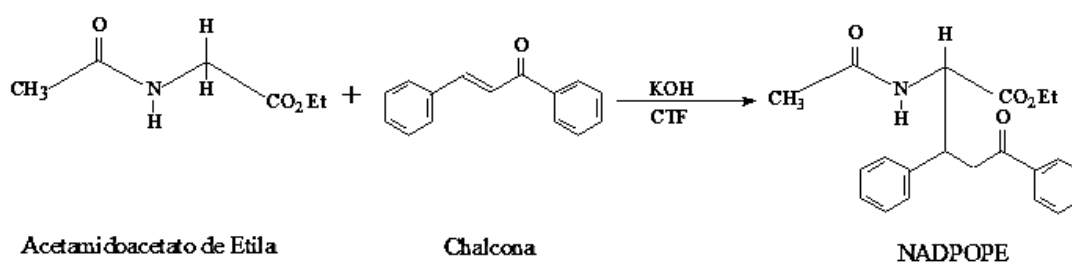


Figura 1 – Esquema reacional da síntese do NADPOE

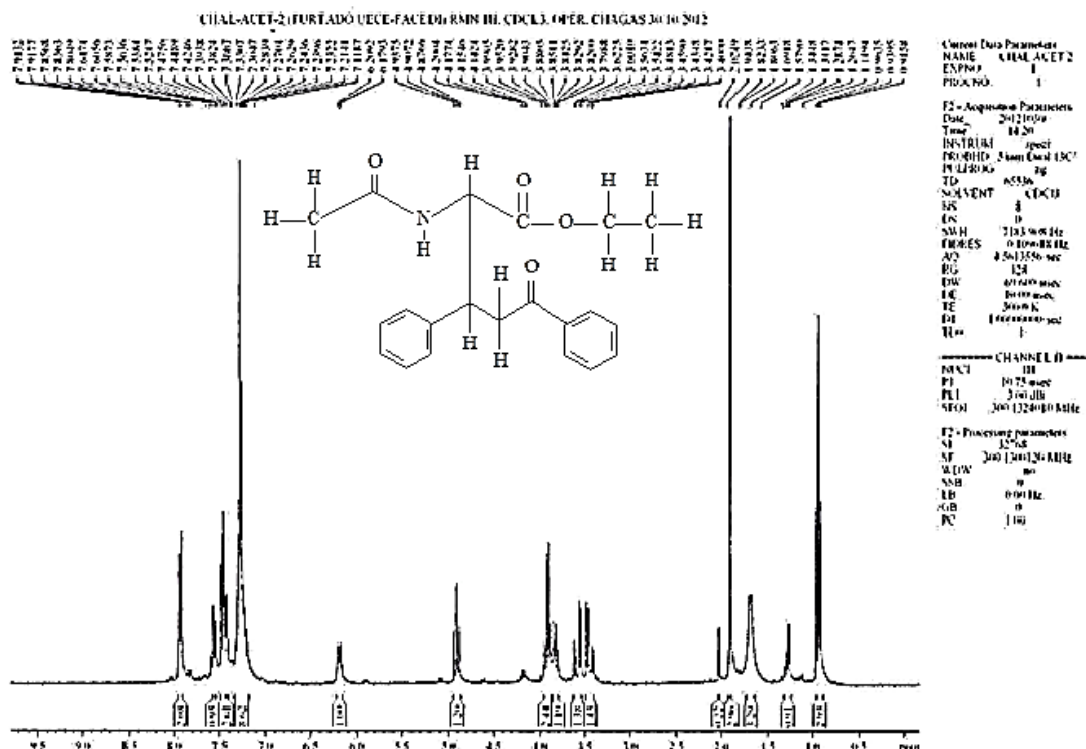


Figura 2 - Espectro de RMN ^1H do NADPOE

Outro fator muito importante foi a utilização da adição de Michael nesta síntese, ela nos permite usar quantidades catalíticas (de 3 a 10 % do mol) de base na reação, pois a utilização de base em quantidades equimolares nesta síntese poderia acarretar reações secundárias indesejáveis como a retro Michael.

A síntese de precursores de aminoácidos não-naturais empregando a metodologia CTF via adição de Michael em condições reacionais ideais, proporcionam rendimentos maximizados de aproximadamente 80 %, o que era esperado para a nossa síntese, já que as condições proposta por Lins (2000) foram empregadas. Como justificativa do rendimento abaixo do esperado, podemos destacar as perdas do produto durante os processos de recristalização.

3.2 - Teste citotóxico usando o microcrustáceo *Artemia Salina* Leach

No teste citotóxico utilizando as larvas do microcrustáceo *Artemia salina* verificou-se que os intervalos de concentrações onde se observa a morte de 50 % da população (DL50), encontram-se entre as concentrações 100 e 1 ppm. Os dados obtidos no teste foram analisados, observando-se os logaritmos das concentrações das amostras utilizando a equação reduzida da reta. Nas Tabelas 1 e 2 estão organizados os dados das porcentagens das médias de mortes para cada concentração, assim como os dados necessários para o cálculo da DL50.

TABELA 1: Média das porcentagens de mortes das larvas da *Artemia salina*

Concentração (µg/mL)	Nº de larvas mortas			% das médias de mortes
1000	10	10	10	100%
100	10	10	10	100%
10	7	7	8	73,3%
1	1	3	0	13,3%
0*	0	0	0	0,0%

* Teste branco

Tabela 2: Dados utilizados no cálculo do teste citotóxico

Concentração (ppm)	Logaritmo da Concentração	% da média de mortes	Y= ln [% morte/100 - % morte]
1000	3,00	100	9,210
100	2,00 (x2)	100	9,210 (y2)
10	1,00	73,3	0,690
1	0 (X1)	13,33	-1,877 (y1)

A DL50 foi calculada utilizando os valores de duas concentrações, a de maior e menor valor de porcentagem de mortes. Nesse caso as concentrações de 100 e 1 ppm foram utilizadas. Para a porcentagem da média de mortes de 100%, adotou-se 99,99% para o referido cálculo. De posse do resultado obtido através do cálculo, $DL50 = 0,409$ ppm. pode-se afirmar que o composto apresenta atividade citotóxica frente as larvas do ASL, pois segundo a literatura para uma substância poder ser considerada tóxica, a mesma deve apresentar DL50 abaixo de 1000 ppm (MEYER *et al.*, 1982), o que significa que quanto menor a concentração necessária para eliminar o organismo teste, maior será sua atividade citotóxica.

Segundo o Krishnaraju *et al.* (2005) substâncias que apresentam DL50 abaixo de 80 ppm, são consideradas de toxicidade alta. Portanto o NADPOPE além de apresentar atividade citotóxica frente ao ASL, também pode ser classificado como uma substância de toxicidade alta, pois o seu valor de DL50 é bem menor que 80 ppm.

3.3 - Análise do Teste de Inibição da Enzima Acetilcolinesterase

O NADPOPE foi submetido ao teste de inibição da AChE afim de se determinar uma possível atividade de inibição enzimática. O resultado de inibição foi obtido através da medição do halo formado na cromatoplaca, quando o NADPOPE foi aplicado em comparação ao valor do halo obtido pelo padrão utilizado. O padrão utilizado no teste foi a fisostigmina cujo halo de inibição é de 0,9 cm de diâmetro. Este padrão serviu como base para a detecção do potencial de inibição do NADPOPE.

Ao medir-se o halo de inibição enzimática quando o NADPOPE foi aplicado, obteve-se um valor de 1,2 cm de diâmetro, valor esse que se encontra acima do apresentado pelo padrão, o que reforça o fato do mesmo possuir atividade de inibição frente a enzima. Nesse tipo de teste de inibição quanto maior o diâmetro de halo apresentado pela substância em estudo, maior será o potencial de inibição. O teste de inibição aplicado ao NADPOPE, destaca apenas a existência ou não de atividade de inibição frente a enzima AChE, já que o mesmo é considerado de caráter qualitativo, por isso outros testes mais específicos deverão ser aplicados ao composto afim de verificar sua eficácia, assim como sua possibilidade de uso como fármaco anticolinesterásicos. Como possível justificativa para o potencial de inibição do NADPOPE, tendo-se como base as interações da AChE com outros inibidores enzimáticos, acredita-se que o NADPOPE ao chegar no sítio ativo da enzima possivelmente interaja com a estrutura de

alguns aminoácidos aromáticos, através de interações pi-pi entre os anéis aromáticos, ligações de hidrogênio entre o hidrogênio ligado ao nitrogênio do NADPOPE com oxigênios carbonílicos dos aminoácidos, ligações de hidrogênio entre hidrogênios das hidroxilas dos aminoácidos com o oxigênio das carbonilas do NADPOPE dentre outras interações, como as de Van der Waals de menor intensidades.

4 - CONCLUSÕES

A síntese do aduto de Michael apresentou rendimento de 67% quando empregou-se a metodologia CTF em condições reacionais adequadas, a saber: KOH como base, hidrogenossulfato como catalisador de CTF, temperatura de 60 °C, agitação de 1700 rpm e 2 horas de tempo reacional.

O bioensaio utilizando o *Artemia Salina* foi de grande importância para se detectar a atividade citotóxica do NADPOPE, mostrando-se um teste preliminar muito útil na detecção de substância com potencial citotóxico.

O NADPOPE apresentou resultado significativo em termos de inibição da enzima Acetilcolinesterase, quando submetido ao teste de Ellman, apresentando valor de halo acima do padrão.

Os resultados dos testes propostos ao precursor de aminoácidos NADPOPE, foram satisfatórios em termos de inibição enzimática e toxicidade, mostrando assim características de uma substância muito promissora e que deve ser melhor estudada. Perspectivas futuras para este trabalho serão realizadas através de ensaios de modelagem molecular com a finalidade de propor um mecanismo de interação entre o NADPOPE e a AChE, que explique sua atividade de inibição enzimática.

ABSTRACT

Studies of amino acid precursors has been gaining a lot of attention in recent years. This is due to the fact of being used in different areas , and have various applications. Its applications ranging from use as starting material in the synthesis of pharmaceuticals, cosmetics , herbicides , pesticides, among other applications and enzyme inhibitors. This study aimed to the synthesis of the amino acid precursor ethyl 2-N -acetyl- 3-5 -diphenyl -5- oxo-pentanoate (NADPOPE) and verification of their cytotoxic activity against the saline artemia and enzymatic inhibition of acetylcholinesterase. The synthesis of the precursor in study occurred through of the Michael reaction, that promotes the C-C link using phase transfer catalysis methods (PTC). The experimental procedures were accomplished in four steps: reaction between ethyl acetamidoacetato with chalcone under conditions PTC, treatment of the reaction mixture, purification and identification of the product obtained by ¹H-Nuclear Magnetic Resonance. Subsequently the product was subjected to toxicity tests and inhibition of acetylcholinesterase. The results obtained in the tests analyzed and showed very significant, thus demonstrating characteristics very promising of the ethyl 2- N-acetyl-3-5 -diphenyl -5- oxo-pentanoate as a potential enzyme inhibitor.

Key words: Phase Transfer Catalysis; Unnatural amino acids; enzyme inhibition; Acetylcholinesterase.

REFERÊNCIAS

BRASIL. **Instituto Brasileiro de geografia e estatística (IBGE): Projeções e estimativas da população do Brasil e das Unidades da federação**. 2010 Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/apps/populacao/projecao/index.html>> Acesso em: 10 Jun. 2015.

DIEZ-BARRA, Enrique; LA HOZ, Antonio; MERINO, Sonia; RODRIGUEZ, Ana; SÁNCHEZ-VERDÚ, Prado. **Tetrahedron**, 54, 1835, 1998.

DOWNEY, Deborah. Pharmacologic management of Alzheimer Disease, **Journal of Neuroscience Nursing**. v. 40, n. 1, 2008. p. 55-59.

IEONG, K; PAVLOV, M.Y; KWIATKOWSKI, M; FOSTER, A. C; EHRENBERG, M. Inefficient delivery but fast peptide bond formation of unnatural L-Aminoacyl-tRNAs in translation, **J. Am. Chem. Soc** 134, 17955-17962, 2012.

KRISHNARAJU, Alluri V.; RAO, Tayi. V.; SUNDARARAJU, Dodda; VANISREE, Mulabagal; TSAY, Hsin-Sheng; SUBBARAJU, Gottumukkala V. Assessment of bioactivity of indian medicinal plants using brine shrimp (*artemia salina*) lethality assay, **International Journal of Applied Science and Engineering**. p. 125 a 134, 2005.

LINS, Francisco Furtado Tavares. Estudo da indução assimétrica na síntese de precursores de aminoácidos não-naturais via adição de Michael sob condições de catálise de transferência de fase (CTF), **Dissertação (Mestrado em Química)** - UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ. Fortaleza-CE. 243p. 2000

LUCCHESI, Angelica Maria; MARZORATI, Liliana; Catálise de Transferência de Fase, **Química Nova**, 2000, 23(5), 641-652.

MATTOS, Marcos Carlos. Alguns Aspectos da Reatividade e Indução Assimétrica em Adição de Michael sob Condições de Catálise de Transferência de Fase (CTF). **Tese (Doutorado)**. Universidade de São Paulo, São Paulo, 146p. 1996.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L.B., NICHOLS, B.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine Shrimp: A convenient general bioassay for Active Plant Constituents, **Journal of Medical Plant Research**. 45, 31, 1982. 50

REICHMAN, William E. Current pharmacologic options for patients with Alzheimer's disease, **Ann Gen. Hospital Psychiatry** 2: 1-14. 2003.

RHEE In Kiung; VAN DE MEENT Michiel; INGGANINAN Kornkarnok; VERPOORTE Robert Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining, **J Chromatogr A** 915: 217-223. 2001.

SUÁREZ, Antonio Carlos M.; Síntese de novos aminoácidos não naturais a partir de desidroaminoácidos, **Dissertação (Mestrado em Química Medicinal)**. Universidade do Minho, Portugal. 113p, 2011.

XIE, J; SCHULTZ, P.G. An expanding genetic code, **Methods** 36, 227-238, 2005.