

21. Química

Síntesis de análogos de aza-resveratrol con actividad anticolinesterasa

Biscussi, Brunella; Murray, Ana Paula

bruneb91@hotmail.com; apmurray@uns.edu.ar;

Instituto de Química del Sur (INQUISUR-UNS-CONICET)

Universidad Nacional del Sur

Resumen

Una serie de análogos de aza-resveratrol fue diseñada, sintetizada y evaluada por su capacidad para inhibir la actividad de las enzimas acetilcolinesterasa (ACE) y butirilcolinesterasa (BuCE).

Se llevó a cabo la síntesis asistida por microondas (CEM Discover) de *p*-(ω -aminoalquil)-benzaldehídos en dos etapas, en un tiempo total de 20 a 50 minutos y posterior reacción de condensación con anilina (relación molar 1:1) en tiempos de 1 a 2 horas. Este protocolo presentó ventajas frente al método de síntesis convencional tales como importante reducción en los tiempos de reacción, altos rendimientos y simple purificación. Todos los derivados obtenidos mostraron actividad inhibitoria frente a ambas enzimas siendo el compuesto 13c el inhibidor más potente de ACE (IC_{50} = 3,6 μ M) y 12a de BuCE (IC_{50} = 0,8 μ M).

Palabras clave: Análogos de Aza-resveratrol, Síntesis asistida por microondas, Actividad inhibitoria de ACE.

Introducción

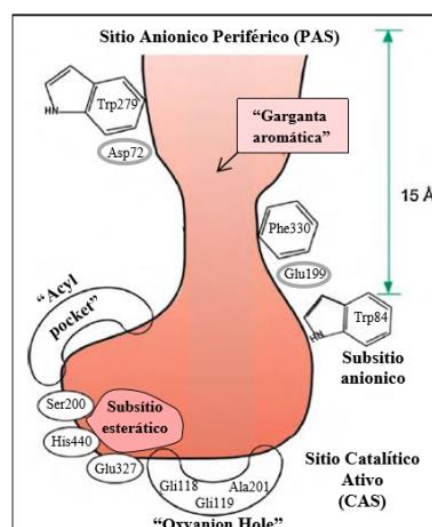
Acetilcolinesterasa (ACE) y butirilcolinesterasa (BuCE) son enzimas que constituyen el grupo de las colinesterasas (CE). ACE es sintetizada en el músculo, hidroliza al neurotransmisor acetilcolina y está principalmente asociada al tejido nervioso y muscular, siendo principalmente encontrada en la sinapsis, mientras que BuCE hidroliza butirilcolina y es sintetizada por el hígado encontrándose en elevadas concentraciones en el suero.

Actualmente, el principal tratamiento para la Enfermedad de Alzheimer (EA) se basa en el uso de inhibidores de colinesterasas para el mejoramiento sintomático de la enfermedad. En cerebros sanos, ACE hidroliza la mayor parte del neurotransmisor acetilcolina, mientras que BuCE juega un rol secundario. Sin embargo, en el progreso de EA, la actividad de ACE decrece mientras que la de BuCE incrementa significativamente en el hipocampo y la corteza temporal¹.

La mayoría de los inhibidores de ACE interaccionan con el sitio catalítico de la enzima (CAS) localizado en el fondo de una estrecha y profunda cavidad donde es llevada a cabo la hidrólisis de acetilcolina. La entrada de esta cavidad contiene el sitio aniónico periférico (PAS) el cual también es un importante blanco de interacción. El interés en sitios de unión dual de inhibidores de ACE se debe a la llamada "acción no colinérgica de ACE". La interacción del péptido β -amiloide ($A\beta$) en el PAS de ACE acelera enormemente la agregación de este péptido tóxico. Por lo tanto, aquellos inhibidores de ACE que se unan al PAS, disminuirán la velocidad de agregación de $A\beta$. Con este propósito, se han desarrollado inhibidores duales de ACE, que se unan tanto al CAS como al PAS de la enzima.

En el intento de mejorar el perfil biológico del estilbeno natural resveratrol, se ha observado que análogos de este compuesto han mostrado un buen perfil de actividad como agentes multifuncionales para la terapia de la EA. Teniendo en cuenta estos antecedentes y la experiencia previa del grupo², se trabajó sobre la hipótesis de incorporar una cadena hidrocarbonada unida a una amina terciaria, a una estructura que se sabe presenta una importante actividad biológica, con el objetivo de obtener agentes multifuncionales de potencial aplicación en la EA³.

En los últimos años, el método rápido de calentamiento por microondas se ha aplicado en gran medida en síntesis orgánica ya que puede inducir reacciones muy rápidas y eficientes, siendo provechoso para la optimización de diversas etapas sintéticas⁴. En este trabajo se llevó a cabo la síntesis asistida por microondas (CEM Discover) de *p*-(ω -aminoalquil)-benzaldehídos partiendo de *p*-hidroxibenzaldehído y dihalogenuros de alquilo con cadenas de 3 a 6 metilenos, seguido de la adición de la correspondiente amina secundaria. Posteriormente, se obtuvieron los distintos derivados aza-estilbeno por una reacción de condensación con anilina. Las correspondientes iminas fueron preparados en altos rendimientos y en tiempos cortos de reacción usando este efectivo método, mostrando grandes ventajas frente al método convencional.



Objetivos

El objetivo general de este trabajo es contribuir al descubrimiento de nuevas moléculas con actividades biológicas que puedan significar un aporte para el desarrollo futuro de nuevos fármacos, en particular con actividad inhibitoria de ACE y/o BuCE de interés en el tratamiento de EA. Para alcanzar este objetivo se ha trabajado en la síntesis de análogos de compuestos que se sabe presentan importante y variada actividad biológica, como es el caso del aza-resveratrol⁵. Se plantearon como objetivos específicos:

- Obtener análogos sintéticos mediante transformaciones químicas sencillas de aza-resveratrol adicionando una cadena alquílica seguida de una amina terciaria que tengan la capacidad de ser inhibidores duales de ACE.
- Optimizar las etapas sintéticas mediante el uso de radiación de microondas (CEM Discover)
- Caracterizar los compuestos nuevos sintetizados y evaluar su actividad inhibitoria de ACE y BuCE

Materiales y Métodos

Los espectros de RMN fueron registrados en un espectrómetro Bruker ARX 300 (300 MHz y 75 MHz para ¹H y ¹³C respectivamente). Se utilizó como solvente CDCl₃ con TMS como estándar interno. Las mediciones de actividad enzimática se registraron en un espectrofotómetro

JASCO V-630BIO, provisto de un controlador de temperatura Peltier.

▪ *Procedimiento general para la síntesis convencional de los compuestos 2-5*

1 mmol de *p*-hidroxibenzaldehído fue disuelto en 3 mL de acetona, se agregaron 2 mmol de K₂CO₃ y luego 10 mmol de α,ω -dibromoalcano. La mezcla fue agitada y calentada a reflujo por 2 h. La obtención del producto fue confirmado por TLC. El solvente fue evaporado bajo presión reducida y el crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna usando sílica gel 60 (70-230 mesh) como fase estacionaria y mezclas hexano:EtOAc (85:15).

▪ *Procedimiento general para la síntesis asistida por microondas de compuestos 2-5*

En un tubo de vidrio de reacción de microondas se colocó 0,1 mmol de *p*-hidroxibenzaldehído disuelto en 1 mL de acetonitrilo, se agregaron 0,3 mmol de K₂CO₃ y luego 0,2 mmol de α,ω -dibromoalcano. El tubo fue colocado en el equipo de microondas a 150W, 80°C por 10 minutos. La obtención del producto fue confirmado por TLC. El solvente fue evaporado bajo presión reducida y el crudo de reacción fue purificado por cromatografía en columna usando sílica gel 60 (70-230 mesh) como fase estacionaria y mezclas hexano:EtOAc (85:15).

▪ *Procedimiento general para la síntesis convencional de compuestos 6-7*

A una solución de 2-5 (0.1 mmol) en DMF (2 mL) se añadió la amina apropiada (0,3 mmol). Se agitó a temperatura ambiente por 24-48 h hasta observar conversión total por TLC. La mezcla fue particionada en agua y AcOEt. La capa orgánica separada fue secada sobre MgSO₄ anhidro y filtrada. El solvente fue evaporado a presión reducida para dar el compuesto 6-7 sin más purificación.

▪ *Procedimiento general para la síntesis asistida por microondas de compuestos 6-9*

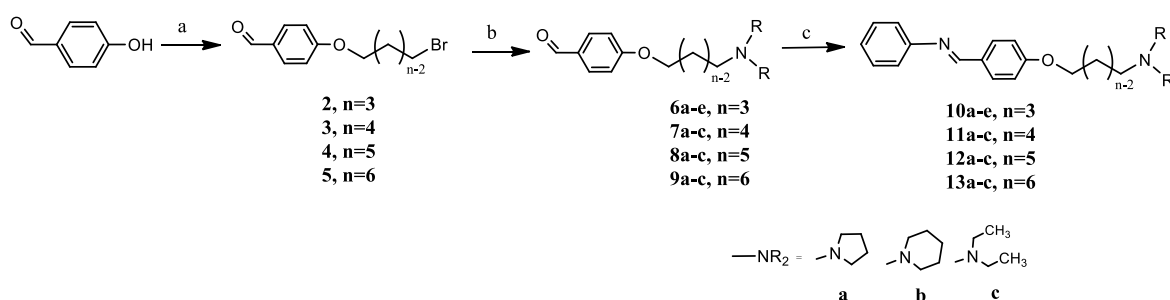
En un tubo de reacción para microondas se agregó una solución de 2-5 (0.1 mmol) en DMF (2 mL), y se añadió la amina secundaria apropiada (0,3 mmol). El tubo de vidrio fue colocado en el equipo de microondas a 150W, 130°C, 5-40 minutos hasta observar conversión total por TLC.

▪ *Procedimiento general para la síntesis asistida por microondas de compuestos 10-13*

Se agregó al tubo de reacción de microondas el compuesto 6-9 (0,1mmol), etanol (1 mL) y anilina (0,1mmol). Se irradió en el equipo de microondas a 150W, 90°C, 1-2 h hasta observar conversión completa por TLC. El solvente fue evaporado a presión reducida proporcionando la imina deseada sin más purificación.

▪ *Ensayo cuantitativo de inhibición ACE y BuCE*

ACE de anguila eléctrica (500 U, Sigma) y BuCE de suero equino (300 U, MP Biomedicals) se utilizaron como fuente de colinesterasas. La actividad inhibitoria de



Esquema 1: Síntesis de derivados 10-13. (a) Br(CH₂)_nBr, K₂CO₃, acetona o acetonitrilo; (b) NHR₂, DMF; (c) Anilina, etanol.

La mezcla fue particionada en agua y AcOEt. La capa orgánica separada fue secada sobre MgSO₄ anhidro y filtrada. El solvente fue evaporado a presión reducida para dar el compuesto 6-9 sin más purificación.

Tabla 1: Optimización de reacción **a** por método de microondas

| Compuesto | Método de microondas | | | | Método convencional | | |
|-----------|----------------------|------------------|------------------|----------|-----------------------|----------------|----------|
| | Potencia (Watt) | Temperatura (°C) | Tiempo (minutos) | Rdto (%) | Condición de reacción | Tiempo (horas) | Rdto (%) |
| 2 | 150 | 80 | 10 | 40 | Reflujo | 2 | 42 |
| 3 | 150 | 80 | 10 | 45 | Reflujo | 2 | 40 |
| 4 | 150 | 80 | 10 | 50 | Reflujo | 2 | 43 |
| 5 | 150 | 80 | 10 | 55 | | | |

Tabla 2: Optimización de reacción **b** por método de microondas

| Compuesto | Método de microondas | | | | Método convencional | | |
|-----------|----------------------|------------------|------------------|----------|-----------------------|----------------|----------|
| | Potencia (Watt) | Temperatura (°C) | Tiempo (minutos) | Rdto (%) | Condición de reacción | Tiempo (horas) | Rdto (%) |
| 6a | 150 | 130 | 5 | 89 | 40°C | 24 | 88 |
| 7a | 150 | 130 | 8 | 93 | 40°C | 24 | 94 |
| 8a | 150 | 130 | 5 | 95 | 40°C | 24 | 95 |
| 9a | 150 | 80 | 8 | 95 | | | |
| 6b | 150 | 80 | 10 | 89 | 40°C | 24 | 80 |
| 7b | 150 | 80 | 10 | 93 | 40°C | 24 | 96 |
| 8b | 150 | 80 | 5 | 95 | 40°C | 24 | 75 |
| 9b | 150 | 80 | 7 | 94 | | | |
| 6c | 100 | 80 | 30 | 96 | 40°C | 24 | 95 |
| 7c | 100 | 80 | 30 | 95 | 40°C | 24 | 95 |
| 8c | 100 | 80 | 35 | 90 | 40°C | 24 | 70 |
| 9c | 100 | 80 | 40 | 93 | | | |




ACE y BuCE fue determinada in vitro mediante el método espectrofotométrico desarrollado por Ellman con pequeñas modificaciones^{2,6}. La absorbancia se registró a 405 nm por 120 s a 27°C. La actividad enzimática se calculó por comparación de las velocidades de reacción entre la muestra y el blanco. La concentración de muestra que refleja el 50% de inhibición (IC₅₀) se calculó por regresión no lineal de la curva respuesta vs log (concentración) utilizando GraphPadPrism 5. Tacrina se utilizó como inhibidor de referencia.

Resultados y Discusión

Con el objetivo de desarrollar moléculas anticolinesterasas y anticipar el desarrollo de un inhibidor del sitio de unión dual decidimos incorporar a una estructura aza-estilbeno una cadena hidrocarbonada unida a una amina terciaria. Esta estrategia ha sido aplicada con éxito previamente en el grupo².

A pH fisiológico, el grupo amina protonada podría interactuar con el CAS de la enzima, mientras que la estructura aza-estilbeno podría interactuar con el PAS de ACE.

Tabla 3. Inhibición de CE para los compuestos 10-13

| Compuesto | -R | n | ACE | | BuCE | | Índice de Selectividad ^a |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------|---|-----------------------|---------------------------|-----------------------|---------------------------|-------------------------------------|
| | | | IC ₅₀ (μM) | log IC ₅₀ ± DS | IC ₅₀ (μM) | Log IC ₅₀ ± DS | |
| 10a |  | 3 | 53,6 | 1,729 ± 0,1144 | 21,1 | 1,325 ± 0,0666 | 0,4 |
| 11a | | 4 | 30,4 | 1,489 ± 0,0456 | 3,3 | 0,519 ± 0,1101 | 0,1 |
| 12a | | 5 | 10,6 | 1,025 ± 0,0589 | 0,8 | -0,111 ± 0,0658 | 0,07 |
| 13a | | 6 | 5,0 | 0,697 ± 0,0822 | 4,3 | 0,634 ± 0,0958 | 0,09 |
| 10b |  | 3 | 84,3 | 1,926 ± 0,047 | 42,0 | 1,623 ± 0,0634 | 0,5 |
| 11b | | 4 | 51,2 | 1,709 ± 0,0628 | 13,3 | 1,124 ± 0,0640 | 0,2 |
| 12b | | 5 | 10,1 | 1,002 ± 0,0232 | 1,0 | -0,019 ± 0,029 | 0,1 |
| 13b | | 6 | 4,2 | 0,622 ± 0,0539 | 1,3 | 0,1172 ± 0,0780 | 0,3 |
| 10c |  | 3 | 85,0 | 1,929 ± 0,0682 | 70,2 | 1,846 ± 0,1108 | 0,8 |
| 11c | | 4 | 51,2 | 1,710 ± 0,6283 | 3,3 | 0,1019 ± 0,1019 | 0,1 |
| 12c | | 5 | 12,3 | 1,089 ± 0,0302 | 1,9 | 0,2685 ± 0,0677 | 0,2 |
| 13c | | 6 | 3,6 | 0,562 ± 0,08220 | 9,2 | 0,9635 ± 0,1125 | 2,5 |
| Tacrina | - | - | 0,029 | -1,53 ± 0,05 | 0,004 | -2,35 ± 0,07 | |

^aÍndice de selectividad: IC₅₀(BuCE)/IC₅₀(ACE)

La preparación de los derivados se realizó utilizando los procedimientos mostrados en el **Esquema 1**. En un principio las etapas sintéticas fueron llevadas a cabo de manera convencional, y luego fueron optimizadas reduciendo notablemente los tiempos de reacción y mejorando rendimientos. Dichas ventajas se reflejan en las **tablas 1 y 2**.

Finalmente, la reacción de condensación de los aldehídos **6-9** con anilina se llevó a cabo en el equipo de microondas en tiempos de 1-2 h, con 99% de conversión dando como resultado los compuestos **10-13**.

▪ Estudio *in vitro* de inhibición de ACE y BuCE

La actividad inhibidora de ACE y BuCE de los compuestos **10-13** fue evaluada *in vitro* mediante el método espectrofotométrico de Ellman con ligeras modificaciones. Se

utilizó tacrina como inhibidor de referencia.

Los valores de IC₅₀ para la inhibición de ACE y BuCE se resumen en la **Tabla 3**.

Los resultados muestran que todos los compuestos probados fueron capaces de inhibir ACE y BuCE. El compuesto **13c**, con un espaciador de seis carbonos y dietilamina, mostró la inhibición más potente para ACE con un valor IC₅₀ de 3,6 μM. El compuesto **12a** fue el más efectivo frente a BuCE con un valor IC₅₀ de 0,8 μM. La longitud de cadena óptima para la inhibición de ACE fue la de seis carbonos, mientras que para BuCE fue la de cinco carbonos.

Conclusiones

En conclusión, fueron obtenidos doce nuevos compuestos mediante tres etapas de síntesis asistida por microondas en tiempos mucho más reducidos que

mediante el método convencional. Todos ellos mostraron actividad inhibitoria de CE. Los resultados obtenidos sugieren que los derivados aza-resveratrol con cadena hidrocarbonada de cinco y seis carbonos unida a pirrolidina y dietilamina son los compuesto más efectivos como inhibidores de ACE y BuCE.

El compuesto **13c** con dietilamina unida por una cadena espaciadora de seis carbonos al aza-estilbeno resultó ser el inhibidor más efectivo de ACE (IC_{50} = 3.6 μ M) y **12a**, con

pirrolidina unida a una cadena hidrocarbonada de cinco carbonos, lo fue para BuCE (IC_{50} = 0,8 μ M), por lo tanto, son compuestos candidatos para el desarrollo de nuevas drogas multifuncionales para el tratamiento de la EA.

Financiamiento

Éste trabajo ha sido financiado por CONICET y Universidad Nacional del Sur.

Bibliografía

-
- ¹Da Costa, J.S.; Lopes, J.P.B.; Russowsky, D.; Petzhold, C.L.; Borges, A.C.A.; Ceschi, M.A.; Konrath, E.; Batassini, C.; Lunardi, P.S.; Gonçalves, C.A.S.; *Eur. J. Med. Chem.* 2013, **62**, 556-563.
- ²Alza, N.P.; Richmond, V.; Baier, C.J.; Freire, E.; Baggio, R.; Murray, A.P.; *Bioorg. Med. Chem.* 2014, **22**, 3838-3849.
- ³Luo, W.; Su, Y.B.; Hong, C.; Tian, R.G.; Su, L.P.; Wang, Y.Q.; Li, Y.; Yue, J.J.; Wang,

C.J.; *Bioorg. Med. Chem.* 2013, **21**, 7275-7282.

⁴Bekdemir, Y.; Efil, K.; *Organic Chemistry International* . 2014, Article ID 816487, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/816487>

⁵ Li, S.Y.; Wang, X.B.; Kong, L.Y.; *Eur. J. Med. Chem.* 2014, **71**, 36-45.

⁶Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM. *Biochem. Pharmacol.* 1961, **7**, 88-95.