

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE ACIL-HIDRAZONAS POTENCIALMENTE INIBIDORAS DA GSK-3 β

Palavras-Chave: Alzheimer; acil-hidrazonas; GSK-3 β ; *scaffold hopping*, *docking* molecular.

Autores(as):

Júlia Gonçalves Silva, FCF – UNICAMP

Profa. Dra. Wanda Pereira Almeida (orientadora), FCF – UNICAMP

Prof. Dr. Ricardo Pereira Rodrigues (coorientador), FCF – UNICAMP

1. INTRODUÇÃO:

A Doença de Alzheimer (AD) é a principal demência senil e sua abordagem terapêutica ainda representa um desafio significativo. Os fármacos atualmente utilizados no tratamento consistem em inibidores de acetilcolinesterase (AChE), administrados em monoterapia ou associados à memantina, uma antagonista do glutamato no receptor N- metil-D- aspartato (NMDA).

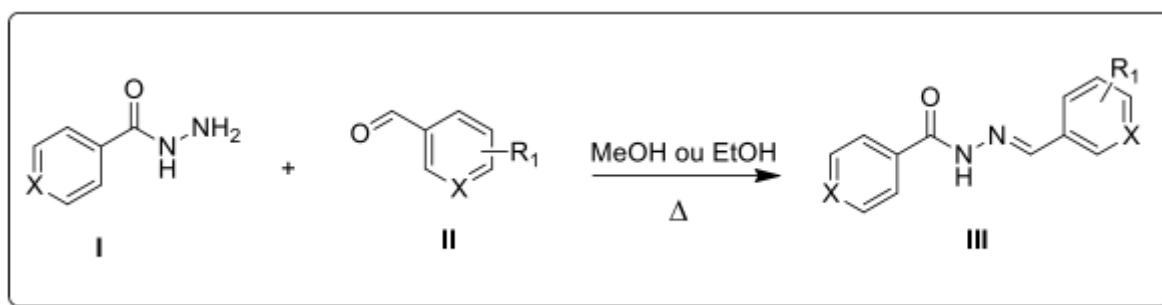
Entretanto, os efeitos sobre o déficit cognitivo são muito modestos, o que acarreta uma pesquisa contínua sobre novos fármacos. Paralelamente aos resultados promissores alcançados pelos dispendiosos anticorpos monoclonais, há um destaque também para pequenas moléculas que possam atuar sobre os marcadores da AD.

A presente proposta se insere em um projeto maior, que é a temática do nosso laboratório de pesquisas, que é a identificação de *hits* e candidatos a fármacos para tratar doenças neurodegenerativas, principalmente a AD. Neste projeto, o objetivo central é a síntese e caracterização de acil-hidrazonas potencialmente ativas frente à 3- β -glicogênio sintase quinase. Esta enzima e seus inibidores têm sido alvo de estudos importantes como alvo potencial para o desenvolvimento de candidatos a fármacos para a AD. A abordagem adotada envolve a síntese de uma série de acil-hidrazonas, a partir da estrutura de pirimidinas, aplicando uma estratégia da Química Medicinal denominada *scaffold hopping*, que consiste basicamente na modificação do núcleo principal da molécula, chegando a análogos estruturalmente relacionados. Os compostos serão caracterizados por métodos e espectroscópicos, e, uma vez confirmadas as estruturas e determinado o grau de pureza, as amostras selecionadas e que atenderem as características de druglikeness serão submetidas ao *docking* molecular.

2. METODOLOGIA:

2.1. Síntese

As acil-hidrazonas foram obtidas por uma reação de condensação entre uma hidrazida I e um aldeído II adequadamente substituídos (Esquema 1). As reações são conduzidas em refluxo de etanol ou metanol, dependendo da solubilidade dos reagentes. A seleção dos substituintes R1 dependeu de: a) propriedades físico-químicas e farmacocinéticas em consonância com os filtros druglikeness; b) estudos paralelos de modelagem molecular com a estrutura cristalina da GSK-3 β .



Esquema 1. Reação de obtenção de acil-hidrazonas III, a partir de hidrazidas I (X = CH, N) e de aldeídos II (X = CH, N)

2.2. Caracterização:

Os compostos foram caracterizados por Espectroscopia no Infravermelho (IV) e de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e de ^{13}C . Os pontos de fusão foram determinados pela técnica do capilar. Os compostos inéditos foram submetidos à análise por espectrometria de massas de alta resolução.

2.3. Propriedades estruturais, físico-químicas e farmacocinéticas

As propriedades relevantes para o perfil de drug-likeness, incluindo peso molecular, número de doadores e aceptores de hidrogênio, logP, TPSA e número de rotações livres, foram calculadas por meio da plataforma SwissADME [13]. Além disso, foram avaliados os filtros de Lipinski, Ghose, Veber, Egan e Muegge, bem como a predição da absorção intestinal e permeabilidade no sistema blood-brain barrier (BBB).

2.4. Docking Molecular

Para simular as interações entre os ligantes e o sítio ativo da enzima e prever com precisão a viabilidade de inibição foi realizado o docking molecular, utilizando o programa AutoDock Vina (versão 1.2.5). A estrutura da proteína foi obtida a partir do banco de dados PDB (código PDB: 1PYX), representando a enzima complexada com o análogo nucleotídico ANP. O ligante co-cristalizado foi utilizado para definição da região ativa e validação do protocolo por redocking.. Isso foi essencial para otimizar o design de moléculas e direcionar a síntese.

Preparo da Proteína e demais ligantes para o Docking Molecular

A preparação da proteína envolveu a remoção do ligante e moléculas de água utilizando o Discovery Studio Visualizer, seguida da adição de hidrogênios polares e cargas parciais de Kollman via AutoDock Tools (versão 1.5.6), resultando no arquivo da proteína no formato PDBQT. Os ligantes foram desenhados no Marvin Sketch, convertidos para 3D e otimizados com o Avogadro e convertidos em formato PDBQT após adição de hidrogênios e cargas de Gasteiger.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO:

3.1. Síntese de acil-hidrazonas

Foram sintetizadas três acil-hidrazonas: 5b, 7b e 15b, pela reação de isoniazida com seus respectivos aldeídos, em etanol sob refluxo (para 5b e 7b) e em metanol anidro à temperatura ambiente (para 15b). Os rendimentos foram de 73%, 84% e 62%, respectivamente. Os produtos obtidos foram sólidos brancos, purificados por recristalização em diclorometano. A pureza das amostras foi verificada por cromatografia líquida (Agilent 1260), com resultados próximos a 99%.

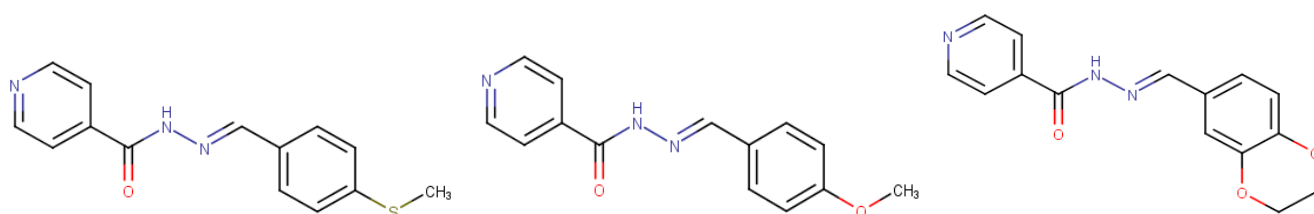


Figura 1. Representação das acil-hidrazonas sintetizadas: 5b, 7b e 15b, respectivamente.

3.2. Caracterização

Ressonância Magnética Nuclear (RMN): Os espectros de ^1H -RMN foram obtidos para os compostos 5b, 7b e 15b em DMSO- d_6 , todos consistentes com dados já relatados na literatura, permitindo confirmar suas estruturas químicas.

Espectrometria de Massas por HRMS: Os espectros de massas de alta resolução foram registrados com ionização por electrospray (modo positivo). Verificou-se a protonação dos nitrogênios ligados à carbonila, fenômeno comum devido ao caráter básico desses átomos. As análises mostraram compatibilidade entre os valores experimentais e simulados, confirmando as massas moleculares esperadas.

3.3. Propriedades estruturais, físico-químicas e farmacocinéticas

Utilizando o software SwissADME, foram avaliadas propriedades como lipofilicidade, solubilidade, peso molecular, TPSA e outros parâmetros relevantes. Todos os compostos da serie apresentam perfil de biodisponibilidade estimada de 55%, boa solubilidade aquosa (LogS entre -2,48 e -2,92) e índice de facilidade de síntese variando entre 2,23 e 2,67, indicando viabilidade. Quanto aos dados farmacocinéticos preditos:

- Todos os compostos têm alta absorção intestinal.
- Nenhum é substrato da glicoproteína-P (P-gp), o que sugere baixa propensão à excreção ativa.
- Apenas a 5b é predito como não capaz de atravessar a barreira hematoencefálica.
- Todos são preditos como inibidores do CYP1A2 do citocromo P450; sendo que apenas 7b também inibe a CYP2C19.
- Nenhum composto inibe as isoformas CYP2D6 e CYP3A4, o que representa uma vantagem sobre a safinamida, que apresenta maior potencial de interações medicamentosas.

Esses dados reunidos na Tabela 2 reforçam o potencial farmacológico dos compostos sintetizados, com destaque para os parâmetros de solubilidade, lipofilicidade moderada (LogP entre 1,73 e 2,34) e valores adequados de TPSA, compatíveis com permeabilidade e absorção oral.

Composto	PM	NLR.	HBA	HBD	RM	TPS	NTA	NH	NA	Log P	Sol.H2O*
s	(g/mol)					A				(Consenso)	(Log S)
						(Å ²)					
Safinamid	302,34	7	4	2	82,48	64,35	41	5	2	2,62	-3,04
a											
5b	271,34	5	3	1	77,13	79,65	32	5	2	2,34	-2,92
7b	255,27	5	4	1	71,90	63,58	32	5	2	2,14	-2,48
15b	283,28	4	5	1	76,28	72,81	34	6	3	1,73	-2,69

Tabela 2. Propriedades moleculares e físico-químicas dos compostos sintetizados e da safinamida, calculadas utilizando o Programa SwissADME.

PM = peso molecular (g/mol); NLR = número de ligações rotacionáveis; HBA = aceptores de hidrogênio; HBD = doadores de hidrogênio; RM = raio molecular (Å); TPSA = área de superfície polar topológica (Å²); NTA = número total de átomos;

NH = número de hidrogênios; NA = número de átomos pesados; Log P = coeficiente de partição lipofílico (valor de consenso); Sol.H₂O (Log S) = solubilidade aquosa estimada.

3.4. Docking Molecular

A técnica de docking foi empregada visando simular as interações entre os compostos sintetizados e o sítio ativo da enzima GSK-3 β . Utilizou-se como modelo estrutural o complexo cristalográfico disponível no PDB (1PYX), contendo uma molécula de ANP no interior do sítio catalítico.

Os compostos 5b, 7b e 15b foram submetidos ao docking, com base na mesma região ocupada pelo ligante co-cristalizado e demonstraram interações moleculares similares às observadas para o ANP, incluindo possíveis ligações de hidrogênio e interações de empilhamento π com resíduos-chave da cavidade ativa.

Os resultados reforçam a afinidade predita dos compostos pela GSK-3 β , sugerindo que tais moléculas apresentam potencial de atuação como inibidores competitivos. Essas evidências justificam a escolha dos três compostos como candidatos promissores para etapas futuras de desenvolvimento.

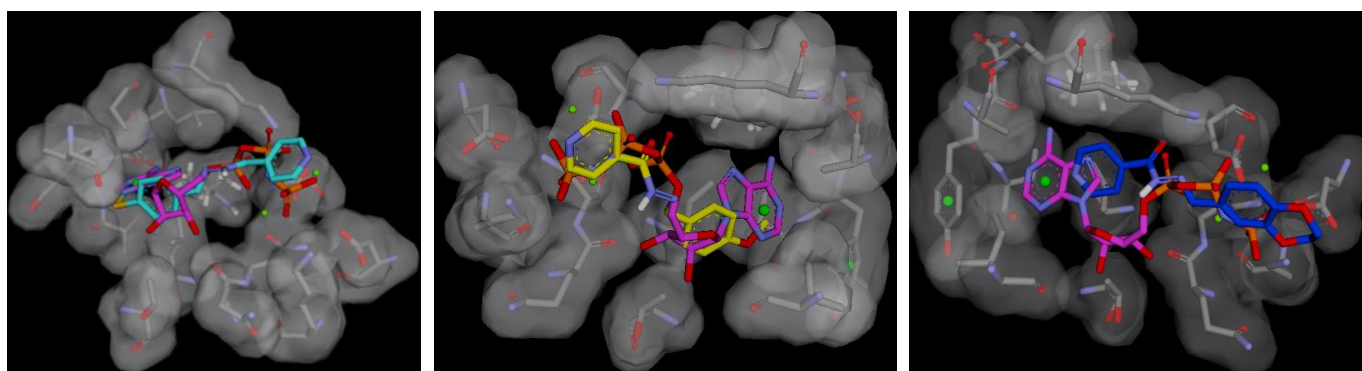


Figura 2. Representação do composto 5b (ciano), 7b(amarelo) e 15b (azul) sobrepostos à molécula 1PYX (rosa e laranja) no sítio ativo da enzima GSK-3 β .

4. CONCLUSÕES:

O presente trabalho permitiu a síntese e caracterização de três acil-hidrazonas derivadas do ácido isonicotínico, com potencial atividade inibitória frente à enzima GSK-3 β , um alvo relevante no contexto da Doença de Alzheimer. Os compostos 5b, 7b e 15b foram obtidos com bons rendimentos e elevada pureza, apresentando características estruturais confirmadas por RMN e espectrometria de massas de alta resolução.

As predições de propriedades físico-químicas e farmacocinéticas, realizadas por meio da plataforma SwissADME, indicaram que os compostos possuem parâmetros compatíveis com o perfil druglikeness e boa absorção intestinal, além de baixa probabilidade de interações indesejadas com as principais isoformas do citocromo P450, como CYP3A4 e CYP2D6. Os estudos de docking molecular reforçaram o potencial inibitório dessas moléculas, mostrando interações relevantes com o sítio ativo da GSK-3 β e sugerindo um encaixe adequado na região do sítio ativo da enzima.

Dessa forma, os dados obtidos demonstram que as acil-hidrazonas sintetizadas apresentam candidatos promissores para etapas subsequentes de desenvolvimento, incluindo testes biológicos *in vitro* e, futuramente, estudos *in vivo*. O trabalho contribui para o avanço na identificação de novas entidades moleculares com potencial terapêutico para doenças neurodegenerativas, em especial a Doença de Alzheimer.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Alzheimer's Association. Alzheimer's disease facts and figures, 2024. <https://www.alz.org/media/documents/alzheimers-facts-and-figures.pdf>.
- [2] Chen, Z. -R.; Huang, J.-B.; Yang, S.-L.; Hong, F.- F. Role of Cholinergic Signaling in Alzheimer's Disease, *Molecules* 27 (2022), 1816. <https://doi.org/10.3390/molecules27061816>
- [3] Iqbal, K.; Grundke-Iqbal, I. Alzheimer Disease, a Multifactorial Disorder Seeking Multi-therapies. *Alzheimer's dementia*, 6 (2010), 420-424. [10.1016/j.jalz.2010.04.006](https://doi.org/10.1016/j.jalz.2010.04.006)
- [4] a) Sakata, R. P.; Antoniolli, G.; Almeida, W. P. et al. Synthesis, and biological evaluation of 2'-Aminochalcone: A multi-target approach to find drug candidates to treat Alzheimer's disease. *Bioorganic Chemistry*, 103 (2020) 104201. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104201>. ; b) Da Silva, G.S.; Figueiró, M.; Almeida, W.P. Effects of novel acylhydrazones derived from 4-quinolone on the acetylcholinesterase activity and A β 42 peptide fibrils formation. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31 (2016), 1464-1470. <https://doi.org/10.3109/14756366.2016.1144597>
- [5] Hampel, H.; Hardy, J.; Blennow, K., et al. The Amyloid- β Pathway in Alzheimer's Disease. *Molecular Psychiatry*, 26 (2021) 5481–5503. <https://doi.org/10.1038/s41380-021-01249-0>
- [6] Ahmed, M.; Davis, J.; Aucoin, D.; et al. Structural conversion of neurotoxic amyloid- β (1-42) oligomers to fibrils. *Nature Structure Molecular Biology*, 17 (2010) 561–567. <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb.1799>.
- [7] Busche, M. A.; Hyman, B. T. Synergy between amyloid- β and tau in Alzheimer's disease. *Nature Neuroscience*, 23 (2020) 1183-1193. <https://doi.org/10.1038/s41593-020-0687-6>
- [8] Maqbool, M.; Mobashir, M.; Hoda, N. Pivotal role of glycogen synthase kinase 3: a therapeutic target for Alzheimer disease. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 107 (2016) 63-81. [10.1016/j.ejmech.2015.10.018](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.10.018)
- [9] Moreno-Jiménez, E. P.; Flor-García, M.; Terreros-Roncal, J. et al. Adult hippocampal neurogenesis is abundant in neurologically healthy subjects and drops sharply in patients with Alzheimer's disease. *Nature Medicine*, 25 (2019) 554-560. [10.1038/s41591-019-0375-9](https://doi.org/10.1038/s41591-019-0375-9)
- [10] Morales-Garcia, J. A.; Luna-Medina, R.; Alonso-Gil, S., et al. Glycogen synthase kinase 3 inhibition promotes adult hippocampal neurogenesis in vitro and in vivo. *ACS Chemical Neuroscience* 3 (2012) 963-971. [10.1021/cn300110c](https://doi.org/10.1021/cn300110c)
- [11] Luo, G.; Chen, L.; Burton, C. R., ET AL. Discovery of isonicotinamides as highly selective, brain penetrable and orally active glycogen synthase kinase 3- inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 59 (2016) 1041-1051. [10.1021/acs.jmedchem.5b01550](https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01550)
- [12] Böhm, H. J.; Flohr, A.; Stahl, M. Scaffold Hopping. *Drug Discovery Today Technology*, 1 (2004) 217–224. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2004.10.009>
- [13] A. Daina, O. Michielin, V. Zoete. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness, and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific Reports*, 7 (2017) 42717. <https://doi.org/10.1038/srep42717>