

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**CAMILA COELHO RODRIGUES**

**ESTUDO DA APOCININA, DIAPOCININA E DERIVADOS: SÍNTESE,  
MODELAGEM MOLECULAR, AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ACEPTORA DE  
RADICAIS E NEUROPROTETORA FRENTE A SINTOMAS DA  
DOENÇA DE PARKINSON**

**Uruguiana  
2018**

**CAMILA COELHO RODRIGUES**

**ESTUDO DA APOCININA, DIAPOCININA E DERIVADOS: SÍNTESE,  
MODELAGEM MOLECULAR, AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ACEPTORA DE  
RADICAIS E NEUROPROTETORA FRENTE A SINTOMAS DA  
DOENÇA DE PARKINSON**

Dissertação de Mestrado apresentado ao  
Programa de Pós Graduação em Ciências  
Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Fávero Reisdorfer Paula

**Uruguaiana  
2018**

**CAMILA COELHO RODRIGUES**

**ESTUDO DA APOCININA, DIAPOCININA E DERIVADOS: SÍNTESE,  
MODELAGEM MOLECULAR, AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ACEPTORA DE  
RADICAIS E NEUROPROTETORA FRENTE A SINTOMAS DA  
DOENÇA DE PARKINSON**

Comissão Julgadora  
da  
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

---

Prof. Dr. Fávero Reisdorfer Paula  
Orientador

---

Prof. Dr. Elton Luís Gasparotto Denardin  
Universidade Federal do Pampa

---

Prof. Dr. Juliano Braun de Azeredo  
Universidade Federal do Pampa

Uruguaiana, 13 de julho de 2018

## **AGRADECIMENTOS**

É difícil agradecer todas as pessoas que de algum modo, nos momentos serenos e ou apreensivos, fizeram ou fazem parte da minha vida e que de alguma forma colaboraram com a realização deste trabalho, por isso primeiramente agradeço a todos de coração.

Agradeço aos meus pais, Lucia e Cleir pelo apoio e suporte que me deram durante esses dois anos e, por muitas vezes abrirem mão de outras coisas para que esse sonho pudesse ser realizado. Sem o carinho, o apoio e o incentivo de vocês nada seria possível. Amo vocês!

Ao professor Elton e o pessoal do seu laboratório, que sempre estiveram dispostos a nos ajudar. E ao professor Clésio que foi sempre prestativo e muito atencioso quando precisei de sua ajuda. Aos demais professores do curso, agradeço pelos ensinamentos e pelas lições não só profissionais, mas também de vida compartilhados em sala de aula. E agradeço também as pessoas que cruzaram na minha vida nessa jornada, que direta ou indiretamente contribuíram, em especial a minha colega e hoje amiga Mayara, obrigada pelo coleguismo, amizade e troca de experiências.

Ao aluno de iniciação científica e hoje amigo para toda a vida, Alex. Obrigada pelo companheirismo, pela convivência, pelas risadas. Por ter abraçado esta pesquisa e sempre estar disposto a ajudar, contribuindo muito para a realização desse trabalho, obrigada por tudo! E também ao aluno Mauricio que no final desse período ajudou para que esse trabalho fosse concretizado.

Agradeço à meu orientador Fávero pela competência e atenção, que me ajudou a trilhar este caminho para que eu chegasse até aqui. Pela oportunidade de trabalharmos juntos, e por toda a experiência e ensino transmitidos. Muito obrigada!

Por fim, agradeço a Deus que iluminou toda minha trajetória durante o mestrado, me fortalecendo nos momentos em que mais necessitei e, nos momentos de ausência de pessoas importantes foi sempre o meu porto seguro e escutou minhas orações.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema de representação da diferença da quantidade de dopamina e acetilcolina na doença de Parkinson .....	18
Figura 2 - Estrutura química da apocinina.....	22
Figura 3 - Estrutura química da diapocinina (A) e do análogo estrutural bioativo obtido por Marchiani et al. (2013) (B) .....	23
Figura 4 - Estrutura química padrão de chalconas (A) e das chalconas derivadas da diapocinina (B) .....	31
Figura 5 - Diagrama de Craig (correlação de $\sigma$ versus $\pi$ em para e meta-substituição aromática) e derivados das chalconas escolhidos .....	32
Figura 6 - Esquema de reação de obtenção da diapocinina a partir da apocinina ....	33
Figura 7 - Esquema de obtenção de chalconas derivadas da diapocinina.....	34
Figura 8 - Esquema ensaio apocinina e diapocinina .....	38
Figura 9 - Esquema ensaio das chalconas derivadas da diapocinina .....	39
Figura 10 - Cromatoplaça contendo os sinais de migração do material de partida apocinina (A) e da diapocinina (B) .....	45
Figura 11 - Cromatogramas dos compostos apocinina (A) e diapocinina (B) obtidos com o emprego de CLAE .....	47
Figura 12 - Espectro de ATR-FTIR da diapocinina.....	48
Figura 13 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ da diapocinina.....	49
Figura 14 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ da diapocinina.....	50
Figura 15 - Proposta de mecanismo de formação da diapocinina: Reação de acoplamento radicalar de grupo fenoxi e tautomerização ceto-enólica.....	51
Figura 16 - Fotos da corrida cromatográfica em coluna realizada para a 4-clorochalcona derivada da diapocinina .....	52
Figura 17 - Cromatogramas das chalconas derivadas da diapocinina 4-Cl (A) e 4-OCH <sub>3</sub> (B) .....	54
Figura 18 - Curva de calibração do DPPH em faixa de concentração 10 a 50 $\mu\text{M}$ ...	56
Figura 19 - Foto dos resultados da avaliação de atividade aceptora de radicais DPPH realizada em microplaca (coloração rosa presença de radical e redução desta a partir da redução de coloração até atingir coloração levemente amarelada) .....	57
Figura 20 - Número de <i>Drosophila melanogaster</i> sobreviventes quando expostas ao paraquat e a apocinina.....	59
Figura 21 - Resultado do ensaio de toxicidade da apocinina e diapocinina expostos ao PQ .....	61
Figura 22 - Capacidade de escalada do controle e dos compostos nas concentrações 0,05; 0,1 e 0,15 $\mu\text{M}$ quando expostos ao Paraquat .....	62
Figura 23 - Número de travessias das DM quando expostos ao Paraquat (PQ), nas concentrações 0,05; 0,1 e 0,15 $\mu\text{M}$ da apocinina e diapocinina.....	63

Figura 24 - Estruturas químicas da apocinina, dopamina e epinefrina .....	64
Figura 25 - Estrutura química dos confôrmeros de menor energia mínima obtido por método DFT B3LYP-6.31G* para a apocinina (A) e a diapocinina (B): modelo misto de bolas e tubo. Coloração dos átomos: C (cinza); H (branco); O (vermelho) .....	65
Figura 26 - Principais interações da apocinina e a diapocinina com o segmento p47 da estrutura cristal da proteína NOX em conformação aberta (PDB: 1NG2) .....	69
Figura 27 - Principais Interações dos compostos apocinina (A) e diapocinina (B) com resíduos de aminoácidos envolvidos no local de ligação de NOX-1 (PDB: 1K4U)....	71

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Rendimento (%) das diapocininas obtidas .....	46
Tabela 2 - Frequências em $\text{cm}^{-1}$ características de grupos funcionais encontrados na diapocinina .....	48
Tabela 3 - Valores utilizados para a construção da curva de calibração do ensaio de DPPH .....	55
Tabela 4 - Resultados em porcentagem obtidos no ensaio sequestrante de radical pelo DPPH em microplaca da apocinina e diapocinina .....	57
Tabela 5 - Resultados em porcentagem obtidos no ensaio sequestrante de radical pelo DPPH em microplaca das chalconas derivadas da diapocinina .....	58
Tabela 6 - Valores de propriedades físico-químicas calculadas com o programa Molinspiration .....	66
Tabela 7 - Energias de interação (Van der Waals - VDW, ligação de hidrogênio e eletrostática) entre a apocinina e a diapocinina e o receptor NOX-1 (1NG2) obtidas com o uso de software Igemdock 2.1 .....	70
Tabela 8 - Principais interações entre a apocinina e a diapocinina (Van der Waals - VDW, ligação de H – Lig-H, e eletrostática – elet.) e os resíduos de aminoácidos envolvidos na ligação com o sítio ativo da NOX-1 (1K4U) com normal e aplicação de Análise Consenso Residual obtidas com o uso de software Igemdock 2.1 .....	71
Tabela 9 - Risco de efeitos tóxicos calculados no programa OSIRIS® Property Explorer e admetSAR para a apocinina, diapocinina e chalconas derivadas da diapocinina .....	72

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3D – Tridimensional

ABTS - 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)

AchE - Acetilcolinesterase

ADMET - Absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade

ATR-FTIR - Espectrofotômetro de Infravermelho com acessório de reflexão atenuada

BG - *Bougainvillea glabra choisy*

BHT – 2,6-di-terc-butil-4-metil-fenol

CCD – Cromatografia de camada delgada

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

DFT - Density Functional Theory

DM - *Drosophila melanogaster*

DMSO – Dimetilsulfóxido deuterado

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

DP - Doença de Parkinson

DPPH - 2,2-difenil-1-picrilidrazila

EROs - Espécies reativas de oxigênio

GA - Algoritmo genético

IL-10 – Interleucina-10

LBDD - Ligand-based drug design

MHz - Megahertz

miLogP - Coeficiente de partição

NADPH – Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina

nm - Nanômetro

nAtom - Número de átomos

NCE - Nova Entidade Química

NDA - New Drug Application

nOHNH – Número de doador de ligações de hidrogênio

nON – Número de acceptor

nRot – Número rotações das ligações

PDB - Protein Data Bank

PM – Peso molecular

Ppm - Partes por milhão

PQ – Paraquat

QSAR - Relação quantitativa entre a estrutura e atividade

RMN - Ressonância magnética nuclear

SAR – Relação entre a estrutura e atividade

SBDD - Structure-based drug design

SN - Substância nigra

SBDD - Structure-based drug design

TNF- $\alpha$  - Fator de necrose tumoral alfa

TPSA - Área de superfície polar topológica

UFSM - Universidade Federal de Santa Maria

UV – Radiação ultravioleta

UV-VIS – Radiações ultravioleta-visível

VDW - Van der Waals

VM – Volume molecular

$\pi$  - Valores de propriedades físico-químicas de hidrofobicidade

$\sigma$  - Valores de propriedades físico-químicas de efeito eletrônico

$\lambda$  – Comprimento de onda

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	12
2. OBJETIVOS .....	14
2.1 OBJETIVO GERAL .....	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	14
3. JUSTIFICATIVA .....	15
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	16
4.1 Doença de Parkinson.....	16
4.2 Radicais Livres e Estresse Oxidativo .....	19
4.3 Compostos com Ação Antiparkinsoniana.....	21
4.3.1 Apocinina .....	21
4.3.2 Diapocinina .....	22
4.3.3 Chalconas.....	23
4.4 Protocolos <i>in vivo</i> de Avaliação de Atividade Antiparkinson .....	24
4.5 Planejamento e Desenvolvimento de Fármacos.....	26
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
5.1 Reagentes.....	30
5.2 Equipamentos e materiais.....	30
5.3 Planejamento dos compostos - padrão de substituição .....	30
5.4 Substituição do grupo ácido no anel B.....	31
5.5 Síntese da diapocinina.....	33
5.6 Procedimento de obtenção das chalconas - Condensação de Claisen-Schmidt .....	33
5.7 Caracterização estrutural da diapocinina e das chalconas .....	36
5.8 Determinação da atividade antioxidante .....	36
5.8.1 Determinação da curva do DPPH.....	36
5.8.2 Preparo de soluções - Apocinina e diapocinina .....	37
5.8.3 Ensaio – Apocinina e diapocinina .....	37
5.8.4 Preparo de soluções - Chalconas.....	38
5.8.5 Ensaio - Chalconas.....	38
5.9 Ensaio de avaliação dos sintomas de Doença de Parkinson - <i>Drosophila melanogaster</i> .....	40
5.9.1 Cultura e Tratamento de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	40
5.9.2 Ensaio de sobrevivência de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	40
5.9.3 Ensaio de toxicidade do Paraquat e ensaios de comportamento .....	40

5.9.4 Ensaio de geotaxia negativo.....	41
5.9.5 Ensaio de comportamento .....	41
5. 10 Modelagem Molecular .....	41
5.10.1 Cálculos dos modelos em 3D e estudo de propriedades físico-químicas	41
5.1.2 Estudos de ancoramento molecular (Docking) .....	42
5.1.3 Avaliação da Toxicidade <i>in silico</i> .....	43
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
6.1 Planejamento dos compostos e padrão de substituição .....	44
6.2 Síntese da diapocinina.....	45
6.3 Obtenção das chalconas.....	51
6.4 Ensaio sequestrante de radical pelo DPPH .....	55
6.5 Ensaio de avaliação dos sintomas de Doença de Parkinson em <i>Drosophila melanogaster</i> .....	58
6.5.1 Ensaio de sobrevivência de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	59
6.5.2 Ensaio de toxicidade do Paraquat e ensaios de comportamento .....	60
6.6 Modelagem Molecular dos compostos.....	64
6.6.1 Desenho, análise e cálculo de propriedades físico-químicas .....	64
6.6.2 Análise de Docking Molecular.....	67
6.6.3 Avaliação da Toxicidade <i>in silico</i> .....	72
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	73
8. PERSPECTIVAS.....	75
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	76

## RESUMO

A apocinina apresenta estrutura pequena e possui diversas atividades biológicas, sua estrutura pode ser oxidada em certas condições e resultar na formação do seu dímero, a diapocinina. Como um potencial agente terapêutico, análogos estruturais da diapocinina, contendo grupos substituintes ligados a esta molécula, podem apresentar atividade neuroprotetora e aceptora de radicais. As chalconas apresentam estrutura química 1,3-diaril-2-propen-1-ona simples que permite variadas modificações estruturais com a finalidade de otimizar o perfil farmacológico ou direcioná-las para diferentes atividades biológicas. A resposta de maior destaque é a capacidade aceptora de radicais e atividade neuroprotetora. Neste trabalho foram realizadas a síntese e caracterização da diapocinina e seus derivados, a avaliação das propriedades físico-químicas e da atividade aceptora de radicais, estudos de modelagem e docking molecular, toxicidade *in silico* e *in vivo*, com a finalidade de se obter compostos que possam ser empregados como candidatos a novos fármacos aceptores de radicais e antiparkinsonianos. A diapocinina foi sintetizada a partir da apocinina e caracterizada por CLAE, espectroscopia IV, e RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . As chalconas derivadas da diapocinina com substituintes 4-Cl, 4-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 4-OCH<sub>3</sub> e 4-NO<sub>2</sub>, foram sintetizadas através da condensação de Claisen-Schmidt. A análise de capacidade aceptora de radicais foi realizada através do ensaio de DPPH utilizando como padrão BHT. A análise de toxicidade *in silico*, especificamente o risco de causar genotoxicidade, mutagenicidade, efeitos irritante e sobre sistema reprodutor, foi realizado através dos programas computacionais *Osiris Property Explorer* e *admetSAR*. Os estudos de docking molecular foram realizados utilizando o software *iGemdock 2.1* e envolveu a avaliação de ligação individual da apocinina e diapocinina. Os protocolos experimentais pré-clínicos *in vivo* de avaliação de atividade frente a sintomas de doença de Parkinson foi realizado com *Drosophila melanogaster*. A apocinina demonstrou capacidade de captura de DPPH maior que seu dímero, sugerindo-se que este composto se apresenta como melhor candidato para o desenvolvimento de compostos com atividade antioxidante potencial. A partir da análise da toxicidade *in silico* observou-se que somente os compostos 4-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> e 4-NO<sub>2</sub> apresentaram riscos de causar os efeitos mutagênicos e genotóxicos, sendo que os demais compostos apresentaram risco teórico baixo. Os resultados obtidos no estudo de docking molecular permitiram a obtenção de modelos teóricos onde a apocinina e a diapocinina não possuem ligação no mesmo sítio de interação. Assim sugere-se que estruturas químicas possam, de maneira simultânea, atuar no mesmo alvo, mas em sítios adjacentes de interação. A avaliação da atividade frente a sintomas da doença de Parkinson realizada através de ensaio de sobrevivência, toxicidade e comportamento com *Drosophila melanogaster* constata que tanto a apocinina e diapocinina são compostos promissores para o estudo e o desenvolvimento de agentes para se utilizar na terapêutica, com atividade neuroprotetora.

**Palavras-chave:** Apocinina, Diapocinina, Chalconas, Síntese Orgânica, Antioxidante, Antiparkinsoniana.

## ABSTRACT

Apocynin is phenolic compound with a small structure which exhibit diverse pharmacological activities. Aromatic ring structure can be oxidized under enzymatic or in oxidizing medium generating its dimer, diapocinin. Structural analogues of diapocinin are considering a potential therapeutic agent, and depending on substituent moieties attached to this molecule. Chalcones have a simple chemical 1,3-diaryl-2-propen-1-one structure which allows structural modifications aiming the optimization of the broad recognized pharmacological profile or to reach some different biological activities. Oxygen radical acceptor (antioxidant) and neuroprotective are highlighted biological activities observed to these class of compounds and they were studied in this research. In this work, the synthesis and characterization of diapocinin and its chalcone derivatives, the evaluation of physicochemical properties and radical acceptor activity, molecular modeling and docking studies, in silico and in vivo toxicity, and evaluation of Parkinson's disease in *Drosophila melanogaster* protocols were performed in order to support the new antioxidant and antiparkinsonian drugs. Diapocinin was synthesized from apocynin and characterized by HPLC, IR spectroscopy, and  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR. Chalcones derived from diapocinin, with 4-Cl, 4-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 4-OCH<sub>3</sub> and 4-NO<sub>2</sub>, were synthesized by the condensation of Claisen-Schmidt. Radical acceptor evaluation was performed using DPPH assay using BHT as standard. In silico toxicity analysis, specifically the risk of causing genotoxicity, mutagenicity, irritant effects and activity on the reproductive system, were performed using Osiris Property Explorer and admetSAR. Molecular docking studies were performed using iGemdock 2.1 software, and this study involved the evaluation of individual binding of apocynin and diapocinin and alfa-synuclein and NADPH oxidase. In vivo preclinical experimental protocols of activity against Parkinson's disease symptoms were performed with *Drosophila melanogaster*. Apocynin demonstrated higher DPPH radical capture than diapocynin, suggesting that this compound is the best candidate for the development of compounds with potential antioxidant activity. From the analysis of in silico toxicity, it was observed the 4-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> and 4-NO<sub>2</sub> compounds presented risks of causing the mutagenic and genotoxic effects, and the other compounds presented low theoretical risk. The results obtained in the molecular docking study allowed the generation of theoretical models which the apocynin and diapocinin not show binding or interactions in the same molecular protein site. Thus, it is suggested that chemical structures may, simultaneously, act on the same target, but in adjacent sites of interaction. The evaluation of activity against Parkinson's disease symptoms performed by survival, toxicity and behavior assays with *Drosophila melanogaster* suggest the both apocynin and diapocinin are promising compounds for the study and development of agents to be used in therapy, with neuroprotective activity.

Key words: Apocynin, Diapocinin, Chalcone, Organic Synthesis, Antioxidant, Antiparkinsonian drugs.

# 1. INTRODUÇÃO

---

A química farmacêutica medicinal tem por finalidade a busca e a descoberta de agentes bioativos novos, bem como o planejamento e o desenvolvimento de agentes terapêuticos eficazes que apresentem reduzidos índices de efeitos colaterais. O processo global de descoberta e desenvolvimento de um composto bioativo, desde o início das pesquisas, até o seu lançamento no arsenal terapêutico demanda tempo, aproximadamente de quinze anos, e recursos elevados, de cerca de oitocentos milhões de dólares americanos (CHONG *et al.*, 2007). Desta forma, um medicamento inovador chegará ao mercado com custo alto e, muitas vezes, inacessível para o uso pela população em geral.

Uma solução eficaz para atenuar o tempo e aperfeiçoar o processo de obtenção de fármacos é a pesquisa de substâncias ativas a partir de compostos com atividade biológica estabelecida, ensaiados a partir de protocolos de ação aprovados pela comunidade científica. Os produtos naturais constituem uma das fontes principais para a obtenção de agentes bioativos candidatos a novos fármacos. A biodiversidade da natureza é ponto positivo uma vez que fornece substâncias que podem ser utilizadas como protótipos para o desenvolvimento de agentes terapêuticos a serem utilizados para o tratamento de diversas doenças (CHONG *et al.*, 2007).

A apocinina, um composto fenólico, foi isolada a partir da planta nativa *Picrorhiza kurroa* encontrada no Himalaia e tem sido extensivamente estudada para explorar suas aplicações terapêuticas potenciais no tratamento de doenças (HEUMÜLLER *et al.*, 2008). Ela apresenta capacidade para prevenir à formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e, tem sido amplamente utilizada como um inibidor da enzimas NADPH oxidase, também responsável pela liberação de EROs (MORA-PALE *et al.*, 2009). Segundo Heumüller *et al.* (2008) esta molécula é biotransformada e ativada pela enzima mieloperoxidase em leucócitos, sendo considerada um pró-fármaco, o que resulta na formação do seu dímero, a diapocinina, que também é ativo na inibição de espécies reativas de oxigênio e da enzima NADPH.

Ghosh *et al.* (2012) verificaram que a diapocinina apresentou atividade de neuroproteção frente a sintomas da doença de Parkinson (DP) em ratos, uma vez que reduziu os sintomas observados, quando submetidas a protocolos experimentais pré-

clínicos. Outro estudo, realizado por Marchiani *et al.* (2013) sugeriu que análogos estruturais da diapocinina, contendo grupos substituintes ligados a esta moléculas, poderiam apresentar atividade neuroprotetora e aceptora de radicais, o que também pode ser benéfico para o tratamento da doença de Parkinson. Por apresentar maior hidrofobicidade, a diapocinina deve ser mais susceptível a atravessar a barreira hematoencefálica e, potencialmente, pode apresentar maior eficácia em doses mais baixas a serem utilizadas na DP. A administração de diapocinina pode oferecer uma maior proteção do que apocinina, sendo um potencial agente terapêutico (TRUMBULL *et al.*, 2012).

As chalconas são compostos de origem vegetal, precursores da via de biossíntese de flavonoides de cadeia aberta, que apresentam atividades biológicas diversas (DEVIA *et al.*, 1998; HASSAN, 2011). Sua estrutura química relativamente simples permite variadas modificações estruturais com a finalidade de otimizar o perfil farmacológico observado ou direcioná-las especificamente para diferentes atividades biológicas (DEVIA *et al.*, 1998; NIELSEN *et al.*, 2005; AVILA *et al.*, 2008).

Estudos demonstraram que modificações estruturais nos anéis aromáticos das chalconas, apresentam-se como alternativas viáveis em protocolos de ação aceptora de radicais e antiparkinson, apresentando-se desta forma como proposta viável para o desenvolvimento de fármacos com atividade neuroprotetora a neurônios (PATIL, 2009; NOBRE-JÚNIOR *et al.*, 2009).

As atividades aceptoras de radicais e antiparkinsoniana da apocinina, diapocinina e das chalconas, evidenciam a necessidade de realização de novos estudos envolvendo estas moléculas bioativas. Esta classe de compostos mostra-se como alvo importante para a aplicação de métodos utilizados em planejamento de fármacos. Neste trabalho, propôs-se a síntese da diapocinina, de compostos da classe das chalconas derivadas da diapocinina, a determinação de suas propriedades físico-químicas, e a avaliação dos efeitos aceptores de radicais e dos sintomas clínicos característicos da DP, com a finalidade de explorar o seu potencial terapêutico.

## **2. OBJETIVOS**

---

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Estudar os compostos apocinina, diapocinina e derivados chalconas da diapocinina que possam ser empregados como candidatos a novos fármacos aceptor de radicais e antiparkinsoniano.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Sintetizar e caracterizar a diapocinina e chalconas derivados da diapocinina, candidatas a novos aceptores de radicais e antiparkinsonianos;
- Avaliação das propriedades físico-químicas dos compostos estudados;
- Realizar estudos de modelagem molecular dos compostos propostos e de ancoramento molecular para se propor modelos de interação entre compostos bioativos e o receptor;
- Avaliar a atividade aceptor de radicais dos compostos propostos através de ensaio DPPH;
- Realizar estudos toxicidade *in silico* dos compostos propostos;
- Realizar estudos de atividade sobre sintomas relativos à doença de Parkinson *in vivo* com modelo animal *Drosophila melanogaster*.

### **3. JUSTIFICATIVA**

---

A diapocinina, é dímero covalente da apocinina que se apresenta como agente terapêutico potencial. Esta substância tem sido mencionada para ser um potente inibidor da enzima que produz superóxido, a NADPH oxidase, sendo esta proteína uma importante fonte de estresse oxidativo no cérebro, principalmente em doenças neurodegenerativas.

As chalconas são substâncias de origem natural com estrutura química estabelecida que apresenta diversas atividades biológicas e atividade neuroprotetora a neurônios. As respostas biológicas de maior destaque são a capacidade aceptora de radicais (considerada antioxidante) e a ação antiparkinsoniana.

A modificação estrutural de compostos com ação antiparkinsoniana e/ou aceptora de radicais, como a diapocinina e as chalconas, se apresenta como alternativa viável para o estudo e a busca de novos agentes bioativos. Entre os métodos que delineiam a modificação molecular da estrutura química de moléculas ativas destaca-se a hibridização molecular, que é uma estratégia eficaz para propor alterações e a obtenção de compostos novos com atividade biológica potencial. No caso deste trabalho, o emprego da hibridização molecular da apocinina, e a consequente obtenção da diapocinina, foi combinada com métodos de planejamento de fármacos, como a modelagem molecular de compostos bioativos e o estudo das propriedades físico-químicas. A aplicação destas metodologias na pesquisa de diapocinina e de chalconas com ações antiparkinsoniana e antioxidante promissoras forneceram dados importantes que darão suporte a obtenção de novos agentes terapêuticos.

Este estudo visou à investigação da atividade biológica de compostos derivados da estrutura química da diapocinina e das chalconas, através da sua síntese orgânica, com inserção de grupos substituintes no anel B das chalconas, e da avaliação da atividade aceptora de radicais e antiparkinsoniana. Esta pesquisa teve a finalidade de obter informações que direcionem a busca de compostos candidatos a fármacos antiparkinsonianos e/ou aceptores de radicais, que possam ser empregados como neuroprotetores.

# **4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## **4.1 Doença de Parkinson**

Doenças neurodegenerativas são caracterizadas por um distúrbio no sistema nervoso central relacionados com a morte de neurônios, com redução da capacidade cognitiva, de evolução gradual e irreversível. Uma delas é a doença de Parkinson que foi primeiramente descrita em 1817 por James Parkinson (MONTEIRO, 2007).

A doença de Parkinson é um distúrbio neurológico que possui evolução crônica e progressiva e é caracterizada por sinais e sintomas basicamente relacionados a desordens motoras, como tremores, bradicinesia e rigidez muscular, juntamente com vários sintomas não-motorizados. Entre estes últimos se destacam o comprometimento da memória, depressão, alterações do sono e distúrbios do sistema nervoso autônomo (STOKES, 2000; MONTEIRO, 2007).

Apesar dos avanços da medicina e da investigação científica nesta área, a origem da DP ainda tem que ser esclarecida. Alguns estudos mostram que esta enfermidade manifesta-se normalmente na forma esporádica, constatando uma maior incidência da doença em populações expostas continuamente a toxinas ou fatores ambientais, tais como pesticidas, herbicidas, químicos industriais ou metais, ao longo da vida (PERFEITO *et al.*, 2012).

O início da DP geralmente é apontado pela família, colegas ou amigos do indivíduo portador a partir do estabelecimento de pequenas mudanças diárias. O desenvolvimento inicial da enfermidade costuma ser silencioso e dificilmente o próprio paciente identifica o momento exato de confirmação de seu estado clínico atual (GONÇALVES *et al.*, 2007). Os efeitos e sintomas da DP podem prejudicar as atividades de vida diária do portador resultando em uma diminuição da participação social e qualidade de vida, tornando-se assim uma das doenças com maior impacto negativo aos portadores (MORRIS, 2000).

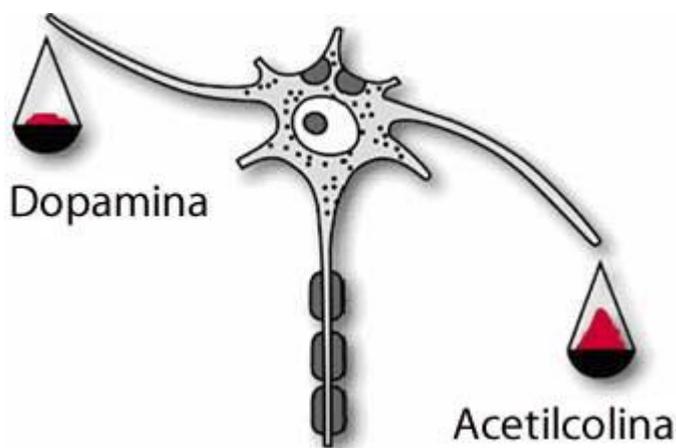
A DP é considerada a segunda doença neurodegenerativa senil mais comum (NAKABAYASHI *et al.*, 2008), sendo que sua prevalência é estimada em 1% a 2 % da população acima de 65 anos (TEXEIRA *et al.*, 2004), embora uma pequena porcentagem possa ser acometida pela doença na faixa dos 40, e até 30 anos

(LODOVICI, 2006). Sua incidência tem variação entre diferentes países, no entanto sugere-se que estas diferenças não possuem relação com diferenças étnicas e/ou geográficas. Estudos recentes mostram que 3,4 % da população acima de 64 anos de idade têm DP no Brasil (AZEVEDO *et al.*, 2009). O sexo masculino apresenta incidência maior da doença do que o sexo feminino, em uma proporção de 3:2 (O´SULLIVAN *et al.*, 1993).

O surgimento dos sinais da DP é causado principalmente pela deficiência da dopamina na região da substância nigra (SN) no cérebro, sendo esta substância um neurotransmissor importante na coordenação motora (O´SULLIVAN *et al.*, 1993). Desse modo, as características patológicas da DP estão associadas pelo esgotamento de dopamina estriatal, causada pela degeneração dos neurônios dopaminérgicos, e aparecimento de corpos citoplasmáticos inclusos, conhecidos como corpos de Lewis e ativação de células gliais (GHOSH *et al.*, 2012). Estes corpos são constituídos principalmente pelas proteínas alfa-sinucleína, ubiquitina e sinfilina-1, sendo que a mutação do gene da alfa-sinucleína e multiplicação destes estão relacionadas ao desenvolvimento de formas familiares da DP (PERFEITO *et al.*, 2012). Esta situação pode ocasionar a destruição celular ou tornar os neurônios da SN mais suscetíveis a presença de agentes tóxicos (SILVA, 2003).

A redução da dopamina resulta em desequilíbrio entre neurotransmissores cerebrais, onde a conseqüente elevação da concentração da acetilcolina ativa o processo de contração muscular e assim manifesta-se a base fisiopatológica da DP. Este cenário se estabelece quando há uma diminuição de 25% do funcionamento dos neurônios dopaminérgicos (MONTEIRO, 2007).

Figura 1 – Esquema de representação da diferença da quantidade de dopamina e acetilcolina na doença de Parkinson



Fonte: Adaptado de MONTEIRO, 2007.

Para que os sinais clínicos da DP se tornem evidentes clinicamente é necessário que exista perda de cerca de 80% dos neurônios responsáveis pela produção de dopamina, na SN e o mesmo grau de depleção de dopamina no corpo estriado (NATIONAL PARKINSON FOUNDATION, 2008).

Embora os mecanismos etiológicos de DP sejam mal compreendidos, relatórios implicam que a inflamação do cérebro e a ocorrência de estresse oxidativo também desempenham um papel importante na patogênese da doença. Neste cenário, a microglia e os astrócitos são os principais mediadores da neuroinflamação na DP. Vários estudos demonstraram a ativação de células da microglia e células astrogliais em estreita proximidade com os neurônios dopaminérgicos danificados na SN (GHOSH *et al.*, 2012).

A cura da DP ainda não foi estabelecida e sua progressão não pode ser evitada (SANTOS *et al.*, 2010). Ao contrário das células do resto do nosso organismo, as células cerebrais não sofrem renovação. A partir do momento que as células produtoras de dopamina morrem, não há forma de regenerá-las (MONTEIRO, 2007). No tratamento, é de grande importância atenuar os sintomas e retardar a progressão da patologia. A disfunção deve ser tratada de maneira multiprofissional e a terapia deve ser projetada de acordo com cada caso (SAITO, 2011). Assim, cirurgias, fisioterapia, medicamentos e terapia ocupacional, são os grandes trunfos da medicina perante esta doença (MONTEIRO, 2007).

A terapia de tratamento farmacológico da DP é indicação obrigatória e na maioria das vezes proporciona uma elevação dos níveis de dopamina ou aumento do efeito desta, ou ainda reduz o efeito da acetilcolina no sistema nervoso central, assim controlando os sintomas (FOYE *et al.*, 2008). Desta forma, são utilizados para estes fins fármacos anticolinérgicos, antidepressivos e agonistas dopaminérgicos (SANFELICE, 2004).

O fármaco mais utilizado para suavizar os sintomas da doença de Parkinson é a Levodopa ou L-Dopa, tendo como nome químico é 3,4-dihidroxi-fenilalanina. Este medicamento atravessa a barreira hematoencefálica e no sistema nervoso central é convertido em dopamina pela ação enzimática da dopa-descarboxilase (SILVA, 2003). Apesar de seus benefícios aos pacientes, pode causar movimentos involuntários anormais e deve-se ter um cuidado especial em cardiopatas e portadores de glaucoma e ser evitado em pacientes com antecedentes psicóticos (SANFELICE, 2004). Adicionalmente, seu uso pode resultar em tolerância com o decorrer do tempo, efeito que poderá ser observado em que cerca da metade dos pacientes em tratamento (MONTEIRO, 2007; SAITO, 2011). Desta forma, é necessária a obtenção de fármacos novos que possam atuar na DP com mecanismo de ação novo e que apresentem menores índices de efeitos colaterais.

## **4.2 Radicais Livres e Estresse Oxidativo**

A oxidação é parte fundamental do nosso metabolismo e da vida aeróbica e, assim, as espécies reativas de oxigênio são geradas naturalmente ou por algum distúrbio biológico no funcionamento do organismo, podendo ainda serem provenientes do meio ambiente. No organismo, estão envolvidas na sinalização intercelular, regulação do crescimento celular, produção de energia, fagocitose e síntese de substâncias biológicas importantes. São moléculas instáveis que reagem com outras moléculas existentes. Promovem reações com substratos biológicos podendo ocasionar também danos às biomoléculas e, seu excesso também apresenta efeitos prejudiciais (BARREIROS *et al.*, 2006).

Quando existe um desequilíbrio entre fatores que promovem os mecanismos de defesa antioxidativos e a formação de EROs, ocorre o estresse oxidativo (MENESES *et al.*, 2003). Dessa forma, as EROs encontram-se correlacionadas com

um grande número de patologias. Cabe às moléculas como flavonóides, tacomferóis, carotenóides, entre outros, inibir o ataque de EROs ou recuperar os prejuízos ocasionados em sistemas biológicos primordiais (BARREIROS *et al.*, 2006).

A produção de radicais livres pode ser uma das causas da doença de Parkinson. O metabolismo normal da dopamina produz as EROs, os quais na presença de depósito de ferro no cérebro, são capazes de resultar em neurotoxicidade por intervenção da cadeia respiratória (SOUZA *et al.*, 2011). Acredita-se também, que possam se aglomerar em uma área cerebral denominada substância nigra, desencadeando ou podendo levar ao agravamento do processo degenerativo das células (SILVA, 2003).

A neurodegeneração seletiva indica que a DP tem sido associada a muitos processos intracelulares, especificamente a um distúrbio da mitocôndria e a um aumento do estresse oxidativo intracelular. Modificações na estrutura molecular da alfa-sinucleína podem estimular o estresse oxidativo através da interferência na regulação da síntese de dopamina, da sua auto-oxidação e também da sua neurotransmissão. Entretanto, o estresse oxidativo também influencia a oxidação da alfa-sinucleína e a sua capacidade de agregar e formar os corpúsculos de inclusão. Além do exposto, as mutações genéticas que podem ocorrer no gene desta proteína ocasionam a DP na forma hereditária autossômica dominante (PERFEITO *et al.*, 2011).

Atualmente, se discute o quanto o estresse oxidativo contribui para o processo patogênico de morte de células nigrais na DP (MENESES *et al.*, 2003). Uma importante fonte de estresse oxidativo no cérebro, particularmente em doenças neurodegenerativas, é uma enzima multimérica que gera superóxido, NADPH oxidase (BEDARD *et al.*, 2007; GHOSH *et al.*, 2012). Coletivamente, estes resultados sugerem fortemente que a mitigação da neuroinflamação e estresse oxidativo pode ser uma estratégia de neuroproteção viável para o tratamento da DP (GHOSH *et al.*, 2012). Substâncias que possam inibir a citada enzima podem ser uma proposta viável para o tratamento da doença.

### 4.3 Compostos com Ação Antiparkinsoniana

#### 4.3.1 Apocinina

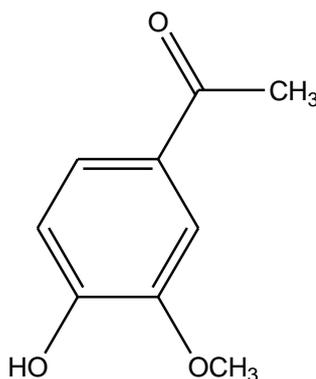
A apocinina (4-hidroxi-3-metoxi-acetofenona), é um composto fenólico de estrutura pequena com várias atividades biológicas mencionadas na literatura (DASARI *et al.*, 2008). Foi isolada pela primeira vez em 1883, das raízes de *Apocynum cannabinum* e, em 1971 a partir de uma pequena planta, da espécie *Picrorhiza kurroa*, que cresce em altitudes elevadas no oeste do Himalaia (CHANDASANA *et al.*, 2015). É muito solúvel em água quente, álcool, benzeno, clorofórmio e éter e, pouco solúvel em água em temperatura ambiente (DASARI *et al.*, 2008). Esta substância tem sido amplamente estudada para descobrir aplicações terapêuticas potenciais, sendo útil como agente neuroprotetor e desempenhando um papel crucial na patogênese da lesão cerebral e disfunção neurológica (CHANDASANA *et al.*, 2015; HEUMÜLLER *et al.*, 2008).

A apocinina tem a capacidade de impedir a formação de espécies reativas de oxigênio, além de ser uma forte inibidora de enzimas NADPH oxidase, também responsável pela liberação de EROs (HEUMÜLLER *et al.*, 2008; MORA-PALE *et al.*, 2009). Uma produção excessiva de EROs é observada em várias doenças e, uma delas é a DP (OBERMAYER-PIETSCH *et al.*, 2004; GHOSH *et al.*, 2012). Sendo assim, HEUMÜLLER *et al.* (2008) sugeriram que a apocinina é um eficiente inibidor da formação em neutrófilos e macrófagos de peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila tóxicos às células humanas, sem intervir na formação de outras espécies reativas.

Heumüller *et al.* (2008), propõem ainda que a apocinina é considerada um pró-fármaco, uma vez que é biotransformada e ativada pela enzima mieloperoxidase em leucócitos o que resulta na formação de seu dímero, a diapocinina, que também é ativo na inibição da NADPH e na geração de EROs. Kanegae *et al.* (2010), sintetizaram a diapocinina a partir da apocinina e compararam os efeitos sobre uma variante da NADPH oxidase e inibição da produção dos mediadores fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e da interleucina-10 (IL-10), liberados em leucócitos polimorfonucleares ativadas. Os autores sugeriram que a diapocinina inibe a produção do TNF- $\alpha$ , efeito não observado para a apocinina, e da IL-10 nas células avaliadas. Os autores sugerem que estudos que abordem atividades biológicas causadas pela

apocinina devem, se possível, considerar a avaliação da diapocinina em paralelo, uma vez que o efeito desta pode ser maior em relação a substância de origem. A estrutura química da apocinina, está ilustrada na figura abaixo.

Figura 2 - Estrutura química da apocinina



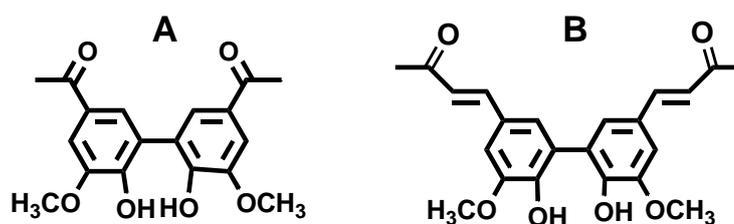
#### 4.3.2 Diapocinina

A diapocinina, o dímero covalente da apocinina, tem sido relatada para ser um inibidor mais potente de NADPH oxidase. A administração de diapocinina poderia oferecer uma maior proteção do que apocinina devido a sua estrutura química apresentar duas moléculas da apocinina ligadas entre si. Sua presença também eliminaria a necessidade de um envolvimento de enzima peroxidase que pode limitar a formação de diapocinina *in vivo*. Como um potencial agente terapêutico, a diapocinina deve ser mais susceptível de atravessar a barreira hematoencefálica, devido à sua maior hidrofobicidade e, potencialmente, pode ser eficaz em doses reduzidas (TRUMBULL *et al.*, 2012).

A diapocinina apresentou atividade de neuroproteção frente a sintomas da DP quando submetidas a protocolos experimentais pré-clínicos com animais (GHOSH *et al.*, 2012). Já Dranka *et al.* (2013), avaliaram o efeito da diapocinina contra sintomas da DP em camundongos transgênicos causados pela super expressão da proteína *leucine-rich repeat kinase 2*. Os autores verificaram que a molécula em questão apresentou efeito neuroprotetor aos animais estudados, uma vez que reduziu os sintomas observados no transcorrer do protocolo.

Em outro estudo, Marchiani *et al.* (2013) sugeriram que análogos estruturais da diapocinina, contendo grupos substituintes ligados a esta moléculas, poderiam apresentar atividades de inibição da agregação da alfa-sinucleína, aceptora de radicais e neuroprotetora, o que pode ser benéfico para o tratamento da DP. Os resultados apontados pelos autores sugerem que é possível a modulação da estrutura química da diapocinina para fins de aperfeiçoamento da atividade antiparkinsoniana observada. A estrutura química da diapocinina e do análogo estrutural da diapocinina estão ilustrados na figura abaixo.

Figura 3 - Estrutura química da diapocinina (A) e do análogo estrutural bioativo obtido por Marchiani *et al.* (2013) (B)



Fonte: Marchiani *et al.*, 2013.

O processo de síntese do dímero ocorre por meio de acoplamento oxidativo, sendo que estudos apontaram que a capacidade inibitória da apocinina estava ligada à sua prévia oxidação mediada pela peroxidase, levando à formação da diapocinina (LUCHTEFELD *et al.*, 2008; SOUZA *et al.*, 2016). Portanto, atualmente a diapocinina sintética tem sido usada em modelos experimentais em uma variedade de aplicações, apresentando uma maior eficiência farmacológica (SOUZA *et al.*, 2016).

### 4.3.3 Chalconas

As chalconas são substâncias de origem vegetal considerados flavonoides de cadeia aberta que apresentam atividades biológicas diversas, tais como antibacteriana (NIELSEN *et al.*, 2004), antifúngica (BATOVSKA *et al.*, 2007), antitumoral (KONIECZNY *et al.*, 2007) antioxidante (SIVAKUMAR *et al.*, 2011), antiparasitária, e anti-inflamatória (MENG *et al.*, 2007), entre outras. Estes compostos

apresentam grupo cromóforo em sua estrutura química que resulta em coloração que vai do amarelo até o vermelho (ANDERSEN *et al.*, 2006).

Estas substâncias foram primeiramente sintetizadas em laboratório no século XIX (SHIMOKORIYAMA, 1962), e desde este período são geralmente obtidas através da reação de condensação de Claisen-Schmidt entre um aldeído aromático e uma cetona, em presença de catalisadores básicos (CZAKO *et al.*, 2005). Suas estruturas químicas são caracterizadas pela presença da porção 1,3-propenona central que liga dois anéis aromáticos substituídos, intitulados A e B. Neste cenário, Nobre-Júnior *et al.* (2009) observaram que chalconas apresentam atividade neuroprotetora a neurônios em protocolo experimental com a 6-hidroxi-dopamina. Patil *et al.* (2009) avaliaram chalconas em protocolos de ação aceptora de radicais e antiparkinsoniana *in vivo* (modelo de catalepsia induzido por haloperidol) e confirmaram que estas estruturas apresentam atividade potencial nos dois protocolos avaliados.

Adicionalmente a estas propostas, verifica-se que o efeito antioxidante também pode ser benéfico para o tratamento dos danos causados pelas EROs na DP. Neste contexto, Sivakumar *et al.* (2011) sintetizaram uma série de chalconas com substituintes nos anéis A e B e avaliaram estes em diversos protocolos de atividade aceptora de radicais, como acceptor de radical superóxido, acceptor de superóxido (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), poder redutor do ferro, e acceptor de radical 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH). Os autores observaram que compostos que apresentam grupos metoxila ligados ao anel A da estrutura das chalconas possuem forte efeito acceptor de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e de radical DPPH, inclusive com representantes mais efetivos em comparação ao ácido ascórbico utilizado como padrão nos ensaios. As chalconas se apresentam desta forma como proposta viável para o desenvolvimento de fármacos com atividade aceptora de radicais e que possam ser utilizadas como antiparkinsonianos novos.

#### **4.4 Protocolos *in vivo* de Avaliação de Atividade Antiparkinson**

A espécie *Drosophila melanogaster* (DM), conhecida como mosca da fruta, é uma espécie de inseto usado em estudos genéticos desde 1909. É um modelo experimental alternativo muito utilizado em testes toxicológicos. Além disso, a partir de resultados obtidos com a DM verifica-se que este inseto é um excelente organismo

alternativo para utilização em ensaios pré-clínicos, antes de partir para organismos mais complexos (SNUSTAD *et al.*, 2006; BASTIANI, 2014).

Sua utilização é vantajosa em estudos por serem organismos de fácil cultivo e manutenção, com poucas exigências nutricionais e baixo custo. Tem um ciclo de vida moderadamente curto, cerca de 30 dias a 25° C, e apresentam dimorfismo sexual e alta fecundidade. Quando adultos, possuem cerca de 2 mm de comprimento, três pares de pernas e apenas um par de asas, porque o segundo par foi modificado e está dentro de pequenos apêndices chamados halteres, que ajudam na aerodinâmica para o voo (SNUSTAD *et al.*, 2006).

A *Drosophila melanogaster* e os humanos compartilham muitos genes, preservam vias metabólicas e sinalizadoras celulares similares entre si. Especificamente, a DM apresenta um número pequeno de cromossomos e o seu genoma é relativamente reduzido em comparação a humanos ou camundongos (GOMES, 2001; SNUSTAD *et al.*, 2006; IBMC, INEB, 2008) o que não impede o seu uso em estudos de natureza científica. Adicionalmente, apresentam um índice progressivo de conservação a nível comportamental, e mecanismos moleculares estabelecidos, englobando ritmos circadianos, aprendizagem, memória e sono. Diante do exposto, observa-se que esses insetos tornam-se fortes aliados na pesquisa, sendo usados como ferramentas para obtenção de parâmetros biológicos em diversos testes em ensaios experimentais, possibilitando o estudo de patologias humanas.

O incessante desenvolvimento e a caracterização de modelos experimentais de doenças neurodegenerativas dominante é de fundamental importância e aplicabilidade para o estudo de compostos psicoativos novos. Neste contexto, estes insetos têm sido utilizados como modelos animais de doenças que afetam o sistema nervoso (NICHOLS, 2006; BENTON, 2008; MORALES, 2008; BAGATINI *et al.*, 2011) e, segundo Pereira *et al.* (2007), as DM têm sido usadas como modelos experimentais no estudo da fisiopatologia da doença de Parkinson.

Feany e Bender (2000), desenvolveram um protocolo experimental que permitiu avaliar a expressão da alfa-sinucleína, a degeneração das células dopaminérgicas, a formação de corpusculos de inclusão, e a disfunção locomotora em *Drosophila*, essenciais para o estudo da doença de Parkinson. Neste contexto, o estudo de Faust *et al.* (2009) apresentou como tema a avaliação do efeito neuroprotetor e ação antiparkinsoniana de substâncias sintéticas em protocolo

experimental de DM. Os autores verificaram que dois compostos ensaiados, minoxidina e celastrol, foram efetivos para atenuar os sintomas da redução da dopamina no cérebro das DM.

Outro estudo em destaque realizado com DM como modelo experimental no estudo de substâncias com ação antiparkinsoniana e neuroprotetora envolveu as folhas de *Bougainvillea glabra choisy* (BG), planta já utilizada em medicina tradicional. Moscas machos adultas foram expostas ao paraquat (PQ) e ao extrato de BG, onde observou-se que em presença do extrato de BG preveniu a mortalidade e a depleção de dopamina causada pelo PQ, melhorando o desempenho locomotor e diminuindo a atividade da AchE (SOARES, 2017).

Os autores Feany e Bender (2000), sugerem ainda que o modelo de avaliação de doença de Parkinson nas DM poderá facilitar e agilizar o desenvolvimento de outros compostos sintéticos biotivos candidatos a novos antiparkinsonianos.

#### **4.5 Planejamento e Desenvolvimento de Fármacos**

Os métodos utilizados na obtenção de novos compostos bioativos e fármacos resultam de um significativo aumento no investimento em planejamento e desenvolvimento por parte da indústria farmacêutica. Entre as metodologias ou etapas envolvidas podem-se mencionar as modificações moleculares, guiadas com base no conhecimento das propriedades físico-químicas fundamentais para a atividade biológica desejada, os conhecimentos quantitativos e qualitativos das relações estrutura-atividade (QSAR e SAR) e, os estudos *in silico* (via computacional) como a modelagem molecular das estruturas químicas e dos parâmetros toxicológicos e farmacocinéticos (MARIÑO, 2014).

Para que não haja uma experimentação aleatória, o processo de planejamento e desenvolvimento de novos fármacos permite a construção de protótipos de maneira direta, seguindo um planejamento prévio das etapas de desenvolvimento de compostos candidatos a novos fármacos (ARROIO *et al.*, 2010).

Atualmente, o uso de programas computacionais e banco de dados, muitos disponíveis *online* na internet, são ferramentas importantes para a descoberta, planejamento e desenvolvimento de fármacos. Dados obtidos a partir desses recursos

permitem uma avaliação das propriedades físico-químicas versus atividade biológica de uma série de moléculas de interesse. Através da análise de dados teóricos de estrutura-atividade de forma tridimensional (3D), obtidos por técnicas de planejamento e desenvolvimento de fármacos, novos agentes terapêuticos podem ser desenvolvidos (CARVALHO *et al.*, 2003).

Estudos mostram que o planejamento e o desenvolvimento pode tornar fármacos já existentes em um agente mais eficiente e com menos efeitos colaterais. Como exemplo cita-se a Levodopa, um dos antiparkinsonianos mais utilizados atualmente no tratamento da doença de Parkinson, mas que com muito tempo de uso pode levar a problemas de saúde aos pacientes. Pesquisas mostram que usando uma abordagem de caracterização eletrônica e estrutural, compostos análogos deste fármaco que apresentam substituição do grupamento hidroxila por outros grupos químicos podem gerar substâncias bioativas com estruturas estáveis e com características distintas a molécula original. Este processo caracteriza o início para o desenvolvimento de novos fármacos mais eficientes contra a DP (CRISÓSTOMO *et al.*, 2017).

O procedimento de descoberta e desenvolvimento de um novo fármaco segue estágios já determinados, estando dividido em três etapas: (a) descoberta, que engloba a definição do alvo terapêutico, reconhecimento e elaboração de moléculas líderes, (b) otimização da estrutura do protótipo simultaneamente aos estudos de ADMET – absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade e, (c) desenvolvimento (melhoria da formulação galênica e estudos clínicos) (LIMA, 2007; BARREIRO *et al.*, 2008; GUIDO *et al.*, 2010).

Na etapa de descoberta, uma fase inicial de extrema importância é a escolha do alvo molecular ou biomacromolécula envolvida em determinada disfunção biológica ou enfermidade. Este processo inclui vários elementos, como o entendimento da fisiopatologia da doença, o detalhamento da via bioquímica envolvida, a seleção de uma ou mais proteínas alvo, e a confirmação e o estudo do envolvimento do alvo no tratamento ou a cura terapêutica (BARREIRO *et al.*, 2008). O biorreceptor (alvo molecular biológico) escolhido (por exemplo, receptores proteicos, membranas, DNA) pode ter a sua estrutura tridimensional conhecida ou não. Mas, os grandes avanços da genômica e proteômica, aliados à evolução das técnicas de ressonância magnética nuclear (RMN) e cristalografia de raios-X disponibilizaram um incremento no número

de alvos moleculares com estruturas 3D acessíveis, principalmente em banco de dados de proteínas (FERREIRA *et al.*, 2011).

O conhecimento da estrutura molecular 3D do alvo biológico proporciona o desenho de um novo composto, considerado bioligante, com parâmetros estruturais adequadas ao reconhecimento biomolecular do mesmo, designado de planejamento de fármacos baseado na estrutura do receptor (SBDD, do inglês *structure-based drug design*) (GUIDO *et al.*, 2010). Barreiro *et al.* (2008) descrevem que nem sempre a molécula bioligante detectada em ensaios *in vitro* mostrará um perfil de biodisponibilidade adequado, fazendo-se necessário, na maioria das vezes, sua alteração molecular a fim de acertar propriedades farmacocinéticas e/ou farmacodinâmicas.

Os métodos de planejamento de fármacos baseado na estrutura do composto (ou ligante) (LBDD, do inglês *ligand-based drug design*) podem ser usados quando a estrutura do alvo biológico não é conhecida, analisando características e propriedades de séries de compostos bioativos. Estes dados são utilizados para planejar assim o reconhecimento de um análogo ativo. A obtenção de um composto considerado protótipo ocorre depois da validação da atividade farmacológica desejada *in vivo* desta molécula (GUIDO *et al.*, 2010; FERREIRA *et al.*, 2011).

Depois da descoberta e melhoria deste protótipo, ele necessitará ter seu perfil de toxicidade analisado para que possa então ser reconhecido como um candidato a novo fármaco (LIMA, 2007; BARREIRO *et al.*, 2008).

A partir desta etapa, uma Nova Entidade Química (NCE) é reconhecida na etapa de desenvolvimento pré-clínico dos projetos envolvendo candidatos a novos fármacos. Depois da sua confirmação, submete-se esta NCE a três etapas de ensaios clínicos, onde a partir de sua aprovação nestas se sugere a solicitação de nova aplicação de fármaco (NDA, do inglês *New Drug Application*). Após permissão pelas agências regulatórias, o fármaco será liberado no mercado para uso terapêutico (LIMA, 2007).

No contexto apresentado, a ferramenta de modelagem molecular e ancoramento molecular, que foram propostos para emprego neste trabalho, fornecem informações essenciais para o processo de descoberta de fármacos. Seu emprego permite a obtenção de propriedades específicas de uma molécula, reduzindo o custo

e o tempo no planejamento e desenvolvimento de novos agentes terapêuticos (CRISÓSTOMO *et al.*, 2017).

# **5. MATERIAIS E MÉTODOS**

## **5.1 Reagentes**

A apocinina, os benzaldeídos, o 2,2-difenil-1-picrildrazil (DPPH), o 2,6-di-terc-butil-4-metil-fenol (BHT) e o persulfato de potássio foram de grau sintético (Sigma-Aldrich®, USA), o ferro (II) heptahidratado (Vetec®) e hidróxido de sódio (Dinâmica, Brasil). Os demais reagentes utilizados como ácido clorídrico, clorofórmio, dimetilsulfóxido, hidróxido de sódio, etanol, e metanol foram de grau analítico (Merck®, Neon®, Synth® e Vetec®). Utilizou-se água destilada e desionizada Milli-Q na realização dos experimentos.

## **5.2 Equipamentos e materiais**

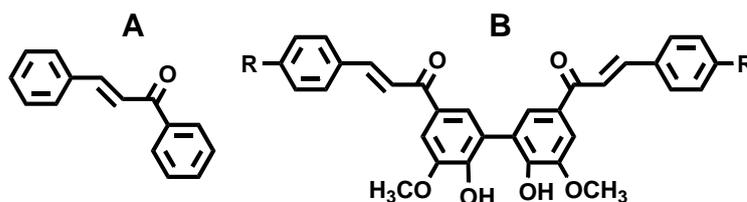
Os equipamentos disponíveis para a realização do trabalho junto a UNIPAMPA foram: Balança analítica digital com quatro casas decimais Shimadzu; Agitador magnético com aquecimento Fisaton; Câmera de Leitura Luz UV/Vis; Espectrofotômetro de Infravermelho médio Perkin Elmer com acessório de reflexão atenuada PIKE (PIKE Technologies) (ATR-FTIR); Cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu equipado com bomba LC-20AT, autosampler SIL-20A, forno de coluna CTO-20A, software LC Solution V. 1.24 SP1, e detector de arranjo de diodos SPD-20AT; Fusiômetro digital Gehaka PF1500 FARMA, Evaporador rotativo digital Büchi R-215.

## **5.3 Planejamento dos compostos - padrão de substituição**

Inicialmente, o trabalho envolveu a escolha de compostos que seguiram a aplicação de ferramenta de sugestão de modificação molecular intitulada replicação molecular, seguindo a duplicação da estrutura química da apocinina para geração da diapocinina. Nesta etapa, considera-se a combinação da estrutura química da diapocinina e da chalcona como um híbrido das duas, o que caracteriza a ferramenta

de modificação molecular hibridização molecular. A estrutura química básica das chalconas e das chalconas derivadas da diapocinina substituídas estão expressas na figura 4.

Figura 4 - Estrutura química padrão de chalconas (A) e das chalconas derivadas da diapocinina (B)



#### 5.4 Substituição do grupo ácido no anel B

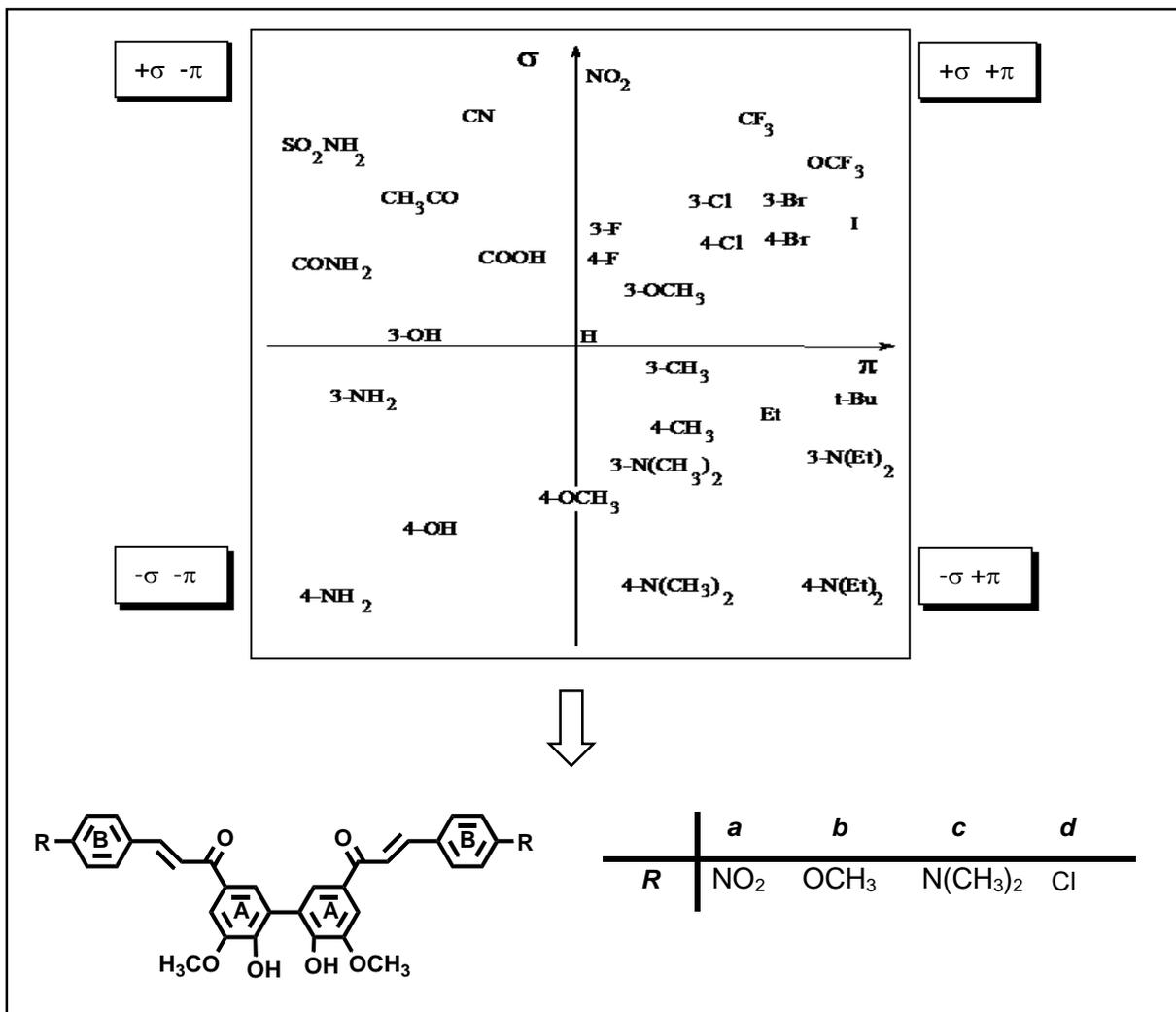
A variação dos grupos substituintes da série de chalconas ocorreu em posição *para* no anel benzênico (B), e envolveu grupos com graus variáveis de efeito eletrônico, expressa por meio do descritor estrutural  $\sigma$  de Hammett (TAVARES, 2004, HANSCH E FUJITA, 1964).

Os compostos foram escolhidos de acordo com o emprego do Diagrama de Craig, figura 5 (CRAIG, 1971). Este diagrama correlaciona valores de propriedades físico-químicas de hidrofobicidade ( $\pi$  de Hansch) e de efeito eletrônico ( $\sigma$  de Hammett) de grupos substituintes em diagrama cartesiano bidimensional (CRAIG, 1971). Atualmente, esta ferramenta fundamenta diversas técnicas modernas de desenvolvimento racional de novos fármacos.

Inicialmente foram escolhidos os compostos que continham grupos funcionais localizados em região que permite variação dos valores de efeito eletrônico ( $\sigma$  de Hammett) no anel B das chalconas, sem variar significativamente os valores de lipofilicidade ( $\pi$  de Hansch). Com esta finalidade os compostos escolhidos encontram-se distribuídos ao redor de região caracterizada por uma linha reta paralela ao eixo da propriedade de  $\sigma$  de Hammett (4-Cl, 4-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 4-OCH<sub>3</sub>, 4-NO<sub>2</sub>). Neste caso, localizam-se próximos ao eixo de  $\sigma$  de Hammett e apresentam pequena variação dos valores de  $\pi$  de Hansch. Os grupos substituintes escolhidos para serem ligados no anel B são descritos na figura 5. Neste cenário, escolheu-se a aplicação do Diagrama

de Craig para sugestão de grupos substituintes a fim de se avaliar a influência das propriedades de efeito eletrônico e de volume molecular entre os compostos derivados da diapocinina. Em paralelo é possível se avaliar também a influência das propriedades sobre as atividades aceptoras de radicais e antiparkinsoniana.

Figura 5 - Diagrama de Craig (correlação de  $\sigma$  versus  $\pi$  em *para* e *meta*-substituição aromática) e derivados das chalconas escolhidos

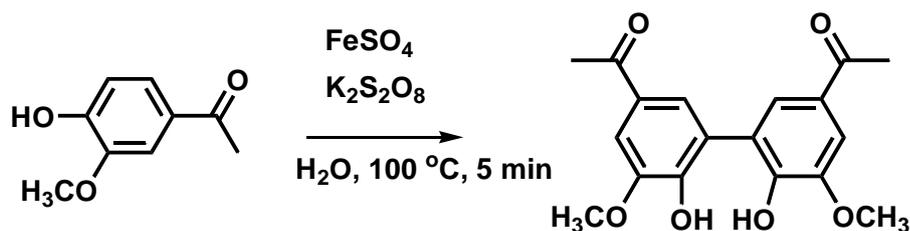


Fonte: Adaptado de Craig (1971).

## 5.5 Síntese da diapocinina

A diapocinina foi sintetizada de acordo com Dasari *et al.* (2008), onde a apocinina (acetovallinone, Sigma-Aldrich) foi dissolvida em água desionizada em aquecimento, sob agitação, até a solução entrar em ebulição suave. A partir desta etapa, foram adicionados à solução os reagentes sulfato de ferro (II) heptahidratado e persulfato de potássio, e mantidos sob agitação constante até formar um precipitado marrom. Manteve-se a mistura nesta condição por 5 minutos, o precipitado formado foi esfriado e filtrado a vácuo. Recristalizou-se o mesmo em solução de NaOH 3 M, HCl 6 M, sob agitação e o precipitado foi lavado três vezes com água fervente e metanol em ebulição. O produto foi mantido em dessecador para secagem.

Figura 6 - Esquema de reação de obtenção da diapocinina a partir da apocinina

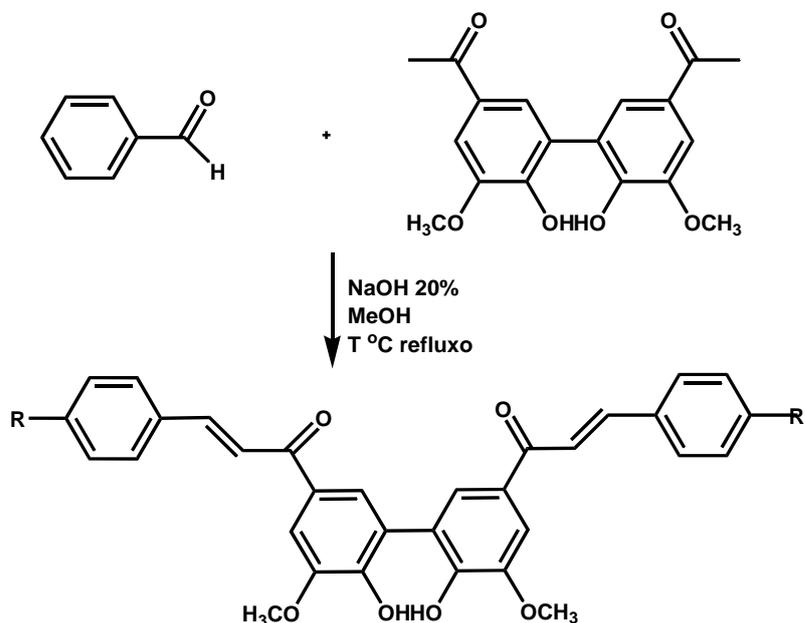


Fonte: Dasari *et al.*, 2008.

## 5.6 Procedimento de obtenção das chalconas - Condensação de Claisen-Schmidt

Os derivados de chalconas da diapocinina foram sintetizados a partir da diapocinina (3 mM) e os benzaldeídos (6 mM) substituídos, que foram dissolvidos em metanol e em solução de NaOH (20%). A mistura foi posta em refluxo pelo período de 24 horas. Após o término da reação, a mistura de reação foi acidificada com solução aquosa de HCl (2 mol) e o precipitado formado foi filtrado sob pressão reduzida. (BATOVSKA *et al.*, 2007; NIELSEN *et al.*, 2004). O esquema da reação é observado na figura 7.

Figura 7 - Esquema de obtenção de chalconas derivadas da diapocinina



***(E)-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-(4-chloridephenyl)prop-2-en-1-one***

Na reação de obtenção da 4-cloro-chalcona derivada, a diapocinina (0,300 mM) foi inicialmente dissolvida em 2 mL de DMSO e o 4-clorobenzaldeído (0,600 mM) em 20 mL de metanol. Estas soluções foram inseridas em um balão de reação, seguido de adição de 20 mL de metanol e 15 mL de NaOH 20%. A mistura foi mantida sob agitação pelo período de 24 horas, sob proteção da luz, e em temperatura de 100 °C. Após o término da reação, o composto formado foi acidificado com solução de HCl (2 mol) até atingir o pH de valor 1. A mistura de reação foi submetida a uma extração líquido-líquido com clorofórmio, onde a fase orgânica foi retirada de funil de separação e logo após submetida a redução parcial de solvente em evaporador rotativo. O sólido formado foi filtrado sob pressão reduzida e armazenado em dessecador. Para a purificação o composto foi primeiramente submetido a recristalização com o emprego de sistemas de solvente clorofórmio : acetato de etila : etanol (70:25:5 %, v/v). O produto obtido foi ainda solubilizado em base pH 10,0, sob aquecimento e submetido a uma nova extração líquido-líquido com clorofórmio. A fase aquosa foi lavada com

clorofórmio por outras duas vezes. O composto recristalizado foi filtrado e recolhido em dessecador.

**Fórmula Molecular:**  $C_{32}H_{24}Cl_2O_6$

***(E)-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-(4-dimethylaminophenyl)prop-2-en-1-one***

Na reação de obtenção da 4-dimetilamino-chalcona derivada, a diapocinina foi inicialmente dissolvida em 2 mL de DMSO e o 4-dimetilaminobenzaldeído em 20 mL de metanol. O procedimento de obtenção do composto seguiu conforme descrito para o composto cloro derivado.

**Fórmula Molecular:**  $C_{36}H_{36}N_2O_6$

***(E)-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-(4-methoxyphenyl)prop-2-en-1-one***

Na reação de obtenção da 4-metoxi-chalcona derivada, a diapocinina foi dissolvida em 2 mL de DMSO e juntamente com o 4-metoxibenzaldeído foram inseridos em um balão de reação, seguido de adição de 40 mL de metanol e 15 mL de NaOH 20%. O procedimento de obtenção do composto seguiu conforme descrito para o composto cloro derivado. Para a purificação o composto foi solubilizado em base pH 10,0 e submetido a uma extração líquido-líquido com acetato de etila. O composto recolhido foi filtrado a vácuo e armazenado em dessecador.

**Fórmula Molecular:**  $C_{34}H_{30}O_8$

***(E)-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-(4-nitrophenyl)prop-2-en-1-one***

Na reação de obtenção da 4-nitro-chalcona derivada, a diapocinina foi inicialmente dissolvida em 2 mL de DMSO e o 4-nitrobenzalaldeído em 20 mL de metanol. O procedimento de obtenção do composto seguiu conforme descrito para o composto cloro derivado. Para a purificação o composto foi solubilizado em base pH 11,0 e submetido a uma extração líquido-líquido com clorofórmio. O composto recolhido foi filtrado a vácuo e armazenado em dessecador novamente.

**Fórmula Molecular:**  $C_{32}H_{24}N_2O_8$

## **5.7 Caracterização estrutural da diapocinina e das chalconas**

As reações de obtenção da diapocinina e das chalconas foram monitoradas através do emprego de cromatografia em camada delgada (CCD), realizadas em placas de alumínio com sílica gel 60GF 254 da Sigma-Aldrich e visualizadas em luz ultravioleta e visível em comprimentos de onda de  $\lambda=254$  e 365 nm. A comprovação de obtenção dos compostos foi realizada por meio de análise do ponto de fusão (com o uso de fusiômetro), de espectroscopias de infravermelho, e ressonância magnética nuclear de próton e carbono 13 (RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ). As análises de ressonância magnética nuclear foram realizadas no departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), em espectrômetro Bruker DPX 300 ( $^1\text{H}$  a 300 MHz e  $^{13}\text{C}$  a 100 MHz). O solvente utilizado para estas análises foi dimetilsulfóxido deuterado e os deslocamentos químicos foram registrados em ppm usando tetrametilsilano como padrão interno.

A análise da presença de contaminantes junto aos compostos isolados foi realizada através de separação cromatográfica utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Neste processo, a amostra foi filtrada em filtro de nylon Millipore (13 mm x 0.45  $\mu\text{m}$ ) antes da injeção e a coluna cromatográfica utilizada foi ThermoQuest Lichrosorb RP18 (250 x 4.6 mm, 10  $\mu$  de diâmetro de partícula). A detecção ocorreu em comprimento de onda de 276 nm em detector LC-20 UV/Vis Shimadzu.

## **5.8 Determinação da atividade antioxidante**

A avaliação da atividade aceptora de radicais dos compostos obtidos foi realizada através de método de ensaio sequestrante do radical DPPH.

### **5.8.1 Determinação da curva do DPPH**

A partir das leituras desse ensaio, foi obtida a curva de calibração da análise do DPPH. Para a realização, foi preparada uma solução metanólica de DPPH em concentração de 100  $\mu\text{M}$ , e a seguir foram feitas diluições para as concentrações de 10, 20, 30, 40 e 50  $\mu\text{M}$  as quais foram mantidas em ambiente escuro até serem

transferidas para cubetas de vidro para a realização de leituras em espectrofotômetro UV/Visível a 550 nm. O metanol foi usado como solvente de calibração.

### **5.8.2 Preparo de soluções - Apocinina e diapocinina**

Para realizar esse ensaio foi preparada as soluções metanólicas de DPPH 0,1mM, da apocinina e da dipocinina em concentração de 2,0 mM, e de antioxidante BHT 2,0 mM utilizado como controle positivo.

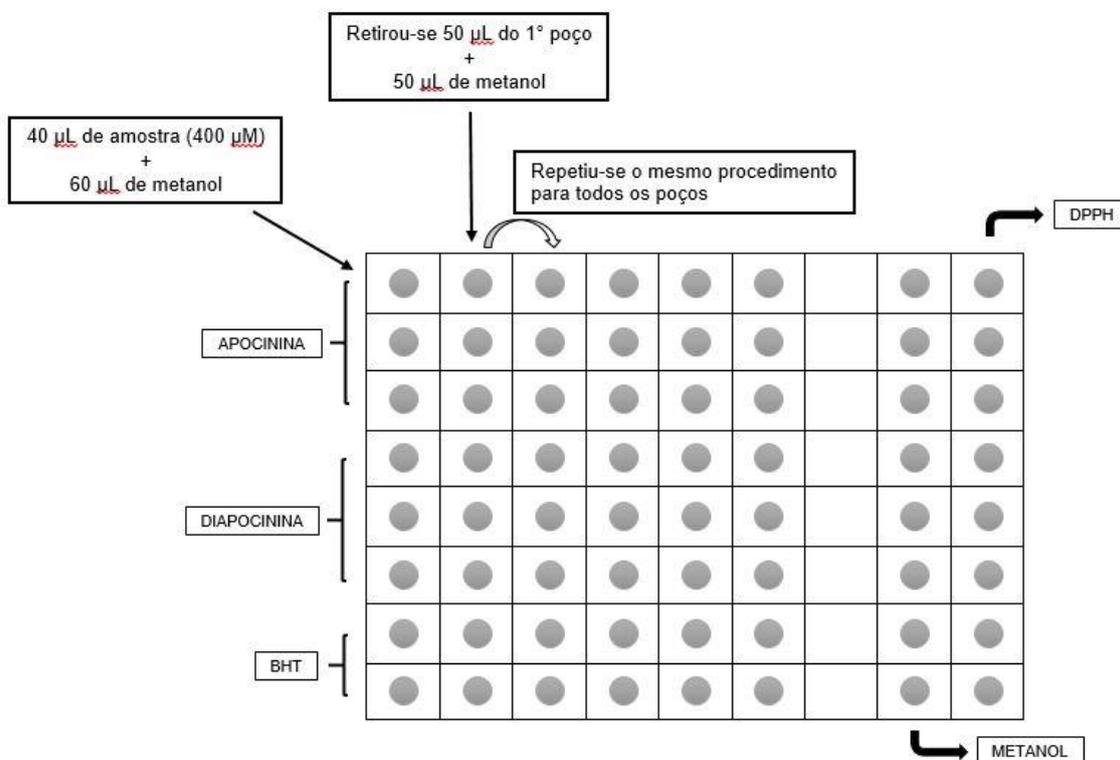
### **5.8.3 Ensaio – Apocinina e diapocinina**

Nos primeiros poços da microplaca foram adicionadas as soluções da apocinina e diapocinina nas concentrações 400, 200, 100, 50, 25, 12,5 e 6,25 µM, respectivamente. Depois, foram adicionados 50 µL da solução de metanol e também da solução de DPPH. Todas as análises foram realizadas em triplicata. A microplaca foi mantida em ambiente escuro por 30 minutos, e em seguida foram feitas as leituras no comprimento de onda de 550 nm em um espectrofotômetro UV-VIS. A inibição da coloração foi expressa em porcentagem de atividade sequestradora (%), através da fórmula (DUARTE-ALMEIDA *et al.*, 2006).

$$\% = \frac{Ac - Aa}{Ac} \times 100$$

Onde % = Atividade sequestradora; Ac = Absorbância do controle; e Aa = Absorbância da amostra.

Figura 8 - Esquema ensaio apocinina e diapocinina



#### 5.8.4 Preparo de soluções - Chalconas

Para a realização do ensaio das chalconas foram preparadas as seguintes soluções: solução metanólica de DPPH 200 µM; solução metanólica de cada composto em concentração de 400 µM; solução metanólica de antioxidante BHT 400 µM, utilizado como substância de referência da atividade sequestradora de radical DPPH (controle positivo) (MIRANDA *et al.*, 2006).

#### 5.8.5 Ensaio - Chalconas

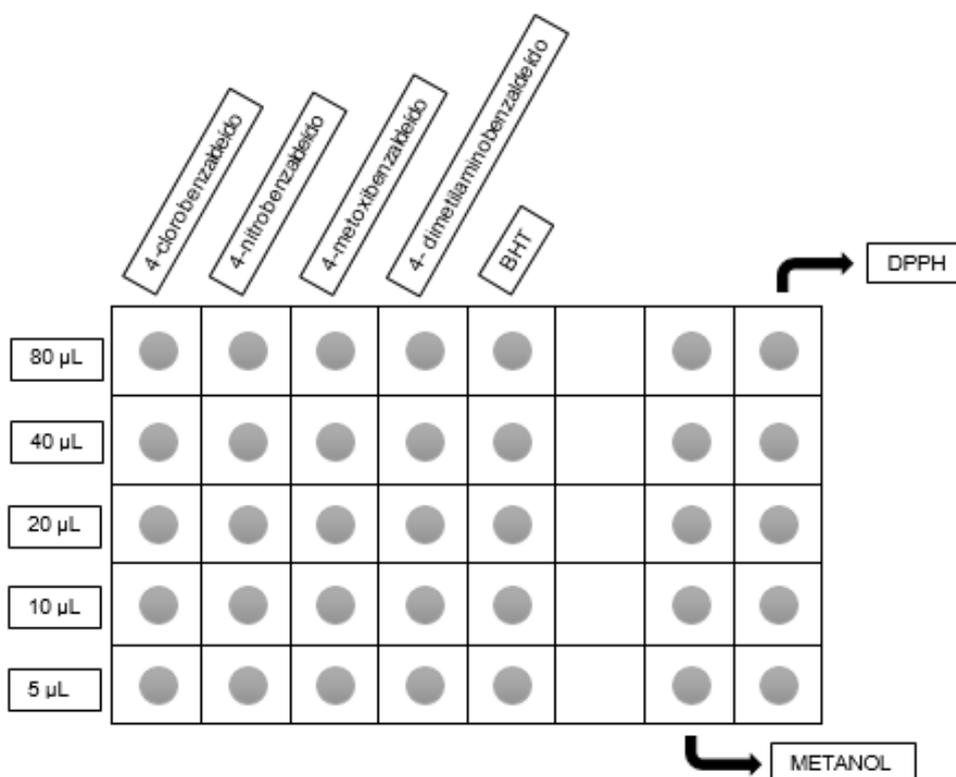
Adicionou-se a solução dos compostos nos primeiros poços da placa nas diluições de 80, 40, 20, 10 e 5 µM, e após foram adicionados 70, 110, 130, 140 e 145 µL de metanol e 50 µL da solução de DPPH. As leituras foram realizadas em um espectrofotômetro UV-VIS no comprimento de onda de 518 nm, nos tempos 0 e após manter em ambiente escuro por 30 minutos. Todas as análises foram realizadas em

triplicata. A inibição da coloração foi expressa em porcentagem de atividade sequestradora (%), através da fórmula (DUARTE-ALMEIDA *et al.*,2006).

$$\% = \frac{Ac - Aa}{Ac} \times 100$$

Onde % = Atividade sequestradora; Ac = Absorbância do controle; e Aa = Absorbância da amostra.

Figura 9 - Esquema ensaio das chalconas derivadas da diapocinina



COMPOSTOS E BHT	METANOL	DPPH
80 µL	70 µL	50 µL
40 µL	110 µL	50 µL
20 µL	130 µL	50 µL
10 µL	140 µL	50 µL
5 µL	145 µL	50 µL

## **5.9 Ensaios de avaliação dos sintomas de Doença de Parkinson - *Drosophila melanogaster***

### **5.9.1 Cultura e Tratamento de *Drosophila melanogaster***

Machos selvagens de DM com três dias de idade foram coletadas de populações criadas em laboratório. As DM foram cultivados em meio padrão de alimentação com um ciclo claro/escuro de 12:12 h mantida a  $22 \pm 1^\circ\text{C}$  e 60-70% de umidade relativa.

### **5.9.2 Ensaio de sobrevivência de *Drosophila melanogaster***

Foi feito um estudo preliminar para verificação da curva de sobrevivência para fins de determinação das concentrações dos compostos estudados a serem estudadas em presença do paraquat (PQ). Nesta etapa, foram realizados três ensaios: um com o PQ, um com a apocinina e outro com a diapocinina. As moscas foram alimentadas com a solução de alimentação (1g açúcar, 1g leite em pó, 100 mL água destilada) e, com as soluções do PQ na faixa de concentração de 0,05 – 0,20  $\mu\text{M}$ , da diapocinina nas concentrações de 0,05; 0,1 e 0,15  $\mu\text{M}$ , e apocinina nas concentrações 0,05; 0,1; 0,15; 5; 25 e 50  $\mu\text{M}$  pelo período de 4 dias. Foi avaliado o número de moscas sobreviventes nos ensaios, que foram realizados com 30 moscas macho para cada concentração, em triplicata.

### **5.9.3 Ensaio de toxicidade do Paraquat e ensaios de comportamento**

Nesta etapa, foram realizados ensaios com PQ juntamente com a apocinina e PQ com a diapocinina considerando sempre as duas substâncias na mesma concentração. As moscas foram expostas a PQ e posteriormente alimentadas com o composto e comparadas com o controle negativo (solução de alimentação). Estes ensaios foram realizados com 30 moscas macho para cada concentração, em triplicata, durante 4 dias em temperatura ambiente. Após esta etapa os ensaios de geotaxia negativa e campo aberto foram realizados.

#### **5.9.4 Ensaio de geotaxia negativo**

A função locomotora foi determinada pelo ensaio de geotaxia negativo, onde foram inseridas 10 moscas do ensaio anterior em uma proveta de 50 mL e realizou-se o treinamento delas no sistema. Após este procedimento, verificou-se e registrou-se o número de indivíduos que passaram da linha de 50 mL no tempo de 8 segundos. O ensaio foi repetido seis vezes e os dados foram expressos em média e desvio padrão.

#### **5.9.5 Ensaio de comportamento**

O ensaio de campo aberto foi realizado de acordo com o método descrito por Hirth (2010) com algumas modificações. Após o tratamento, as moscas foram mantidas em uma placa de Petri dividida por quadrados (1 cm x 1 cm). A atividade e a trajetória das moscas foram registradas por uma câmera de vídeo pelo tempo de 60 segundos, onde foram observados o número de quadrados atravessados por cada mosca do ensaio.

### **5. 10 Modelagem Molecular**

#### **5.10.1 Cálculos dos modelos em 3D e estudo de propriedades físico-químicas**

Os estudos computacionais foram realizados com os compostos apocinina, diapocinina, e chalconas derivadas da diapocinina para obter informações que auxiliem no entendimento da atividade antiparkinsoniana. A metodologia semi-empírica Austin Model 1 (AM1) e empírico teoria do funcional de densidade (DFT, do inglês *Density Functional Density*) B3LYP com o emprego de base de dados teóricos 6-31G\* em fase gasosa, disponível no software Spartan'08 para Windows (Wavefunction Inc., Irvine, EUA) foram usadas para otimização de geometria e análise conformacional. A geometria dos compostos foi otimizada, seguindo-se a análise conformacional com busca sistemática em incrementos de ângulo de torção de 30° na faixa de 0-360°. O confômero com estrutura química de menor energia foi salva em

arquivo de extensão sybyl mol2 antes do emprego em estudos de ancoramento molecular.

Os valores de propriedades físico-químicas como coeficiente de partição (miLogP), área de superfície polar topológica (TPSA), número de átomos (nAtom), de acceptor (nON) ou de doador de ligações de hidrogênio (nOHNH), e de rotações das ligações (nRot), volume e peso molecular, associadas a Regra dos cinco de Lipinski (LIPINSKI, 1997), foram determinados e calculados com o emprego do software Molinspiration, disponível online na web.

### **5.1.2 Estudos de ancoramento molecular (Docking)**

Na análise do docking molecular (ancoramento) escolheu-se inicialmente o emprego da apocinina e diapocinina nos estudos de interação destes com as proteínas candidatas a alvo destes compostos. Neste cenário, a estrutura dos receptores alfa-sinucleína codificados no site Protein Data Bank (PDB) com códigos de identificação 3Q25 e 1XQ8, referentes às estruturas cristalinas da alfa-sinucleína fundida a estrutura de ligação de maltose e ligada a estrutura micelar humana, respectivamente. Foram estudados também a interação dos compostos com estruturas de NADPH oxidases do tipo 1 com código PDB ID 1K4U e 1NG2 referentes a porções carbono terminal SH3 do domínio da proteína p67 fosforilada complexada com carbono terminal da proteína e p47 fosforilada, e estrutura da proteína p47 autoinibida.

As estruturas foram baixadas do site do PDB e preparadas antes de realizar os estudos de ancoramento. Neste processo, as estruturas 3D foram submetidas à remoção de moléculas de água e adição hidrogênios polares com o emprego de software Autodock Tools 1.5.6 (MORRIS *et al.*, 2009). Os estudos de docking foram realizados utilizando o software iGemdock (YANG *et al.*, 2004), no qual a ligação individual da apocinina e diapocinina foram submetidas a ancoramento no sítio ativo das proteínas estudadas. Os cálculos de ancoragem foram realizados com parâmetros de algoritmo genético (GA) escolhidos para tamanho da população, geração e número de soluções como 200, 70 e 3, respectivamente, uso de cálculo padrão de docking, função de escore Gemdock de hidrofóbica e eletrostática

(preferência 1:1), e aplicação das funções arquivo proteico total (estrutura completa do receptor) e sítio de ligação do ligante.

### **5.1.3 Avaliação da Toxicidade *in silico***

A primeira etapa das análises toxicológicas *in silico* envolveu o desenho das estruturas químicas e sua descrição em linguagem smiles pelo programa Molinspiration. Na segunda etapa foram utilizados os softwares Osiris Property Explorer e admetSAR para predição de toxicidade. O programa Osiris prediz o risco da toxidade aos efeitos mutagênico, cancerígenos, tumorigênico, irritante e sobre o sistema reprodutor e o programa admetSAR prediz a genotoxicidade.

# 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 6.1 Planejamento dos compostos e padrão de substituição

O objetivo principal do estudo desenvolvido, foi explorar a obtenção da apocinina e diapocinina e avaliar suas atividades biológicas, se antioxidantes e antiparkinsoniana potenciais. A estrutura química da diapocinina foi planejada a partir da estrutura química da apocinina através da replicação molecular, uma ferramenta de sugestão de modificação molecular, que tem a finalidade de alterar o perfil farmacoterapêutico ou modificar as propriedades físico-químicas, duplicando a estrutura química de um composto (BARREIRO *et al.*, 2008; ARAÚJO *et al.*, 2015).

A partir da diapocinina foi sugerida a obtenção de chalconas por hibridização molecular através de combinação de estruturas químicas de chalconas com a da diapocinina. O padrão de substituição molecular das chalconas seguiu aplicação da ferramenta de planejamento de fármacos intitulada Diagrama de Craig (CRAIG, 1971). Neste contexto, os compostos obtidos contêm o núcleo diapocinina ligados a duas porções estruturais características das chalconas, foram planejados 4 compostos derivados da diapocinina, com modificações em posição *para* do anel aromático. Desta forma esperou-se que estes compostos se apresentassem como substâncias promissoras para o desenvolvimento de fármacos com ação antiparkinsoniana e com atividade aceptora de radicais.

A alteração proposta para o anel B baseou-se nos graus variáveis de efeito eletrônico, expressa por meio do descritor estrutural  $\sigma$  de Hammett, ocorrendo substituições com grupos 4-NO<sub>2</sub>, 4-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 4-OCH<sub>3</sub>, 4-Cl na posição *para* do citado anel aromático. Deste modo, a formação do conjunto de quatro compostos de chalconas derivadas da diapocinina estão dispostos no diagrama de Craig ao redor de uma região caracterizada por uma linha reta paralela ao eixo da propriedade de  $\sigma$  de Hammett, que permitem variação dos valores de efeito eletrônico no anel B das chalconas, sem variar significativamente os valores de lipofilicidade.

## 6.2 Síntese da diapocinina

A síntese da diapocinina, seguiu de acordo com os procedimento descrito por Dasari *et al.* (2008) em que se obteve um sólido branco, insolúvel em água. O produto formado foi seco e mantido em dessecador com sílica gel sob proteção da luz. O sólido formado é solúvel em solução aquosa básica (pH 10 – 12) e em clorofórmio.

A diapocinina foi submetida à avaliação da pureza através da CCD com emprego de fase móvel clorofórmio e detecção na câmera escura com luz UV (254 nm) e visível (365 nm), realizada em placas de alumínio com sílica gel 60GF 254 da Sigma-Aldrich e visualizadas em luz ultravioleta. O material de partida apocinina também foi utilizado como padrão para verificação dos resultados obtidos na corrida cromatográfica. A partir da realização dos experimentos foram observadas bandas (spots) de migração nas placas cromatográficas do material de partida e do produto final da síntese, e os principais resultados estão demonstrados na figura 10. O rendimento obtido em diversos dias de reação de obtenção da diapocinina encontram-se descritos na tabela 1.

Figura 10 - Cromatoplaça contendo os sinais de migração do material de partida apocinina (A) e da diapocinina (B)

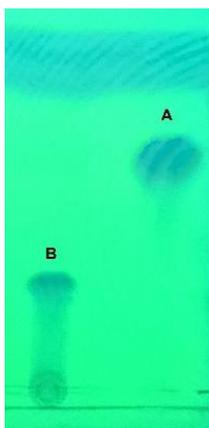


Tabela 1 - Rendimento (%) das diapocininas obtidas

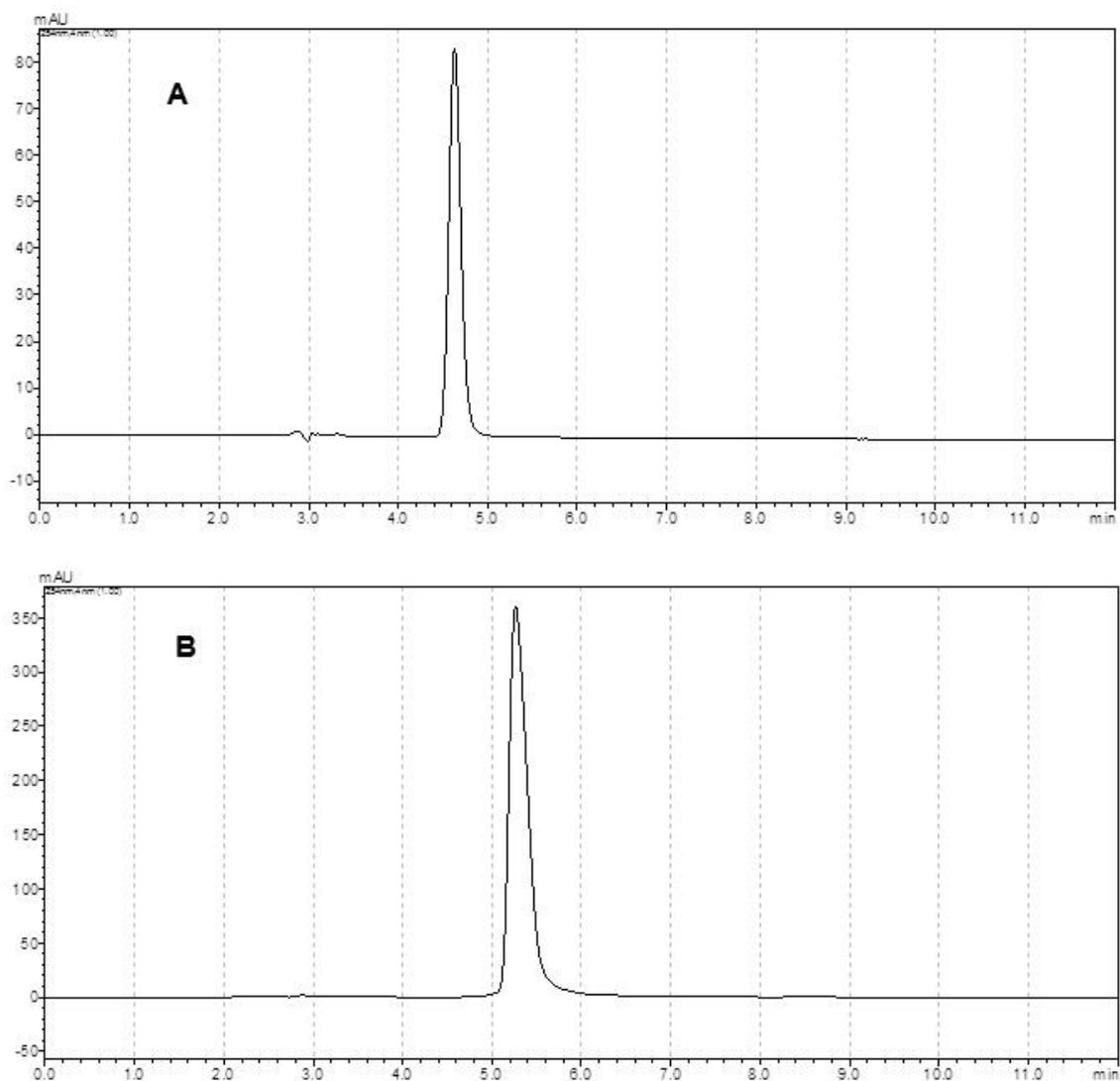
Composto	Rendimento
Diapocinina (1)	71 %
Diapocinina (2)	28 %
Diapocinina (3)	87 %
Diapocinina (4)	28 %

Para comprovar os resultados da formação da diapocinina e detectar a presença de impurezas ou material de partida junto ao produto formado obtidos com o uso de CCD, realizou-se uma análise mais detalhada com o emprego de CLAE.

Neste processo, empregou-se como fase móvel uma proporção entre água miliQ : metanol : acetato de amônia (52:47,7:0,31), conforme método descrito por Luchtefeld *et al.* (2008), com o emprego de fluxo de fase móvel de 1,0 mL.min<sup>-1</sup>. As concentrações utilizadas da apocinina e da diapocinina foram na faixa de 5-50 µM onde as substâncias foram dissolvidas em NaOH 0,1 M e depois diluídas em fase móvel previamente a realização da análise.

A partir dos cromatogramas demonstrados na figura 11, foi possível verificar o tempo de retenção do material de partida, a apocinina, de 4,5 a 4,9 minutos, e de seu dímero, a diapocinina, com tempo de 5,2 a 5,6. Neste contexto, verifica-se que a diapocinina, nas condições experimentais utilizadas, foi o único composto formado e que não houve a ocorrência de subprodutos ou impurezas.

Figura 11 - Cromatogramas dos compostos apocinina (A) e diapocinina (B) obtidos com o emprego de CLAE

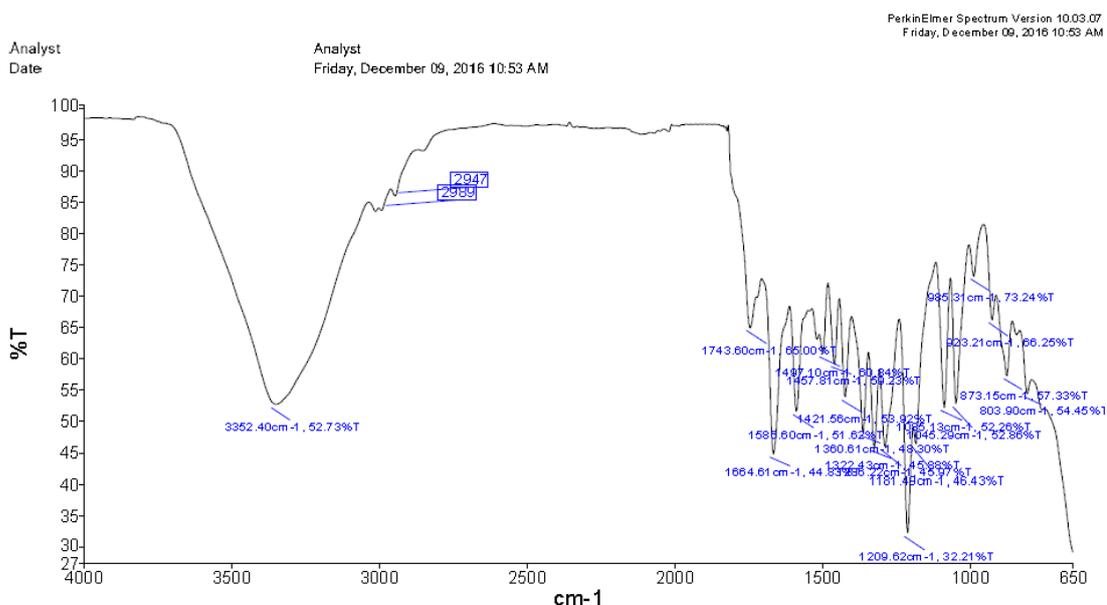


A caracterização estrutural da diapocinina ocorreu através de análises de ATR-FTIR e RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , sendo que os resultados encontram-se descritos a seguir. Devido à presença de grupamentos funcionais característicos, a diapocinina pode ser facilmente caracterizada por espectroscopia de infravermelho (CORREA, 2009) e os sinais e bandas característicos das frequências dos principais grupos funcionais estão descritos na figura 12 e na tabela 2.

Tabela 2 - Frequências em  $\text{cm}^{-1}$  características de grupos funcionais encontrados na diapocinina

Banda de absorção ( $\text{cm}^{-1}$ )	Atribuição
3600 - 3200	O-H
1820 – 1660	Grupo carbonila (C=O)
1600 e 1475	Anel aromático

Figura 12 - Espectro de ATR-FTIR da diapocinina



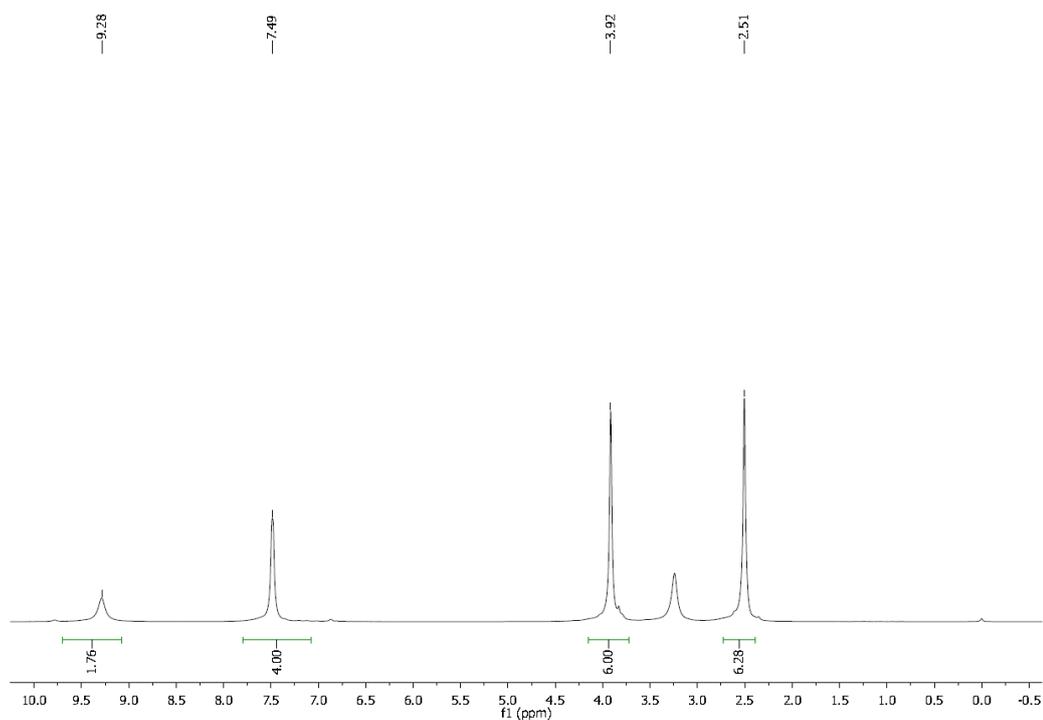
No espectro demonstrado na figura 12, verifica-se a presença de bandas O-H em  $3352 \text{ cm}^{-1}$ , em  $1743 \text{ cm}^{-1}$  e  $1664 \text{ cm}^{-1}$  (C=O) e relacionado aos anéis aromáticos  $1585 \text{ cm}^{-1}$ .

A partir dos dados e picos observados no espectro na análise de IV atribui-se bandas como: ATR-FTIR ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3352 (OH), 1743 (C=O), 1664 (C=O), 1585 (aril C=C), 1209, 1204, 1127, 1045, 873.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  foi registrado em 300 MHz e o RMN  $^{13}\text{C}$  em 100 MHz, usando como solvente o dimetilsulfóxido deuterado (DMSO). Os deslocamentos

químicos ( $\delta$ ) estão expressos em partes por milhão (ppm) e calibrados de acordo com o sinal referente ao DMSO.

Figura 13 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da diapocinina

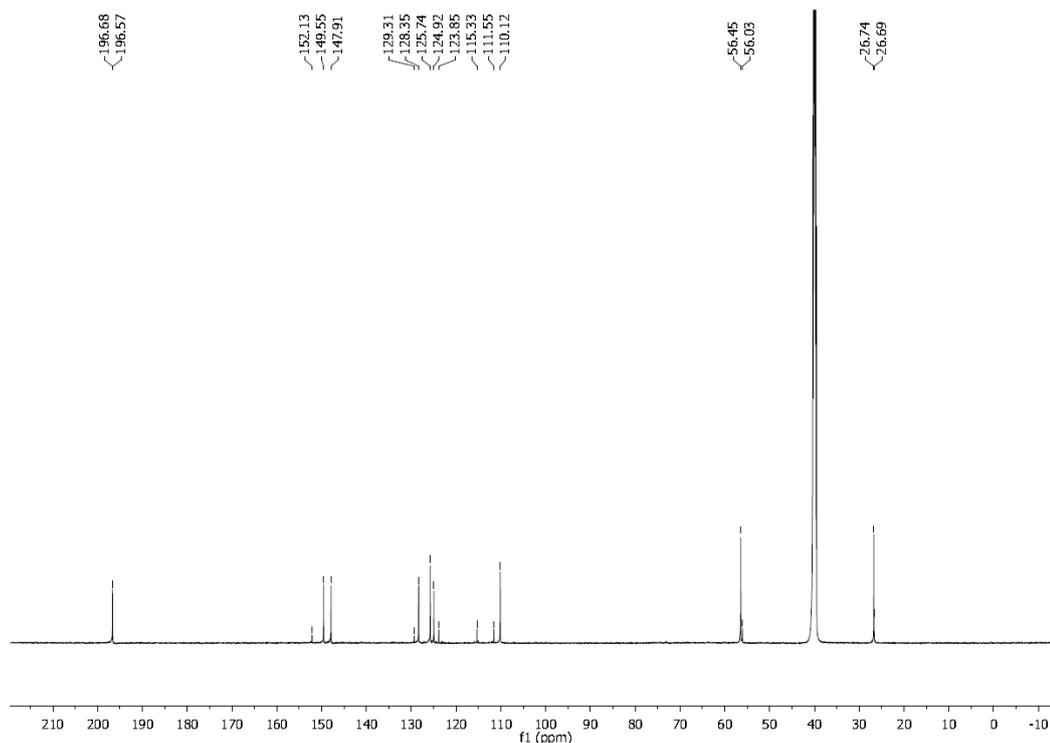


A partir da análise de RMN  $^1\text{H}$  da diapocinina foi possível atribuir em 2.51 ppm o sinal característico de um singlete para a metila ( $\text{CH}_3$ ), em 3.895 ppm um singlete para os átomos de hidrogênio do grupamento metoxila ( $\text{OCH}_3$ ), e a região de 7.49 ppm para os quatro prótons do anel ( $\text{CH}$  aromáticos), e 9.28 ppm para o átomo de hidrogênio ligado ao heteroátomo hidroxila ( $\text{OH}$ ). Os átomos de hidrogênio do anel não foram desdobrados e provavelmente será observado a partir de obtenção de espectro de RMN de campo de maior energia. Dasari *et al.* (2008) apresentou espectro de RMN  $^1\text{H}$  para a diapocinina obtido com espectrômetro de RMN de 50 MHz com o mesmo perfil observado com o expresso na figura 13, onde o sinal dos prótons aromáticos também com pouca resolução.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) da diapocinina encontra-se expresso na figura 14. A partir desta figura observa-se e atribui-se os sinais de deslocamento químico de RMN  $^{13}\text{C}$  (ppm) em 26,74, 26,69 ( $\text{CH}_3$ ); 56,03, 56,45 ( $\text{OCH}_3$ ); 110,12,

111,55, 115,33 (4C-arom); 124,92, 125,74 (2CA-arom); 128,35 (1C-arom); 129,31 (3C-arom); 147,1 (6C-arom); 152,13 (5C-arom); 196,68 (CO).

Figura 14 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da diapocinina



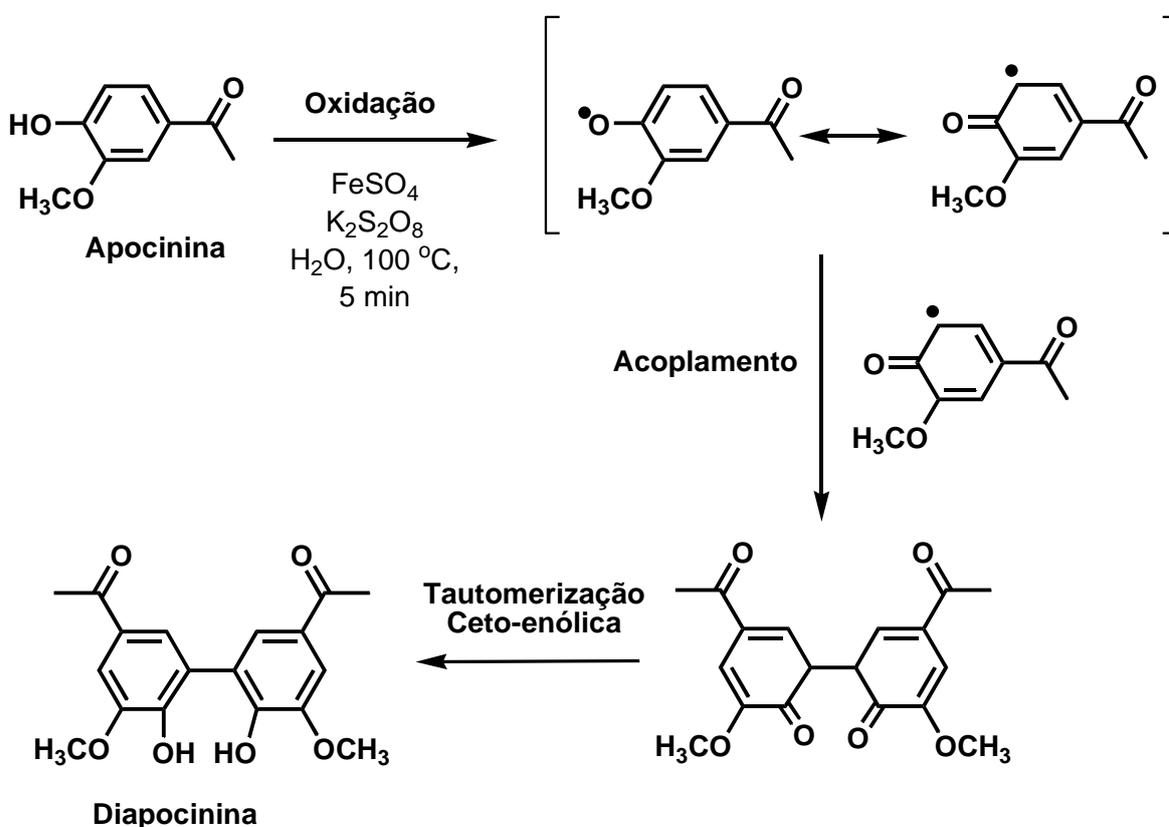
Os valores obtidos em análise de ponto de fusão da diapocinina não foram descritos uma vez que a mesma apresenta faixa de fusão superior a 300 °C, limite para os fusiômetros disponíveis no laboratório. Machado (2016) determinou o ponto de fusão da diapocinina em 304 °C por meio de análise térmica. As análises realizadas com o fusiômetro chegaram a 299 °C e foram interrompidas devido ao limite superior do equipamento.

A partir dos dados de CCD, CLAE, ATR-FTIR e RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  obtidos para a diapocinina permitiram observar que ocorreu sua formação e sem a presença de intermediários ou material de partida da reação.

O mecanismo de ação proposto para a formação da diapocinina encontra-se expressa na figura 15, onde se sugere a oxidação da hidroxila do grupamento fenol a partir do emprego de agente oxidante persulfato de potássio. Para a ativação do persulfato foi utilizado o sulfato ferroso ( $\text{Fe}^{+2}$ ) como catalisador (metal de transição),

que, em conjunto com o cloreto ferroso, é considerado o ativador mais comum e prontamente disponível do persulfato. A partir da formação do radical se sugere a ocorrência de acoplamento radicalar entre duas moléculas oxidadas da apocinina e posterior tautomerização ceto-enólica e formação da estrutura química da diapocinina. Este mecanismo é similar à formação do dímero da vanilina obtida a partir das mesmas condições citadas para a diapocinina (NISHIMURA *et al.*, 2010).

Figura 15 - Proposta de mecanismo de formação da diapocinina: Reação de acoplamento radicalar de grupo fenoxi e tautomerização ceto-enólica



Fonte: Adaptado de Nishimura *et al.* 2010.

### 6.3 Obtenção das chalconas

As chalconas foram sintetizadas de acordo com a reação de condensação de Claisen-Schmidt utilizando-se a diapocinina e variando-se os benzaldeídos substituídos (ÁVILA *et al.*, 2008). A diapocinina foi dissolvida em 2 mL de DMSO e, os benzaldeídos, quando necessário em metanol, seguida da adição da solução e

hidróxido de sódio (NaOH) 20% para a realização da reação de síntese. A reação foi mantida sob agitação a temperatura de 100 °C por um período de 24 horas sob proteção da luz.

Os sistemas de solvente de prováveis fases móveis a serem utilizadas foram diclorometano ou clorofórmio puros ou em combinações variáveis (30 – 70%) com acetato de etila ou hexano (30 – 50%) e presença de etanol (5%). Devido à reduzida solubilidade dos compostos a fase móvel utilizada foi o clorofórmio e a detecção na câmara escura com luz UV (254 nm) e visível (365 nm). Desta forma, durante e após o termino as reações foram submetidas a ensaios de caracterização com o uso de placas de CCD.

Os compostos foram filtrados sob pressão reduzida e mantidos no dessecador, e a partir desta, foram novamente avaliados por CCD para verificação da necessidade de purificação. Foi observada a presença de duas bandas (spots) na cromatoplaça para todos os compostos sintetizados e devido a isto optou-se pela realização de procedimento de recristalização. Nesta etapa, foram avaliados os sistemas de solventes clorofórmio:água e clorofórmio:acetato de etila, clorofórmio:etanol, etanol:água onde verificou-se que os solventes não possibilitaram a formação de cristais do produto isolado.

A partir desta etapa optou-se pela realização de cromatografia em coluna com o uso de fase estacionária Sílica gel Vetec® (230-400 mesh) e solvente clorofórmio. O procedimento, visualizado na figura 16, para a 4-cloroalcona derivada da diapocinina, permitiu aparentemente o isolamento do produto final desejado. Para os outros compostos foi observado a presença reduzida de contaminantes.

Figura 16 - Fotos da corrida cromatográfica em coluna realizada para a 4-cloroalcona derivada da diapocinina



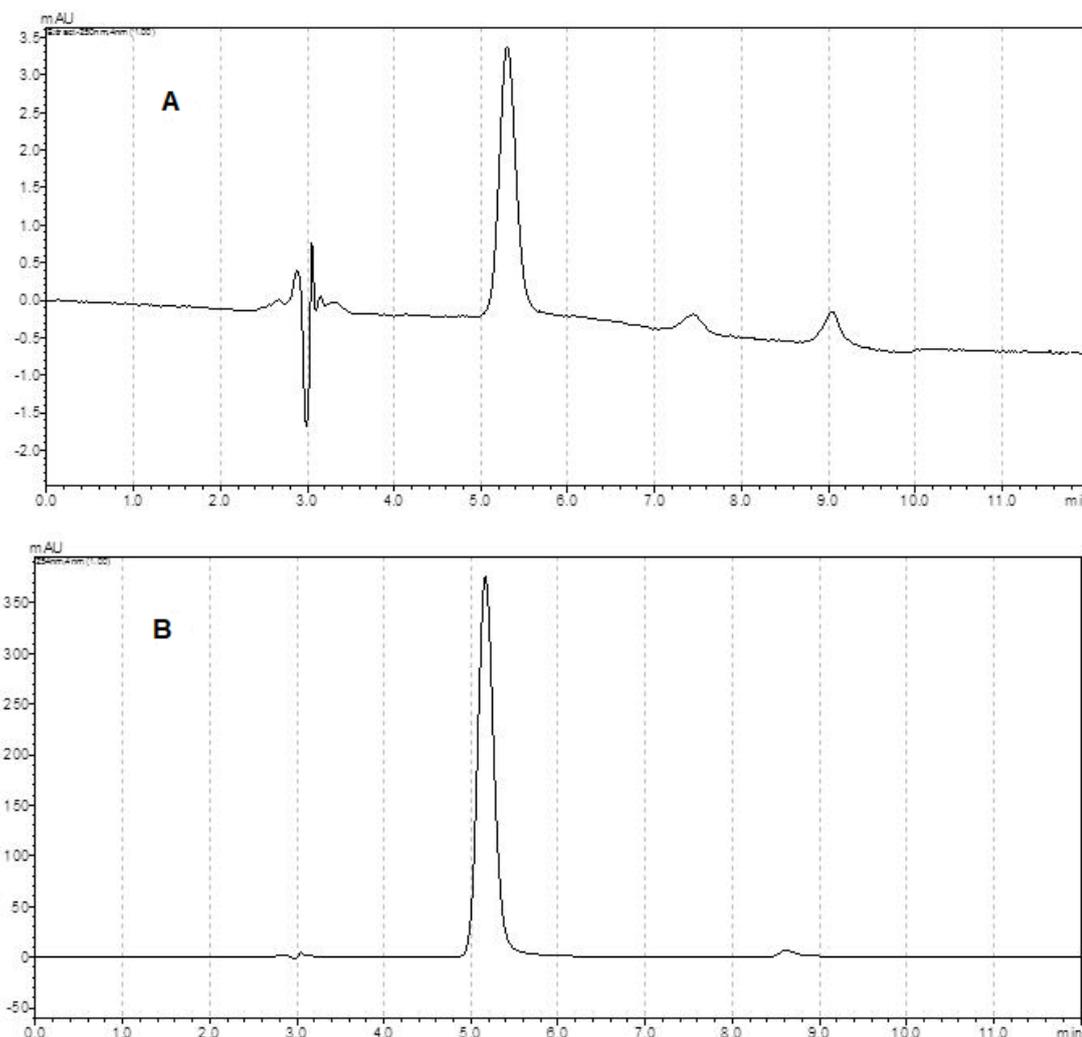
Outro procedimento experimental realizado foi a extração líquido-líquido do composto para explorar a sua solubilidade em base (NaOH ~ 0,1 M) e clorofórmio. Após esta etapa, considerando os compostos sintetizados 4-NO<sub>2</sub>, 4-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 4-OCH<sub>3</sub>, 4-Cl, observou-se que o 4-OCH<sub>3</sub> apresentou presença de impureza em análise de CCD, com dois spots visíveis em luz UV. Os derivados 4-NO<sub>2</sub>, 4-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 4-Cl apresentaram um único spot o que, a princípio, caracterizou a ausência de material de partida, intermediários ou outros produtos de formação dos compostos.

Ainda para verificação e confirmação de produto final estes compostos foram submetidos à análise cromatográfica por CLAE seguindo método descrito por Luchtefeld *et al.* (2008) para a diapocinina, a fase móvel utilizada foi uma proporção entre água miliQ : metanol : acetato de amônia (52:47,7:0,31).

A partir dos cromatogramas demonstrados na figura 17 (A para o Cl e B para o 4-OCH<sub>3</sub>, respectivamente) é possível verificar o tempo de retenção dos compostos resultantes da síntese. Para a 4-clorochalcona derivada da diapocinina é possível observar o pico da diapocinina material de partida e outros dois sinais analíticos, que foram atribuídos a chalcona monoacetilada e ao dímero dichalcona, produto final planejado. Neste cromatograma, devido a grau crescente de lipofilicidade dos compostos, o primeiro pico corresponde a diapocinina, seguida pela chalcona formada a partir de um grupamento acetil da diapocinina (monoacetilada) e a chalcona esperada como resultado final formada a partir dos dois grupos acetil presentes na molécula da diapocinina. Este cenário foi o mesmo observado para os cromatogramas dos compostos 4-NO<sub>2</sub> e 4-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, o que evidencia a necessidade de purificação destes derivados.

Para o derivado 4-OCH<sub>3</sub>, um pico relativo ao tempo de retenção da diapocinina e outro leve sinal em 8,7 minutos foram observados e pode ser atribuído a chalcona derivada da diapocinina formada a partir dos dois grupos acetil presentes na molécula.

Figura 17 - Cromatogramas das chalconas derivadas da diapocinina 4-Cl (A) e 4-OCH<sub>3</sub> (B)



A partir dos cromatogramas é possível observar que os compostos ainda apresentam impurezas em conjunto com o composto principal. A purificação dos compostos propostos encontra-se em andamento e serão confirmados a partir de experimentos realizados no laboratório, sugerindo-se novos estudos para separação destas moléculas, a partir de cromatografia preparativa em coluna. A caracterização estrutural dos compostos através de análises de ATR-FTIR, RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, serão realizadas após a purificação dos compostos por CLAE (coluna preparativa).

#### 6.4 Ensaio sequestrante de radical pelo DPPH

A apocinina, diapocinina e as chalconas derivadas da diapocinina, possuem número e a posição de grupamentos hidroxila (-OH) e metoxila (-OCH<sub>3</sub>) característicos de compostos fenólicos o que colabora para a captura das espécies reativas de oxigênio. Desta forma, apresentam potencial para exercer atividade antioxidante, que ressalta a necessidade de avaliar a capacidade aceptora de radicais dos compostos propostos, e segundo Miranda *et al.* (2006), a presença dos citados grupos substituintes na posição *orto* e *para* em relação ao grupamento carboxila, sendo essa a relação pela capacidade antioxidante dos compostos. As moléculas propostas neste trabalho se enquadram no postulado pelos autores citados.

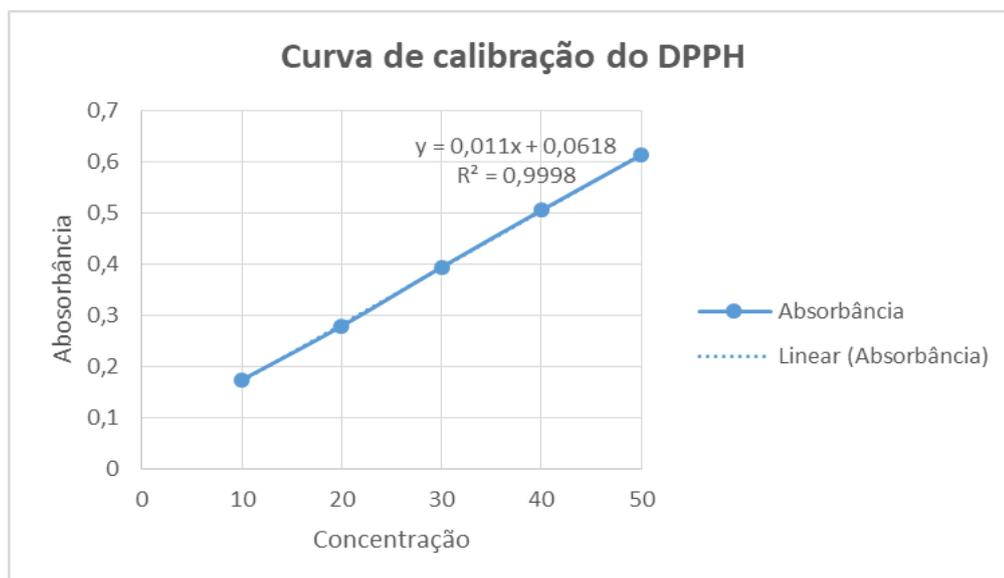
A determinação da atividade aceptora de radicais da apocinina, diapocinina e derivados chalconas da diapocinina foi realizada em fase anterior a realização da análise de CLAE, onde eram consideradas inicialmente como substâncias purificadas. A avaliação da atividade antioxidante potencial foi realizada através da avaliação da capacidade aceptora de radicais, especificamente para o DPPH.

O estudo iniciou-se a partir da construção da curva padrão de calibração do DPPH, solúvel em solução metanólica. Os valores de absorbância para a faixa de concentração 10 a 50 µM estão ilustrados na tabela 3. A construção da curva ocorreu nas referidas concentrações, que correspondeu à linearidade da curva de calibração, conforme expresso na figura 18.

Tabela 3 - Valores utilizados para a construção da curva de calibração do ensaio de DPPH

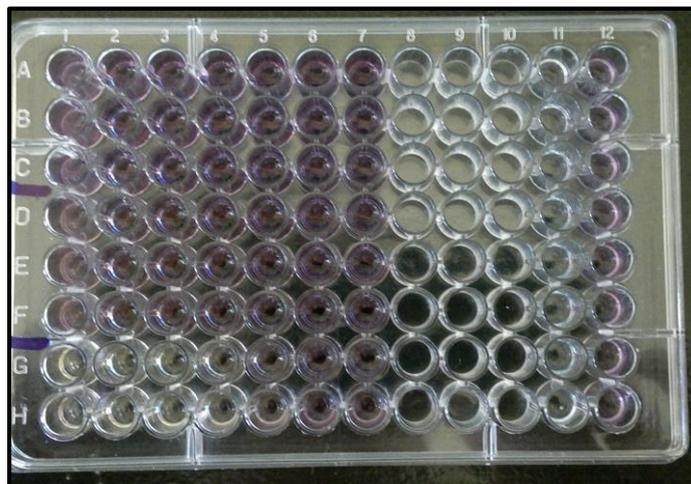
Concentração (µM)	Absorbância
10	0,174
20	0,279
30	0,394
40	0,505
50	0,613

Figura 18 - Curva de calibração do DPPH em faixa de concentração 10 a 50 µM



A partir desta etapa foram determinadas as concentrações do BHT que apresentam atividade antioxidante reconhecida, sendo utilizado como substância padrão dos ensaios e como controle positivo em comparação com os compostos estudados. O ensaio da atividade sequestrante pelo radical DPPH foi realizado em microplaca, para a apocinina e diapocinina foram utilizadas concentrações na faixa de 6,75 a 400 µM e para as chalconas derivadas da diapocinina na faixa de 5 a 80 µM. A solução de DPPH, em presença dos compostos, foi submetida à leitura em tempos 0 e, mantida em ambiente escuro, após 30 minutos. A figura 19 demonstra uma microplaca das análises de avaliação da atividade aceptora de radicais realizadas.

Figura 19 - Foto dos resultados da avaliação de atividade aceptora de radicais DPPH realizada em microplaca (coloração rosa presença de radical e redução desta a partir da redução de coloração até atingir coloração levemente amarelada)



Como medida de análise qualitativa, calculou-se a percentagem (%) de atividade sequestrante de radical dos compostos em análise, comparando-se a concentração de 6,75 a 400  $\mu\text{M}$  para a apocinina e diapocinina e a concentração 5 a 80  $\mu\text{M}$ . Os resultados desta análise estão demonstrados na tabela 4 e tabela 5.

Tabela 4 - Resultados em porcentagem obtidos no ensaio sequestrante de radical pelo DPPH em microplaca da apocinina e diapocinina

Concentração	Apocinina	Diapocinina	BHT
400	55,65	49,24	78,37
200	55,67	47,16	78,63
100	54,97	45,52	78,39
50	53,1	43,52	77,82
25	53,43	43,86	76,03
12,5	52,06	42,7	74,76
6,75	52,92	44,56	76,06

Tabela 5 - Resultados em porcentagem obtidos no ensaio sequestrante de radical pelo DPPH em microplaca das chalconas derivadas da diapocinina

Concentração	4-Cl	4-NO <sub>2</sub>	4-OCH <sub>3</sub>	4-N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	BHT
80	25,2	22,2	25,75	27,9	35,55
40	24,15	24,75	27,4	29,1	34,5
20	24,65	25,25	26,75	28,6	33,65
10	30,25	34,45	33,2	35	35,15
5	26,75	29,6	29,7	31,3	37,1

Segundo Miranda *et al.* (2006), os compostos com ação sequestrante de radical conhecido devem apresentar valores de 90 – 100% de atividade. Nas tabelas 4 e 5, podemos ver que todos os compostos apresentaram atividade sequestrante de radical, mas inferiores quando comparados ao padrão BHT. No entanto, todos os compostos avaliados apresentaram valores inferiores aos descrito na literatura, inclusive a solução de referência BHT. A ocorrência destes resultados pode ser devido ao tempo de incubação utilizado, ou da reduzida solubilidade dos compostos.

A partir dos resultados obtidos é possível realizar a comparação entre a apocinina e a diapocina, onde a apocinina demonstrou capacidade de captura de DPPH maior que seu dímero. Sendo assim, sugere-se que a apocinina apresenta-se como melhor candidato a estrutura protótipo para o desenvolvimento de compostos com atividade antioxidante potencial.

As chalconas derivadas da diapocinina, como não estão puras ainda, serão submetidas a novos ensaios para confirmação da atividade determinada.

### 6.5 Ensaio de avaliação dos sintomas de Doença de Parkinson em *Drosophila melanogaster*

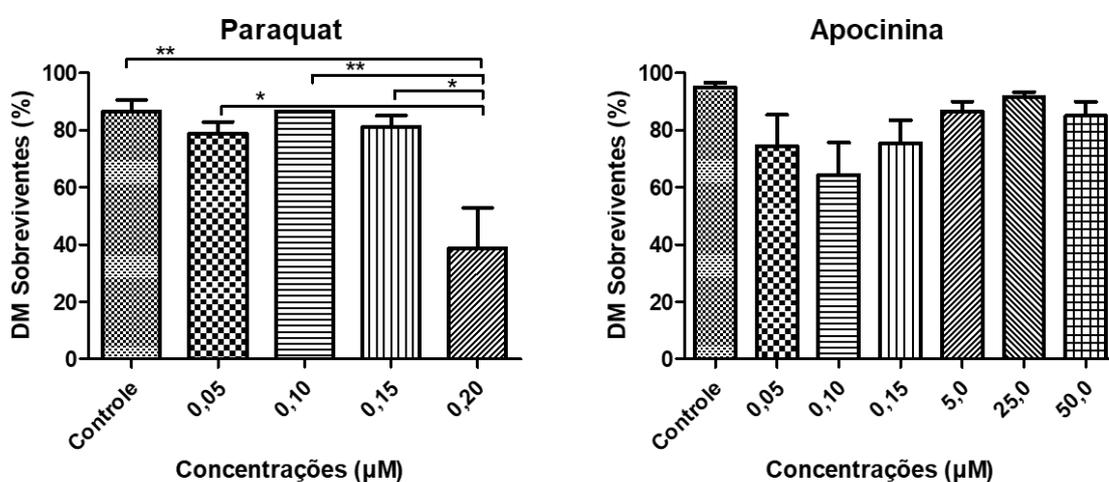
A DP é uma doença neurodegenerativa e, como citado na fundamentação bibliográfica, apresenta sintomas clínicos de desorganização motora como tremores, rigidez muscular, bradicinésia, relacionadas a perda de neurônios no sistema dopaminérgico localizado na substância nigra do cérebro. O uso do herbicida paraquat (PQ) em modelos animais de toxicologia ocasiona a degeneração de neurônios dopaminérgicos, o que resulta em disfunção conhecida como síndrome parkinsoniana

(PARK *et al.*, 2012; JAHROMI *et al.*, 2013). Neste cenário, pesquisadores como Soares *et al.* (2017), Park *et al.* (2012) e Orth *et al.* (2003) têm focado em modelos de indução de sintomas da DP por PQ em vertebrados com a finalidade de monitoramento e busca de agentes terapêuticos com efeito neuroprotetor potencial contra o herbicida em questão. O primeiro ensaio realizado foi o de sobrevivência da DM frente aos compostos apocinina e diapocinina.

### 6.5.1 Ensaio de sobrevivência de *Drosophila melanogaster*

Nesse ensaio verificamos a sobrevivência de indivíduos machos de DM com três dias de idade a partir da sua exposição ao PQ, apocinina e diapocinina isoladas. As moscas foram selecionadas e, logo a seguir alimentadas com a solução controle do experimento e com as contendo os compostos e herbicida estudados. As concentrações utilizadas das substâncias ensaiadas foram 0,05; 0,1; 0,15 e 2,0  $\mu\text{M}$  para o PQ, 0,05; 0,1; 0,15; 5,0; 25 e 50  $\mu\text{M}$  para a apocinina e 0,05; 0,1; 0,15  $\mu\text{M}$  para a diapocinina. Foram utilizadas 30 moscas em cada análise realizada em triplicata para cada concentração dos compostos e também para o controle negativo. Após o período de quatro dias, foi avaliado o número de moscas sobreviventes nos ensaios e os resultados estão expressos na figura 20.

Figura 20 - Número de *Drosophila melanogaster* sobreviventes quando expostas ao paraquat e a apocinina



A figura 20 mostra a curva de sobrevivência de DM do paraquat e apocinina em diferentes concentrações. Como observado nos resultados, o PQ exerce uma maior ação tóxica na concentração 0,20  $\mu\text{M}$ , diminuindo a sobrevivência em cerca de 40%. Já na faixa de concentração 0,05 – 0,15  $\mu\text{M}$  as mesmas causam porcentagem reduzida de mortes de indivíduos de DM em relação ao controle negativo, sendo escolhida para avaliação dos efeitos deletérios do herbicida.

Após o ensaio de sobrevivência, onde as DM foram alimentadas com apocinina foi observado que a todas as concentrações testadas estão próximas ao controle negativo. Em caso de uso para os testes de avaliação de inibição dos efeitos tóxicos do PQ as concentrações mais baixas como a de 0,15  $\mu\text{M}$  se apresentam como ideais para investigação de efeito protetor.

Comparações múltiplas foram realizadas usando ANOVA uma via seguido pelo teste estatística de comparação múltipla de Bonferroni e as diferenças foram consideradas significante quando  $p < 0,05$ ,  $0,01$  e  $0,001$ . As análises estatísticas foram realizada usando o software GraphPad Prisma, onde os dados são apresentados como média  $\pm$  S.E.M. Na análise do ensaio do PQ é possível observar diferenças significativas de  $*p < 0,05$  e  $**p < 0,01$  em relação ao grupo controle e das concentrações 0,05; 0,10 e 0,15 com a concentração com a 0,20  $\mu\text{M}$ . No ensaio com a apocinina não houveram diferenças significativas.

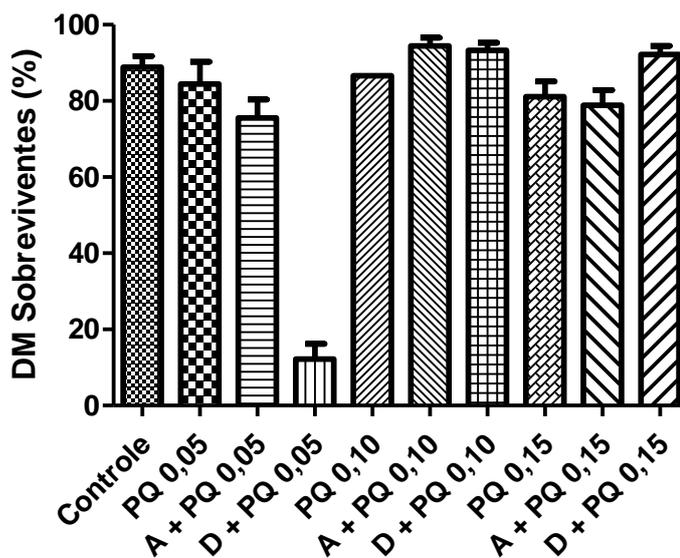
Devido aos resultados obtidos com a apocinina realizou-se até o momento a avaliação da concentração 0,05  $\mu\text{M}$  da diapocinina. Neste experimento observou-se a sobrevivência de 98% de similaridade em relação ao controle negativo.

### **6.5.2 Ensaio de toxicidade do Paraquat e ensaios de comportamento**

Na etapa anterior concluímos que as concentrações na faixa de 0,05 – 0,15  $\mu\text{M}$  do ensaio com PQ eram as ideais para o estudo de toxicidade, porque resultam em uma porcentagem menor na mortalidade das DM. Neste cenário, é possível verificar os sintomas de síndrome parkinsoniana em DM sem causar morte significativa dos indivíduos estudados. Desta forma, assim optamos por realizar esse ensaio para as concentrações 0,05, 0,1 e 0,15  $\mu\text{M}$  do PQ, inclusive para a apocinina e diapocinina, para um melhor comparativo.

Esta etapa envolveu a realização de ensaios com PQ juntamente com apocinina e PQ com diapocinina. As moscas foram alimentadas com o herbicida e com os compostos e comparadas com o controle negativo (solução de alimentação).

Figura 21 - Resultado do ensaio de toxicidade da apocinina e diapocinina expostos ao PQ

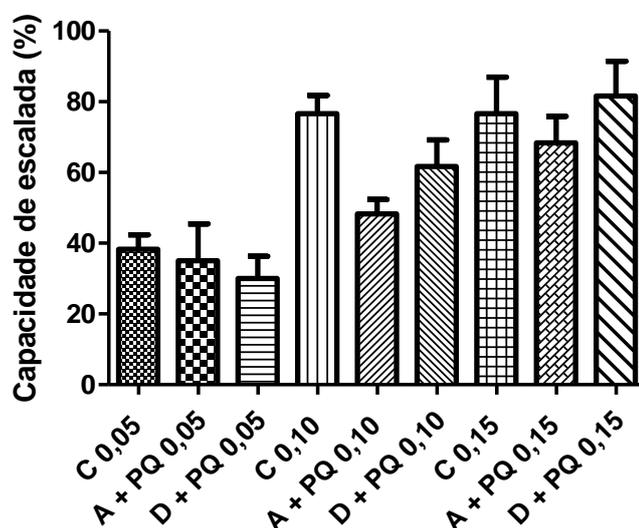


Bonferroni's Multiple Comparison Test	Significant? P < 0.05?	Summary
PQ 0,05 vs D + PQ 0,05	Yes	***
A + PQ 0,05 vs D + PQ 0,05	Yes	***
D + PQ 0,05 vs A + PQ 0,10	Yes	***
D + PQ 0,05 vs D + PQ 0,10	Yes	***
D + PQ 0,05 vs A + PQ 0,15	Yes	***
D + PQ 0,05 vs D + PQ 0,15	Yes	***

A figura 21 mostra o efeito protetor da apocinina e diapocinina contra os danos causados nas DM quando expostas ao PQ. Quando as moscas foram tratadas simultaneamente com os compostos e PQ, na concentração de 0,05  $\mu\text{M}$  a apocinina e a diapocinina não conseguiram proteger as DM contra o herbicida. No entanto a taxa de mortalidade foi significativamente menor quando tratadas na concentração 0,10  $\mu\text{M}$  de ambos os compostos e 0,15  $\mu\text{M}$  da diapocinina. Assim, observamos que uma concentração baixa não reduz a toxicidade do PQ. No teste de Bonferroni em todas as comparações foi possível observar diferença significativa de  $***p < 0,001$ , sendo esta a mais exata.

Após este ensaio, foi realizado o ensaio de geotaxia negativo, para determinar a função locomotora das moscas, onde em uma proveta de 50 mL, foi adicionado 10 moscas do controle e de cada composto dos ensaios anteriores, realizou-se o treinamento delas no sistema e após verificou-se quantas passaram do menisco da proveta no tempo de 8 segundos. O procedimento foi repetido seis vezes para cada análise. A partir dos resultados obtidos, foi calculado a média e o desvio padrão para o controle e, apocinina e diapocina em todas as concentrações.

Figura 22 - Capacidade de escalada do controle e dos compostos nas concentrações 0,05; 0,1 e 0,15  $\mu\text{M}$  quando expostos ao Paraquat



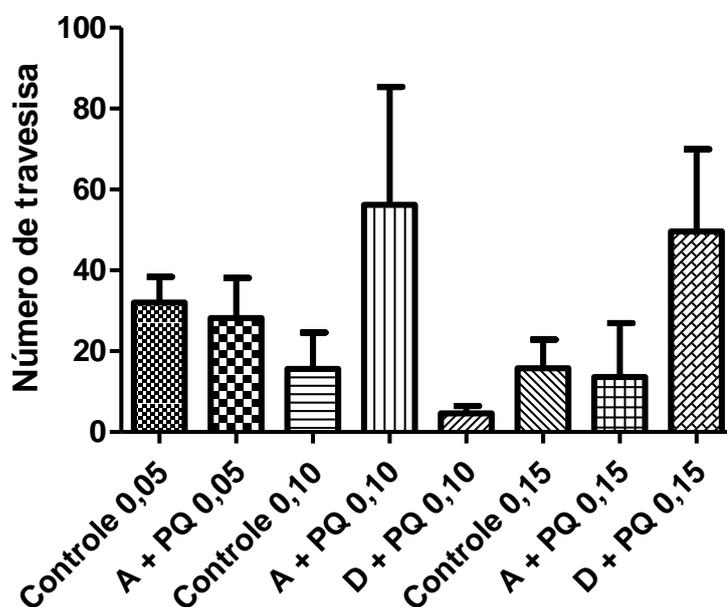
Bonferroni's Multiple Comparison Test	Significant? P < 0.05?	Summary
A + PQ 0,05 vs D + PQ 0,10	Yes	***
A + PQ 0,05 vs A + PQ 0,15	Yes	***
A + PQ 0,05 vs D + PQ 0,15	Yes	***
D + PQ 0,05 vs A + PQ 0,10	Yes	**
D + PQ 0,05 vs D + PQ 0,10	Yes	***
D + PQ 0,05 vs A + PQ 0,15	Yes	***
D + PQ 0,05 vs D + PQ 0,15	Yes	***
A + PQ 0,10 vs A + PQ 0,15	Yes	**
A + PQ 0,10 vs D + PQ 0,15	Yes	***
D + PQ 0,10 vs D + PQ 0,15	Yes	**

Nas concentrações mais baixas, como 0,05  $\mu\text{M}$  houve uma significativa redução no desempenho de escalada. Na concentração de 0,10  $\mu\text{M}$ , em comparação com o grupo controle negativo, observou-se a ocorrência de deficiência na função locomotora provocada pelo PQ quando ensaiadas em presença da apocinina e da diapocinina. Já na concentração mais alta (0,15  $\mu\text{M}$ ), houve o indicativo de resultados

similares ao controle negativo. Para as concentrações de 0,10 e 0,15  $\mu\text{M}$ , observou-se que a diapocinina se mostrou mais eficaz em comparação a apocinina, onde, na última concentração, pouco mais de 80% das DM ultrapassaram a linha de 50 mL da proveta no tempo de 8 segundos. Nas comparações múltiplas do teste de Bonferroni foram constatadas diferenças significativas de  $**p < 0.01$  e  $***p < 0,001$ .

A atividade física e a trajetória das DM foram monitoradas pelo ensaio de campo aberto (em inglês *open field*), característico para se verificar o efeito neuroprotetor de compostos bioativos em presença de PQ. Nesta etapa, foram adicionadas 5 moscas em uma placa de Petri grande, que fica sobre um campo demarcado por quadrados 1 cm x 1 cm, e coberta por outra placa de vidro. O comportamento das DM foi observado por 60 segundos e, registrado por uma câmera de vídeo.

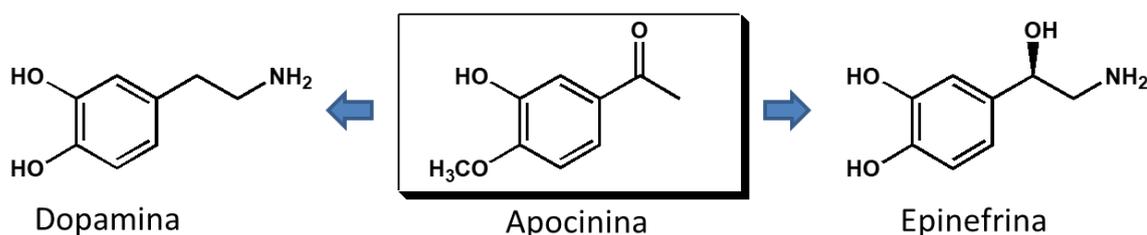
Figura 23 - Número de travessias das DM quando expostos ao Paraquat (PQ), nas concentrações 0,05; 0,1 e 0,15  $\mu\text{M}$  da apocinina e diapocinina



No teste de campo aberto, embora os valores dos resultados positivos tenham apresentado alto desvio, observa-se que a apocinina apresenta similaridade aos resultados obtidos para o controle negativo. Na concentração 0,10  $\mu\text{M}$ , onde as DM foram expostas a apocinina e PQ, observou-se a ocorrência de uma maior atividade exploratória que o seu grupo controle negativo, fato não observado para a diapocinina.

Este resultado foi observado também para a diapocinina na concentração de 0,15  $\mu\text{M}$ . Nesse ensaio não foram observadas diferenças significativas no teste de Bonferroni. O efeito maior da apocinina do que o grupo controle negativo sugere que neste caso, este composto pode além de combater o déficit locomotor, pode estar estimulando as DM no desempenho exploratório. Se este fato ocorre, sugere-se que este estímulo possa ser devido à similaridade estrutural com a dopamina ou epinefrina, envolvidos em sinalização adrenérgica nas DM.

Figura 24 - Estruturas químicas da apocinina, dopamina e epinefrina

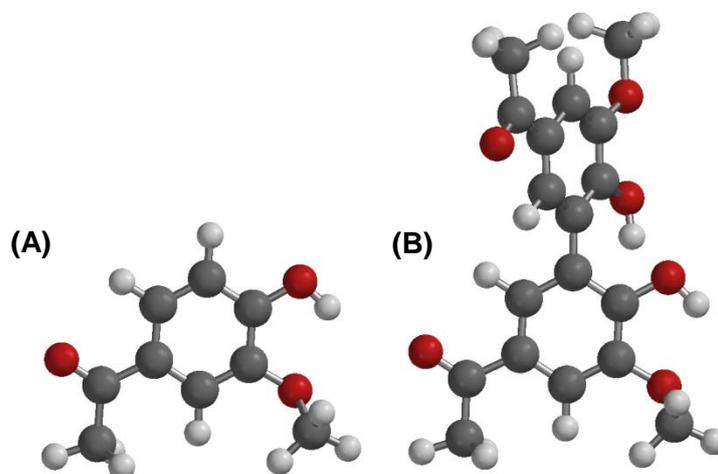


## 6.6 Modelagem Molecular dos compostos

### 6.6.1 Desenho, análise e cálculo de propriedades físico-químicas

A modelagem molecular dos compostos estudados neste trabalho ocorreu a partir de desenhos das moléculas em computador com o emprego de programa de química computacional Spartan'08 para Windows. As estruturas químicas foram otimizadas com método de mecânica molecular, método semi-empírico e análise de DFT, seguido pela análise conformacional através de metodologia DFT B3LYP-6.31G\*, e a determinação de propriedades físico-químicas. Os modelos estruturais em 3D da apocinina e da diapocinina estão expressos na figura 25.

Figura 25 - Estrutura química dos confôrmeros de menor energia mínima obtido por método DFT B3LYP-6.31G\* para a apocinina (A) e a diapocinina (B): modelo misto de bolas e tubo. Coloração dos átomos: C (cinza); H (branco); O (vermelho)



A etapa seguinte envolveu o cálculo de valores de propriedades físico-químicas de caráter lipofílico, eletrônicas e estruturais, a partir do desenho das estruturas químicas, que possam interferir na atividade antiparkinsoniana dos compostos. Estes cálculos foram realizados para se obter modelos teóricos que possam apoiar a compreensão do seu mecanismo aceptor de radicais e de sua reatividade molecular. Neste cenário, observou-se que a diapocinina apresenta volume molecular maior que a apocinina devido a replicação de sua molécula. Machado (2016) observou que a quebra molecular do efeito de coplanaridade molecular da estrutura química da diapocinina interfere no efeito mesomérico existente entre os dois anéis aromáticos. A quebra da coplanaridade molecular pode ser fato relevante na manutenção atividade biológicas propostas para a diapocinina.

Na próxima etapa foi utilizado o software Molinspiration Chemoinformatics, disponível online na internet. Com o uso deste programa computacional foram calculadas as propriedades físico-químicas de coeficiente de partição (miLogP), área de superfície polar topológica (TPSA), número de átomos (nAtom), de aceptor (nON) ou de doador de ligações de hidrogênio (nOHNH), e de rotações das ligações (nRot), volume e peso molecular, para os compostos originalmente propostos e que se encontram em processo de purificação para fins de se obter informações que possam delinear o desenvolvimento de substâncias candidatas a novos fármacos.

Os valores das propriedades físico-químicas de todos compostos estão descritas na tabela 6.

Tabela 6 - Valores de propriedades físico-químicas calculadas com o programa Molinspiration

Compostos	PM	VM	miLogP	TSPA	nAtom	nON	nOHNH	nRot
Apocinina	166,18	153,15	1,18	46,53	12	3	1	2
Diapocinina	330,34	293,67	2,52	93,07	24	6	2	5
4-cloro	575,44	485,27	7,83	93,07	40	6	2	9
4-dimetil	592,69	550,01	6,68	99,54	44	8	2	11
4-metoxi	566,61	509,29	6,59	111,53	42	8	2	11
4-nitro	596,55	504,87	6,39	184,71	44	12	2	11

As propriedades físico-químicas descritas acima foram avaliadas de acordo com o emprego da “Regra dos Cinco” de Lipinski (LIPINSKI, 2004), onde se considera que uma molécula bioativa para ser utilizada e absorvida por difusão passiva, a mesma deve apresentar coeficiente de partição (miLogP) não deve apresentar um valor maior que 5,0, o peso molecular (PM) não deve ultrapassar 500 Daltons, não deve ter mais que 5 grupos funcionais doadores (nOHNH) e 10 grupos aceptores de ligação de hidrogênio (nON). Esta regra foi formulada para avaliar a semelhança ou determinar se um composto químico com certa atividade biológica ou farmacológica tem propriedades que o tornam um provável fármaco a ser usado por via oral em humanos (LIPINSKI, 2004).

Com exceção do peso molecular, que deve ser menor que 500 daltons, todas as chalconas derivadas da diapocinina apresentaram valores característicos de propriedades físico-químicas similares para fármacos que estão no mercado e apresentam absorção por difusão passiva no corpo humano. A apocinina e a diapocinina apresentam valores de propriedades físico-químicas dentro da regra dos cinco de Lipinski, o que pode indicar que as chalconas derivadas da diapocinina podem apresentar problemas de biodisponibilidade no corpo humano. A propriedade de TPSA relativa é relativa à predição de transporte de substâncias ativas e é

correlacionada a absorção intestinal humana ou a passagem da barreira hematoencefálica (EDWARDS *et al.*, 2010). No presente trabalho, os derivados 4-NO<sub>2</sub> e 4-OCH<sub>3</sub> apresentam valores acima de 100 Å<sup>2</sup> o que pode indicar menor possibilidade de absorção destes compostos em relação aos demais compostos. O número de rotações moleculares tem sido descrito como um parâmetro físico-químico de flexibilidade estrutural e é relacionada com a biodisponibilidade de compostos bioativos (VEBER *et al.*, 2002). Os derivados da diapocinina apresentam grande número de rotações e desta forma, a partir dos valores calculados, verificamos que estes compostos apresentaram grande diversidade de biodisponibilidade em comparação a apocinina e diapocinina.

### 6.6.2 Análise de Docking Molecular

Os estudos computacionais foram realizados com os compostos apocinina, diapocinina, e chalconas derivadas da diapocinina para obter informações que auxiliem no entendimento da atividade antiparkinsoniana. A metodologia DFT/B3LYP - 6-311G\* em fase gasoso, disponível no software Spartan'08 para Windows (Wavefunction Inc., Irvine, EUA) foi usada para otimização de geometria e análise conformacional. A geometria dos compostos foi otimizada, seguindo-se a análise conformacional sistemática com incrementos de ângulo de torção de 30° na faixa de 0-360°. O confômero com estrutura química de menor energia foi salva em arquivo de extensão sybyl mol2 antes do emprego em estudos de ancoragem.

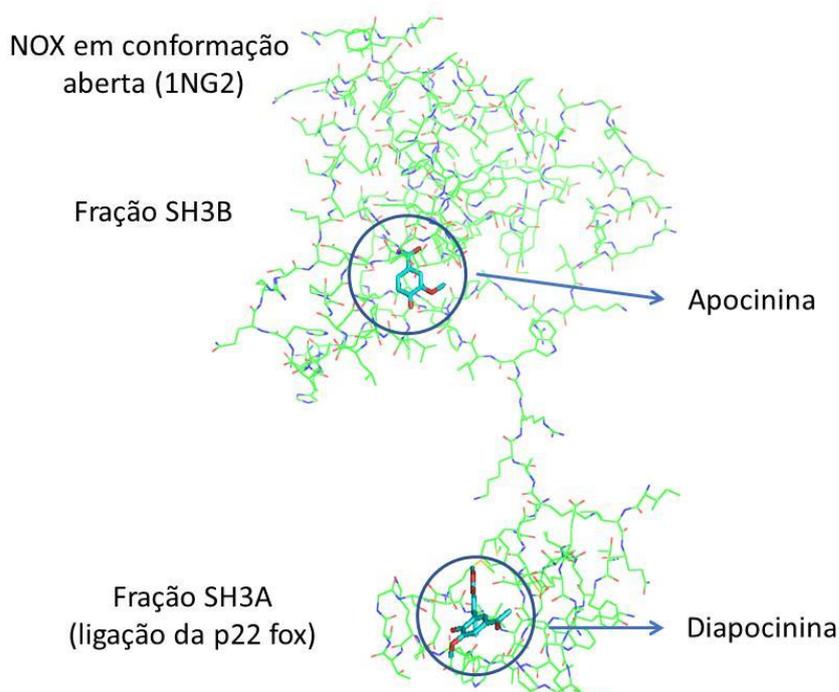
A primeira etapa deste estudo envolveu a avaliação das possíveis interações da apocinina e da diapocinina com a alfa-sinucleína, intimamente ligada às estruturas corpos de Lewis, envolvidos na fisiopatologia da DP. Como citado anteriormente, Marchiani *et al.* (2013) sugeriram que análogos estruturais da diapocinina, contendo grupos substituintes ligados a esta moléculas, poderiam apresentar atividades de inibição da agregação da alfa-sinucleína, aceptora de radicais e neuroprotetora, o que pode ser benéfico para o tratamento da DP. Desta forma, a investigação da ligação entre ambos compostos com os receptores 3Q25 e 1XQ8 foi verificada para fins de obtenção de um modelo teórico que possa auxiliar no desenvolvimento de agentes antiparkinsonianos novos.

O estudo permitiu verificar que a apocinina e a diapocinina não tem interação nos sítios ativos das alfa-sinucleínas estabelecidos na literatura (ZHAO *et al.*, 2011; ULMER *et al.*; 2005) em todas as condições estudadas. Os compostos sempre apresentam ligação em outros pontos moleculares das proteínas estudadas e, desta forma, não devem ser considerados uma vez que não foi possível validar os resultados obtidos.

A NADPH oxidase 1 foi outro receptor biológico utilizado nos estudos de docking visto que é considerado como envolvido na potencial atividade antiparkinsoniana. Como considerado anteriormente, a diapocinina, um dímero covalente da apocinina, tem sido mencionada para ser um potente inibidor da enzima que produz superóxido, a NADPH oxidase, sendo ela uma importante fonte de estresse oxidativo no cérebro, principalmente em doenças neurodegenerativas. Do mesmo modo, Cristovão *et al.* (2012) relataram que a NADPH oxidase 1 media a alfa-sinucleinopatia na DP o que torna inibidores desta enzima como candidatos a fármacos antiparkinsonianos.

Os estudos de interação entre os compostos apocinina e diapocinina e os receptores 1K4U e 1NG2 foram realizados onde se verificou os resultados obtidos, expressos nas tabelas 7 e 8 e figuras 26 e 27. Para o receptor 1NG2 foi observado que o software apresenta opção de cálculo de arquivo completo somente sem a possibilidade de aplicação da opção de por sítio de ligação do receptor. Desta forma observou-se que a apocinina apresenta sítio de interação junto a fração SH3B, região polibásica característica para interação de ligantes inibidores da NOX. A diapocinina apresentou, no entanto, sítio de interação preferencial junto a SH3A, sítio de ligação da proteína p22 fosforidada, diferente da apocinina. Em todos os cálculos realizados com este programa computacional foi sugerido que a apocinina não se liga na mesma região da diapocinina.

Figura 26 - Principais interações da apocinina e a diapocinina com o segmento p47 da estrutura cristal da proteína NOX em conformação aberta (PDB: 1NG2)



A partir destes dados optou-se por se obter modelos de interação compostos ativos e bioreceptor com o uso de outra proteína NOX-1 a 1K4U. A função de pontuação empírica do iGemdock é a soma total estimada de Van der Waals, ligação de hidrogênio e energia eletrostática. Neste caso, as melhores poses dos ligantes diapocinina e apocinina, consideradas as conformações com menor energia de interação, apresentaram energia de intensidade de  $-84,47$  e  $-65,11$  Kcal mol<sup>-1</sup>, respectivamente, sendo maior a interação do tipo Van der Waals, seguida pela tipo ligação de hidrogênio. A diapocinina apresentou menor energia de interação com o sítio ativo da NOX-1 em comparação com a apocinina. Nenhuma interação do tipo eletrostática foi observada nestes estudos.

Tabela 7 - Energias de interação (Van der Waals - VDW, ligação de hidrogênio e eletrostática) entre a apocinina e a diapocinina e o receptor NOX-1 (1NG2) obtidas com o uso de software Igemdock 2.1

<b>Compostos</b>	<b>Energia de Afinidade (Kcal mol<sup>-1</sup>)</b>	<b>VDW</b>	<b>Ligação-H</b>	<b>Eletrostática</b>
Diapocinina	-84,47	-68,02	-16,45	0
Apocinina	-65,11	-48,48	-16,62	0

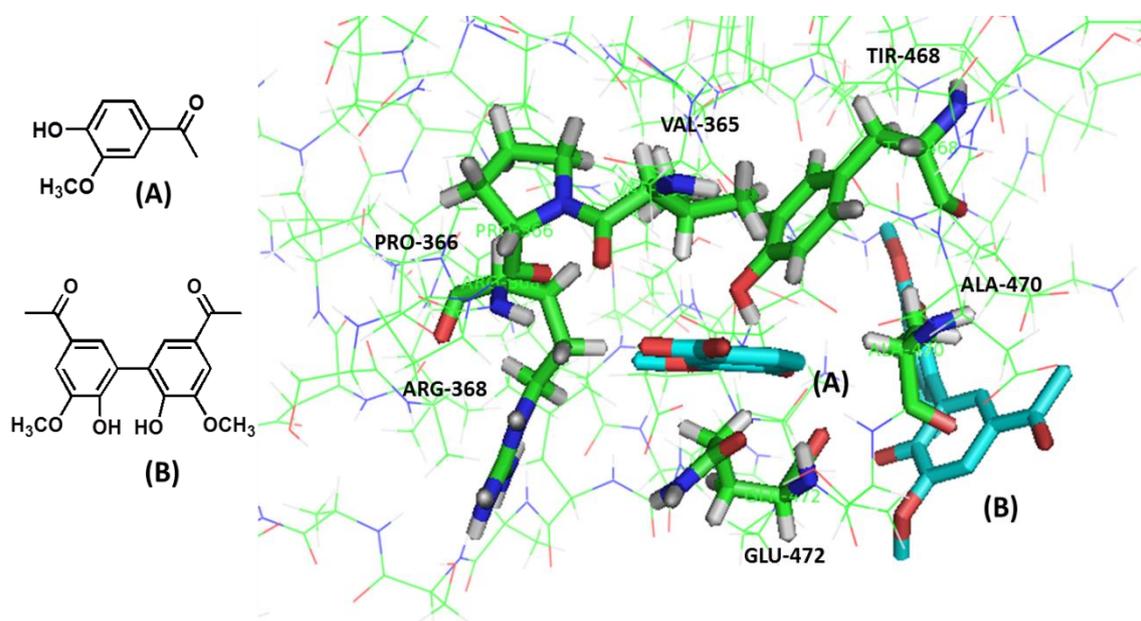
De acordo como descrito na tabela 8, as principais interações observadas entre a apocinina e a proteína ocorrem com os aminoácidos VAL 365, PRO 366, PRO 367 e ARG 368 a partir de forças de Van der Waals e do tipo ligações de hidrogênio com os resíduos TYR 468 e ARG 368. Já a diapocinina apresentou interações de Van der Waals com os resíduos GLN 472, PRO 473, ASP 475, LEU 476, GLU 477, GLN 479, SER 499, LYS 500 e LYS 502, e do tipo ligação de hidrogênio com os resíduos GLU 477 e LYS 502. A análise de Consenso Residual permitiu observar que a ARG 368 é o principal aminoácido envolvido na interação apocinina – NOX-1 (com pontuação Z - 1,12 e WPharma 1,00). As maiores interações podem ser visualizadas na figura 27.

Os resíduos de aminoácidos VAL 365, PRO 366, ARG 368, TYR 468 e GLN 472 foram os mesmos observados no sítio de interação molecular número 4 proposto por Jiang *et al.* (2013) para compostos derivados da apocinina o que confirma e valida o modelo obtido. Neste trabalho os autores sugerem que a diapocinina não apresenta boa interação com o sítio ativo em questão. Os resultados obtidos em nosso estudo indicam que, embora a diapocinina tenha estrutura química muito similar a apocinina a mesma não apresenta ligação no mesmo sitio de interação da apocinina. Desta forma, observa-se que a existência de proposição de dois locais distintos e próximos de interação no sítio ativo possibilita o planejamento e desenho de estruturas químicas que contenham aumento de cadeia lateral, e assim que possam atuar no mesmo local da apocinina e também da diapocinina de maneira simultânea.

Tabela 8 - Principais interações entre a apocinina e a diapocinina (Van der Waals - VDW, ligação de H – Lig-H, e eletrostática – elet.) e os resíduos de aminoácidos envolvidos na ligação com o sítio ativo da NOX-1 (1K4U) com normal e aplicação de Análise Consenso Residual obtidas com o uso de software Igemdock 2.1

Compostos/ Interações	Aminoácidos													
	VAL 365	PRO 366	PRO 367	ARG 368	TYR 468	GLN 472	PRO 473	ASP 475	LEU 476	GLU 477	GLN 479	SER 499	LYS 500	LYS 502
<b>Apocinina</b>														
VDW	-13,4	-7,4	-5,9	-6,0	0,0	-10,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Lig-H	0,0	0,0	0,0	-7,0	-2,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Elet.	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>Diapocinina</b>														
VDW	-8,2	0,0	0,0	0,0	0,0	-1,1	-2,9	-4,4	-6,0	-23,9	-4,5	-1,9	-2,2	-8,0
Lig-H	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-2,5	0,0	0,0	0,0	-3,5
Elet.	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Figura 27 - Principais Interações dos compostos apocinina (A) e diapocinina (B) com resíduos de aminoácidos envolvidos no local de ligação de NOX-1 (PDB: 1K4U)



### 6.6.3 Avaliação da Toxicidade *in silico*

A predição da toxicidade de todos os compostos propostos neste trabalho foi realizada através do emprego de dois programas computacionais distintos, Osiris Property Explorer (que determina os risco mutagênicos, tumorogênicos, cancerígenos, irritantes e sobre o sistema reprodutor) e admetSAR (genotoxicidade). Este estudo tem a finalidade de verificar o risco de toxicidade teórica e assim, de posse destes dados, propor qual é a melhor alternativa para direcionar a continuidade dos estudos com as moléculas propostas.

Nas análises de predição de toxicidade *in silico*, os resultados obtidos com o emprego dos programas, que estão dispostos na tabela 9, indicaram que apenas os compostos chalcona 4-NO<sub>2</sub> e 4-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> derivados da diapocinina apresentaram atividades tóxicas para os riscos mutagênicos e genotóxicos. Neste caso, o presente teste avalia um determinado produto químico se pode ser viável para causar mutações no DNA do organismo, podendo agir como um agente cancerígeno. Já os compostos 4-Cl e 4-OCH<sub>3</sub> apresentam-se como predição de ausência de toxicidade, mostrando-se como promissores para o planejamento e desenvolvimento de novos fármacos a auxiliar no tratamento de diversas doenças, devido baixo risco de toxicidade.

Tabela 9 - Risco de efeitos tóxicos calculados no programa OSIRIS® Property Explorer e admetSAR para a apocinina, diapocinina e chalconas derivadas da diapocinina

Efeito Tóxico	Compostos					
	Apocinina	Diapocinina	4-NO <sub>2</sub>	4-Cl	4-OCH <sub>3</sub>	4-N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
<b>Mutagênico</b>	Não	Não	Sim	Não	Não	Sim
<b>Tumorogênico</b>	Não	Não	Não	Não	Não	Não
<b>Irritante</b>	Não	Não	Não	Não	Não	Não
<b>Reprodutivo</b>	Não	Não	Não	Não	Não	Não
<b>Genotóxico</b>	Não	Não	Sim	Não	Não	Sim

## **7. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Nesta pesquisa foi realizado o estudo da apocinina, diapocinina e de quatro derivados chalconas da diapocinina candidatas a fármacos antioxidantes e antiparkinsonianos. O trabalho envolveu a síntese, caracterização, avaliação da atividade aceptora de radicais e das propriedades físico-químicas, estudos de modelagem e docking molecular e de toxicidade *in vivo* e *in silico*, e atividade frente a sintomas de doença de Parkinson em protocolos de *Drosophila melanogaster*.

A diapocinina foi sintetizada conforme a metodologia descrita por Dasari *et al.* (2008) e, teve sua formação comprovada, sem a presença de intermediários ou material de partida da reação. Já os seus compostos derivados de chalconas foram obtidos através de reação de condensação de Claisen-Schmidt, observando que esses ainda apresentam impurezas em conjunto com o composto principal. Assim a purificação e separação dessas moléculas encontram-se em fase de execução.

Em relação à atividade aceptora de radicais, observada a partir dos ensaios de DPPH, os compostos não apresentaram atividades sequestrantes situadas entre 90-100%, características para substâncias consideradas antioxidantes e, apresentaram atividades inferiores ao padrão utilizado, BHT. Entretanto, em uma comparação entre a apocinina e a diapocinina, o dímero demonstrou capacidade de captura menor que a apocinina, sugerindo-se assim que esta apresenta-se como melhor candidato a estrutura protótipo para o desenvolvimento de compostos com atividade antioxidante potencial.

Nos estudos de modelagem molecular, observou-se que a partir da predição de toxicidade dois compostos derivados da diapocinina (dimetilamino e nitro) apresentaram riscos para os efeitos mutagênicos e genotóxicos, sendo que os demais apresentaram risco teórico baixo. Já na análise de docking molecular, observou-se que estruturas químicas apresentam interação com o sítio ativo da NADPH oxidase sem evidenciar interação clara com a alfa-sinucleína. Com a NADPH oxidase, este estudo indicou que a apocinina e seu dímero não possuem ligação no mesmo sítio de interação, mas sim em locais adjacentes. Sugere-se que estas moléculas possam, de maneira simultânea, atuar no mesmo alvo terapêutico.

A apocinina e diapocinina se apresentaram como compostos promissores na avaliação da atividade frente aos sintomas da doença de Parkinson *in vivo*, resultado demonstrado através de ensaio sobrevivência, toxicidade e comportamento com *Drosophila melanogaster*. Desta forma, se apresentam como candidatos para o estudo e o desenvolvimento de agentes terapêuticos, com atividade neuroprotetora.

## **8. PERSPECTIVAS**

---

- Realizar a purificação das chalconas derivadas da diapocinina, com novos estudos para separação destas moléculas;
- Submeter as chalconas derivadas da diapocinina, após purificação, a novos ensaios para confirmação da atividade aceptora de radicais através de ensaio DPPH;
- Avaliar a atividade antioxidante dos compostos propostos através de ensaio ABTS;
- Realizar estudos sobre o estímulo da apocinina no desempenho exploratório das *Drosophila melanogaster*.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSEN, O. M.; MARKHAM, K. R. **Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications**, 1 ed. New York: Taylor & Francis Group, 2006.
- ARAÚJO, C. R. M.; LEITE FILHO, C. A.; SANTOS, V. L. A.; MAIA, G. L. A.; GONSALVES, A. A. Desenvolvimento de fármacos por hibridação molecular: uma aula prática de química medicinal usando comprimidos de paracetamol e sulfadiazina e a ferramenta virtual SciFinder®. **Quim. Nova**, Petrolina, v. 38, n. 6, p. 868-873, 2015.
- ARROIO, A.; HONÓRIO, K.; SILVA, A. Propriedades químico-quânticas empregadas em estudos das relações estrutura-atividade. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 33, n. 3, p. 694-699, 2010.
- ÁVILA, H.; SMÂNIA, E. A.; MONACHE, F. D.; SMÂNIA A. J. Structure-activity relationship of antibacterial chalcones. **Bioorg. Med.Chem.**, v.16, n. 22 p. 9790-9794, 2008.
- AZEVEDO, L. L.; CARDOSO, F. Ação da levodopa e sua influência na voz e na fala de indivíduos com doença de Parkinson. **Revista da Sociedade Brasileira de Fonoaudiologia**, São Paulo, v. 14, n. 1, p. 136-141, 2009.
- BAGATINI, P. B.; SAUR, L.; RODRIGUES, M. F.; BERNARDINO, G. C.; PAIM, M. F.; COELHO, G. P.; SILVA, D. V.; OLIVEIRA, R. M.; SCHIRMER, H.; SOUTO, A. A.; VIANNA, M. R.; XAVIER, L. L. The role of calcium channel blockers and resveratrol in the prevention of paraquat-induced parkinsonism in *Drosophila melanogaster*: a locomotor analysis. **Invert. Neurosci**, Porto Alegre, v. 11, n. 1, p. 43-51, 2011.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal: As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos**, 2 ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2008.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 113-123, jan./feb. 2006.
- BASTIANI, M. B.; BIANCHINI, M. C.; PUNTEL, R. L. **Aluminum Induces Parkinson-like Symptoms in *Drosophila melanogaster***. 2014.
- BATOVSKA, D.; PARUSHEV, S. T.; SLAVOVA, A.; BANKIVA, V.; TSVETKOVA, I.; NINOVA, M.; NAJDENSKI, H. Study on the substituents' effects of a series of synthetic chalconas against the yeast *Candida albicans*. **Eur. J. Med. Chem.**, Paris, v. 42, n 1, p. 87-92, 2007.
- BEDARD K, KRAUSE K. H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. **Physiol. Rev.**, Geneva, v. 87, n.1, p. 245-313, 2007.
- BENTON, R. Chemical sensing in *Drosophila*. **Curr.Opin.in Neurob.**, Lausanne, v. 18, n. 4, p. 357-363, 2008.

CARVALHO, I. PUPO, M. T.; BORGES, A. D.; BERNARDES, L. S. Introdução à modelagem molecular de fármacos no curso experimental de química farmacêutica. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 26, n. 3, p. 428-438, mai./jun. 2003.

CHANDASANA, H.; CHHONKER, Y.S.; BALA V.; PRASAD, Y.D.; CHAITANYA, T.K.; SHARMA, V.L.; BHATTA, R.S. Pharmacokinetic, Bioavailability, Metabolism and Plasma Protein Binding Evaluation of NADPH-Oxidase Inhibitor Apocynin using LC-MS/MS. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, 2015.

CHONG, C. R., SULLIVAN JR., D. New uses for old drugs. **J. Nature**, Baltimore, v. 448, n. 7154, p. 645-646, 2007.

CORREA, R. **Chalconas, imidas e derivados como moléculas bioativas: estudo da relação estrutura-atividade**. Florianópolis, 2009.

CRAIG, P.N. Interdependence between physical parameters and selection of substituent groups for correlation studies. **J. Med. Chem.**, Columbus, v. 14, n. 8, p. 680-684, 1971.

CRISÓSTOMO, L. C. S.; MARINHO, M. M.; MARINHO, E. S. In Silico Study of Antiparkinson Drug Levodopa and Drug Design of Four Theoretical Analogues. **International Journal of Recent Research and Review**, Ceará, v. 10, n. 4, p. 24-28, 2017.

CRISTÓVÃO, A. C.; GUHATHAKURTA, S.; BOK, E.; JE, G.; YOO, S. D.; CHOI, D. H.; KIM, Y. S. NADPH oxidase 1 mediates alpha-synucleinopathy in Parkinson's disease. **J. Neurosci**, v. 32, n. 42, p. 14465–14477, 2012.

CZAKO, B., KURTI, L. **Strategic applications of named reactions in organic synthesis**. 1 ed: Elsevier Academic Press, 2005.

DASARI, M. S.; RICHARDS, K. M.; ALT, M. L.; CRAWFORD, C. F. P.; SCHLEIDEN, A.; INGRAM, J.; HAMIDOU, A. Z. A.; WILLIAMS, A.; CHERNOVITZ, P. A.; LUO, R.; SUN, G. Y.; LUCHTEFED, R.; SMITH, R. E. Synthesis of diapocynin, **J. Chem. Educ.** v. 85, n. 3, p. 411-412, 2008.

DEVIA, C.M. PAPPANO, N.B.; DEBATTISTA, N.B. Structure-biological activity relationship of synthetic trihydroxylated chalcones. **Rev. Microbiol.**, São Paulo, v. 29, n. 4, out./dez. 1998.

DRANKA, B.P.; GIFFORD, A.; GHOSH, A.; ZIELONKA, J.; JOSEPHA, J.; KANTHASAMY, A.G.; KALYANARAMAN, B. Diapocynin prevents early Parkinson's disease symptoms in the leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2R1441G) transgenic mouse. **Neurosci. Lett**, Milwaukee v. 549, p. 57– 62, 2013.

DUARTE-ALMEIDA, J. M., SANTOS, R. J., GENOVESE, M. I., LAJOLO, F. M.,

Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico e método de sequestro de radicais DPPH. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 26, n. 2, p. 446-452, 2006.

EDWARDS, M. P.; PRICE, D. A. Role of Physicochemical Properties and Ligand Lipophilicity Efficiency in Addressing Drug Safety Risks. **Elsevier**, v. 45, p. 380-391, 2010.

FAUST, K.; GEHRKE, S.; YANG, Y.; YANG, L.; BEAL, M.F.; LU, B. Neuroprotective effects of compounds with antioxidant and anti-inflammatory properties in a *Drosophila* model of Parkinson's disease. **BMC Neurosci.**, v. 10, p. 109-126, 2009.

FEANY, M. B.; BENDER, W. W. A *Drosophila* model of Parkinson's disease. **Nature**, Massachusetts, v. 404, n. 6776, p. 394-398, 2000.

FERREIRA, R. S.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Integração das técnicas de triagem virtual e triagem biológica automatizada em alta escala: oportunidades e desafios em P&D de fármacos. **Quim. Nova**, v. 34, n. 10, p. 1770-1778, 2011.

FOYE O. W.; LEMKE, T. L.; WILLIAMS, D. A. **Principles of medicinal Chemistry**. 1 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2008.

GHOSH, A.; KANTHASAMY, A.; JOSEPH, J.; ANANTHARAM, V.; SRIVASTAVA, P.; DRANKA, B. P.; KALYANARAMAN, B.; KANTHASAMY, A. G. Anti-inflammatory and neuroprotective effects of an orally active apocynin derivative in pre-clinical models of Parkinson's disease. **J. Neuroinflam.**, Ames, v. 9, n. 241, 2012.

GOMES, R. A. P. L. **Protocolo**: utilização de *Drosophila* em Genética: 1ª parte. Lisboa, v.1, 2001.

GONÇALVES, L. H. T.; ALVAREZ, A. M.; ARRUDA, M. C. Pacientes portadores da Doença de Parkinson: significado de suas vivências. **Acta Paulista de Enfermagem**, São Paulo, v. 20, n. 1, p. 62-8, jan./mar. 2007.

GUIDO, R. V.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estudos Avançados**, São Paulo, v. 24, n. 70, p. 81-98, 2010.

HASSAN, S. Y. Synthesis and biological activity of some new pyrazoline and pyrimidine derivatives. **J. Bra. Chem. Soc.**, São Paulo, v. 22, n. 7, p. 1286-1298, 2011.

HANSCH, C.; FUJITA, T.  $p$ - $\sigma$ - $\pi$  Analysis. A method for the correlation of biological activity and chemical structure. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 86, n.8, p. 1616-1626, 1964.

HEUMÜLLER, S.; WIND, S.; BARBOSA-SICARD, E.; SCHMIDT, H. H. H. W.; BUSSE, R.; SCHRÖDER, K.; BRANDES, R. P. Apocynin Is Not an Inhibitor of Vascular NADPH Oxidases but an Antioxidant. **Hypertension**, Frankfurt am Main, v. 51, n. 2, p. 211-217, 2008.

HIRTH, F. *Drosophila melanogaster* in the study of human neurodegeneration. **CNS Neurol. Disord. Drug Targets**, London, v. 9, n. 4, p. 504–523, 2010.

IBMC, INEB. **Estaleiro da ciência**: guia prático. Porto: Universidade do Porto, IBMC, INEB, 2008.

JAHROMI, S. R.; HADDADI, M.; SHIVANANDAPPA, T.; RAMESH, S. R. Neuroprotective effect of *Decalepis hamiltonii* in paraquat-induced neurotoxicity in *Drosophila melanogaster*: biochemical and behavioral evidences. **Neurochem. Res.**, v. 38, n. 12, p. 2616–2624, 2013.

JIANG, J.; KANG, H.; SONG, X.; HUANG, S.; LI, S.; XU, J. A Model of Interaction between Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (NADPH) Oxidase and Apocynin Analogues by Docking Method. **Int. J. Mol. Sci.**, v.14, n. 1, p. 807-817, 2013.

KANEGAE, M. P., CONDINO-NETO, A., PREDROZA, L. A., ALMEIDA, A. C., REHDER, J., FONSECA, L. M., XIMENES, V. F. Diapocynin versus apocynin as pretranscriptional inhibitors of NADPH oxidase and cytokine production by peripheral blood mononuclear cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Araraquara, v. 393, n. 3, p. 551-554, 2010.

KONIECZNY, M. T., KONIESCZNY, W., SABISZ, N., SKLADANOWSKI, A., WAKIEC, R., AUGUSTYNOWICZ-KOPEC, E., ZWOLSKA, Z. Acid-catalyzed synthesis of oxathiolone fused chalcones. Comparison of their activity toward various microorganisms and human cancer cells line. **Eur. J. Med. Chem.**, Gdańsk, v. 42, n. 5, p. 729-733, 2007.

LIMA, L. M. Química Medicinal Moderna: desafios e contribuição brasileira. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 30, n. 6, p. 1456-1468, nov./dez. 2007.

LIPINSKI, C. A. Lead and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 1, n. 4, p. 337-341, 2004.

LODOVICI, P. **A musicoterapia como coadjuvante à doença de Parkinson**. São Paulo, 2006.

LUCHTEFELD, R; LUO, R.; STINE, K.; MIKAELA, A. L.; CHERNOVITZ, P. A.; SMITH, R. E. Dose formulation and analysis of diapocynin. **J. Agric. Food Chem.**, Lenexa, v. 56, n. 2, p. 301-306, 2008.

MACHADO, C. L. S. **Estudo da apocinina e diapocinina e seus derivados de chalconas como antioxidante e antibacterianos potenciais: síntese, avaliação da ação antibacteriana, antioxidante e das propriedades físico-químicas**. Uruguaiana, 2016.

MARCHIANI, A.; MAMMI, S.; SILIGARDI, G.; HUSSAIN, R.; TESSARI, I.; BUBACCO, L.; DELOGU, G.; FABBRI, D.; DETTORI, M. A.; SANNA, D.; DEDOLA, S.; SERRA, P. A.; RUZZA, P. Small molecules interacting with  $\alpha$ -synuclein: antiaggregating and cytoprotective properties. **Amino Acids.**, Padua, v. 45, n. 2, p. 327–338, 2013.

MARIÑO, Patrícia. **Estudo de chalconas como antibacterianos potenciais: síntese, avaliação da ação antibacteriana e das propriedades físico-químicas.** Uruguaiana, 2014.

MENESES, M. S.; TEIVE, H. G. **Doença de Parkinson.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

MENG, C. Q., NI, L., WORSENCLORFT, K. J., YE, Z., WEINGARTEN, D., SIMPSON, J. E., SKUDLAREK, J. W., MARINO, E. M., SUEN, K. L., KUNSCH, C., SOUDER, A., HOWARD, R. B., SUNDELL, C. C., WASSERMAN, M. A., SIKORSKI, J. A. Carboxylated, heteroaryl-substituted chalcones as inhibitors of vascular cell adhesion molecule-1 expression for use in chronic inflammatory diseases. **J. Med. Chem.**, Alpharetta, v. 50, n. 6, p. 1304-1315, 2007.

MIRANDA, A. L. P.; FRAGA, C. A. M. Atividade seqüestradora de radical livre determinação do potencial antioxidante de substâncias bioativas. **Practical Studies for Medicinal Chemistry**, Genebra: IUPAC, 2006.

MONTEIRO, I. J. S. **Doença de parkinson: as suas bases bioquímicas.** Portugal, 2007.

MORALES, M. M.. Métodos alternativos à utilização de animais em pesquisa científica: mito ou realidade? **Experimentação Animal/Artigos**, São Paulo, v. 60, n. 2, p. 33-36, 2008.

MORA-PALE, M.; WEÏWER, M.; Yu, J.; LINHARDT, R. J.; DORDICK, J. S. Inhibition of human vascular NADPH oxidase by apocynin derived oligophenols. **Bioorg. Med. Chem.**, Troy, v. 17, n. 14, p. 5146–5152, 2009.

MORRIS, M. Movement disorders in people with Parkinson's Disease: A model for physical therapy. **Physical Therapy**, Bundoora, v. 80, n. 6 p. 578-597, 2000.

MORRIS, G. M. *et al.* AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. **Journal Computational Chemistry**. La Jolla, v. 30, n. 16. P. 2785-2791, 2009.

NAKABAYASHI, T. I. K *et al.* Prevalência de depressão na Doença de Parkinson. **Revista de Psiquiatria Clínica**, São Paulo, v. 35, n. 6, p. 219-27, 2008.

NATIONAL PARKINSON FOUNDATION. **Parkinson's disease.** Disponível em: <[http:// www.parkinson.org](http://www.parkinson.org)>. Acesso em 17 de maio de 2016.

NICHOLS, C. D. *Drosophila melanogaster* neurobiology, neuropharmacology, and how the fly can inform central nervous system drug discovery. **Pharmacol.Ther.**, New Orleans, v. 112, n. 3, p. 677-700, 2006.

NIELSEN, S. F., BOESEN, T., LARSEN, M., SCHONNING, K., KROMANN, H. Antibacterial chalcones-bioisosteric replacement of the 4'-hydroxy group. **Bioorg. Med. Chem.**, Oxford, v. 12, n. 11, p. 3047-3054, 2004.

NIELSEN, S. F., LARSEN, M., BOESEN, T., SCHONNING, K., KROMANN, H. Cationic chalcone antibiotics. Design, synthesis, and mechanism of Action. **J. Med. Chem.**, Columbus, v. 48, n. 7, p. 2667-2677, 2005.

NISHIMURA, R. T.; GIAMMANCO, C. H.; DAVID, A. Vosburg. Green, Enzymatic Syntheses of Divanillin and Diapocynin for the Organic, Biochemistry, or Advanced General Chemistry Laboratory. **Journal of Chemical Education**, Claremont, v. 87, n. 5, p. 526-527, 2010.

NOBRE-JUNIOR, H. V.; OLIVEIRA, R. A.; MAIA, F. D.; NOGUEIRA, M. A.; DE MORAES, M. O.; BANDEIRA, M. A.; ANDRADE, G. M.; VIANA, G. S. Neuroprotective effects of chalcones from *Myracrodruon urundeuva* on 6-hydroxydopamine-induced cytotoxicity in rat mesencephalic cells. **Neurochem Res.**, Fortaleza, v, 34, n. 6, p. 1066- 75, 2009.

OBERMAYER-PIETSCH, B.; CAVALCA, V.; ELIGINI, S.; BRAMBILLA, M.; CAIANI, A.; TREMOLI, E.; COLLI, S. Apocynin prevents cyclooxygenase 2 expression in human monocytes through NADPH oxidase and glutathione redox-dependent mechanisms. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 37, n. 2, p. 156–165, 2004.

ORTH, M.; TABRIZI, S. J. Models of Parkinson's disease. **Mov. Disord.**, London, v. 18, n. 7, p. 729–737, 2003.

O'SULLIVAN, S. B.; SCHMITZ, T. J. **Fisioterapia: avaliação e tratamento**. 2 ed. São Paulo: Manole, 1993.

PARK, J. H.; JUNG, J. W.; AHN, Y. J.; KWON, H. W. Neuroprotective properties of phytochemicals against paraquat-induced oxidative stress and neurotoxicity in *Drosophila melanogaster*. **Pesticide Bioch. Physiol.**, v. 104, n. 2, p. 118–125, 2012.

PATIL, C. B., MAHAJAN, S. K., KATTI, S. A. Chalcone: A Versatile Molecule. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 1, n. 3, p. 11-22, 2009.

PEREIRA, M. C. L.; SUZUKI, D. E.; JANJOPPI, L.; OKAMOTO, O. K. Estratégias para neuro-restauração em modelos experimentais de doença de Parkinson. **Einstein**, São Paulo, v. 5, n. 4, p. 387-391, 2007.

PERFEITO, R.; REGO, A. C. Papel da alfa-sinucleína e da disfunção mitocondrial associada à doença de Parkinson. **Rev Neurocienc.**, Coimbra, v. 20, n. 2, p. 273-284, 2012.

SAITO, C. T. **A doença de Parkinson e seus tratamento: uma revisão de literatura**. Londrina, 2011.

SANFELICE, E. A. Moléstia de Parkinson. **Fisioterapia em movimento**. Curitiba, v.17, n.1, p. 11-24, jan./mar. 2004.

SANTOS, V. V. *et al.* Fisioterapia na Doença de Parkinson: uma breve revisão. **Revista Brasileira de Neurologia**, Niterói, v. 46, n. 2, p. 17-25, 2010.

SHIMOKORIYAMA, M. **Flavanon, chalcones and aurones**. Geissman, TA. New York: Mac Millan Company, p. 286-313, 1962.

SILVA, S. C. **Mal de Parkinson**. Brasília, 2003.

SIVAKUMAR, P. M., PRABHAKAR, P. K., DOBLE, M. Synthesis, antioxidant evaluation and QSAR studies of chalcones. **Med. Chem. Res.** v. 20, p. 482–492, 2011.

SNUSTAD, D. P.; SIMMONS, M. J. **Cellular reproduction and model genetic organisms, in: Principles of genetics**. 4. ed. [S.l.]: Wiley, 2006.

SOARES, J. J., RODRIGUES, D. T., GONÇALVES, M. B.; LEMOS, M. C.; GALLARRETA, M. S.; BIANCHINI, M. C.; GAYE, M. C.; PUNTEL, R. L.; ROEHRS, R.; DENARDIN, E. L. G. Paraquat exposure-induced Parkinson's disease-like symptoms and oxidative stress in *Drosophila melanogaster*. Neuroprotective effect of *Bougainvillea glabra* Choisy. **Elsevier**, Uruguaiana, v. 95, p. 245-251, 2007

SOUZA, C. F. M.; ALMEIDA, H. C. P.; SOUSA, J. B.; COSTA, P. H.; SILVEIRA, Y. S. S.; BEZERRA, J. C. L. A Doença de Parkinson e o Processo de Envelhecimento Motor: Uma Revisão de Literatura. **Rev Neurocienc.**, v. 19, n. 4, p. 718-723, 2011.

SOUZA, A. R.; MORGON, N. H. Interação entre o Dímero de Apocinina e Ciclodextrina. **Rev. Virtual Quim.**, Campinas, v. 8, n. 2, p. 417-424, 2016.

STOKES, M. **Neurologia para fisioterapeutas**. São Paulo: Ed. Premier, 2000.

TAVARES, L.C. QSAR: A abordagem de Hansch. **Quim. Nova**, v. 27, n. 4, p. 631-639, 2004.

TEXEIRA, J. A. L.; CARDOSO, F. Tratamento inicial da Doença de Parkinson. **Neurociências**, Belo Horizonte, v.12, n.3, p. 141-6, 2004.

TRUMBULL, K. A.; MCALLISTER, D.; GANDELMAN, M. M.; FUNG, W. Y.; LEW, T.; BRENNAN, L.; LOPEZ, N.; MORRÉ, J.; KALYANARAMAN, B.; BECKMAN, J. S. Diapocynin and apocynin administration fails to significantly extend survival in G93A SOD1 ALS mice. **Neurobiol Dis.**, Corvallis, v. 45, n. 1, p. 137–144, 2012.

ULMER, T. S.; BAX, A.; COLE, N. B.; NUSSBAUM, R. L. Structure and dynamics of micelle-bound human alpha-synuclein. **J. Biol. Chem.**, v. 280, p. 9595-9603, 2005.

VEBER, D. F.; JOHNSON, S. R.; CHENG, H. Y.; SMITH, B. R.; WARD, K. W.; KOPPLE, K. D. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. **J.Med.Chem.**, v. 45, n. 12, p. 2615-2623, 2002.

YANG, J. M.; CHEN, C. C. Gemdock: a generic evolutionary method for molecular docking. **Proteins**, Hsinchu, v. 44, n. 2, p. 288-304, 2004.

ZHAO, M.; CASCIO, D.; SAWAYA, M. R.; EISENBERG, D. Structures of segments of alpha-synuclein fused to maltose-binding protein suggest intermediate states during amyloid formation. **Protein Sci.**, Los Angeles, v. 20, n. 6, p. 996-1004, 2011.

