

9

Considerações Finais

Neste trabalho, foram estudados dois ligantes hidrazônicos derivados do agente anti-tuberculose isoniazida (INH) que poderiam atuar como MPACs no processo terapêutico da doença de Alzheimer, além de quatro complexos metálicos formados por eles, dois envolvendo o íon Cu(II) e outros dois o íon Zn(II), que são íons de grande interesse para a doença.

Um dos ligantes (**H₂L1**) apresenta sua estrutura relacionada à do clioquinol, o primeiro MPAC a ser testado para essa finalidade terapêutica. Já o outro (**HL2**) tem sua estrutura baseada no hormônio melatonina, secretado pela glândula pineal, e que apresenta características estruturais, particularmente as antioxidantes, que poderiam ser importantes no contexto da doença.

Para ambos os ligantes foi realizado o estudo cristalográfico. Cada um apresentou a configuração (*E*) em relação à ligação hidrazônica além de interações π-π stacking, que interconectavam as cadeias de moléculas. Apenas o ligante **H₂L1** apresentou ligações de hidrogênio intramoleculares. Para o ligante **HL2**, foi atribuído que a mudança conformacional em relação à ligação N2-C1 possibilitou uma maior acomodação à rede de ligações de hidrogênio intermoleculares, fato que deve ter implicado no maior empacotamento apresentado por ele em relação à **H₂L1**. Por outro lado, estudos de RMN indicam que essas configurações do tipo (*E*) são mantidas em solução.

Diferentemente dos ligantes, não foram obtidos monocristais para nenhum dos complexos formados. A baixa solubilidade destes em solventes comuns dificultou demasiadamente as tentativas de recristalizações, apesar do uso de diversas misturas solventes. Contudo, a partir de algumas análises e dados da literatura referentes a compostos relacionados, estruturas puderam ser propostas. Para os complexos de **H₂L1**, foram propostas estruturas onde o ligante se comportava como tridentado, coordenando-se através dos átomos de nitrogênio quinolínico e da azometina, bem como pelo oxigênio carbonílico. Foi sugerido também que o ligante se coordenou na forma cetônica para o complexo de Zn(II) e na forma enólica para o de Cu(II). A análise de RPE para o complexo

de cobre(II) apontou um ambiente de coordenação quadrático-plano para o íon. Neste ligante, o oxigênio fenólico não estaria envolvido na coordenação.

Já para os complexos de **HL2**, foram propostas estruturas onde o ligante se comportava como bidentado, coordenando-se através dos átomos de oxigênio carbonílico e nitrogênio da azometina. Diferente do comportamento dos complexos de **H₂L1**, foi o complexo de Zn(II) que se coordenou na forma enólica, mantendo-se o de Cu(II) na forma cetônica. Além do mais, a análise de RPE para o complexo de cobre(II) apontou um ambiente tetraedricamente distorcido para a espécie central.

Quanto às titulações potenciométricas, **H₂L1** mostrou dois prótons ácidos, um relacionado ao hidrogênio fenólico e outro ao nitrogênio hidrazônico, sendo o primeiro mais ácido, sustentando a observação do espectro de RMN de ¹H para esse ligante, que mostra o próton da hidroxila como o mais desblindado. Já **HL2** apresentou apenas um próton ácido, pertencente ao nitrogênio hidrazônico.

Foram realizadas, também, titulações potenciométricas para os sistemas Cu(II):**H₂L1** e Zn(II):**H₂L1**. A partir das propostas estruturais para os complexos no estado sólido foram sugeridas estruturas razoáveis para cada uma das espécies mostradas nos modelos de equilíbrio propostos. Para os sistemas com zinco(II), a espécie ML é predominante em pH fisiológico. Já para aquele com cobre(II), a espécie predominante, na mesma condição, é MLOH. Além disso, a comparação entre as constantes de estabilidade condicionais para as espécies correspondentes em ambos os sistemas mostrou que os complexos de Cu(II) são mais estáveis, conforme previsto pela série de Irving-Williams.

Quanto às titulações para os sistemas Cu(II):**HL2** e Zn(II):**HL2**, não se obteve o mesmo sucesso que as anteriores. A hidrólise é muito intensa, mesmo em condições mais ácidas, fato que dificultou a realização das titulações e, mesmo com os resultados colhidos, não foi possível a proposição de um modelo de equilíbrio razoável para nenhum dos sistemas.

Isso implicou que investigações biológicas, *in vitro* ou *in vivo*, fossem executadas apenas para o ligante **H₂L1**, o mais solúvel. No entanto, uma análise farmacológica *in silico* foi passível a ser realizada para ambos os ligantes.

A análise *in silico* mostrou que tanto **H₂L1** como **HL2** são atóxicos e capazes de atravessar a barreira hematoencefálica. Além disso, verificou-se que, teoricamente, os compostos apresentam cerca de 70% de chances de virem a ser fármacos comerciais, o que é um resultado bastante satisfatório.

Para as investigações *in vitro*, experimentos de RMN uni- (^1H) e bidimensionais (^1H - ^{15}N HSQC) envolvendo Cu(II)-A β e Zn(II)-A β na presença de **H₂L1** mostraram que o ligante inibe a interação de A β com os biometais por um mecanismo que deve envolver o sequestro deles. Por sua vez, os testes *in vivo* realizados com ratos Wistar machos injetados com 200 mg kg⁻¹ de **H₂L1** mostraram que os mamíferos permaneceram com seus comportamentos normais, dentro das 72 h que foram avaliados. Além disso, a análise do conjunto dos parâmetros bioquímicos e análise de metais realizadas levou à conclusão de que o composto é, de fato, atóxico, conforme previsto pela análise *in silico*. Além disso, os níveis de metalotioneínas cerebrais não se apresentaram muito diferentes daqueles observados para ratos do grupo controle, fato que ratifica que este ligante, de fato, atua como um MPAC.

Finalmente, é importante destacar que a síntese de **H₂L1** envolve uma única etapa, apresentando alto rendimento e elevada eficiência atômica. O processo de produção desta substância, assim como seu uso no tratamento de desordens neurodegenerativas e possíveis formulações farmacêuticas foram protegidas pela PUC-Rio através do depósito de um pedido de patente nacional (BR 10 2013 033006 0) devido ao seu bom desempenho em testes farmacológicos, tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

10

Perspectivas e Etapas Futuras do Trabalho

Mais dois ligantes, agora contendo um anel furânico, e cujas estruturas são apresentadas nas Figuras 91 e 92, foram sintetizados ao longo desse trabalho. Eles foram caracterizados por espectroscopias vibracional e de RMN de ^1H . Além disso, monocristais de cada um deles foram obtidos e encaminhados à difração de raios-X, mas as determinações estruturais não ficaram prontas a tempo de serem incluídas neste trabalho.

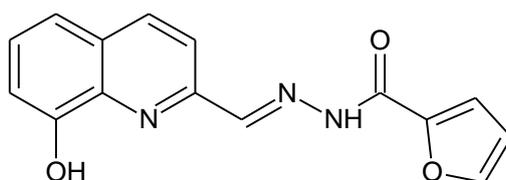


Figura 91: Estrutura do ligante **H₂L3**

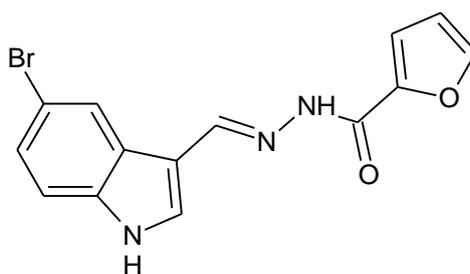


Figura 92: Estrutura do ligante **HL4**

Assim, para esses ligantes há um grande quantidade de estudos a serem ainda realizados, que incluem difração de raios X, síntese e caracterização dos complexos, estudos de equilíbrio, análise *in silico* e testes biológicos.

Além disso, há a necessidade de conclusão dos estudos dos sistemas **H₂L1-metal**, em solução, através de ESI-MS, que possibilitaria identificar as espécies propostas nos equilíbrios químicos para os sistemas estudados neste trabalho.

Há ainda a necessidade de avançar com os testes biológicos envolvendo **H₂L1**, utilizando agora modelos animais da doença de Alzheimer, e não mais cobaias saudáveis.

Além de estudos relacionados à DA, este composto poderia também atuar no tratamento da doença de Parkinson. Essa é mais uma doença neurodegenerativa, que causa uma severa desordem motora devido a mudanças no sistema nervoso central. No contexto da doença de Parkinson, a proteína alfa-Sinucleína (AS) se encontra agregada e esse processo de agregação parece estar associado a interações com biometais, como cobre e ferro.¹⁷ A influência do composto **H₂L1** quanto à redução da interação entre a AS e os metais destacados deve ser pesquisada através de interações que envolvam a AS, em solução, por RMN. Além disso, estudos utilizando leveduras transgênicas expressando uma quimera AS-gfp (green fluorescent protein) podem nos dar uma noção sobre se o composto é capaz de alterar a agregação da AS dentro das células. Isto também pode ser feito com neurônios humanos.