

SÍNTSESE E POTENCIAL APLICAÇÃO DE UMA BASE DE SCHIFF DERIVADA DE 2,4-DINITROFENILHIDRAZINA COMO AGENTE TERAPÊUTICO PARA A DOENÇA DE ALZHEIMER

Solange de O. Pinheiro¹; Vinicios da S. Simoes¹; Jordana L. Braga¹; Sara I. C. Gomes Barbosa¹; Lucas S. Frota¹; Luzia, D. S. Marques¹, Selene M. de Moraes¹; Francisco E. A. Magalhães¹; Wildson M. B. da Silva²

¹Universidade Estadual do Ceará (UECE)

²Universidade Vale do Acaraú (UVA)

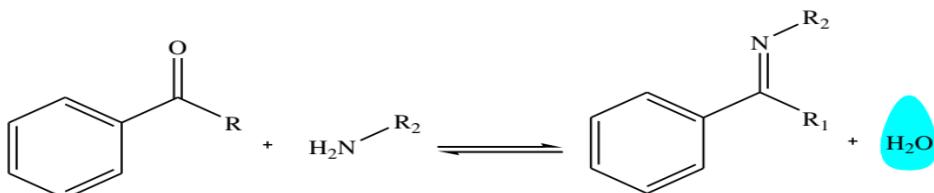
E-mail do autor principal: solange.pinheiro@uece.br

Palavras-Chave: Antioxidante, Acetilcolinesterase, Imina.

Introdução

As bases de Schiff são espécies importantes de compostos orgânicos. Seu primeiro histórico de sintetização ocorreu em 1864 por um químico alemão, Hugo Schiff, ganhador do Prêmio Nobel. Esses compostos são produzidos a partir da condensação de aminas primárias ou compostos de hidrazina com compostos carbonílicos, como aldeídos ou cetonas. De forma estrutural, as bases de Schiff, também conhecidas como azometinas ou compostos imina, além da classe hidrazone, é um análogo do aldeído ou cetona em no qual o grupo carbonila (COOH) será substituído por um grupo imina (-CH = N- ou C = N -) (MAHMOOD *et al.*, 2017). Nos últimos anos, as bases de Schiff apresentaram um vasto conjunto de atividades biológicas, incluindo propriedades antibacterianas, antifúngicas, antivirais, anticancerígenas, antimoniais, antiprotiferantes, anti-inflamatórias, antipiréticas e biocidas (MEENA *et al.*, 2023). O grupo azometina e hidrazone (-CH=N-NH- ou C=N-NH-) em bases de Schiff demonstraram ser decisivos para suas atividades biológicas. As bases de Schiff são um conjunto de intermediários orgânicos que são utilizados também na síntese e análise química. Eles são utilizado na produção da indústria de medicamentos e agroquímicos. A Figura 01 apresenta a reação de formação de uma base de Schiff.

Figura 01. Exemplo da formação da base de Schiff.



Fonte: Ragaini; Cenini, 1999.

A 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) é um reagente clássico utilizado para a detecção de aldeídos e cetonas. Ela reage com esses compostos para formar hidrazonas, que são facilmente identificáveis devido às suas cores intensas (SOUZA *et al.*, 2020). O 4-dimetilaminobenzaldeído (DMAB) é um composto aromático utilizado em várias reações de condensação. Ele é conhecido por formar bases de Schiff estáveis e coloridas, que são úteis em

análises qualitativas e quantitativas (SOUZA *et al.*, 2020). No caso da DNPH e do DMAB, a reação é facilitada pela presença de grupos funcionais que estabilizam a imina formada (SOUZA *et al.*, 2020).

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa progressiva e seus sintomas incluem demência, declínio da memória, delírios e alucinações, quando em estado mais avançado, pacientes com DA podem perder a capacidade de se comunicar verbalmente, tornar-se dependentes de outros e apresentar dificuldade na realização de tarefas diárias básicas (BORDOLOI *et al.*, 2024; KAUR *et al.*, 2022). Com isso, estudos realizados anteriormente demonstraram que os níveis de acetilcolina são muito baixos nos estágios finais da DA (TURAN *et al.*, 2021), ou seja, a diminuição do neurotransmissor acetilcolina (ACh) está intimamente relacionada ao prognóstico da doença de Alzheimer (ZAFAR *et al.*, 2021).

Deste modo, a redução na liberação de acetilcolina na sinapse é responsável pelo declínio da função cognitiva. A acetilcolinesterase (AchE) é uma enzima importante na família da colinesterase que desempenha um papel significativo no funcionamento adequado do sistema nervoso humano (SEMBIRING; NURSANTI; RAHMANIA, 2023).

Assim, vem sendo desenvolvido estudos voltados para compostos com potencial inibidor da enzima acetilcolinesterase, com propriedade de impossibilitar a realização da hidrólise do neurotransmissor cerebral nas sinapses colinérgicas centrais e periféricas, consequentemente aumentando os teores de ACh atuantes no cérebro impulsionando as sinapses colinérgicas em portadores da doença de Alzheimer (SILVA *et al.*, 2020).

O objetivo deste trabalho é apresentar um novo composto, uma base de Schiff, a partir de uma reação entre o DNPH e DMAB, com potencial ação biológica na terapia da Doença de Alzheimer (DA).

Material e Métodos

A Síntese da base de Schiff foi preparada seguindo a metodologia de Mahmood *et al.* (2016) com modificações que se segue: foram misturadas quantidades equimolares de 2,4-dinitrofenilhidrazina (100 mg) e 4-dimetilaminobenzaldeído (75,29 mg), ambos dissolvidos em 30 ml de solvente metanol e depois adicionadas 3 gotas de HCl concentrado (36%). A mistura reacional foi aquecida sob refluxo durante 8 horas, após arefecimento o produto castanho preto foi separado em solução, depois filtrado e posteriormente levado ao dessecador para secagem e armazenamento.

Para a caracterização da base de Schiff e seus precursores, utilizou-se o método de espectroscopia eletrônica na região do ultravioleta e visível (UV-Vis). Foi utilizado o espectrofotômetro Shimadzu UV-1800, que é uma ferramenta comum para análises espectrofotométricas na faixa do ultravioleta e visível (UV-Vis). Os compostos em estudo, a base de Schiff e seus precursores foram analisados em solução de 1×10^{-3} mol/L. Varredura feita no espectro de comprimento de onda 200 a 800 nm, utilizando uma cubeta de quartzo para realização do experimento. Para a caracterização na região do Infravermelho (IV) os espectros foram obtidos utilizando um espectrofotômetro Nicolet iS5 da Thermo Scientific onde as amostras em estudo foram preparadas em pastilhas de KBr, na proporção 1:20 (m/m) (amostra: KBr) para se obter a leitura do percentual de transmitância das amostras, os espectros foram registrados na faixa de 4000 a 400 cm^{-1} , usando 32 varreduras e 4 cm^{-1} .

Nos estudos das atividades *in vitro*, a atividade antioxidante foi avaliada utilizando os métodos DPPH e ABTS, conforme descrito por Becker *et al.* (2019) e Re *et al.* (1999), com modificações. As análises foram realizadas em microplaca de 96 poços, utilizando um leitor Elisa BioTek modelo ELX 800. As amostras e padrões foram diluídos a partir de uma solução mãe de 2,0 mg/mL em concentrações que variaram de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 3,12 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A absorbância foi medida a 515 nm para DPPH[·] após 60 minutos e a 630 nm para ABTS⁺ após 10 minutos. Os antioxidantes queracetina e ácido gálico foram utilizados como padrões de comparação.

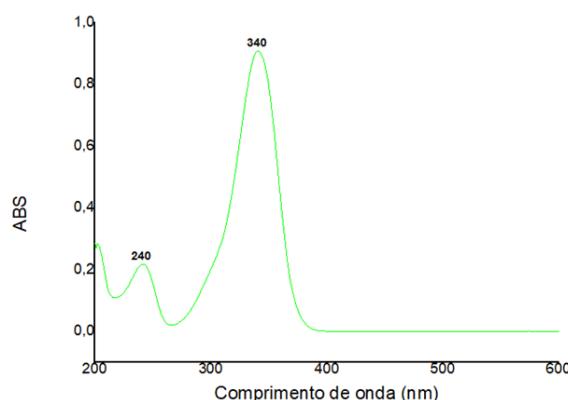
A atividade inibitória da acetilcolinesterase (AChE) foi avaliada em placas de 96 poços utilizando o leitor Elisa BIOTEK ELX 800 e o software “Gen5 V2.04.11”, seguindo o método de Ellman *et al.* (1961). Em cada poço, foram adicionados: 25 µL de iodeto de acetiltiocolina (15 mM), 125 µL de 5,5' ditiobis-[2-nitrobenzóico] (DTNB) em solução Tris/HCl (50 mM, pH=8) com NaCl e MgCl₂, 50 µL de solução Tris/HCl (50 mM, pH=8) com 0,1% de albumina sérica bovina (BSA), e 25 µL da amostra de extrato diluída (0,2 mg/mL). A absorbância foi medida a 405 nm durante 30 segundos. Após, 25 µL de AChE (0,25 µM/mL) foram adicionados e a absorbância foi monitorada a cada minuto por 25 minutos. As amostras e padrões positivos (galantamina e fisostigmina) foram diluídos a partir de uma solução mãe de 2,0 mg/mL em concentrações de 100 a 3,12 µg/mL.

Resultados e Discussão

As bandas de absorção observadas no espectro eletrônico na região do UV-Vis da base de Schiff, Figura 02, em 240 nm e 340 nm são atribuídas à transições $\pi \rightarrow \pi^*$ (anel aromático e imina) e transições $n \rightarrow \pi^*$ (grupo carbonila e ligações N-H), respectivamente.

A Tabela 01 apresenta as bandas observadas nos espectros eletrônicos na região do UV-Vis dos compostos precursores e da base de Schiff.

Figura 02. Espectro eletrônico na região do ultravioleta e visível da base de Schiff em dimetilsulfóxido (DMSO).



Fonte: Próprios autores.

Tabela 01. Valores das bandas e atribuições observadas no espectro eletrônico na região do UV-Vis.

Composto	Banda (nm)	Atribuição
2,4-Dinitrofenilhidrazina	218, 260	Transições $\pi \rightarrow \pi^*$ (anel aromático e nitro)
	349	Transições $n \rightarrow \pi^*$ (nitro e ligações N-H)
4-Dimetilaminobenzaldeído	242	Transições $\pi \rightarrow \pi^*$ (anel aromático)
	340	Transições $n \rightarrow \pi^*$ (grupo aldeído e amina)
Base de Schiff	240	Transições $\pi \rightarrow \pi^*$ (anel aromático e imina)
	340	Transições $n \rightarrow \pi^*$ (grupo carbonila e ligações N-H)

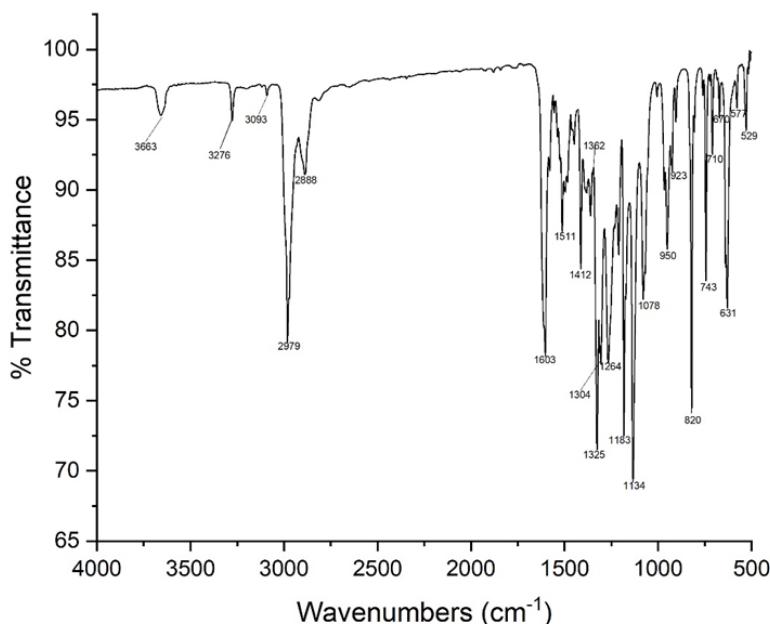
O espectro vibracional na região do infravermelho (IV) da base de Schiff derivada do

2,4-dinitrofenilhidrazina encontra-se na Figura 03.

A Tabela 02 apresenta as principais bandas observadas no espectro de IV da base de Schiff.

Conforme a análise do espectro de IV da base de Schiff, houve a formação do grupamento imina (-C=N-), característico da base de Schiff, sugerindo a estrutura do composto conforme Figura 04.

Figura 03. Espectro vibracional na região do infravermelho da base de Schiff.

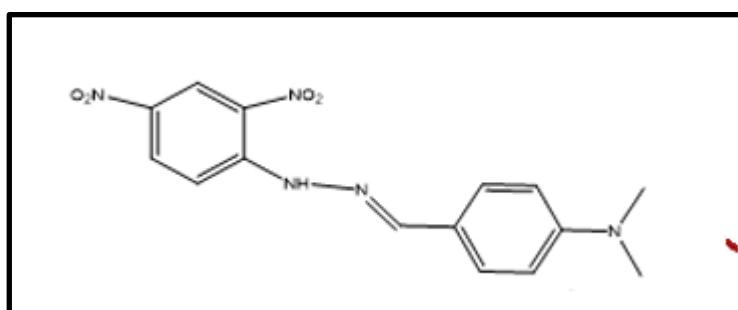


Fonte: Próprios autores.

Tabela 02. Valores das bandas e atribuições observadas no espectro de IV para a base de Schiff.

Banda (cm ⁻¹)	Atribuição
1603	Estiramento C=N (ligação imina)
1511	Estiramento C=C (anéis aromáticos)
1264	Estiramento C-N (ligações de amina)
3276	Estiramento N-H (ligações aminas)
2888 e 2979	Estiramento C-H (alifáticos e aromáticos)

Figura 04. Estrutura da base de Schiff.



Fonte: Próprios autores.

Nos ensaios antioxidantes, a base de Schiff derivada dos derivada de 2,4-dinitrofenilhidrazina demonstrou concentração inibitória (CI_{50}), de $9,78 \pm 0,23 \mu\text{g.mL}^{-1}$ no teste de inibição do radical DPPH. Utilizando o método ABTS, o valor de CI_{50} foi de $10,56 \pm 0,66$, Tabela 03. Estes resultados indicam que a base de Schiff em estudo apresentam elevada atividade antioxidante. Para os testes de inibição da enzima acetilcolinesterase, a base de Schiff reagiu inibindo a enzima acetilcolinesterase, Tabela 03, sendo, portanto, um grande promissor em estudos envolvendo o tratamento da Doença de Alzheimer (DA).

Tabela 03. Avaliação da atividade antioxidante e antiacetilcolinesterase e dos precursores da base de Schiff.

Amostras	CI_{50} DPPH [•] ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	CI_{50} ABTS ^{•+} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	CI_{50} AChE ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
Quercetina (Padrão)	$2,74 \pm 0,08$	$3,98 \pm 0,13$	
Ácido gálico (Padrão)	$1,94 \pm 0,27$	$13,01 \pm 0,03$	
Galantamina (Padrão)	-	-	$5,82 \pm 0,02$
Fisostigmina (Padrão)	-	-	$2,15 \pm 0,05$
4-dimetilaminobenzaldeído	$21,02 \pm 0,52$	$31,15 \pm 0,54$	$25,17 \pm 0,77$
2,4-dinitrofenilhidrazina	$12,58 \pm 0,29$	$23,04 \pm 0,48$	$10,28 \pm 0,39$
Base de Schiff	$9,78 \pm 0,23$	$10,56 \pm 0,66$	$9,27 \pm 0,56$

CI_{50} - concentração inibitória média.

Observa-se de acordo com a Tabela 03 que houve uma potencialização nas atividades tanto oxidantes como anticolinesterásica após a formação da base de Schiff em comparação aos seus precursores, isso se deve em parte ao grupo imina que demonstra ser decisivos para atividades biológicas.

A atividade anticolinesterásica se refere à capacidade de uma substância inibir a enzima acetilcolinesterase (AChE), que degradam o neurotransmissor acetilcolina. A inibição dessas enzimas aumenta os níveis de acetilcolina nas sinapses, o que melhora a função cognitiva em pacientes com déficits de memória. A atividade antioxidante é a capacidade de uma substância neutralizar radicais livres e outras espécies reativas de oxigênio (ROS), que causam estresse oxidativo e danos celulares, incluindo em neurônios. Essas duas atividades se conectam de várias maneiras: Sinergia na neuroproteção, o estresse oxidativo contribui significativamente para a degeneração dos neurônios colinérgicos, que são os mesmos neurônios afetados na doença de Alzheimer, substâncias com dupla atividade (antioxidante e anticolinesterásica) podem oferecer proteção tanto funcional quanto estrutural aos neurônios; Funcional, por manter os níveis de acetilcolina e; Estrutural, por reduzir o dano oxidativo. Alvos terapêuticos complementares, a abordagem multialvo (*multi-target*) é uma estratégia comum no desenvolvimento de fármacos para doenças neurodegenerativas, compostos com ambas as atividades têm maior potencial terapêutico porque combatem duas causas principais do declínio cognitivo: a perda de neurotransmissão colinérgica e o estresse oxidativo (OLIVEIRA *et al.* 2018).

Conclusões

As bases de Schiff aromáticas tem chamado atenção considerável em relação a formação de fármacos, compostos de atividade biológica, além de inúmeras outras aplicações

importantes. Este interesse decorre das propriedades físicas e químicas destes compostos. Os resultados do estudo relatado neste trabalho indicam a preparação de uma nova base de Schiff aromática, sua estrutura foi identificada por meio da espectroscopia de UV-VIS e IV e avaliados frente ao teste inibidor da enzima acetilcolinesterase e antioxidante, dos quais os resultados se mostraram satisfatórios, sendo promissor composto a ser utilizado no tratamento da Doença de Alzheimer (DA).

Agradecimentos

Agradecemos à UECE e aos órgãos de fomento CNPq e FUNCAP.

Referências

- MAHMOOD, A. T. & KHUDHAIR, N. A. Synthesis and Spectral Characterization of Some New Aromatic Schiff Bases Derivated from 2,4 Dinitrophenylhydrazine. **Ibn AL-Haitham Journal for Pure and Applied Sciences**, 29(2), 200–216, 2017.
- MEENA, R.; MEENA, P.; KUMARI, A.; SHARMA, N. AND FAHMI, N. Schiff Bases and their metal complexes: Synthesis, structural characteristics and applications. Em: AKITSU, T. (Ed.). **Schiff Base in Organic, Inorganic and Physical Chemistry**. Londres, England: IntechOpen, 2023.
- SOUZA, D.C.M.; SOUSA, V.C.S; CRUZ, L.P.L.; CARNEIRO, S.M.P.; ALVES, M.M.M.; CARVALHO, F.A.A.; COSTA, M.P.; CORRÊA, C.M.; GONSALVES, A.A.; ARAÚJO, C.R.M. Síntese, Atividade Antileishmania e Cítotóxica de Hidrazonas Derivadas de Aldeídos Naturais. **Quim. Nova**, 43(1), 50-57, 2020.
- BORDOLOI, S. *et al.* Some promising medicinal plants used in Alzheimer's disease: an ethnopharmacological perspective. **Discover Applied Sciences**, [S.L.], 6(5), p. 1-20, 2024.
- OLIVEIRA, C.; CAGIDE, F.; TEIXEIRA, J.; AMORIM, R.; SEQUEIRA, L.; MESITI, F.; SILVA, T.; GARRIDO, J.; REMIÃO, F.; VILAR, S.; URIARTE, E.; OLIVEIRA, P.J.; BORGES, F. Hydroxybenzoic Acid Derivatives as Dual-Target Ligands: Mitochondriotropic Antioxidants and Cholinesterase Inhibitors. **Front Chem.** 23:6:126, 2018.
- KAUR, R. *et al.* Potential of flavonoids as anti-Alzheimer's agents: bench to bedside. **Environmental Science And Pollution Research**, [S.L.], 29(18), 26063-26077, 2022.
- ZAFAR, R. *et al.* Prospective Application of Two New Pyridine-Based Zinc (II) Amide Carboxylate in Management of Alzheimer's Disease: synthesis, characterization, computational and in vitro approaches. **Drug Design, Development And Therapy**, [S.L.], 15, 2679-2694, 2021.
- SEMBIRING, M. H.; NURSANTI, O.; RAHMANIA, T. A. Molecular docking and toxicity studies of nerve agents against acetylcholinesterase (AChE). **Journal Of Receptors And Signal Transduction**, [S.L.], 43(5), 115-122, 2023.
- SILVA, W. M. B. da *et al.* Anacardic Acid Complexes as Possible Agents Against Alzheimer's Disease Through Their Antioxidant, In vitro, and In silico Anticholinesterase and Anxiolytic Actions. **Neurotoxicity Research**, [S.L.], 39(2), 467-476, 2020.
- BECKER, M. *et al.* Determination of the Antioxidant Capacity of Red Fruits by Miniaturized Spectrophotometry Assays. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 3(4), 223–227, 2019.
- RE, R. *et al.* Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, 26(9–10), 1231–1237, 1999.