
Potencial Terapêutico das Fenilcromonascarboxamidas

Joana Filipa Oliveira Diogo Meireles

Universidade Fernando Pessoa-Faculdade de Ciências da Saúde

Porto 2014



Potencial Terapêutico das Fenilcromonascarboxamidas

Joana Filipa Oliveira Diogo Meireles

Projeto de Pós Graduação apresentado à
Universidade Fernando Pessoa como parte dos
requisitos para obtenção do grau de Mestre em
Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Professora Doutora Lúgia Gomes

RESUMO

Apesar do enorme progresso nos últimos anos no desenvolvimento de novos fármacos, a maioria deles apresentam efeitos laterais indesejáveis, pelo que, a descoberta de novos agentes terapêuticos, mais eficazes e seguros continua a ser um importante campo de estudo na química medicinal.

Os processos de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos é dispendioso, demorado e na maioria das vezes com baixa taxa de sucesso. Apesar do crescente investimento económico por parte da indústria farmacêutica, o número de novos fármacos tem diminuído ao longo das últimas décadas. Este desafio torna-se mais aliciante no caso das doenças de natureza multifatorial, como o caso das doenças neurodegenerativas.

Este trabalho consiste numa revisão bibliográfica que se centra na importância das cromonas no tratamento da Doença de Parkinson. Inicia-se pela execução da caracterização química dos compostos derivados do núcleo de cromonas e pelas diversas formas de executar a sua obtenção. Segue-se uma breve resenha dedicada às principais utilizações das cromonas na terapia. Faz-se o resumo fundamental dos aspetos ligados com as relações estrutura-atividade. Finalmente aborda-se brevemente os aspetos etiológicos das doenças multifuncionais que suportam a terapia utilizada, e os avanços promissores que os estudos com compostos derivados de cromonas podem impulsionar.

ABSTRACT

In spite of the tremendous progress that has been operated in the last years on the development of new drugs, most of them have been rejected due to the side effects that present. Thus, the search for new therapeutic agents, with higher efficiency and safety stills an important milestone for the medicinal chemistry.

The search and development processes for new drugs is highly expensive, cumbersome and with low successful ratio. In spite of the increased investment for research by pharmaceutical industry the number of new active molecules that successfully pass though clinical trials has been decreasing in the last decades. This challenge becomes more attractive in the case of degenerative diseases.

This work is a short revision concerning about the importance of exploration of new substances with pharmacological activities based on the cromone nucleus. It starts with the chemical characterization of the cromones and by their main synthetic pathways followed by a brief description of their actual uses in therapy. A condensed summary of the main aspects concerning the structures activities relationships are addressed part 2 of the second chapter. Finally the third chapter revises the etiology, actual treatment and promising applications of cromones in the Parkinson disease

Ao Alexandre Almeida

AGRADECIMENTOS

À *Professora Doutora* Lígia Gomes, com quem tive o orgulho e o privilégio de colaborar, agradeço todos os estímulos e desafios para a realização deste Projeto.

Aos meus amigos dos diversos círculos dos quais faço parte, um muito obrigado pela amizade demonstrada em todos os momentos.

À minha família, agradeço o apoio incondicional ao longo de toda a minha vida.

Finalmente, agradeço aos meus pais pelo amor, carinho e dedicação com que me brindaram ao longo dos anos e pelos sacrifícios que passaram para que eu chegasse até aqui.

ÍNDICE GERAL

RESUMO	I
ABSTRACT	II
AGRADECIMENTOS	IV
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
ÍNDICE DE TABELAS	X
ABREVIATURAS	XI
1 AS CROMONAS	1
1.1 Métodos de síntese das cromonas	2
1.1.1 Método de Kostanecki-Robinson	2
1.1.2 Método de Baker-Vent katamaran	3
1.1.3 Método via ácido de Meldrum	4
1.1.4 Método de adição intramolecular de Michael	5
2 USO DAS CROMONAS NA TERAPIA	6
2.1 Atividade anti- inflamatória	7
2.2 A atividade antimicrobiana e antiviral	11
2.3 Atividade anticancerígena	12
2.4. Doenças neurodegenerativas	13
2.5 Relações estrutura atividade das cromonas	16

3 APLICAÇÃO DAS CROMONAS NA DOENÇA DE PARKINSON	19
3.1 Etiologia da doença de Parkinson	19
3.2 Tratamento farmacológico atual da doença de Parkinson	22
3.3 Recetores da adenosina	23
3.4 Estudos da ação inibidora das fenilcromonascarboxamidas para os recetores da adenosina	27
3.5 Enzimas MAO-A e MAO-B	29
3.6 Estudos da ação inibidora da MAO-B pelas 3-fenilcromonascarboxamidas	32
CONSIDERAÇÕES FINAIS	38
BIBLIOGRAFIA	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Estrutura e numeração da cromona segundo a IUPAC.	1
Figura 1.2 Estrutura de fenilcromonascarboxamidas.	2
Figura 1.3 Método de Kostanecki-Robinson.	3
Figura 1.4 Método de Baker-Ventkatamaran para a síntese do anel de 3-cromona. (1- 2-hidroxiacetofenona; 2- halogeneto de acilo; 3- éster; 4- dicetona; 5- cromona; A- POCl ₃ /Piridina; B- KOH/Piridina ou NaH/DMSO; C- H ₂ SO ₄ /ácido acético)	4
Figura 1.5 Síntese via ácido de Meldrum (1- fenol; 2- ácido de Meldrum; 3- cromona; A- Yb(OTf) ₃ /CH ₃ NO ₂).	4
Figura 1.6 Adição intramolecular de Michael (1- 2-hidroxifenil-inona; 2- 1,4-benzopirona; A- MeOH ou acetona)	5
Figura 2.1 Planta <i>Ammi visnaga</i> e estrutura química da quelina e do visnagin.	6
Figura 2.2 Estrutura química do ácido cromona-2-carboxílico e do ácido cromoglicólico.	7
Figura 2.3 Estrutura de diferentes compostos derivados de cromonas e respectivas propriedades farmacológicas.	8
Figura 2.4 Cascata do ácido araquidónico.	9
Figura 2.5 Estrutura química do stellatin e seus derivados.	9
Figura 2.6 Estrutura química da 6-fenoxi-7-metilsulfoxiaminocromona e da sua 2-amida (T-614).	10
Figura 2.7 Estrutura química do Pramlukaste.	10
Figura 2.8 Estrutura química dos derivados piperidinilalcoxi.	11

Figura 2.9 Estrutura química de sulfonamidas derivadas de cromonas.	11
Figura 2.10 Estrutura química de derivados ditiazólicos.	12
Figura 2.11 Estrutura química de derivados de cromonas com potencial antineoplásico.	13
Figura 2.12 Metabolismo da acetilcolina e dopamina nos neurónios adergénicos.	14
Figura 2.13 Estrutura química de um derivado de cromonas com capacidades inibitórias para a monoaminaoxidase e para a acetilcolinesterase.	15
Figura 2.14 Estrutura química de um derivado de cromonas com capacidades agonistas para o recetor D ₂ da Dopamina.	15
Figura 2.15 Padrões de substituição no núcleo cromona e correspondentes atividades biológicas associadas.	16
Figura 2.16 Cromonas 2-substituídas e correspondentes atividades biológicas.	17
Figura 2.17 Exemplos da estrutura química da estirilcromonas.	18
Figura 3.1 Aspeto citoquímico dos corpos de Lewy.	20
Figura 3.2 Esquema para a formação de radicais livres apartir da dopamina (DA) e respetiva a morte celular. Radical superóxido (O ₂ ⁻), superóxido dismutase (SOD), peróxido de hidrogénio (H ₂ O ₂), glutaciona redutase (GR), flavina-adenina dinucleótido (FAD), nicotinamida-adenina-dinucleotídeo (NAD), glutaciona dissulfato (GSSG), glutaciona (GSH), adenosina trifosfato (ATP)	21
Figura 3.3 Relação entre a dopamina e acetilcolina em indivíduos normais e com doença de Parkinson (Adaptado da internet).	23
Figura 3.4 Formula estrutural da adenosina.	24
Figura 3.5 Recetores de adenosina	24
Figura 3.6 Distribuição dos recetores da adenosina nas diferentes regiões do SNC (Adaptado da internet).	25
Figura 3.7 Interação adenosina-dopamina.	26
Figura 3.8 Estrutura de 3-fenilcromonascarboxamidas e da 3-fenilcromonascarboxamidas	28
Figura 3.9 Estruturas de 3-fenilcromonascarboxamidas com afinidade para	29

o recetor A2a da adenosina, K_i -constante de inibição, SI-razão de inibição entre o recetor A2a e A1.	29
Figura 3.10 Desaminação das aminas biogénicas catalisada pela MAO.	31
Figura 3.11 Comparação das duas isoformas de MAO.	33
Figura 3.12 Estruturas da L-deprenil da rasagilina.	34
Figura 3.13 Interação de uma cromona com a MAO-B.	37
Figura 3.14 Tipo de interação da N-(4-(clorofenil)-cromona-3-carboxamida com a MAO-B.	

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 3.1 Fórmula estrutural e atividade inibitória para as isoformas da MAO para cinco cromona-3-carboxamidas.	36
---	----

ABREVIATURAS

A1, A2a, A2b e A3 – Recetores da adenosina

AMPC - Adenosina monofosfato cíclico

ATP - Adenosina trifosfato

CH₃NO₂ – Nitrometano

COX – Enzima ciclooxigenase

Cys - Cisteína

D₁, D₂, D₃, D₄ – Recetores da dopamina

DA - Dopamina – Ácido sulfúrico

DMSO - Dimetilsulfóxido

DP - Doença de Parkinson

FAD - Dinucleótido de flavina e adenina

FAD - Flavina-adenina dinucleótido

GR - Glutathione redutase

GSH - Glutathione

GSSG - Glutathione dissulfato

H₂O₂ - Peróxido de hidrogénio

5-HT – Serotonina (5-hidroxitriptamina)

H₂SO₄ – Ácido sulfúrico

IC₅₀ - Concentração inibitória a 50 %

KOH – Hidróxido de potássio

L-DOPA - Levodopa

Leu - Leucina

Lle - Isoleucina

MAO - Monoamina oxigenase

NAD - Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo

NaH – Hidreto de sódio

NO - Monóxido de azoto

(O₂⁻) - Anião superóxido

Pro - Prolina

REA - Relação estrutura atividade

SNC - Sistema nervoso central

SOD - Superóxido dismutase

Tyr - Tirosina

Yb(OTf)₃ - Trifluormetanosulfonato de itérbio

CAPÍTULO I

1 AS CROMONAS

As cromonas constituem um grupo de compostos que ocorrem naturalmente, especialmente nas plantas. A palavra cromona é derivada da palavra grega *croma* que significa "Cor," na realidade estes compostos podem apresentar uma diversidade de cores.

Em termos químicos, as cromonas são compostos heterocíclicos oxigenados, formados por um anel pirona fundido com um anel benzênico, cuja estrutura geral é apresentada na figura 1.1. Estes compostos são, na maioria, de origem natural e existem em grande quantidade no reino vegetal como referido. Os mais frequentes são os derivados substituídos nas posições 2 e 3, figura 1.1 (Alcaro *et al.*, 2010). Quando a substituição no carbono 3 é feita por uma fenilamida temos as fenil-cromonas-carboxamidas. A figura 1.2 mostra algumas delas que foram objeto de investigação em química médica.

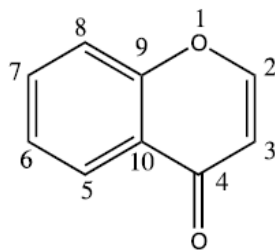
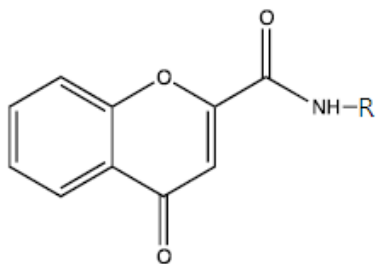


Figura 1.1 Estrutura e numeração da cromona segundo a IUPAC (Alcaro *et al.*, 2010).



R=Ph

R=4'-I-Ph

R=4'-OCH₃-Ph

R=4'-SCH₃-Ph

R=4'-CH₃-Ph

Figura 1.2 Estrutura de fenilcromonascarboxamidas (Alcaro *et al.*, 2010).

O núcleo base das cromonas é considerado como sendo um farmacóforo associado a inúmeros efeitos biológicos, originando um grande número de moléculas bioativas, com propriedades interessantes. Referem-se as atividades antialérgica, anti-inflamatória, anti tumoral (Shaw *et al.*, 2009), antiagregante plaquetária, antioxidante, antiviral e antifúngica (Bernstein, 1998). Estas atividades fundamentam-se no facto das cromonas e seus derivados possuírem a capacidade de inibir a atividade de algumas enzimas, nomeadamente oxidoredutases, cinases, tirosinases, lipoxigenases e cicloxigenases (Alcaro *et al.*, 2010, Hadjeri *et al.*, 2003). Recentemente foi descrita a potencial aplicação de derivados das fenil-cromonas-carboxamidas em doenças neurodegenerativas, nomeadamente na doença de Parkinson, devido à sua capacidade de atuarem como inibidores da monoamino-oxidase B, MAO-B humana e na doença de Alzheimer (Shaw *et al.*, 2009).

1.1 MÉTODOS DE SÍNTESE DAS CROMONAS

Existem vários e diferentes métodos descritos na literatura para a síntese de cromonas, que se apresentam de forma resumida e breve nesta secção.

Os principais métodos são o método de Kostanecki-Robinson, o de Baker-Vent Katamaran e pela via do ácido de Meldrum e pelo método de adição intramolecular de Michael.

1.1.1 Método de Kostanecki-Robinson

O método de Kostanecki-Robinson, figura 1.3, inicia-se por uma condensação de Claisen entre uma 2-hidroxiacetofenona e um oxalato de etilo em meio alcalino

conduzindo à formação de um intermediário que sofre, posteriormente, a ciclização em meio ácido originando a cromona substituída em 2. A partir desta cromona, pode-se alterar o grupo ácido carboxílico pelo grupo amida através dos diversos métodos de amidação descritos na literatura (Trost *et al.*, 1991).

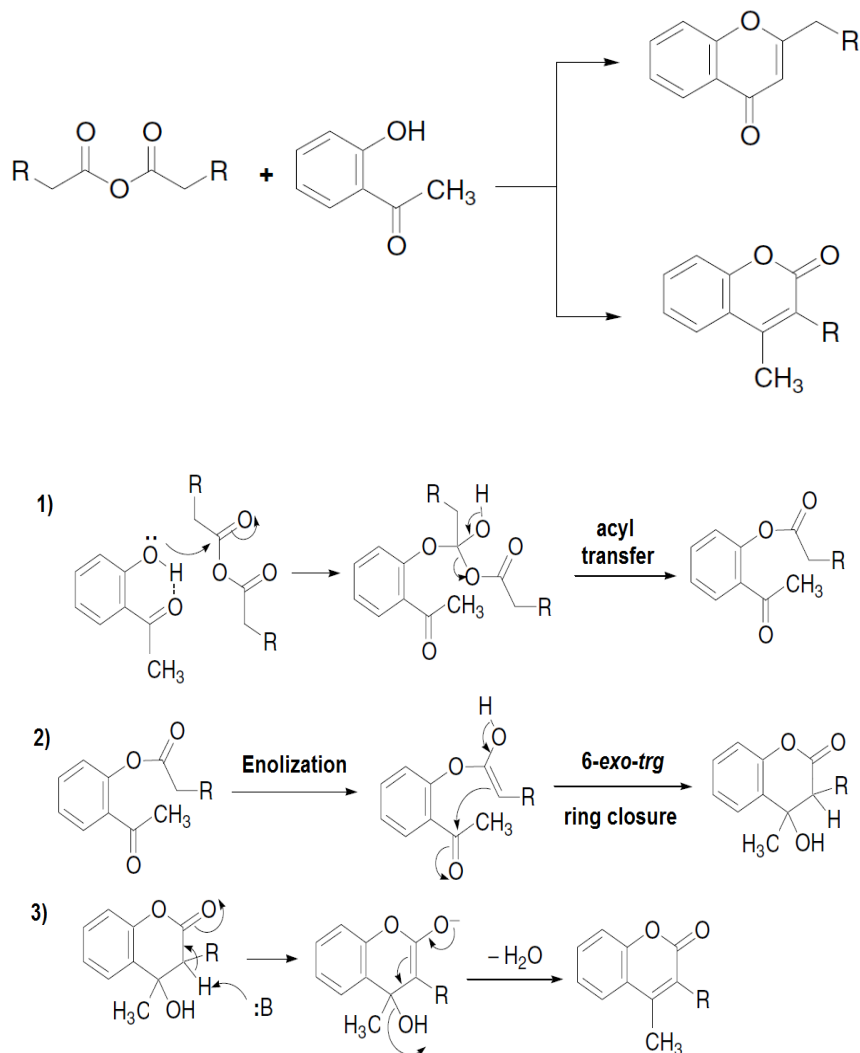


Figura 1.3 Método de Kostanecki-Robinson

(http://es.wikipedia.org/wiki/Acilaci%C3%B3n_de_Kostanecki).

1.1.2 Método de Baker-Vent Katamaran

O método de Baker-Vent Katamaran, figura 1.4, consiste na conversão de uma 2-hidroxiacetofenona num intermediário éster que sofre um rearranjo para originar uma dicetona. Posteriormente ocorre uma ciclização em meio ácido forte dando origem à

cromona com o padrão de substituição correspondente. Este método tem sido bastante utilizado para a síntese de flavonas e de 3-acil cromonas (Ganguly, 2005).

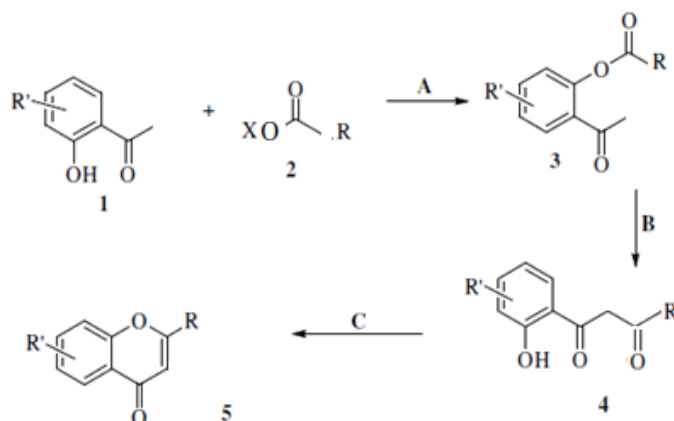


Figura 1.4 Método de Baker-Venkataratnam para a síntese do anel de 3-cromona. (1- 2-hidroxiacetofenona; 2- halogeneto de acilo; 3- éster; 4- dicetona; 5- cromona; A- POCl_3 /Piridina; B- KOH /Piridina ou NaH /DMSO; C- H_2SO_4 /ácido acético) (Adaptado de Junior, 2001).

1.1.3 Método via ácido de Meldrum

Este é o método mais recente e baseia-se na reação do ácido de Meldrum, composto 2 da figura 1.5, com um fenol substituído na presença de um catalisador, conduzindo à formação da cromona com o padrão de substituição pretendido, segundo a figura 1.5 (Fillion, 2006).

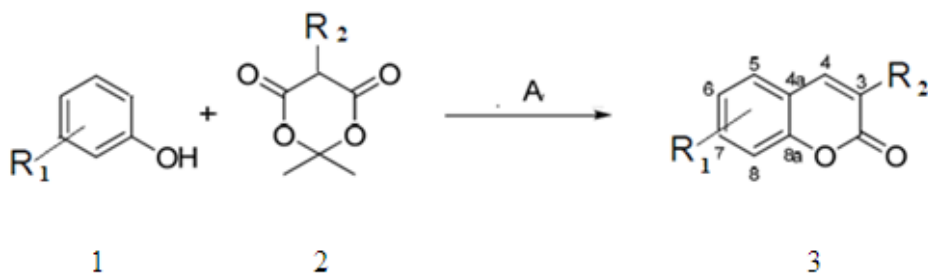


Figura 1.5 Síntese via ácido de Meldrum (1- fenol; 2- ácido de Meldrum; 3- cromona; A- $\text{Yb}(\text{OTf})_3/\text{CH}_3\text{NO}_2$) (http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422007000400035&script=sci_arttext).

1.1.4 Método de adição intramolecular de Michael

A obtenção de cromonas pelo método da adição intramolecular de Michael envolve a adição intramolecular de 2-hidroxifenil-inonas a 1,4-benzopironas, figura 1.6. O método em regra apresenta bom rendimento (Ishiki, 1998).

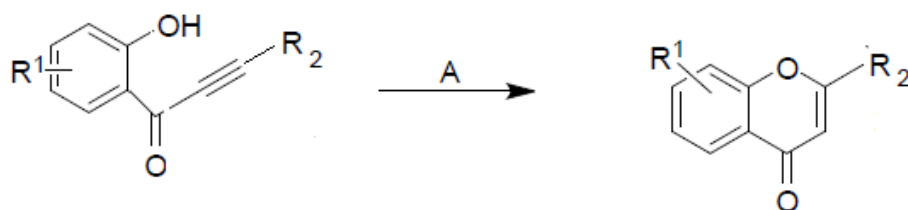


Figura 1.6 Adição intramolecular de Michael (**1**- 2-hidroxifenil-inona; **2**- 1,4-benzopirona; **A**- MeOH ou acetona).

CAPÍTULO II

2 USO DAS CROMONAS NA TERAPIA

Desde os tempos antigos que Cromonas, nomeadamente a quelina, uma furanocromona extraída das sementes da planta *Ammi visnaga*, figura 2.1, tem sido utilizada em várias terapias. A quelina e o seu derivado desmetoxilado na posição 9, visnagin, foram utilizados como broncodilatadores, como espasmolíticos e no tratamento de pedra nos rins (Svendsen, 1982). Contudo, os efeitos secundários, nomeadamente, as náuseas e os vômitos limitou o uso da quelina ao tratamento do vitiligo (Svendsen, 1982).

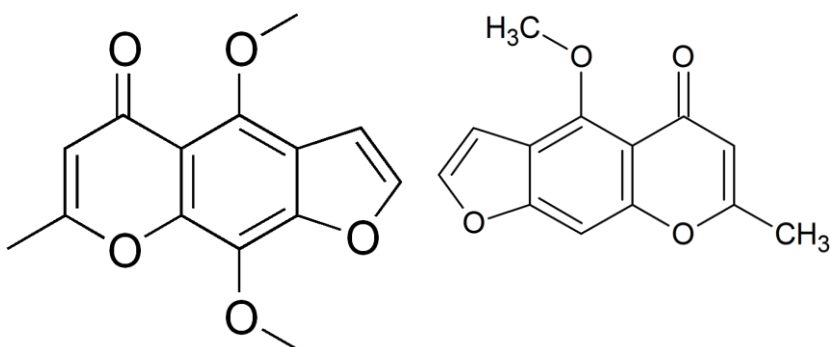


Figura 2.1 Planta *Ammi visnaga* e estrutura química da quelina e do visnagin.

Fonte: <http://higgledygarden.com/products-page/>

A necessidade de encontrar um derivado da quelina com propriedades broncodilatadoras, com melhor solubilidade em água e sem efeitos secundários, deu origem ao ácido cromona-2-carboxílico, figura 2.2. Este derivado é uma cromona com características antiespasmódicas da árvore brônquica causadas por antigénios (Svendsen, 1982). Apesar desta aplicabilidade o seu uso foi curto, sendo substituído pelas bis-cromonas, como o cromoglicato dissódico, figura 2.2, que foi amplamente utilizado no tratamento da asma leve ou moderada em adultos e especialmente em crianças, evitando o uso de corticosteróides com os efeitos laterais a eles associados. (Netzer, 2012).

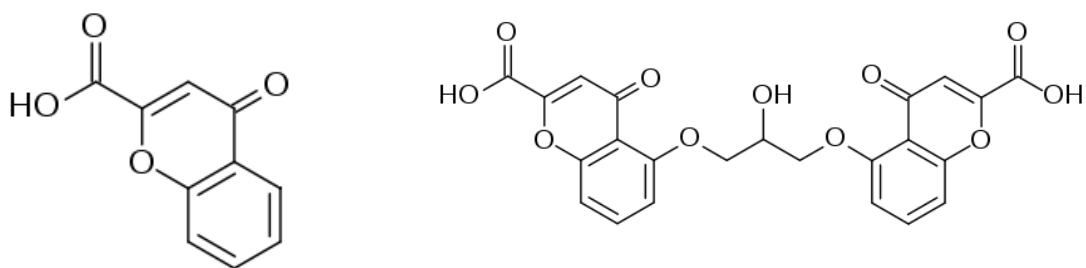


Figura 2.2 Estrutura química do ácido cromona-2-carboxílico e o do ácido cromoglicólico (http://es.wikipedia.org/wiki/%C3%81cido_cromogl%C3%ADcico).

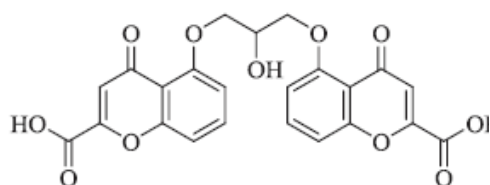
Na figura 2.3 apresentam-se alguns exemplos de cromonas e suas aplicações terapêuticas. Dada a diversidade dessas aplicações o núcleo da cromona é privilegiado para a descoberta de novos fármacos de síntese e desenvolver estudos das relações estrutura-atividade conducentes a um determinado efeito farmacológico predominante.

2.1 Atividade anti-inflamatória

Os processos inflamatórios são de extrema importância, pois, para além dos processos associados à sua etiologia, podem desempenhar um papel preponderante noutras doenças, como as cardiovasculares, a aterosclerose, a diabetes, a doença de Alzheimer, a doença de Parkinson e o cancro.

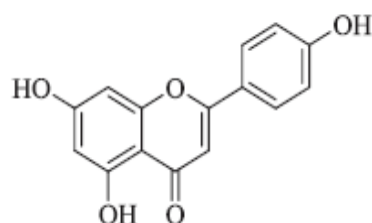
O tratamento das doenças inflamatórias, como a artrite, a psoríase, a asma, e o síndrome do intestino irritável restringe-se ao uso de anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) e

glucocorticóides. Contudo, ambas as terapêuticas apresentam efeitos secundários, sendo alguns dos quais graves. Assim, e apesar do sucesso já obtido nesta área, existe uma grande necessidade de desenvolver terapias alternativas para o tratamento destas doenças.



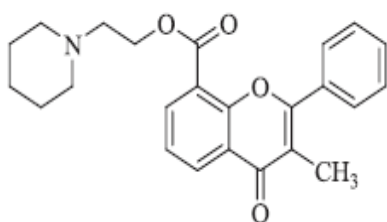
Cromolina

Antiinflamatório



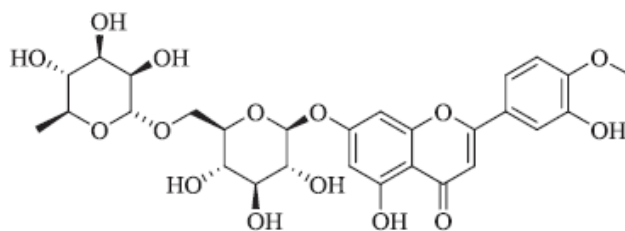
Apigenina

Inibidor do citocromo P450



Flavoxato

**Anticolinérgico com efeitos
antimuscarínicos**



Diosmin

Venotónico e vasculoprotetor

Figura 2.3 Estrutura de diferentes compostos derivados de cromonas e respetivas propriedades farmacológicas (<http://pt.wikipedia.org>).

A maior parte dos fármacos com atividade anti-inflamatória (AINEs e glucocorticóides) atuam por inibição de enzimas, como as ciclooxigenases, COX 1 e COX 2 e dos recetores dos leucotrienos, funcionando como antagonistas de mediadores endógenos do processo da inflamação (prostaglandinas, leucotrienos e histamina), *vide* figura 2.4. Estes fármacos apresentam, na maioria das vezes, pouca seletividade e, conseqüentemente, elevados efeitos secundários. Assim, há uma pesquisa continuada no sentido de melhorar a terapêutica, visando a descoberta de novas moléculas complementares com ação anti-inflamatória, onde se inserem os derivados das cromonas.

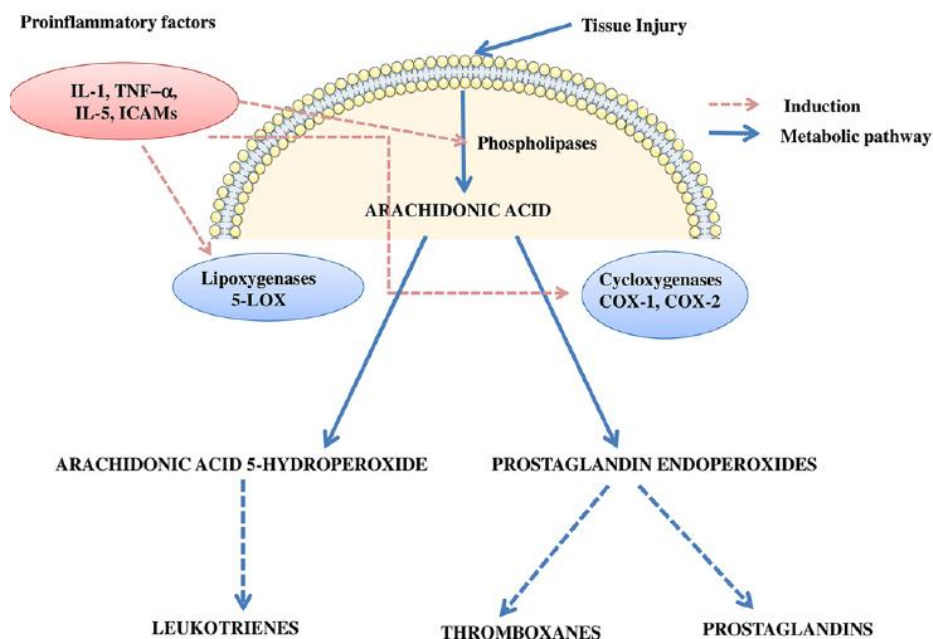


Figura 2.4 Cascata do ácido araquidônico (Gaspar, 2014).

Deste modo Gautam *et al.* sintetizaram vários derivados do stellatin, figura 2.5, uma cromona natural isolada da *dysophylla stellata*, descrita como um inibidor da ciclooxigenase (Gautam *et al.*, 2011).

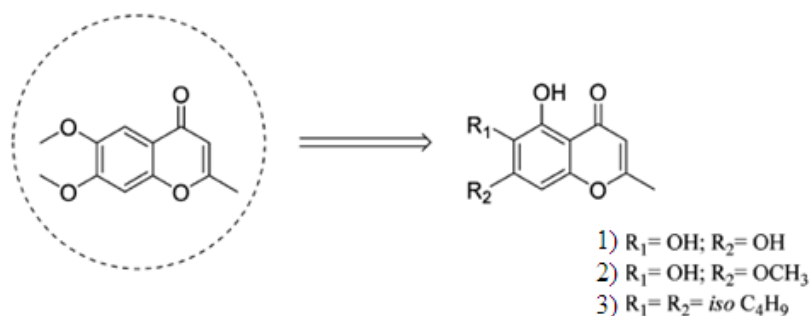


Figura 2.5 Estrutura química do stellatin e seus derivados (Gaspar *et al.*, 2014, Gautam *et al.*, 2011).

A partir dos estudos da relação estrutura atividade verificou-se que os derivados do stellatin apresentam uma maior atividade inibidora da COX 2 e os compostos 1 e 3 da figura. 2.5, apresentam uma atividade anti-inflamatória maior do que a indometacina (Gautam *et al.*, 2011).

O 6-fenoxi-7-metilsulfoxiaminocromona, figura 2.6, e seus análogos, sintetizados a partir de um derivado do 3-formilamino apresentaram atividade antirreumática.

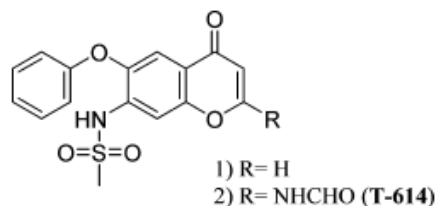


Figura 2.6 Estrutura química da 6-fenoxi-7-metilsulfoxiaminocromona e da sua 2-amida (T-614) (Inaba, 2000).

Entre os anos 1980 e 1990, surgiu o fármaco Pranlukaste, figura 2.7, um inibidor do recetor dos leucotrienos baseado no núcleo cromona. Este medicamento foi lançado inicialmente no mercado para o tratamento da asma e em 2000 a sua licença foi prorrogada para a rinite alérgica.

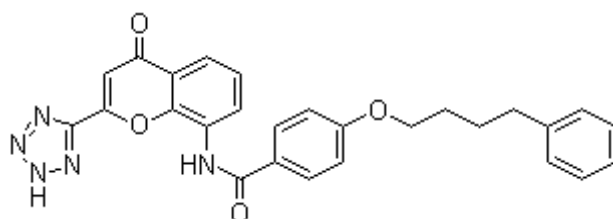


Figura 2.7 Estrutura química do Pranlukaste.

Fonte: <http://www.manusakteva.in/Details/1/188/View/Pranlukast.html>

Outros estudos conduziram à descoberta de fármacos promissores, tais como os derivados piperidinilalcoxi, figura 2.8, que são apontados como estruturas para o desenvolvimento de compostos anti-histamínicos com atividade antagonista adicional para recetor D4 dos leucotrienos (Zhang, 1995).

Outros derivados de cromonas, foram descritos como potenciais compostos antiasmáticos e antialérgicos pois previnem a libertação de substâncias anafiláticas ou bloqueiam as respostas alérgicas desencadeadas pelos mastócitos (Brown *et al.*, 1989; Nohara *et al.*, 1987).

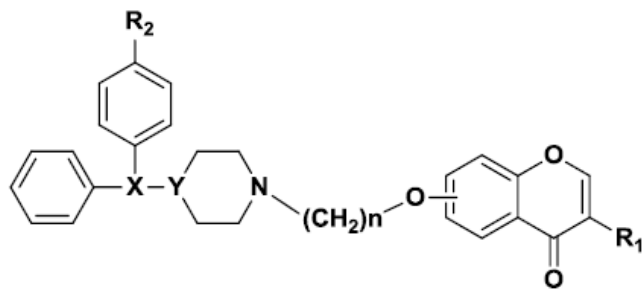


Figura 2.8 Estrutura química dos derivados piperidinilalcoxi (Milhazes, 2007).

2.2 A atividade antimicrobiana e antiviral

Nos últimos 70 anos a quimioterapia, tem sido utilizada com sucesso no tratamento de pacientes com doenças infecciosas. Não obstante, as resistências aos quimioterápicos aumentava e surgiram assim novas estirpes resistentes pelo que a procura de novos compostos nesta área continua atual.

Vários derivados de cromonas, quer de origem natural quer sintética, têm apresentado atividade antibacteriana e antifúngica apreciável (Prakash *et al.*, 2008).

Segundo Chohan *et al*, várias sulfonamidas derivadas de cromonas, figura 2.9, exibiram atividade antibacteriana contra bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri* e *Salmonella typhi*) e Gram-positivas (*Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*) e atividade antifúngica contra fungos de diferentes géneros e espécies: *Aspergillus flavus*, *Trichophyton longifusus*, *Candida albicans*, *Candida glaberata*, *Fusarium solani*, *Microsporium canis* (Chohan *et al.*, 2006).

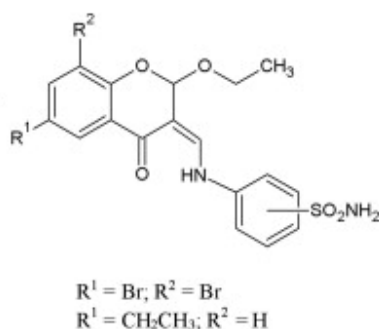


Figura 2.9 Estrutura química de sulfonamidas derivadas de cromonas.

Fonte: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096808961100318X>

Alguns derivados ditiazólicos das cromonas, representados na figura 2.10, apresentam atividade antimicrobiana e uma melhor atividade antifúngica contra *Geotrichum candidum* quando comparados com o fluconazol (Raj, 2009).

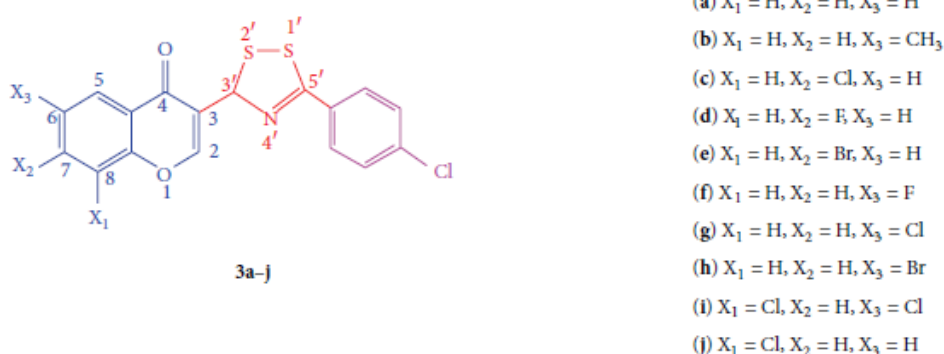


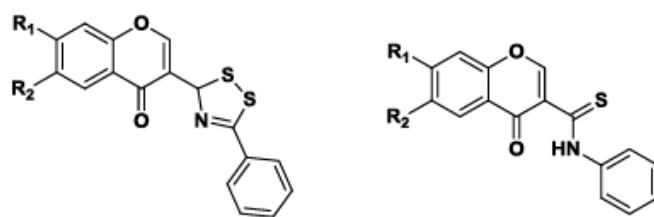
Figura 2.10 Estrutura química de derivados ditiazólicos.

Fonte: <http://www.hindawi.com/journals/ijmc/2013/815453/sch1/>

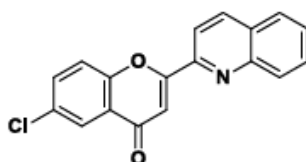
Outras classes de derivados, as 2-estirilcromonas e as 5-hidroxicromonas demonstraram atividade interessante para o desenvolvimento de drogas antivirais (Desideri *et al.*, 2000). Este farmacóforo foi também proposto para o desenvolvimento de derivados contra o vírus da imunodeficiência humana devido à sua capacidade para inibir a enzima transcriptase reversa (Kaye *et al.*, 2004).

2.3 Atividade anticancerígena

Na figura 2.11 mostram-se alguns derivados de cromonas com atividade citotóxica significativa. Os derivados A e B apresentam atividade significativa para sarcomas, já o composto C apresenta atividade antineoplásica para a leucemia quer em monoterapia ou em combinação com metotrexato (Raj *et al.*, 2010; Khan *et al.*, 2009; Budzisz *et al.*, 2002).



A



B



C

Figura 2.11 Estrutura química de derivados de cromonas com potencial antineoplásico (Milhazes, 2007).

Outros derivados cromonas parecem atuar como inibidores de enzimas associadas à fase S do ciclo celular, nomeadamente, a enzima cinase, a tirosina fosfatase, a timidina fosforilase, a topoisomerase e a aromatase parando o ciclo celular e o crescimento do tumor como revelam os trabalhos de Forghieri e Recanatini (Forghieri *et al.*, 2004; Recanatini *et al.*, 2011).

2.4 Doenças neurodegenerativas

A doença de Alzheimer e doença de Parkinson são as doenças neurodegenerativas mais comuns em todo o mundo com etiologias mal conhecidas. A doença de Alzheimer é caracterizada por uma perda de células colinérgicas basais do cérebro anterior, enquanto que a característica histopatológica da doença de Parkinson é a perda de neurónios dopaminérgicos e consequentemente o desequilíbrio da relação acetilcolina/dopamina.

Aumentar os níveis de acetilcolina tem sido considerada uma das terapias mais promissoras para o tratamento sintomático da doença de Alzheimer e da doença de Parkinson (Weinreb, 2012). A enzima acetilcolinesterase, é a enzima responsável pelo metabolismo da acetilcolina, podendo desempenhar um papel importante na aceleração da deposição das placas β -amilóide, um fator importante observado em pacientes com doença de Alzheimer (Weinreb, 2012), figura 2.12. Além disso, pensa-se que esta enzima esteja associada aos mecanismos de regulação da dopamina no corpo estriado, e por essa razão esse alvo é também considerado no tratamento sintomático da doença de Parkinson.

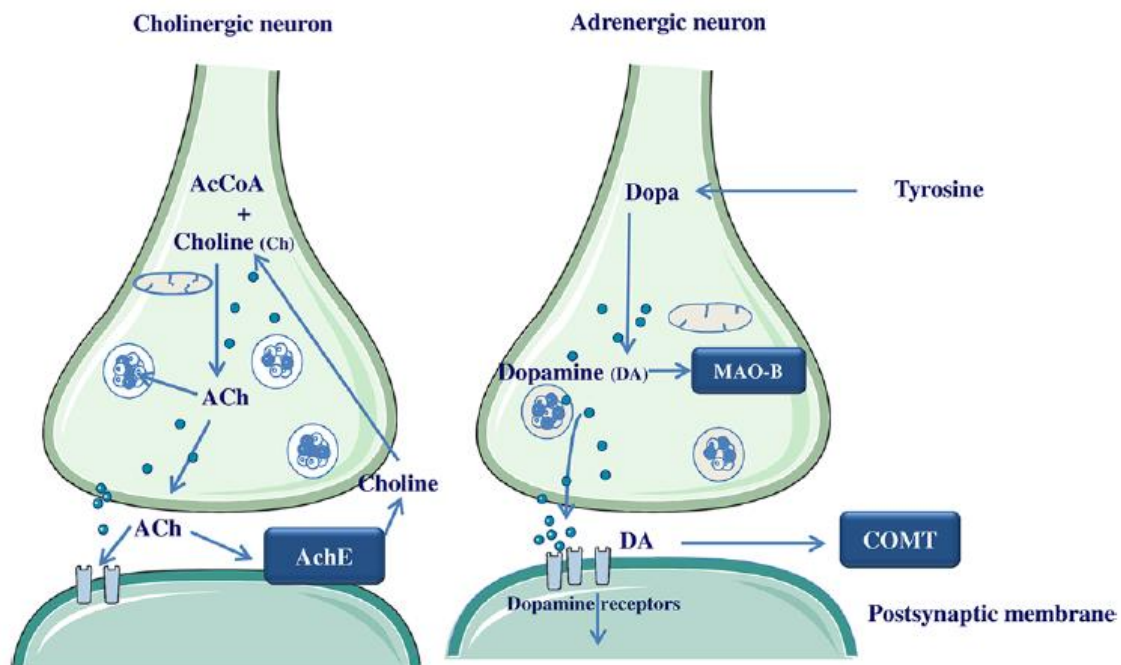


Figura 2.12 Metabolismo da acetilcolina e dopamina nos neurónios adregénicos. (Gaspar, 2014).

A descoberta e desenvolvimento de novos fármacos para as doenças neurodegenerativas é um campo recente, no entanto, o trabalho realizado por Brühlmann demonstrou que certos derivados das cromonas, figura 2.13, apresentam capacidades inibitórias para a monoaminaoxidase e para a acetilcolinesterase (Brühlmann *et. al*, 2001).

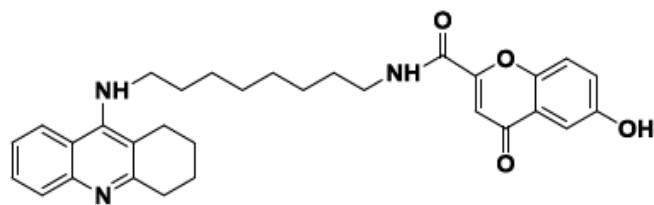
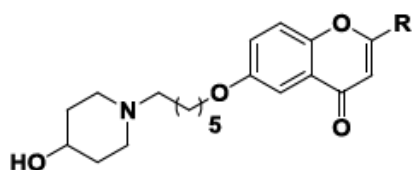


Figura 2.13 Estrutura química de um derivado de cromonas com capacidades inibitórias para a monoaminaoxidase e para a acetilcolinesterase (Milhazes, 2007).

Estudos mais recentes demonstraram que os derivados benziloxicromonas substituídas possuem maior atividade para a isoforma da monoamina-oxidase B e alguns destes derivados apresentavam reversibilidade quanto à inibição da enzima (Legoabe *et al.*, 2012). Outro estudo revelou que as cromonas substituídas em C-2 melhoraram a atividade e/ou seletividade para os agonistas para o recetor D₂ da Dopamina, segundo a figura 2.14 (Erickson *et al.*, 1992).



R=fenil (aumento da potência)

R=ciclopentil (aumento da seletividade)

Figura 2.14 Estrutura química de um derivado de cromona com capacidades agonistas para o recetor D₂ da Dopamina (Milhazes, 2007).

2.5 Relações estrutura atividade das cromonas

Tal como referido anteriormente, as propriedades biológicas das cromonas estão relacionadas com as diferentes características químicas destes compostos. Embora o núcleo da cromona seja essencial para a maioria das atividades biológicas, outros parâmetros estruturais, tais como a natureza, o número e a posição dos grupos de substituintes (incluindo a sua orientação relativa) são fundamentais para a versatilidade deste tipo de compostos (Lopez-Lazaro *et al.*, 2002; Heim *et al.*, 2002; Peixoto *et al.*, 2002; Gomes *et al.*, 2009; Shaw *et al.*, 2009). Para além disso, a capacidade desses compostos para formar adutos com proteínas, enzimas e recetores biológicos, depende da estrutura tridimensional e da distribuição eletrónica dentro da molécula. A figura 2.15 mostra os pontos de substituição no núcleo de cromona e as principais atividades a eles associados. A substituição nas posições 7 e 8 com um grupo hidroxilo confere mais eletronegatividade ao núcleo nesta zona, figura 2.15 (Machado, 2010)

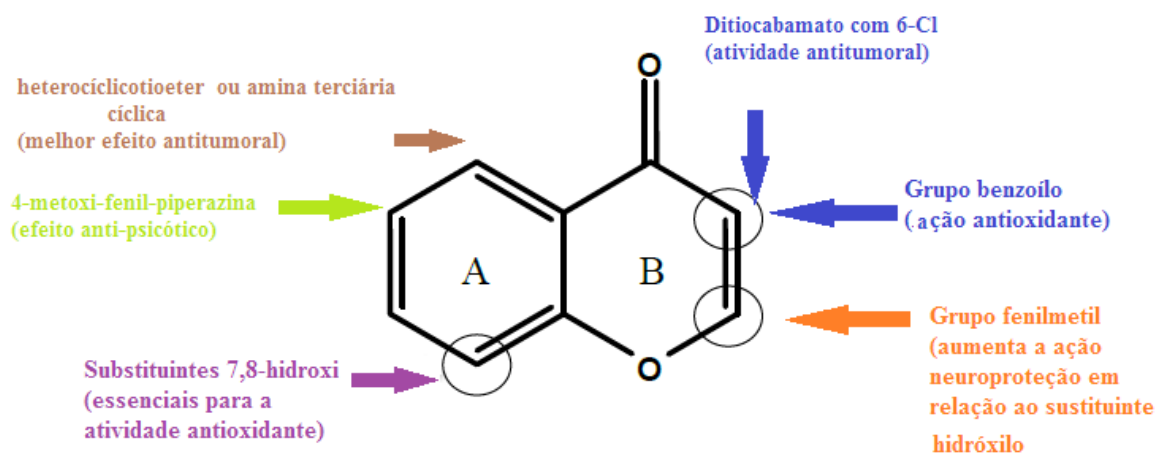


Figura 2.15 Padrões de substituição no núcleo cromona e correspondentes atividades biológicas associadas.

O grande interesse pelos efeitos dos derivados das cromonas, levou ao desenvolvimento de vários estudos com intuito de compreender melhor as relações entre as propriedades estruturais/eletrónicas dos derivados das cromonas e a respetiva atividade biológica

apresentada por esses compostos. Dos resultados obtidos nesses trabalhos poder-se-á definir a seguinte relação estrutura atividade (REA), ver figura 2.16:

- 1) a atividade antioxidante depende essencialmente da presença de grupos hidroxilo ou metoxilo nas posições 7 e 8 da cromona (R3 e R4)
- 2) a substituição na posição 2 é feita de modo a originar as 2-estirilcromonas ou 2-(feniletil)cromonas, figura 2.16. Esta substituição confere-lhe atividades antialérgica, anti tumoral, antiviral, antioxidante e anti-inflamatória (Peixoto *et al.*, 2002; Gomes *et al.*, 2010).

As 2-(feniletil)cromonas estão a ser estudadas com o objetivo de avaliar as suas propriedades antialérgicas e antineoplásicas, nomeadamente para a leucemia e seletividade para os recetores de adenosina (Gomes *et al.*, 2009; Shaw *et al.*, 2009).

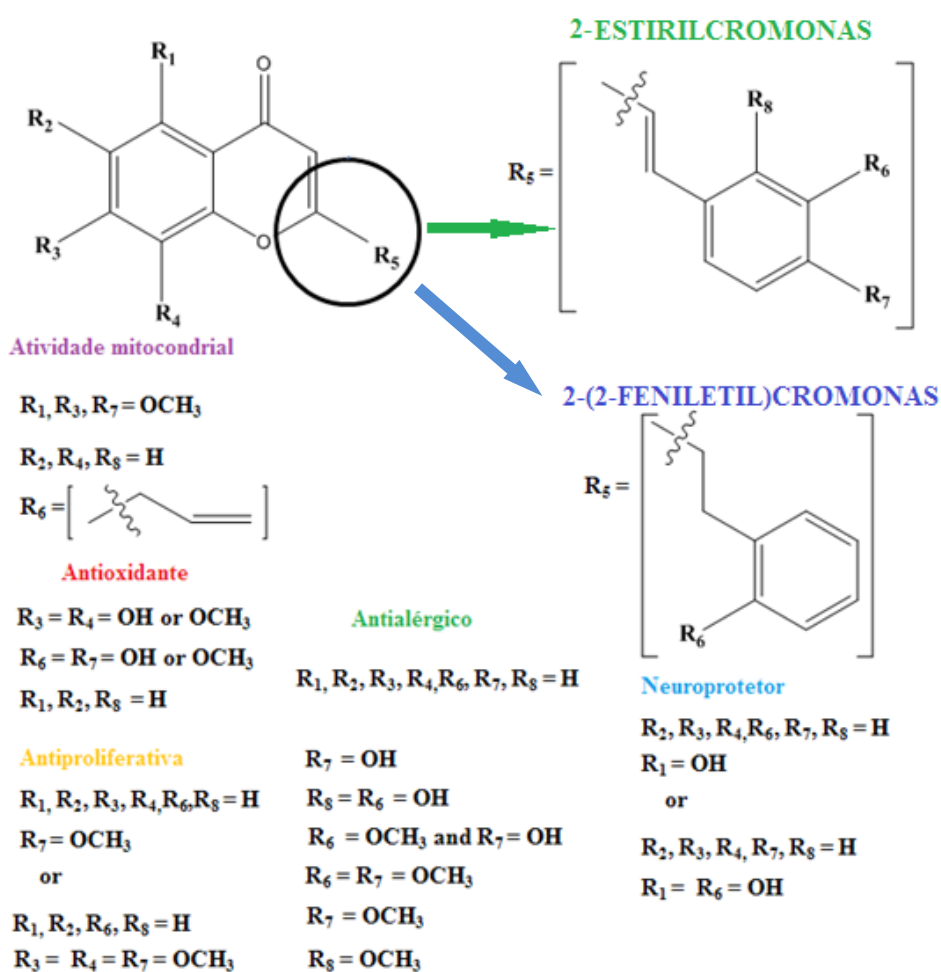


Figura 2.16 Cromonas 2-substituídas e correspondentes atividades biológicas (Adaptado de Machado, 2012).

As fenilcromonas com vários substituintes hidroxilo e metoxilo, exibem ação ao nível do SNC (sistema nervoso central) como neuroprotetores contra a neurotoxicidade induzida pelo glutamato (Yoon, 2005).

- 3) As cromonas sesquiterpeno, figura 2.17, encontradas nas raízes de *Ferula Fukanensis* foram descritas como inibidoras da produção de radicais pelo monóxido de azoto (NO) que desempenha um papel central nas reações inflamatórias e imunológicas (Motai, 2005).

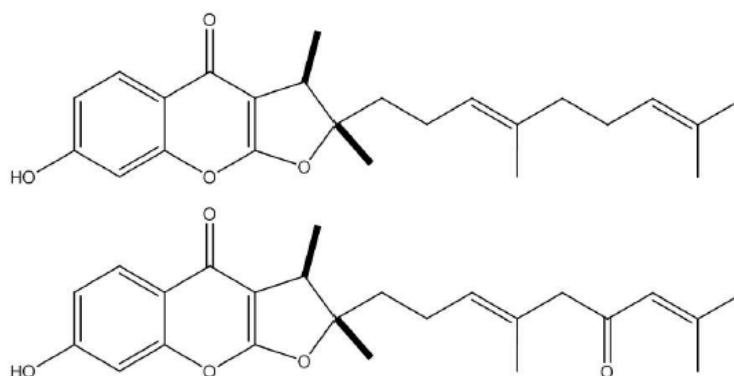


Figura 2.17 Exemplos da estrutura química da estilircromonas (Adaptado de Machado, 2012).

Apesar dos ensaios feitos até à data, ainda é necessário estudar um grande número de derivados das cromonas para se obter uma relação entre a estrutura química e a atividade farmacológica que permita sintetizar e desenvolver novas moléculas com aplicações terapêuticas.

3 APLICAÇÃO DAS CROMONAS NA DOENÇA DE PARKINSON

A doença de Parkinson (DP) é a doença neurodegenerativa mais comum a seguir à doença de Alzheimer. A prevalência desta doença é de aproximadamente 0,15% da população total mundial, crescendo para 0,5% em pessoas com mais de 50 anos de idade (Stoessl, 1999).

Com o crescente envelhecimento da população, acredita-se que o número de pessoas diagnosticadas com doença de Parkinson deva aumentar rapidamente nos próximos 20 anos, pelo que o desenvolvimento de novas substâncias com maior capacidade de inibir a degeneração neuronal e com menores efeitos secundários torna-se imperativo a curto prazo caso se deseje obter uma terapêutica mais eficaz para responder às necessidades de saúde da população.

3.1 Etiologia da doença de Parkinson

A Doença de Parkinson e seus sintomas foram enunciados pela primeira vez em 1871 pelo médico inglês James Parkinson (Stoessl, 1999) no seu estudo “Essay on the shaking palsy” (Ensaio sobre a Paralisia Agitante). É caracterizada, desde então, como um distúrbio do movimento sendo o seu diagnóstico baseado na presença de dois ou mais sintomas motores, tais como, rigidez, bradicinesia, tremor ou perda do reflexo postural. Contudo, uma limitação deste sistema de diagnóstico relaciona-se com o facto de que os pacientes parkinsonianos somente apresentam estes sintomas motores quando aproximadamente 60–70% dos neurónios do SNC já se encontrem degenerados e

quando os níveis estriatais da dopamina estiverem reduzidos em 70-80% (Barrio *et al.*, 1997; Lindner *et al.*, 1999; Meissner *et al.*, 2004).

A doença de Parkinson é um distúrbio neurodegenerativo cuja principal característica neuropatológica é a lesão dos neurónios dopaminérgicos localizados na parte compacta da substância negra que enviam sinais para os gânglios da base, ocasionando uma redução nos níveis de dopamina (DA) no estriado (Lindner *et al.*, 1999; Blandini *et al.*, 2000). As inclusões citoplasmáticas eosinofílicas denominadas corpos de Lewy, figura 3.1, resultantes da acumulação de proteínas α -sinucleína e ubiquitina é outra das características da DP (Hagan *et al.*, 1997; Blandini *et al.*, 2000).

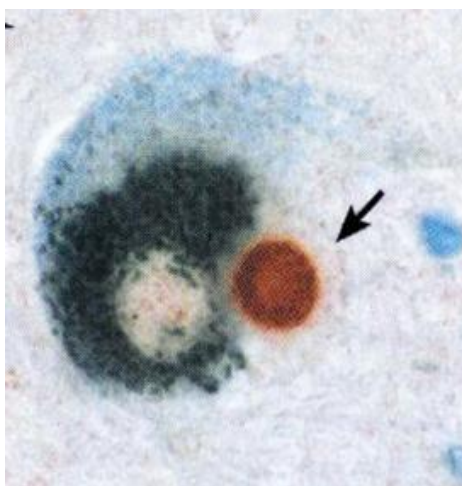


Figura 3.1 Aspeto citoquímico dos corpos de Lewy.

Fonte: http://neuroinformacao.blogspot.pt/2012_10_15_archive.html

Embora a etiologia do processo neurodegenerativo para a DP não esteja completamente elucidada, diversos estudos sugerem que possa ser uma doença multifatorial decorrente da combinação de vários fatores, nomeadamente: i) um estado de desequilíbrio oxidativo desencadeado a nível cerebral, ii) predisposição genética, iii) disfunções mitocondriais, iv) produção de radicais livres e toxinas ambientais (Fukae *et al.*, 2007; Henchcliffe, 2008; Zhou *et al.*, 2008).

A análise de tecidos cerebrais *post-mortem*, sugerem o stresse oxidativo e nitrativo como fatores essenciais no processo de neurodegeneração da SNC associada à DP (Zhou *et al.*, 2008). Por exemplo, a diminuição dos níveis de glutathione um antioxidante ubíquo nos sistemas vivos no SNC parece ser uma das primeiras alterações bioquímicas

observadas na doença. Também é observado um aumento dos níveis de peroxidação lipídica, como resultado da diminuição dos níveis de ácidos gordos polinsaturados (substratos para a peroxidação lipídica) e aumento dos níveis dos produtos da peroxidação lipídica (Hald *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2008).

A aparente vulnerabilidade seletiva dos neurónios dopaminérgicos ao processo oxidativo pode ser em parte oriunda do metabolismo normal da dopamina o qual pode contribuir para a formação de espécies reativas de oxigénio, de acordo com a figura 3.2 (Giasson *et al.*, 2002; Hald *et al.*, 2005).

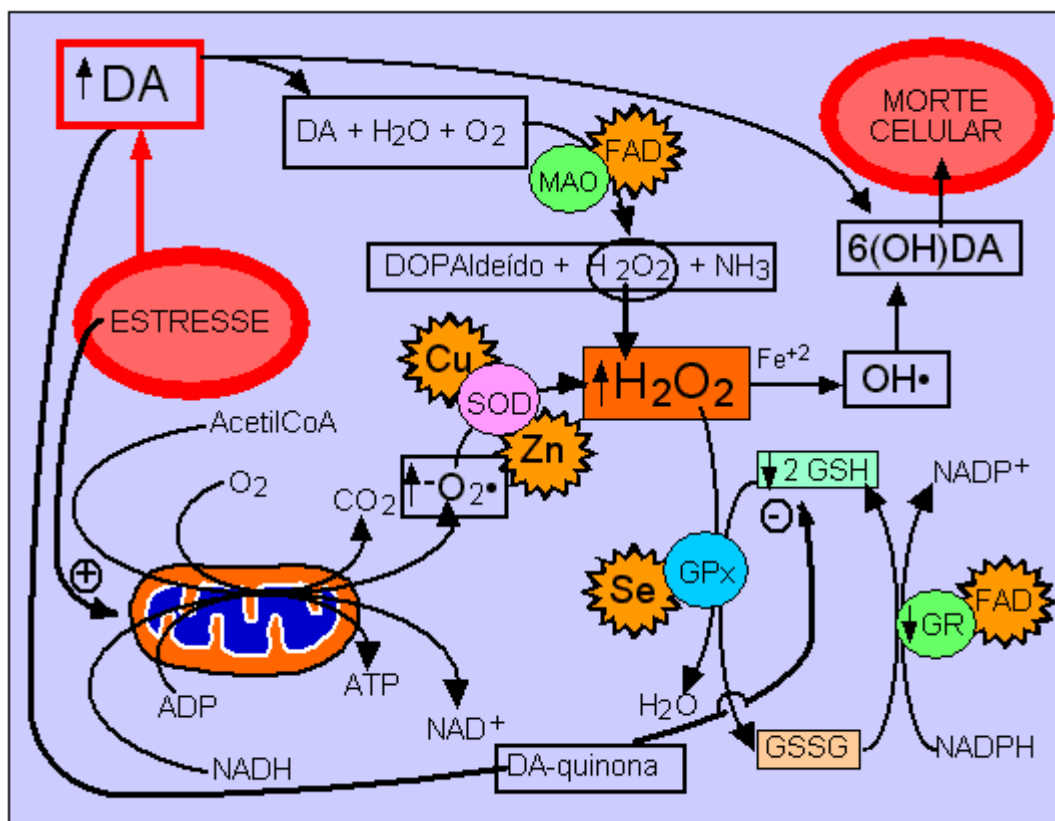


Figura 3.2 Esquema para a formação de radicais livres a partir da dopamina (DA) e respetiva morte celular. Radical superóxido (O_2^-), superóxido dismutase (SOD), peróxido de hidrogénio (H_2O_2), glutaciona redutase (GR), flavina-adenina dinucleótido (FAD), nicotinamida-adenina-dinucleotídeo (NAD), glutaciona dissulfato (GSSG), glutaciona (GSH), adenosina trifosfato (ATP) (<http://www.unifesp.br/dneuro/nexp/riboflavina/h.htm>).

Em condições fisiológicas, a dopamina é oxidada não-enzimaticamente pelo oxigénio molecular a peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e a dopamina-quinona. A dopamina também

é desaminada enzimaticamente pela enzima monoamina oxigenase-B (MAO-B) para formar H_2O_2 e 3,4-desidroxifenilacetaldeído. Desta forma, tanto a auto-oxidação da dopamina quanto o seu metabolismo mediado pela MAO-B envolvem a formação de H_2O_2 , um composto que pode ser facilmente reduzido na presença do ião ferro(II) pela reação de Fenton, formando o radical hidroxilo. Esta espécie altamente reativa parece contribuir para o stresse oxidativo observado na DP, visto que os níveis de ferro no SNC nos pacientes com a DP estão aumentados em aproximadamente 35% (Dexter *et al.*, 1989). Assim sendo, a oxidação da dopamina pode levar a uma vulnerabilidade seletiva dos neurónios dopaminérgicos e à morte celular.

3.2 Tratamento farmacológico atual da doença de Parkinson

A crescente expectativa de obter fármacos com mecanismos de ação não-dopaminérgicos com êxito no tratamento da DP torna promissores o uso de compostos antagonistas do recetor A2a da adenosina que são altamente seletivos e capazes de agir em vias de sinalizações específicas (Williams *et al.*, 1997; Linazasoro *et al.*, 2008).

A diminuição da dopamina no estriado leva a um aumento no tónus glutaminérgico, colinérgico e adenosinérgico originando mudanças na transmissão GABAérgica, opióide e canabinóide na via estriato-palidal. Os efeitos da diminuição da dopamina é dependente do tipo recetores da dopamina D1 ou D2 onde ocorreu a referida diminuição. Este desequilíbrio, figura 3.3, não é normalizado pela administração crónica de levodopa o que resulta em novas alterações relacionadas com o desenvolvimento das discinesias (Linazasoro *et al.*, 2008).

Durante esta última década, têm sido testados em pacientes com DP diferentes compostos que atuam nos sistemas de neurotransmissão glutaminérgico, adenosinérgico, noradrenérgico, serotoninérgico, GABAérgico, canabinóide e opióide (Olson *et al.*, 1997; Verhagen Metman *et al.*, 1998; Henry *et al.*, 1999; Bibbiani *et al.*, 2001; Sieradzan *et al.*, 2001; Samadi *et al.*, 2003). Contudo, os resultados obtidos em humanos não são os esperados. A falta de eficácia preditiva dos modelos pré-clínicos e os efeitos colaterais são os maiores responsáveis pelo insucesso (Linazasoro *et al.*, 2008). Os tratamentos atuais disponíveis para a doença baseiam-se na terapia de reposição da dopamina, com agonistas dopaminérgicos, com inibidores da enzima monoamina oxidase e/ou com antagonistas de recetores colinérgicos destinados a repor

o equilíbrio neuroquímico responsável pela degeneração neuronal (Schapira *et al.*, 2006).

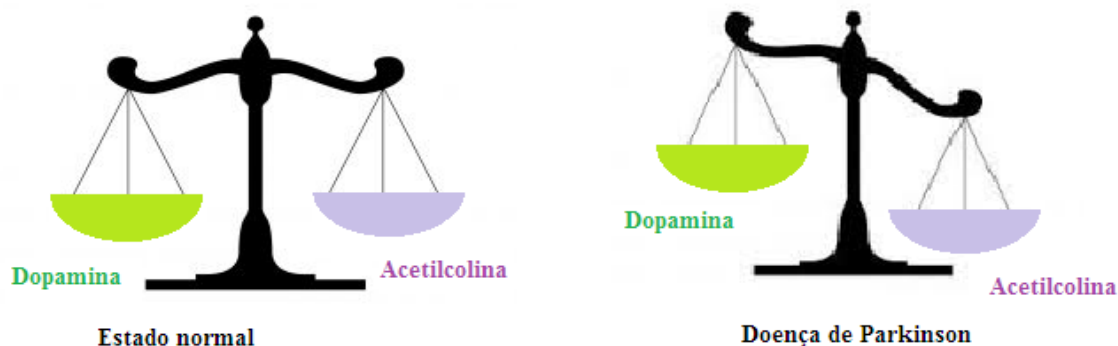


Figura 3.3 Relação entre a dopamina e acetilcolina em indivíduos normais e com doença de Parkinson (Adaptado da internet).

Contudo a progressão da doença não é inibida pelas terapias disponíveis e, com o avançar da doença, são necessárias maiores dosagens dos fármacos devido à tolerância (Dunnet, 1999). Novas estratégias de neuroprotecção sustentam a aplicação de sequestradores de espécies reativas do oxigénio, quelantes de metais de transição (por exemplo, ferro e cobre), anti-inflamatórios não esteroides, antioxidantes naturais (por exemplo, polifenóis) e drogas antiapoptóticas, em monoterapia ou como parte de uma formulação de uma associação antioxidante (Mandel, 2004). Além disso, a etiologia multifatorial da DP sugere o uso de drogas com múltiplos alvos terapêuticos, tais como os antagonistas da monoaminaoxidase (MAO) e do recetor A2 da adenosina.

3.3 Recetores da adenosina

A adenosina é um nucleosídeo formado pela união entre a base adenina e uma ribose. Existe naturalmente no organismo humano, na forma ATP e ADP, ligada ao metabolismo energético e na forma AMPc, onde atua nos mecanismos de sinalização intracelular, figura 3.4.

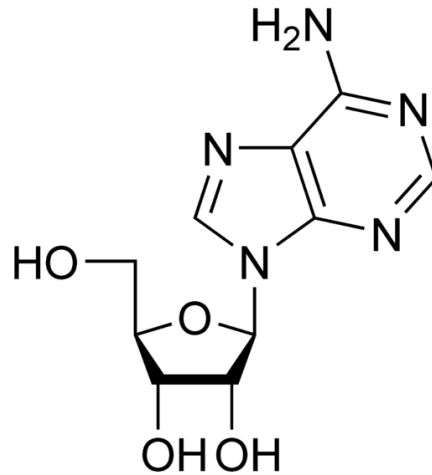


Figura 3.4 Fórmula estrutural da adenosina.
 (<http://pt.wikipedia.org/wiki/Adenosina#mediaviewer/File:Adenosin.svg>)

A adenosina atua via 4 subtipos de recetores já clonados: A1, A2a, A2b e A3, como mostra a figura 3.5.

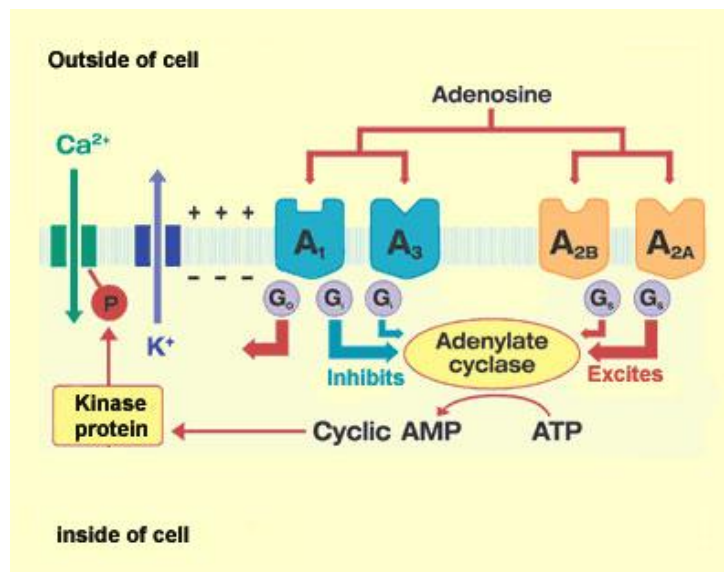


Figura 3.5 Recetores de adenosina.

Fonte: http://thebrain.mcgill.ca/flash/a/a_11/a_11_m/a_11_m_cyc/a_11_m_cyc.html

Estes recetores podem ser divididos em dois grupos: os recetores A1 e A3 (a azul) que inibem a enzima adenilciclase diminuindo os níveis intracelulares de AMPc, e os recetores A2a e A2b (a laranja) que ativam positivamente à enzima adenilciclase promovendo um aumento dos níveis intracelulares de AMPc (van Calker *et al.*, 1979; Zhou *et al.*, 1992; Pierce *et al.*, 1992). Os recetores A1 podem-se acoplar a outros tipos

de proteína G ativando outras vias de sinalização (Biber *et al.*, 1997; Abracchio *et al.*, 1995; Offermanns, 1995; Gao *et al.*, 1999).

Os diferentes tipos de recetores da adenosina estão distribuídos por todo o corpo humano incluindo o sistema nervoso central (SNC), figura 3.6. Os recetores A1 localizam-se tanto em neurónios quanto em astrócitos, microglia e oligodendrócitos (Biber *et al.*, 1997; Gebicke-Haerter *et al.*, 1996; Othman *et al.*, 2003) e nos terminais pré-sinápticos e nos pós-sinápticos (Tetzlaff *et al.*, 1987). A ativação do recetor A1 inibe a liberação de neurotransmissores por hiperpolarizar os terminais pré sinápticos através da abertura de canais de K^+ e pelo fecho de canais de Ca^{2+} . Assim sendo, a ativação de recetores A1 leva a um bloqueio da libertação de neurotransmissores, em particular do glutamato, da serotonina, da acetilcolina e da dopamina, produzindo um efeito anti convulsivante e neuroprotetor (Sakamoto *et al.*, 2004).

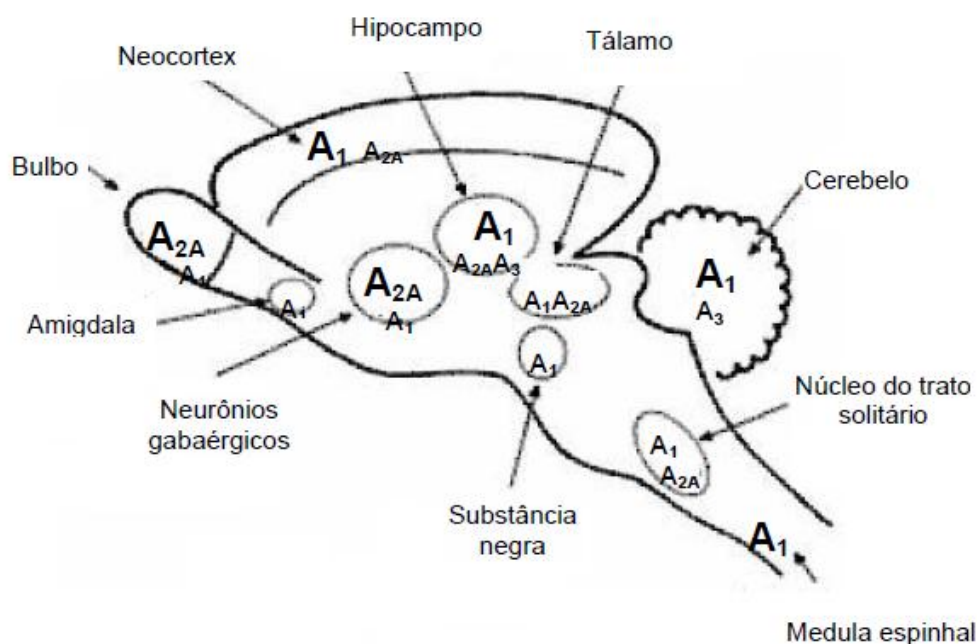


Figura 3.6 Distribuição dos recetores da adenosina nas diferentes regiões do SNC (Ribeiro *et al.*, 2003).

Os recetores A2 foram encontrados nos neurónios, em astrócitos e microglia, nos gânglios (predominantemente nas espinhas dendríticas) e nas regiões pós sinápticas (Li

et al., 2001; Hettinger *et al.*, 2001; Rodrigues *et al.*, 2005). Contudo, os recetores A2a do hipocampo estão mais localizados nas sinapses particularmente das regiões pré-sinápticas (Rebola *et al.*, 2005). Ao contrário do recetor A1, o recetor A2a regula a liberação de glutamato, acetilcolina, GABA e noradrenalina (Lopes *et al.*, 2002; Rebola *et al.*, 2002; Cunha *et al.*, 2000; Barraco *et al.*, 1995). A ativação dos recetores A2a, via proteína G estimulatória (Gs), ativa a adenil ciclase e aumenta as concentrações intracelulares de AMPc e conseqüentemente desencadeia a liberação de neurotransmissores, que provavelmente decorre da ativação de canais de cálcio e da proteína cinase A (Xu *et al.*, 2005). Mecanismos de transdução de sinal independentes de AMPc, como a ativação da fosfolipase C, parecem estar envolvidos na sinalização de neurónios gabaérgicos e colinérgicos do estriado (Fredholm *et al.*, 2007).

O recetor A3 é encontrado em neurónios, astrócitos e microglia (Wittendorp *et al.*, 2004; Hammarberg *et al.*, 2003)

Os recetores dopaminérgicos D1 e D2 são os principais reguladores da função estriatal e os recetores da adenosina A1 e A2a são os principais moduladores dessa via de sinalização, figura 3.7. Existem dois tipos de interações entre recetores da adenosina e os recetores dopaminérgicos no gânglio basal: a interação antagónica entre recetores A1/D1 nos neurónios gabaminérgicos da via estriatonigral-estriatoendopeduncular (via direta) e a interação entre os recetores A2a/D2 nos neurónios gabaminérgicos da via estriato-palidal (via indireta). A via direta promove ativação motora, enquanto a via indireta promove inibição motora (Fuxe *et al.*, 2007).

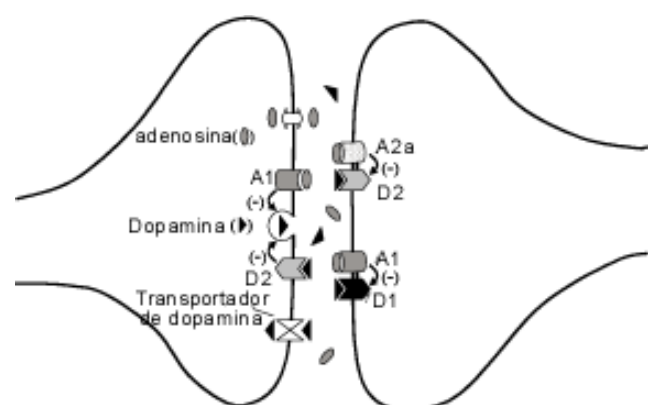


Figura 3.7 Interação adenosina-dopamina

(<http://www.hcnet.usp.br/ipq/revista/vol28/n3/artigos/art160.htm>).

Os estudos comportamentais em modelos da doença de Parkinson utilizando antagonistas não seletivos da adenosina, tais como a cafeína e a teofilina associados a L-DOPA e agonistas dopaminérgicos, originaram um aumento da atividade motora produzida pelas drogas dopaminérgicas o que pode ser explicado pelas interações antagônicas entre recetores da adenosina e dopaminérgicos (Fuxe *et al.*, 1974).

Os recetores A2a estão estreitamente relacionados com os recetores dopaminérgicos D2. A estimulação dos recetores A2a diminui a afinidade para os recetores D2 e diminui a atividade da enzima adenilato ciclase. Diminuindo os níveis de AMPc, ativa os canais de K⁺ e reduz a entrada de iões Ca²⁺, promovendo efeitos opostos aos da ativação dos recetores D2, nomeadamente a coordenação motora.

Os antagonistas do recetor A2a apresentam propriedades anti-parkinsonianas, melhorando a atividade motora (Lewitt *et al.*, 2008).

Por outro lado, a ativação de recetores A2a pode aumentar a liberação do glutamato e, nesse caso, pode contribuir para a excitotoxicidade neuronal (Li *et al.*, 2001; Platt, 2007).

Diferentes estudos enfatizam que os antagonistas A2a como agentes neuroprotetores e consequentemente promissores no tratamento da Doença de Parkinson.

3.4 Estudos da ação inibidora das cromonasfenilcarboxamidas para os recetores da adenosina

Uma análise comparativa dos estudos da interação para algumas cromonas carboxamidas com os recetores da adenosina revelou a existência das mesmas tendências para as diferentes cromonas, nomeadamente uma afinidade e seletividade mais elevada para o subtipo A3 dos recetores da adenosina. A seletividade é mais evidente para as cromonas-2-carboxamidas.

Os resultados obtidos nestes estudos permitem concluir que as cromonas derivadas de ácidos carboxílicos não apresentam afinidade significativa para todos os recetores da adenosina e que a introdução de substituintes do tipo fenilcarboxamida resultam em compostos com diferente seletividade e afinidade em relação aos recetores da adenosina (A1, A2a e A3). Em geral, a introdução do substituinte fenilcarboxamida na posição 2, figura 3.8, com ou sem substituintes no anel aromático resulta em compostos que ligam-

se mais seletivamente ao recetor A3. Este é o caso, por exemplo, da 3',4'-dimetoxifenilcarboxamida substituída na posição 3. No entanto, pode-se salientar que, quando o substituinte fenilcarboxamida está localizado na posição 3, os compostos que apresentam alguma afinidade, são geralmente mais potentes.

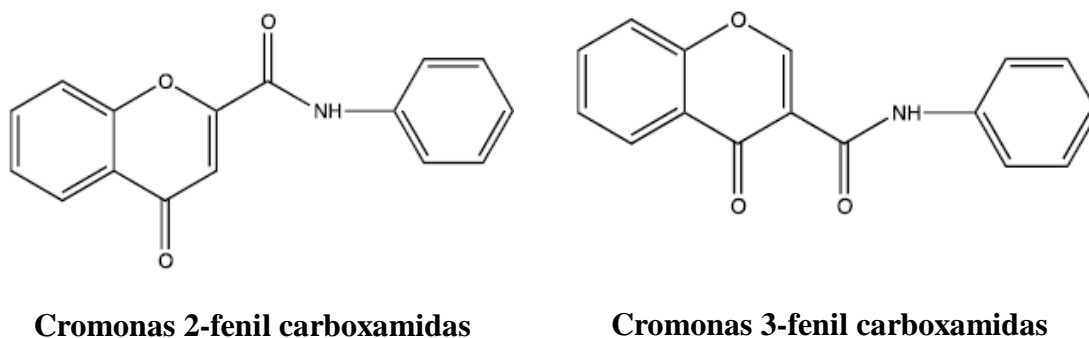


Figura 3.8 Estrutura da 2-fenilcromonascarboxamidas e da 3-fenilcromonascarboxamidas.

A presença de grupos atratores de elétrons provocam diminuição ou perda da afinidade de ligação da cromona para com o recetor A3. No entanto, a presença de cloro ou nitro na posição *para* da cromona-3-fenilcarboxamidas aumenta a afinidade desta para os recetores A2a e A3. A presença de grupos doadores de elétrons no anel aromático das cromonacarboxamidas produz efeitos divergentes. As cromona-2-fenilcarboxamidas com grupos doadores de elétrons aumentam a afinidade para o recetor A3, sendo maior o aumento da potência quando da introdução de um grupo metoxi. Já a introdução do grupo hidroxilo na posição *para* do anel aromático, aumenta a afinidade da cromona para o recetor A2, apesar da diminuição da seletividade relativa.

Em contraste, as cromonas-3-fenilcarboxamidas com grupos doadores, mostram uma melhoria geral das suas potências de ligação e afinidade para todos os recetores, com a exceção para a cromona-3-(4'-metoxifenil) carboxamida que apenas apresenta aumento da afinidade de ligação para o recetor A3, figura 3.9 .

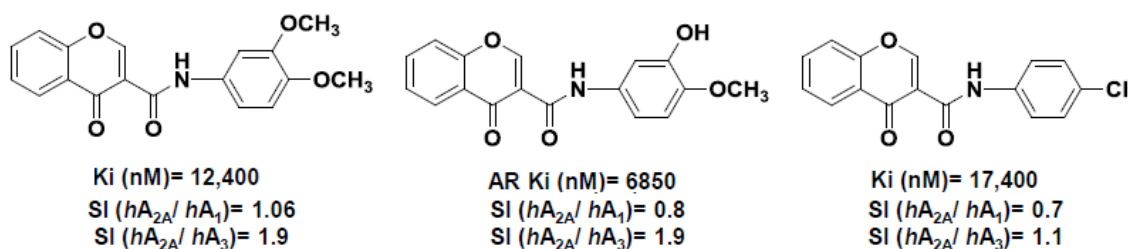


Figura 3.9 Estruturas de 3-fenilcromonascarboxamidas com afinidade para o recetor A2a da adenosina, Ki-constante de inibição, SI-razão de inibição entre o recetor A2a e A1. (Milhazes, 2007).

Os resultados até então realizados, permitem concluir que este tipo de cromonas podem funcionar como um ponto de partida valioso para o desenvolvimento de novos ligandos, para os recetores da adenosina mais seletivos e específicos.

3.5 Enzimas MAO-A e MAO-B

As MAO A e B são enzimas localizadas na membrana mitocondrial externa com a função de catalisar a reação de desaminação das aminas biogénicas (neurotransmissores) e xenobióticos, de acordo com a figura 3.10.

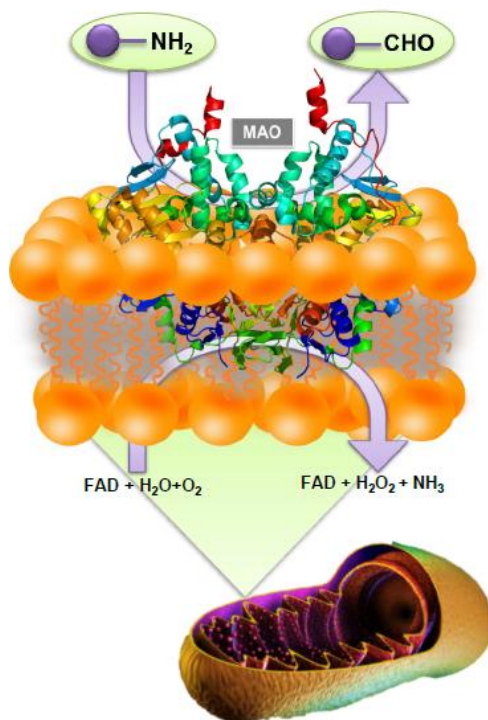
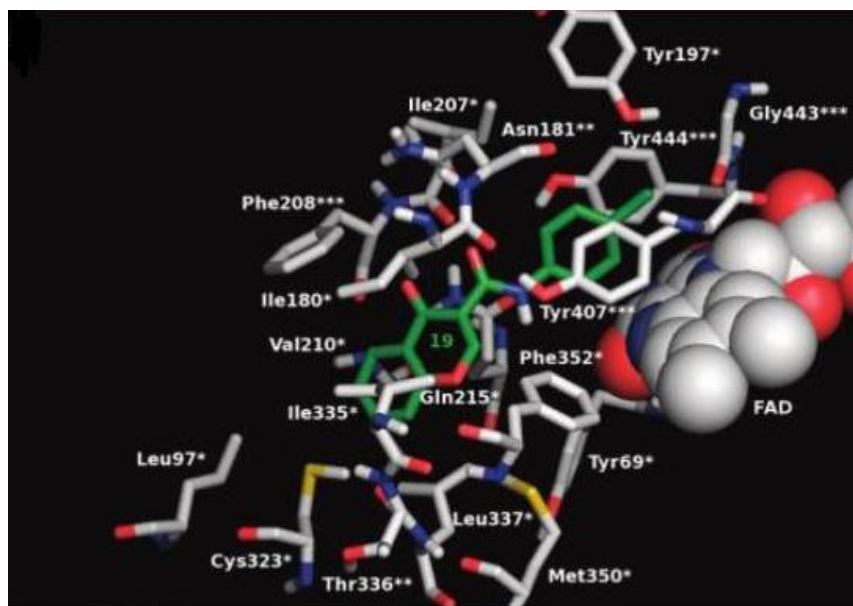


Figura 3.10 Desaminação das aminas biogénicas catalisada pela MAO (Milhazes, 2007).

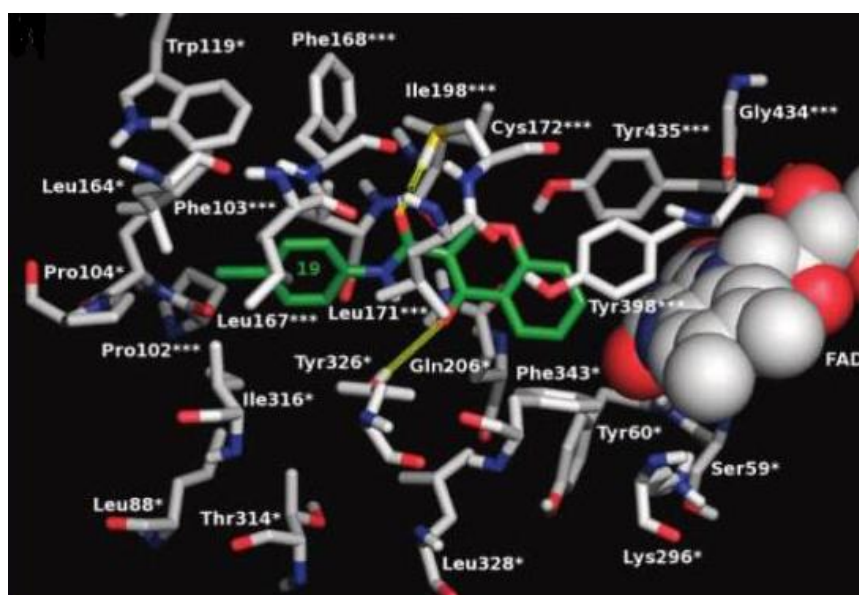
As MAO possuem na sua constituição um dinucleotídeo de flavina e adenina (FAD) ligado covalentemente a um resíduo de cisteína por uma ligação $\delta\alpha$ -(S-cisteinil)-riboflavina, figura 3.11. A inibição das MAO aumenta o nível de neurotransmissores no sistema nervoso central (Cardozo, 2013). As MAO dividem-se em duas isoformas a MAO-A e a MAO-B, cujas sequências de aminoácidos são até 70% idênticas, embora cada uma tenha substratos únicos e inibidores específicos (Cardozo, 2013). A MAO-A humana localiza-se, preferencialmente, no fígado e é distribuída de maneira dispersa no cérebro, além de estar presente também na placenta. A MAO-B humana localiza-se especialmente nas plaquetas, linfócitos, fígado e também se concentra em algumas regiões específicas do cérebro (Cardozo, 2013).

Os principais neurotransmissores que atuam como substratos da MAO são a epinefrina (adrenalina) que tem ação sobre o coração e o músculo liso vascular, sendo um poderoso estimulante cardíaco, a norepinefrina (noradrenalina) que age periféricamente na constrição dos vasos sanguíneos, causando aumento da pressão arterial e no sistema nervoso central onde regula as emoções, relacionando-se com manifestações de agressividade e depressão. A dopamina é o precursor metabólico imediato da norepinefrina e da epinefrina e, além disso, é um neurotransmissor central, particularmente importante na regulação do movimento. A serotonina (5-HT) é um regulador do músculo liso do sistema cardiovascular e do trato gastrointestinal que regula a dor e o humor (Cardozo, 2013).

Os principais neurotransmissores que atuam como substratos da MAO são a epinefrina (adrenalina) que tem ação sobre o coração e o músculo liso vascular, sendo um poderoso estimulante cardíaco, a norepinefrina (noradrenalina) que age periféricamente na constrição dos vasos sanguíneos, causando aumento da pressão arterial e no sistema nervoso central onde regula as emoções, relacionando-se com manifestações de agressividade e depressão. A dopamina é o precursor metabólico imediato da norepinefrina e da epinefrina e, além disso, é um neurotransmissor central, particularmente importante na regulação do movimento. A serotonina (5-HT) é um regulador do músculo liso do sistema cardiovascular e do trato gastrointestinal que regula a dor e o humor (Cardozo, 2013).



MAO-A



MAO-B

Figura 3.11 Comparação das duas isoformas de MAO (Gaspar, 2011).

A MAO-A metaboliza principalmente a serotonina (5-HT), a epinefrina e a norepinefrina, enquanto que a MAO-B tem como substratos preferenciais a feniletilamina e a benzilamina. A MAO-B humana é a responsável pelo metabolismo oxidativo da dopamina, assim sendo, os inibidores da isoforma MAO-B, podem atuar como neuroprotetores, aliviando os sintomas de pacientes com as doenças de Parkinson

ou de Alzheimer e os inibidores seletivos da MAO-A podem ser usados para o tratamento de depressão relacionada com *déficit* de serotonina e como agentes cardioprotetores, uma vez que a MAO-A está associada com a degeneração de células cardíacas.

Os inibidores inespecíficos da MAO podem causar efeitos indesejáveis, porque potencializam a ação de outras monoaminas através da inibição do seu metabolismo periférico (Cardozo, 2013).

A formação de subprodutos tóxicos do metabolismo oxidativo, por exemplo o peróxido de hidrogénio ou radicais de oxigénio, é um dos fatores que podem levar à degradação neuronal, uma das possíveis causas de distúrbios neurodegenerativos como as doenças de Parkinson e de Alzheimer. Estes produtos do metabolismo oxidativo, se não forem devidamente excretados, podem causar danos ao nível do DNA e das membranas celulares, com consequente a morte neuronal, também designada por stress oxidativo (Cardozo, 2013).

Os maiores desafios para estudos, decorrem da dificuldade de obtenção de fármacos seletivos para uma das isoformas reversíveis permitindo a cura das doenças neurodegenerativas e não o alívio dos sintomas provocados por estas doenças.

3.6 Estudos da ação inibidora da MAO-B pelas 3-fenilcromonascarboxamidas

A introdução da L-deprenil em 1975 como um medicamento anti parkinsoniano inibidor da MAO-B impulsionou os estudos da procura de moléculas inibidoras desta enzima (MAO). A L-deprenil, figura 3.9, é um inibidor seletivo e irreversível da monoamina oxidase tipo B (MAO-B), contudo, em doses elevadas perde a sua especificidade e inibe concomitantemente a MAO-A. A inibição da MAO-B reduz a degradação da dopamina, promove a ação dos neurónios dopaminérgicos e protege os neurónios contra os radicais livres e o stress oxidativo. Em 2006 foi aprovada outro inibidor da MAO-B a rasagilina, figura 3.12, para monoterapia na doença de Parkinson inicial ou como terapia adjuvante nos casos mais avançados. Estes dois inibidores seletivos da MAO-B são atualmente utilizados, em monoterapia ou em terapia de combinação com levodopa, no tratamento sintomático da doença de Parkinson.

Apesar de ambas as drogas serem inibidores seletivos altamente potentes da MAO-B são inibidores irreversíveis da desativação permanente da enzima MAO-B, potencializando os efeitos secundários, principalmente devido a interações com fármacos simpaticomiméticos e com alimentos contendo tiramina, o que resulta em reações hipertensivas severas, insônia, irritabilidade, agitação, hipomania, supressão do sono REM, bem como disfunções cardiovasculares (hipotensão ortostática) ou distúrbios sexuais. Assim, o desenvolvimento de novos IMAO tem como desafio a busca de inibidores mais potentes e com menos efeitos laterais (Follmer, 2013).

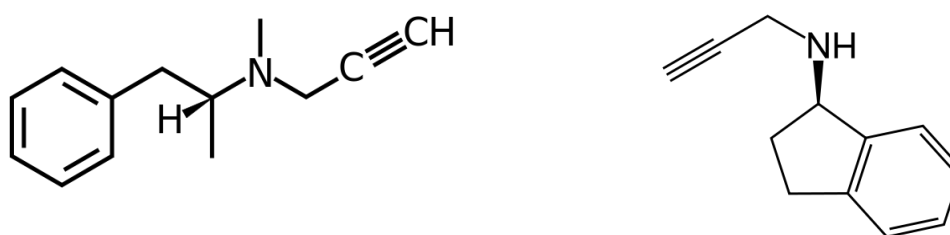


Figura 3.12 Estruturas da L-deprenil da rasagilina.
(<http://sr.wikipedia.org/wiki/D-Deprenil#mediaviewer/File:D-Deprenyl.svg>,
http://es.wikipedia.org/wiki/Rasagilina#mediaviewer/File:Rasagiline_skeletal.svg)

Para validar a estrutura cromonas como suporte para o desenvolvimento de novos inibidores MAO-B, as estruturas cristalográficas da MAO-B e MAO-A são ferramentas essenciais para compreender e reconhecer os possíveis ligantes, para ambas as isoformas (D'Amelio, 2009; Devine, 20011; Bajaj, 2010).

Para além das diferenças pontuais nas sequências de aminoácidos estas isoformas apresentam diferenças estruturais no local ativo, nomeadamente a cavidade bipartida da MAO-B *versus* a cavidade monopartida da MAO-A (Fiala, 2010). De facto, demonstrou-se que o sítio ativo da MAO-B é formada por duas cavidades hidrofóbicas, a cavidade catalítica e a cavidade de entrada (D'Amelio, 2009). Estas duas bolsas são separados por quatro resíduos de aminoácidos, nomeadamente, a Tyr326, Ile199, Phe168 e a Leu171, na MAO-A os aminoácidos Ile199 e Tyr326 são substituídas no pela Phe208 e Ile335 respetivamente (D'Amelio, 2009; Devine, 20011; Fiala, 2010). Os estudos preveem que as interações com Ile199 e Tyr326 são fundamentais para o reconhecimento da MAO-B (Tianhong, 2003).

Os estudos REA revelam a existência de diferentes interações entre as cromonas e o sítio ativo das isoformas da MAO, nomeadamente na ligação de hidrogénio que se estabelece entre a cromona 3-carboxílico e a Tyr 326 da MAO-B, figura 3.13.

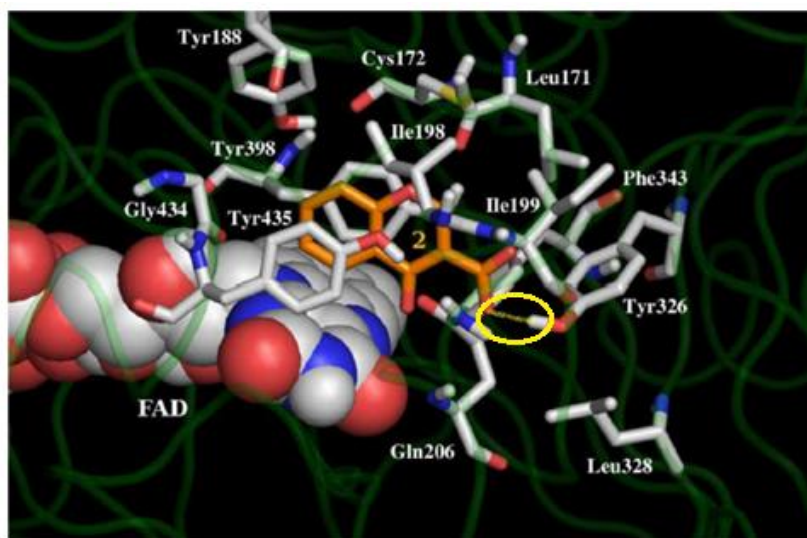


Figura 3.13 Interação da cromona com a MAO-B (Alcaro, 2010).

Os estudos preliminares de REA permitem concluir que:

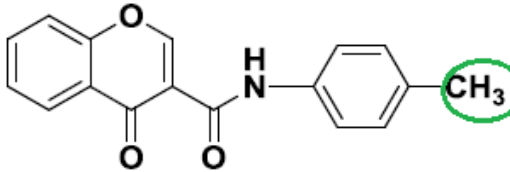
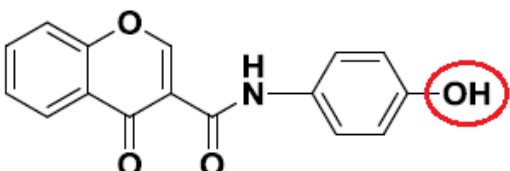
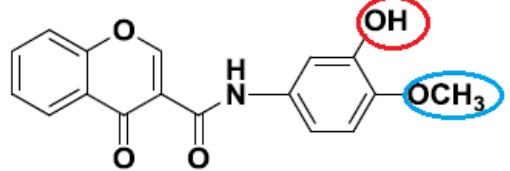
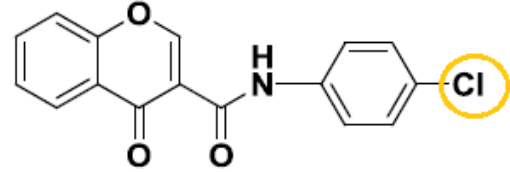
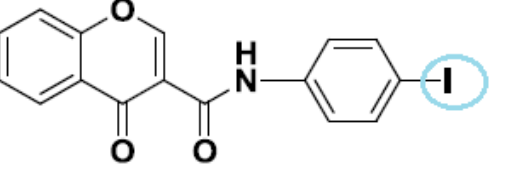
- a troca do grupo funcional ácido carboxílico por um éster ou uma função álcool, dá origem a compostos inativos (Helguera, 2013).;
- quando o ácido carboxílico é substituído por uma função arilamida ou um alquilo/cicloalquilo na posição 3 do anel de cromona, origina vários compostos ativos com diferentes atividades inibidoras verificando-se que as cromonascarboxamidas de alquilo são menos ativas do que as de arilo (Gaspar, 2011).
- a presença de um anel de fenilo localizado na cadeia lateral da 3-carboxamida aumenta potência de inibição para a MAO-B (Gaspar, 2011).
- quando a substituição é feita na da posição 3 do esqueleto cromona verifica-se aumento da atividade inibidora destas cromonas para a MAO-B, enquanto que as correspondentes isoméricas cromonas-2-carboxamidas são inativas para ambas as isoformas da MAO.

- a função amida das cromonacarboxamidas pode desempenhar um papel fundamental na interação destas com o centro ativo da MAO por estabelecimento de uma ligação de hidrogénio com o local ativo da enzima.
- todos os derivados de cromona-3-carboxamida estudados apresentam uma maior atividade e a seletividade de em relação à isoforma MAO-B (Gaspar, 2011).
- a potência e a seletividade da cromona-3-carboxamidas são modulados por substituintes localizados na posição *para* do anel aromático exocíclica, tabela 3.1.
- as cromona-3-carboxamidas da tabela 3.1 comportam-se como inibidores da MAO-B de um forma quase-reversível (Gaspar, 2011).

Os estudos teóricos da interação deste tipo de cromona com a MAO-B demonstraram que as cromonas com substituinte *N*-fenil, *N*-ciclo-propil e *N*-4'-clorofenil, tem interações semelhantes (Gomes, 2010; Gaspar, A. 2011). O modelo proposto para a interação inibitória propõe que a cadeia lateral da carboxamida se localize na direção do cofator FAD e a do anel β -pirona na bolsa de entrada da MAO-B, segundo a figura 3.14.

Os compostos apresentam uma interação da ligação de hidrogénio com resíduo Tyr326 da MAO envolvendo o éter presente no β -pirona e o oxigénio do carbonilo da carboxamida. Também se observou correlação entre as cromonas com o resíduo do aminoácido Cys172 presente na fenda de entrada da MAO-B e interações do cadeia lateral hidrofóbica da cromona com a Ile199, Pro102, Phe103, e Leu167. A interação da cromona com os aminoácidos Ile199, Tyr326 pode explicar a sua seletividade para isoforma MAO-B, uma vez que estes aminoácidos não existem na MAO-A (Gaspar, 2011).

Tabela 3.1 Fórmula estrutural e atividade inibitória para as isoformas da MAO para cinco cromonas-3-carboxamidas.

COMPOSTO	IC ₅₀ MAO-B(μM)	IC ₅₀ MAO-A/ IC ₅₀ MAO-B
	0,068±0,003	>1471
	0,064±0,0054	74
	0,0674±0,0032	110
	0,063±0,0042	1585
	0,069±0,0042	1449

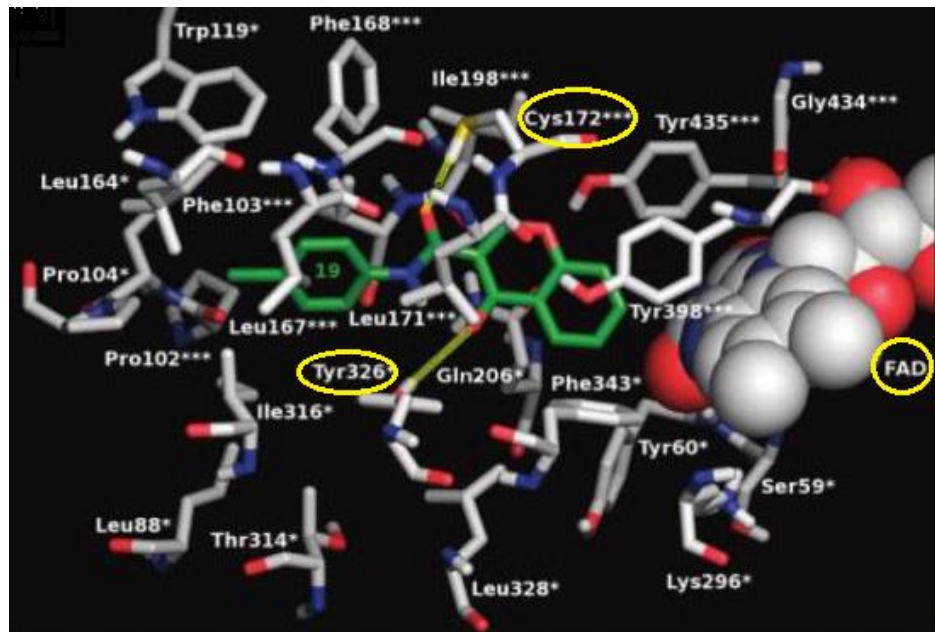


Figura 3.14 Tipo de interação da N-(4-(clorofenil)-cromona-3-carboxamida com a MAO-B (Gaspar, 2011).

Os estudos desenvolvidos permitem concluir que a cromona-3-carboxamida é uma estrutura privilegiada para o desenvolvimento de novos inibidores da MAO-B mais potentes, seletivos e reversíveis evitando desta forma os efeitos secundários dos inibidores da MAO-B usados atualmente na terapia da Doença de Parkinson.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A descoberta e o desenvolvimento de novas moléculas com potencial terapêutico é um trabalho longo e árduo que se inicia com a descoberta de um farmacóforo.

As cromonas e seus derivados são compostos heterocíclicos abrangentes apresentando uma variedade de propriedades farmacológicas. A alteração da sua estrutura oferece um elevado grau de diversidade, mostrando-se bastante útil na descoberta de novos agentes terapêuticos.

As cromonas são um farmacóforo promissor no desenvolvimento de novos compostos para várias doenças, nomeadamente, para a doença de Parkinson funcionando como inibidores da MAO-B e do recetor A_{2a} da adenosina. A sua obtenção é bastante fácil e, em especial as suas capacidades versáteis de ligação aos recetores, fazem destas uma estrutura privilegiada.

Futuramente, será importante analisar as várias modificações moleculares a fim de atingir a REA que permitam otimizar os compostos mencionados, estudar a farmacocinéticas dos mesmos (por exemplo, solubilidade, permeabilidade, estabilidade metabólica) permitindo, desta forma, aumentar a potência bem como a seletividade das cromonas para os recetores da adenosina e para a MAO-B.

Os estudos mencionados neste trabalho abrem um novo caminho para a obtenção de inibidores altamente potentes e seletivos da MAO-B e do recetor da dopamina de modo que no futuro, esta doença tão limitativa tenha cura, pois a terapia atualmente disponível somente retarda a progressão da mesma.

BIBLIOGRAFIA

- Abbracchio, M. P. *et al.* (1995). Gprotein-dependent activation of phospholipase C by adenosine A3 receptors in rat brain. *Mol. Pharmacol.*, 48, pp. 1038-1045.
- Alcaro, S. *et al.* (2010). Chromone-2-and-3-carboxylic acids inhibit differently monoamine oxidases A and B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 20(9), pp. 2709-2012.
- Bajaj, A.; Driver, J.; Schernhammer, E. (2010). Parkinson's disease and cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *CCC* 2010, 21(5), pp. 697-707.
- Barraco, R. A. *et al.* (1995). Evidence for presynaptic adenosine A2a receptors associated with norepinephrine release and their desensitization in the rat nucleus tractus solitarius. *J. Neurochem.*, 65, pp. 1604-1611.
- Barrio, J. R.; Huang, S. C.; Phelps, M. E. (1997). Biological imaging and the molecular basis of dopaminergic diseases. *Biochem Pharmacol.* 54(3), pp. 341-348.
- Bernstein, P. R. (1998). Chemistry and structure-activity relationships of leukotriene receptor antagonists. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 157 (6), pp. 220-226.
- Bibbiani, F.; Oh, J. D.; Chase, T. N. (2001). Serotonin 5-HT1A agonist improves motor complications in rodent and primate parkinsonian models. *Neurology.* 57(10), pp. 1829-1834.
- Biber, K. *et al.* (1997). Adenosine A1 receptor-mediated activation of phospholipase C in cultured astrocytes depends on the level of receptor expression. *J. Neurosci.*, 17, pp. 4956-4964.

- Blandini, F. *et al.* (2000). Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol.* 62(1), pp. 63-88.
- Brown, F. J. *et al.* (1989). Hydroxyacetophenone-Derived Antagonists of the Peptidoleukotrienes. *J. Med. Chem.*, 1989, 32(4), pp. 807-826.
- Brühlmann, C *et al.* (2001). Coumarins derivatives as dual inhibitors of acetylcholinesterase and monoamine oxidase. *J. Med. Chem.*, 44(19), pp. 3195-3198.
- Budzisz, E. *et al.* (2002). A new series of 2-substituted 3-phosphonic derivatives of chromone. Part II. Synthesis, in vitro alkylating and in vivo antitumour activity. *New J. Chem.*, 26(12), pp. 1799-1804.
- Cardozo, M. *et al.* (2013). Aminas Biogênicas: Um Problema de Saúde Pública. *Rev. Virtual Quim.*, 5 (2), pp. 149-168.
- Chohan, Z. H. *et al.* (2006). Antibacterial, antifungal and cytotoxic properties of some sulfonamide-derived chromones. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 21(2), pp. 173-177.
- Cunha, R. A.; Ribeiro, J. A. (2000). Purinergic modulation of [3H]GABA release from rat hippocampal nerve terminals. *Neuropharmacology*, 39, pp. 1156-1167.
- D'Amelio, M. (2009). Parkinson's Disease and Cancer. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1155(1), pp. 324-334.
- Desideri, N. *et al.* (2000). Synthesis and anti-rhinovirus activity of 2-styrylchromones. *Antiviral Chem. Chemother.*, 11(6), pp. 373-381.
- Devine, M. J.; Plun-Favreau, H.; Wood, N. W. (2011). Parkinson's disease and cancer: two wars, one front. *Nat. Rev. Cancer*, 11(11), pp. 812-823.
- Dexter, D. T. *et al.* (1989). Increased nigral iron content and alterations in other metal ions occurring in brain in Parkinson's disease. *J Neurochem.*, 52(6), pp. 1830-1836.
- Dunnett, S. B.; Bjorklund, A. (1999). Prospects for new restorative and neuroprotective treatments in Parkinson's disease. *Nature*. 399(6738 Suppl), pp. A32-9.

- Erickson, R. H. *et al.* (1992). Aminoalkoxy)Chromones - Selective Sigma Receptor Ligands. *J. Med. Chem.*, 35(9), pp. 1526-1535.
- Fiala, K. H.; Whetteckey, J.; Manyam, B. V. (2003). Malignant melanoma and levodopa in Parkinson's disease: causality or coincidence?. *Parkinsonism Relat. Disord.*, 9(6), pp. 321-327.
- Fillion, E. *et al.* (2006). Yb(OTf)₃-catalyzed reactions of 5-alkylidene Meldrum's acids with phenols: one-pot assembly of 3,4-dihydrocoumarins, 4-chromanones, coumarins, and chromones. *J. Org. Chem.*, 71 (1), pp. 409-412.
- Follmer, C; Netto, H. J. C. B. (2013). Fármacos multifuncionais : monoamina oxidase e a sinucleína como alvos terapêuticos na doença de Parkinson. *Quím. Nova*, 36 (2), pp. 306-313.
- Forghieri M. *et al.* (2009). Synthesis, activity and molecular modeling of a new series of chromones as low molecular weight protein tyrosine phosphatase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* 17(7), pp. 2658-2672.
- Fredholm, B. B. *et al.* (2007). Aspects of general biologic of adenosine A_{2a} signaling. *Prog. Neurobiol.*, 83, pp. 263-276.
- Fukae, J.; Mizuno, Y.; Hattori, N. (2007). Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Mitochondrion.*, 7(1-2), pp. 58-62.
- Fuxe, K. *et al.* (2007). Adenosine A_{2A} receptors, dopamine D₂ receptors and their interactions in Parkinson's disease, *Mov. Disord.*, 22, pp. 1990-2017.
- Fuxe, K., Ugerstedt, U. (1974). Action of caffeine and theophyllamine on supersensitive dopamine receptors: considerable enhancement of receptor response to treatment with DOPA and dopamine receptor agonists. *Med. Biol.*, 52, pp. 48-54.
- Ganguly, A. K. *et al.* (2005). Synthesis and properties of 3-acyl-[gamma]-pyrones, a novel class of flavones and chromones. *Tetrahedron Lett.* 46 (23), pp. 4119-4121.
- Gao, Z., Chen, T., Weber, M. J.; Linden, J. (1999). A₂ adenosine and P₂Y₂ receptors stimulate mitogen-activated protein kinase embryonic kidney-293 cells: cross-talk between cyclic AMP and protein kinase C pathways. *J. Biol. Chem.*, 274, pp. 5972-5980.

- Gaspar, A. *et al.* (2011). Chromone, a Privileged Scaffold for the Development of Monoamine Oxidase Inhibitors. *Journal Medicinal Chemistry*, 54, pp. 5165–5173
- Gaspar, A. *et al.* (2011). Towards the Discovery of a Novel Class of Monoamine Oxidase Inhibitors: Structure–Property–Activity and Docking Studies on Chromone Amides. *Chem. Med. Chem.*, 6, pp. 628–632.
- Gaspar, A. *et al.* (2014) Chromone: A Valid Scaffold in Medicinal Chemistry. *Chem. Rev.*, 114, pp. 4960–4992.
- Gautam R. *et al.* (2011). Synthesis, biological evaluation and molecular docking studies of stellatin derivatives as cyclooxygenase (COX-1, COX-2) inhibitors and anti-inflammatory agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 21(6), pp. 1612-1616.
- Gebicke-Haerter, P. J. *et al.* (1996). Bothadenosine A1- and A2-receptors are required to stimulate microglialproliferation. *Neurochem. Int.*, 29, pp. 37-42.
- Giasson, B. I. *et al.* (2002).The relationship between oxidative/nitrative stress and pathological inclusions in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Free Radic Biol Med.*, 32(12), pp. 1264-1275.
- Gomes, A. *et al.* (2010). Biological activities of 2-styrylchromones. *Mini Rev Med Chem.*, 10(1), pp. 1-7.
- Gomes, O. *et al.* (2009). Synthesis and antioxidant properties of new chromone derivatives, *Bioorgan.Med.Chem.* 17, pp. 7218-7226.
- Hadjeri, M., *et al.* (2003). Modulation of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by flavonoid derivatives and analogues. *J. Med. Chem.*, 46 (11), pp. 2125-2131.
- Hald, A.; Lotharius, J. (2005). Oxidative stress and inflammation in Parkinson's disease: is there a causal link? *Exp Neurol.*, 193(2), pp. 279- 290.
- Hammarberg, C., Schulte, G; Fredholm, B. B. (2003). Evidence for functional adenosine A3 receptors in microglia cells. *J. Neurochem.*, 86, pp. 1051-1054.
- Heim, K. E; Tagliaferro, A. R.; Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nut .Biochem.*, 13, pp. 572-584.

Helguera, H. *et al.* (2013). Combining QSAR classification models for predictive modeling of human monoamine oxidase inhibitor. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 59, pp. 75-90.

Henchcliffe, C.; Beal, M. F. (2008). Mitochondrial biology and oxidative stress in Parkinson disease pathogenesis. *Nat Clin Pract Neurol.*,4(11), pp. 600-609.

Henry, B.; Crossman, A. R.; Brotchie, J. M.(1999). Effect of repeated L-DOPA, bromocriptine, or lisuride administration on preproenkephalin-A and preproenkephalin-B mRNA levels in the striatum of the 6-hydroxydopamine-lesioned rat. *Exp Neurol.*, 155(2), pp. 204-20.

Hettinger, B. D. *et al.* (2001). Ultrastructural localization of adenosine A2 a receptor suggests multiprecellular sites for modulation of GABAergic neurons in rat striatum. *J. Comp. Neurol.*, 431, pp. 331-346.

Inaba, T., *et al.* (2000). Synthesis and Antiinflammatory Activity of 7-Methanesulfonylamino-6-phenoxychromones. Antiarthritic Effect of the 3-FormylaminoCompound (T-614) in Chronic Inflammatory Disease Models. *Chem. Pharm. Bull.*, 48(1), pp. 131-139.

Ishiki, H. M.; Donate, P. M.; Galembeck, S. E. (1998). Electronic structure of chromone and its hydroxylated derivatives on positions 2 and 3. *J. of Mol. Struct. Theochem.*, 423 (3), pp. 235-243.

Junior, A. J. (2001) *Síntese e avaliação biológica de uma coleção de flavonoides*. Tese de Doutorado, Universidade de São Carlos, São Paulo.

Kaye, P. T. *et al.* (2004). Novel Heterocyclic Analogues of the HIV-1 Protease Inhibitor, Ritonavir. *Synth. Commun.*, 34(14), pp. 2575-2589.

Khan, K. M. *et al.* (2009). Schiff bases of 3-formylchromone as thymidine phosphorylase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* 17(8), pp. 2983-2988.

Legoabe, L. J.; Petzer, A.; Petzer, J. P. (2012). Selected chromone derivatives as inhibitors of monoamine oxidase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22(17), pp. 5480-5484.

Lewitt, P. A. *et al.* (2008). Adenosine A2A receptor antagonist istradefylline (KW-6002) reduces "off" time in Parkinson disease a double-blind, randomized,

multicenter clinical trial (6002- US-005). 6002-US-005 Study Group. *Ann, Neurol.*, 63. pp. 295-302.

Li, X. *et al.* (2001). Adenosine enhances glial glutamate efflux via A2a adenosine receptors. *Life Sci.*, 68, pp. 1343-1350.

Linazasoro, G. *et al.* (2008). Pharmacological treatment of Parkinson's disease: life beyond dopamine D2/D3 receptors? *J Neural Transm.*, 115(3), pp. 431-41.

Lindner, M. D. *et al.* (1999). Incomplete nigrostriatal dopaminergic cell loss and partial reductions in striatal dopamine produce akinesia, rigidity, tremor and cognitive deficits in middle-aged rats. *Behav Brain Res.* 102(1-2), pp. 1-16.

Lopes, L. V. *et al.* (2002). Adenosine A2a receptor facilitation of hippocampal synaptic transmission is dependent on the tonic A1 receptor inhibition. *Neuroscience.*, 112, pp. 319-329.

Lopez-Lazaro, M. (2002). Flavonoids as anticancer agents: structure-activity relationship study. *Curr. Med. Chem. AnticancerAgents.*, 2, pp. 691-714.

Machado, N. F. L. (2012). *Chromone Derivatives as Antioxidant Agents The Structural Variable*. Tese de Doutoramento ,Universidade de Coimbra, Coimbra.

Machado, N. F.; Marques M. P. (2010). A conformational study of hydroxyflavones by vibrational spectroscopy coupled to DFT calculations. *Curr.Biact.Comp.*, 6, pp. 76-80.

Mandel, S.; Youdim, M. B. (2004). Catechin polyphenols: neurodegeneration and neuroprotection in neurodegenerative diseases. *Free Radic Biol Med.*, 37(3), pp. 304-317.

Meissner, W. *et al.* (2004). Neuroprotective strategies for Parkinson's disease: conceptual limits of animal models and clinical trials. *Trends Pharmacol Sci.* 25(5), pp. 249-253.

Milhazes, N. (2007). Obtenção e Análise de Metabolitos e Intermediários de Síntese - Estudos de Correlação entre Estrutura, Propriedades Físico-Químicas e Actividade Biológica. Tese de Doutoramento. FCUP.

Motai, T., Kitanaka, S. (2005). Sesquiterpene chromones from *Ferula fukanensis* and their nitric oxide production inhibitory effects *J. Nat. Prod.* 68, pp. 1732-1735.

- Netzer N. *et al.* (2012). The actual role of sodium cromoglycate in the treatment of asthma a critical review. *Sleep Breath.* pp. 1-6.
- Nohara, A. *et al.* (1977) Studies on Antianaphylactic Agents -5- Synthesis of 3-(1H-Tetrazol-5-yl)Chromones, a New Series of Antiallergic Substances. *J. Med. Chem.*, 20(1), pp. 141-145.
- Offermanns. S, S.; Simon, M. I. (1995). G alpha 15 and G alpha 16 couple a wide variety of receptors to phospholipase C. *J. Biol. Chem.*, 270, pp. 15175-15180.
- Olson, W. L. *et al.* (1997). Gabapentin for parkinsonism: a double-blind, placebo-controlled, crossover trial. *Am J Med.* 102(1), pp. 60-66.
- Othman, T., Yan, H.; Rivkees, S.A. (2003). Oligodendrocytes express functional A1 adenosine receptors that stimulate cellular migration. *Glia.*, 44, pp. 166-172.
- Peixoto, F. *et al.* (2002). Interactions of a new 2-styrylchromone with mitochondrial oxidative phosphorylation. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 16, pp. 220-226.
- Pierce, K. D. *et al.* (1992). Molecular cloning and expression of an adenosine A2b receptor from human brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 187, pp. 86-93.
- Platt, S. R. (2007). The role of glutamate in central uervous system health and disease-a review. *Vet J.*, 173, pp. 278-286.
- Prakash, O.; Kumar, R.; Parkash, V. (2008). Synthesis and antifungal activity of some new 3-hydroxy-2-(1-phenyl-3-aryl-4-pyrazolyl) chromones. *Eur. J. Med. Chem.*, 43(2), pp. 435-440.
- Raj, T *et al.* (2009). Mechanism of unusual formation of 3-(5-phenyl-3H-[1,2,4]dithiazol-3-yl)chromen-4-ones and 4-oxo-4H-chromene-3-carbothioic acid N-phenylamides and their antimicrobial evaluation. *Eur. J. Med. Chem.*, 44(8), pp. 3209-3216.
- Raj, T. *et al.* (2010). Cytotoxic activity of 3-(5-phenyl-3H-[1,2,4]dithiazol-3-yl)chromen-4-ones and 4-oxo-4H-chromene-3-carbothioic acid N-phenylamides. *Eur. J. Med. Chem.*, 45(2), pp. 790-794.

Rebola, N., Oliveira, C. R.; Cunha R. A. (2002). Transducing system operated by adenosine A2a receptors to facilitate acetylcholine release in the rat hippocampus. *Eur. J. Pharmacol.*, 454, pp. 31-38.

Recanatini, M. *et al.* (2011). A New Class of Nonsteroidal Aromatase Inhibitors: Design and Synthesis of Chromone and Xanthone Derivatives and Inhibition of the P450 Enzymes Aromatase and 17 α -Hydroxylase/C17,20-Lyase. *J. Med. Chem.*, 44(5), pp. 672-680.

Ribeiro, J. A.; Sebastião, A. M.; de Mendonça, A. (2003). Participation of adenosine receptors in neuroprotection. *Drugs News Perspect.*, 16, pp. 80-86.

Rodrigues, R. J. *et al.* (2005). Co-localization and functional interaction between adenosine A2a and metabotropic group 5 receptors in glutamatergic nerve terminals of the rat striatum. *J. Neurochem.*, 92, pp. 443-441.

Sakamoto, K. *et al.* (2004). Histological protection against ischemia-reperfusion injury by early ischemic preconditioning in rat retina. *Brain Res.*, 1015, pp. 154-160.

Samadi, P.; Gregoire, L.; Bedard, P. J. (2003). Opioid antagonists increase the dyskinetic response to dopaminergic agents in parkinsonian monkeys: interaction between dopamine and opioid systems. *Neuropharmacology.*, 45(7), pp. 954-963.

Schapira, A. H. *et al.* (2006). Novel pharmacological targets for the treatment of Parkinson's disease. *Nat Rev Drug Discov.*, 5(10), pp. 845-854.

Shaw, A. Y. *et al.* (2009). Synthesis of 2-styrylchromones as a novel class of antiproliferative agents targeting carcinoma cells. *Eur. J. Med. Chem.*, 44, pp. 2552-2562.

Sieradzan, K. A. (2001). Cannabinoids reduce levodopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease: a pilot study. *Neurology.* 57(11), pp. 2108-2111.

Stoessl, A. J. (1999). Etiology of Parkinson's disease. *Can. J. Neurol. Sci.*, 26(Suppl. 2), pp. S5-12;

Svendsen, A. B.; Scheffer J. J. C. (1982). Natural products in therapy. *Pharm. World Sci.*, 4(4), pp. 93-103.

- Tetzlaff, W., Schubert, P.; Kreutzberg, G. W. (1987). Synaptic and extrasynaptic localization of adenosine binding sites in the hippocampus. *Neuroscience*, 21, pp. 869-875.
- Tianhong, L.; Yanxin, S.; An, X. (2003) Integration of large scale fertilizing models with GIS using minimum unit. *Environ. Model. Software*, 18(3), pp. 221-229.
- Trost, B. M.; Fleming, I. (1991). Comprehensive Organic Synthesis - selectivity, strategy & efficiency in modern organic chemistry, Elsevier, Electronic ISBN: 978-0-08-035929-8.
- Van Calker, D., Muller, M.; Hamprecht, B. (1979). Adenosine regulates via two different types of receptors, the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. *J. Neurochem.*, 33, pp. 999-1005.
- Verhagen, L. *et al.* (1998). Amantadine as treatment for dyskinesias and motor fluctuations in Parkinson's disease. *Neurology.*, 50(5), pp. 1323-1326.
- Weinreb, O. *et al.* (2012). Ladostigil: A Novel Multimodal Neuroprotective Drug with Cholinesterase and Brain-Selective Monoamine Oxidase Inhibitory Activities for Alzheimer's Disease Treatment. *Curr. Drug Targets.*, 13(4), pp. 483-494.
- Williams, M.; Wright, S.; Loygd, G .K. (1997). Improved therapies for Parkinson's disease: life beyond dopamine D2/D3 receptor agonists. *Trends Pharmacol Sci.* 18(9), pp. 307-310.
- Wittendorp, M. C., Boddeke, H. W.; Biber, K. (2004). Adenosine A3 receptor-induced CCL2 synthesis in cultured mouse astrocytes. *Glia*, 46, pp. 410-418.
- Xu K.; Bastia, E.; Schwarzschild, M. A. (2005). Therapeutic potential of adenosine A1A receptor antagonists in Parkinson's disease. *Pharmacol. Ther.*, 105, pp. 267-310.
- Yoon, J. S. *et al.* (2006). Neuroprotective 2-(2-phenylethyl)chromones of *Imperata cylindrica*. *J. Nat. Prod.* 69, pp. 290-291.
- Zhang, M. Q. *et al.* (1995) Piperidinylalkoxy Chromones - Novel Antihistamines with Additional Antagonistic Activity against Leukotriene D-4. *J. Med. Chem.*, 38(13), pp. 2472-2477.

Zhao, K.; Luo, G.; Giannelli, S.; Szeto, H. H. (2005). Mitochondria-targeted peptide prevents mitochondrial depolarization and apoptoses induced by tert-butyl hydroperoxide in neuronal cell lines. *Biochem Pharmacol.*, 70, pp. 1796-1806.

Zhou, C.; Huang, Y.; Przedborski, S. (2008). Oxidative stress in Parkinson's disease: a mechanism of pathogenic and therapeutic significance. *Ann N Y Acad Sci.*, 1147, pp. 93-104.