SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA BIODISPONIBILIDADE ORAL E CITOTÓXICA DE NOVOS COMPOSTOS ARIL-TIAZOIS

Ana Rebeca Melo Dos Santos[1]
Ana Karoline Ribeiro Novais[2]
Cidla Marinho De Sousa[3]
Jamerson Ferreira De Oliveira[4]

RESUMO

O aumento da resistência a antimicrobianos vem se tornando um fator preocupante frente ao insucesso do tratamento a essas infecções. Desse modo, vêm sendo buscadas alternativas terapêuticas a fim de contornar essa problemática. Assim, vem se destacando a classe de moléculas contendo o tiazol as quais vêm apresentando promissora atividade antifúngica. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo a síntese, caracterização estrutural e físico-química, avaliação citotóxica in vitro e da biodisponibilidade oral in silico de novos derivados tiazois. A obtenção dos compostos se deu em 3 etapas, onde inicialmente foram obtidas tiossemicarbazidas. Estas serviram de reagentes para a formação de tiossemicarbazonas. Após, na última etapa, obtiveram-se os tiazóis LAQOF-TZ01 e LAQOF-TZ02 por meio da reação entre 2-bromoacetofenona e tiossemicarbazona. Os compostos obtiveram rendimentos satisfatórios de 95% e 89%, e pontos de fusão de 232º C e 254º C, respectivamente, demonstrando a efetividade da rota sintética empregada. Estudos in silico foram realizados, a fim de determinar propriedades físico-químicas, que determinou a biodisponibilidade oral de ambos os compostos apontando o LAQOF-TZ01 como melhor biodisponível de acordo com os critérios de Lipinski. Outrossim, ocorreram ensaios in vitro de citotoxicidade, evidenciando o LAQOF-TZ01 (18,6 µM) como mais citotóxico comparado ao LAQOF-TZ02 (25,5 µM). Os estudos preliminares demostraram potencialidade dos novos derivados aril-tiazois o que nos encoraja para o desenvolvimento de mais estudos, a fim de garantir a efetividade no tratamento antimicrobiano.

Palavras-chave: Resistência antimicrobiana; Tiazois; Química Medicinal; SwissADME.

UNILAB, ICS, Discente, ana.rebeca.snts@gmail.com[1]
UNILAB, ICS, Discente, karolinenovais@aluno.unilab.edu.br[2]
UNILAB, ICS, Discente, cidlamarinho1@gmail.com[3]
UNILAB, ICS, Docente, jamerson@unilab.edu.br[4]

ISSN: 2447-6161

INTRODUÇÃO

As tiossemicarbazonas são compostos moleculares de considerável interesse científico e terapêutico, devido às suas importantes propriedades químicas e biológicas, tais como antitumoral, antibacteriana, antiviral, antiprotozoária, citotóxica, dentre outras. Estes compostos são geralmente obtidos pela reação de condensação quimiosseletiva de tiossemicarbazidas com aldeídos e/ou cetona (TENÓRIO et al., 2005). Compostos sintéticos contendo o núcleo tiazol, sintetizados a partir de tiossemicarbazonas, vêm se destacando pela sua baixa citotoxicidade e alta atividade diante a cepas de microrganismos.

A literatura demonstra que estes derivados tiazóis vêm apresentando promissora atividade antifúngica frente às cepas de Candida albicans, Candida krusei, Candida parapsilosis, Candida tropicalis, Cryptococcus gatti, Cryptococcus neoformans e Paracoccidioides brasiliensis. Diante do potencial farmacológico dos tiazois, estudos apontaram o composto como um possível novo candidato a fármaco, visando novas formulações de antifúngicos.

Sendo assim, este trabalho teve como objetivos realizar a síntese, elucidação estrutural e determinação das características físico-químicas dos novos derivados tiazóis, avaliar a citotoxicidade in vitro frente a linhagem J774 de macrófagos de camundongo e investigar propriedades farmacocinéticas in silico de todos os compostos obtidos.

METODOLOGIA

Inicialmente, procedeu-se com a síntese dos compostos utilizados no projeto. A um balão de fundo redondo, sob agitação magnética e temperatura ambiente durante 1 hora, foram dispostos 4-cloro-fenilisotiocianato ou 4-nitro-fenilisotiocianato e hidrazina, sob a presença de diclorometano como solvente, a uma proporção estequiométrica de 1:2. Após a precipitação, o conteúdo do balão foi filtrado e lavado com n-hexano obtendo as tiossemicarbazidas intermediárias. Em uma proporção estequiométrica 1:1, sob agitação magnética e refluxo, foram adicionadas as tiossemicarbazidas obtidas anteriormente ao 4- hidroxibenzaldeído, sob a presença do etanol como solvente e ácido acético como catalisador. Decorridas 2 horas, ocorreu a formação de um precipitado o qual foi filtrado e após foi lavado com etanol gelado e então, obteve-se duas tiossemicarbazonas: LAQOF-TSC01 e LAQOF-TSC02. Na última etapa, em um balão de fundo redondo foi adicionado etanol, 2-bromoacetofenona e LAQOF-TSC01 ou LAQOF-TSC02. A reação permaneceu sob refluxo e agitação magnética durante 2 horas. O precipitado formado foi filtrado e lavado com etanol gelado. Foram obtidos dois tiazóis: LAQOF-TZ01 e LAQOF-TZ02.

Após a obtenção dos dois compostos tiazóis procedeu-se com os estudos in silico, onde foi utilizado o software SwissADME (http://www.swissadme.ch/), ferramenta usada para estimar parâmetros físico-químicos, na qual determinou a biodisponibilidade oral dos compostos segundo a regra dos cinco de Lipinski, na qual estabelece parâmetros para uma molécula ser um bom candidato a fármaco. Ademais foram aplicados, conjuntamente os conceitos de Veber, a respeito da biodisponibilidade oral. Ainda nessa etapa foram esclarecidas algumas características estruturais a respeito de ambos os tiazóis.

O ensaio de citotoxicidade foi realizado em triplicatas, em placas de 96 poços com células J774, a uma concentração de 1x105 por poço, incubadas em atmosfera de 5% de CO2 a 37 °C por 24 horas. Posteriormente o tempo decorrido, os compostos LAQOF-TZ01 e LAQOF-TZ02 foram adicionados em quantidades/concentração referentes a 6,25 µM, 12,5 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM e 200 µM, condicionadas durante 48 horas. A uma concentração de Solução Tamponada de Fosfato (PBS) de 5 mg/mL, foram adicionados 20µL da solução 3-(4,5-dimentil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium, 3-(4,5-

ISSN: 2447-6161

dimetiltiazol-2-il)-difenil-tetrazolium bromide, no qual foram mantidas em suas condições iniciais de cultivo para serem incubadas durante 3 horas. Logo após a incubação, foi observado a formação de cristais de formazan, o sobrenadante foi descartado, e os cristais formados, solubilizados por 20µL de DMSO. O leitor utilizado para determinar os valores da absorbância dos cristais de formazan foi ELISA Benchmark Plus (Bio-Rad), no comprimento de onda de 590 nm.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na rota de síntese adotada no nosso grupo de pesquisa, na primeira etapa foram obtidas tiossemicarbazidas a partir de isotiocianatos substituídos (atuando como eletrófilo) e hidrazina (atuando como nucleófilo) (OLIVEIRA, 2016). Na segunda etapa, em solução foi mantida sob agitação o aldeído e o ácido acético com a finalidade de aumentar a eletrofilicidade deste reagente e facilitar o ataque nucleofílico da tiossemicarbazida obtida anteriormente. Após a compensação de cargas, evidências apontam para um ataque intramolecular da hidroxila formada com o objetivo de haver uma desidratação com posterior formação das tiossemicarbazonas de interesse (OLIVEIRA, 2016).

Na etapa final, as tiossemicarbazonas anteriormente obtidas reagiram com acetofenona para originar os tiazóis deste estudo. Nesse mecanismo é evidenciado uma deslocalização de elétrons com a finalidade de tornar o enxofre mais nucleofílico e este realizar o ataque ao carbono alfa da acetofenona. Posteriormente acontece um ataque intramolecular com ciclização e formação de uma estrutura heterocíclica que então sofre uma desidratação e forma os tiazóis como produtos dessa etapa.

Os dois tiazóis, LAQOF-TZ01 e LAQOF-TZ02 obtidos, tiveram suas características físico-químicas determinadas como razão de frente e ponto de fusão, obtidos 232º C e 254º C. Os compostos sintetizados tiveram rendimentos satisfatórios de 95% e 89%, respectivamente. A literatura mostra que a obtenção de tiazóis a partir de tiossemicarbazonas é um processo efetivo com rendimentos variando 37-72% (PEREIRA et al., 2019). Comparando com os nossos resultados, podemos considerar a efetividade da rota sintética empregada devido aos seus rendimentos serem superiores.

O núcleo heterocíclico 1,3-tiazol, proporciona a essa classe de compostos um amplo espectro de atividades biológicas, bem como anticâncer, antibacteriana, anti-inflamatória, imunomoduladora, antihipertensiva, anticonvulsivante e antidepressiva (MESHRAM et al., 2012; BONDOCK et al., 2007). No procedimento de síntese dos tiazóis LAQOF-TZ01 e LAQOF-TZ02 foi evidenciada a formação desse anel heterocíclico, por meio da técnica de bioisosterismo não clássico, caracterizado pelo processo de anelação, onde foi formado um grupo tiazol.

A caracterização estrutural dos compostos formados foi realizada pela técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), técnica estudada pelo F. Bloch e E.M.Purcell ao acompanhar o comportamento de núcleos atômicos inseridos em um campo magnético, foi observado que esses núcleos emitiam sinais após receber energia de ondas específicas e constantes na qual possibilitava registrar essas frequências em um espectro característico, onde foi possível avaliar e analisar o movimento e composição das moléculas estudadas através desses espectros. Durante sua formação do tiazol, houve o surgimento de um ciclo com hidrogênio metínico o qual apresentou um deslocamento químico de 6.08 ppm (em ambos os compostos) que caracterizou, e confirmou a síntese do tiazol na reação. Também foi demonstrado que houve permanência do sinal azometínico 8,12 e 8,20 ppm na molécula formada. Todos os sinais característicos que confirmam as estruturas formadas estão descritos a seguir.

Os ensaios de simulação computacional ou in silico como recentemente é denominado, é comumente utilizado em Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) de medicamentos (TERSTAPPEN; REGGIANI, 2001). Os estudos

ISSN: 2447-6161

farmacológicos in silico surgiram em meados dos anos 70 com a proposta de simular um sistema biológico complexo por métodos computacionais, apresentando-se no mercado de pesquisas como uma metodologia moderna e singular dos meios in vitro e in vivo, formas já adotadas e respeitadas pelo âmbito científico (SANT et al., 2009).

Em 1997, Lipinski e colaboradores, foram os pioneiros nos estudos físico-químicos, para identificar quais propriedades um composto deve possuir para apresentar adequada biodisponibilidade oral. Dessa forma, estudos in silico foram realizados através do software SwissADME, ferramenta usada para estimar parâmetros físico-químicos, onde o tiazol LAQOF-TZ01 apresentou valores de MLogP 2,83 (≤ 4,15), massa molecular 416,45 g/mol, 1 doador de ligação H (NH ou OH), 5 aceptores de ligações H (NH ou OH), obedecendo os quatro parâmetros. No entanto, o LAQOF-TZ02 demonstrou violação nos valores de MLogP 4,27 (≥ 4,15), e obedeceu aos parâmetros da massa molecular 405,90 g/mol, 1 doador de ligação H (NH ou OH), 3 aceptores de ligações H (NH ou OH) atendendo três das quatro regras físico-químicas descritos por Lipinski para a biodisponibilidade oral de uma molécula candidata a fármaco.

Na pesquisa, foram aplicados também os conceitos de biodisponibilidade via oral de Veber, que apresentou 4 ligações rotativas, e demonstrou valores de TPSA (Área Topológica da Superfície Polar) 78,12 $Å^2$. Dentro dessa pesquisa, parâmetros da metabolização também foram analisados, como ser ou não substrato da Pgp (Glicoproteína P), envolvida na absorção e secreção do composto, impedindo que atinja seu efeito farmacológico. Contudo a molécula não apresentou ser substrato da P-gp que atua comumente na resistência a fármacos. Dessa forma, os compostos mostraram promissores resultados diante dos estudos in silico.

Podemos entender o ensaio de citotoxicidade in vitro como um teste inicial utilizado para avaliar a biocompatibilidade de um material para uso como biomaterial. Nesse sentido, a fim de avaliar o potencial citotóxico e atestar a biocompatibilidade destes aril-tiazóis, foi testado seu efeito citotóxico sobre linhagens de células J774 de macrófagos de camundongo. Ambos os compostos apresentaram atividade in vitro, porém, o composto LAQOF-TZ01 apresentou perfil citotóxico superior ao composto LAQOF-TZ02, apontando 18,6 µM e 25,5 µM respectivamente. Com todos os ensaios desenvolvidos, os compostos demonstraram confiança para o desenvolvimento de mais estudos, de maneira aprofundada, a fim de garantir a efetividade no tratamento antimicrobiano.

CONCLUSÕES

Foram sintetizadas duas moléculas aril-tiazóis derivadas de tiossemicarbazonas neste trabalho, demonstrando que a rota sintética empregada apontou significativos resultados, onde se obtiveram rendimentos satisfatórios dos compostos sintetizados. As moléculas foram avaliadas sob testes in silico, utilizando a ferramenta SwisADME para avaliar parâmetros farmacocinéticos e físico-químicos, e in vitro para avaliar citotoxicidade dos novos derivados em linhagem J774 de macrófagos de camundongo, evidenciando que os compostos são promissores candidatos a fármacos.

AGRADECIMENTOS

A Unilab pela oportunidade de desenvolver a pesquisa e ao meu orientador por todo o suporte dado no desenvolvimento deste trabalho.

REFERÊNCIAS

ISSN: 2447-6161

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, “Biological evaluation of medical devices”. Part 5: Tests for cytotoxicity: in vitro methods”, 3st ed, ISO 10993-5, 2009.

MESHRAM, H. M.; THAKUR, P. B.; BABU, B. M.; BANGALE, V. M. Convenient and simple synthesis of 2-aminothiazoles by the reaction of -halo ketone carbonyls with ammonium thiocyanate in the presente of N-methylimidazole. TetrahedronLetters, v. 53, p. 5265-5269, 2012.

OLIVEIRA, J. Síntese, caracterização estrutural e avaliação da atividade antitumoral e antiinflamatória de novos derivados 2-tiofenotiossemicarbazonas. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas).

PEREIRA, ASA et al. In vitro activity of aryl-thiazole derivatives against Schistosoma mansoni schistosomula and adult Worms. PLoS ONE 14(11): e0225425. 2019. Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco. Recife, p. 169. 2016.

TENÓRIO, RP. et al. Tiossemicarbazonas: métodos de obtenção, aplicações sintéticas e importância biológica. Química Nova, v. 28, n. 6, p. 1030-1037, 2005.

ISSN: 2447-6161