

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO, AVALIAÇÃO ANTIOXIDANTE, INTERAÇÃO COM ct-DNA E *IN SILICO* ADMETOX DE UM DERIVADO DE ACILTIOUREIAS

TAISE CARLOS NUNES*¹; RENIEIDY FLÁVIA CLEMENTE DIAS²; ALECIA FERREIRA DA SILVA³; ELVIS FARIAS SILVEIRA JUNIOR⁴; EDUARDA CAROLINA ROMAN MACHADO⁵; ADRIANA CASTRO PINHEIRO⁶.

¹Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) – taisecnunes@outlook.com

²Universidade Federal de Uberlândia (UFU) – flaviaufrgs04@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) – alecia.spo@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) – elvisilveira@hotmail.com.br

⁵Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) – eduardacarolinaroman@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) - acpinheiro@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

Uma classe importante como candidatos a fármacos são as aciltioureas, conhecidas há mais de um século na literatura (Saeed et al., 2014). As aciltioureas apresentam um grupo acila, onde o grupo carbonila está ligado ao núcleo da tiourea conforme está destacado na **Figura 1**, onde R pode ser um grupo alquil, aril, aralquil ou um substituinte heterocíclico. (Saeed et al., 2014).

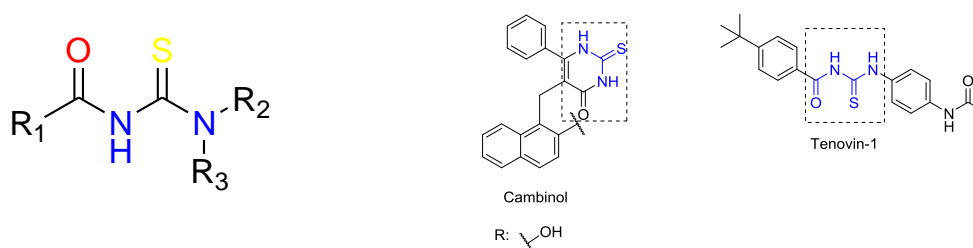
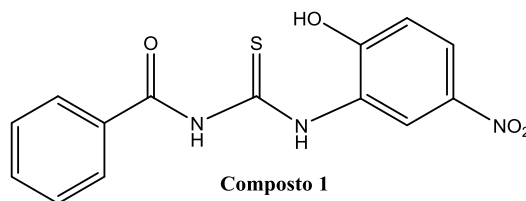


Figura 1. Estrutura química das aciltioureas e alguns exemplos de moléculas bioativas contendo núcleo aciltiourea.

As aciltioureas são uma classe de compostos que apresentam grande potencial biológico, apresentando atividade antifúngica, bactericida, antiviral, antiparasitária, antitumoral e antioxidante (KETCHEMEN et al., 2021). O cambinol e tenovin-1, por exemplo, são moléculas que contêm o núcleo aciltiourea (**Figura 1**), e são conhecidas por serem inibidores de NAD⁺, que são proteínas desacetilases conhecidas como sirtuínas. Existe um interesse em inibidores nessa família de enzimas devido a aplicação na terapia contra o câncer e estudos revelam que células cancerígenas aumentam a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) devido ao estresse oxidativo celular (SULLIVAN; CHANDEL, 2014). Desta forma, agentes antioxidantes estão sendo investigados em terapias mais eficazes contra o câncer. Os mesmos podem minimizar a carga de radicais livres nas células, decorrentes de tratamentos com agentes quimioterápicos (Pinheiro et al., 2023). Com isso, sua aplicação pode ajudar a diminuir a duração dos regimes quimioterápicos e reduzir os efeitos colaterais causados pelo tratamento.

Neste trabalho, nosso grupo de pesquisa trabalhou na síntese e caracterização de um composto aciltiourea. Investigamos o potencial de inibição desse composto frente a radicais DPPH e ABTS⁺, buscando elucidar o seu potencial antioxidante. Avaliamos a capacidade do composto aciltiourea destacado na **Figura 2**, N-((2-hidroxi-4-nitrofenil) carbamotiil) benzamida (**1**) de interagir com ct-DNA

(*calfy thymus*) por espectroscopia de UV-Vis. O estudo de interação entre DNA com pequenas moléculas pode levar a compreensão dos mecanismos moleculares de ação de fármacos, contribuindo para a concepção de novos medicamentos DNA-alvo. Ainda, investigamos *in silico* os parâmetros ADMETox desse molécula. A avaliação de toxicidade de novos fármacos é essencial para garantir a segurança dos medicamentos. Com o desenvolvimento da tecnologia computacional e da quimioinformática, várias ferramentas computacionais econômicas e que economizam tempo estão disponíveis para prever as propriedades ADMET (absorção, distribuição, metabolismo, eliminação e toxicidade) de candidatos a fármacos, com base na estrutura.



Análise antioxidante em ABTS+
IC 50 = 25,36 μmol

Análise antioxidante em DPPH
Resultado: sem potencial antioxidante.

Figura 2. Estrutura molecular do composto N-((2-hidroxi-4-nitrofenil) carbamotioil) benzamida (1).

2. METODOLOGIA

2.1 Síntese e Caracterização

Partindo-se do cloreto de benzoíla e tiocianato de potássio, obtendo na primeira etapa isotiocianato. Na etapa 2, foi adicionado o 4-nitro-2-aminofenol e a reação foi mantida sob agitação por 24h à temperatura ambiente. Após o tempo reacional, adicionou-se água destilada gelada para precipitar o sólido, que foi filtrado e recristalizado em acetona. O sólido foi obtido com 48% de rendimento e caracterizado por RMN de ^1H e ^{13}C em $\text{DMSO-}D_6$.

2.2. Avaliação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante do composto **1** foi avaliada através de sua capacidade de eliminar os radicais sintéticos 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) e 2,2'-azino-bis (ácido 3-tilbenzotiazolína-6-sulfônico) (ABTS^+). O composto foi diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) e empregado para preparar soluções com diferentes concentrações (1-200 μM). Todos os testes foram realizados em triplicata e os dados são expressos como média \pm desvio padrão da média. A concentração da solução do composto **1** para inibir 50% do radical DPPH ou ABTS (IC_{50}) e os valores de máximos de inibição foram calculados usando o software GraphPad Prisma 8.0 (GraphPad Software).

2.3 Ensaios de interação do composto 1 com ct-DNA

A determinação da concentração de ct-DNA (*calfy thymus*) foi realizada por meio de espectroscopia UV-visível. Para verificar a pureza do ct-DNA, foi calculada a razão de absorbância A_{260}/A_{280} . Os experimentos foram conduzidos utilizando um tampão Tris-HCl e coletando o espectro de absorção da amostra. A concentração do composto **1** foi mantida constante em 10 μM , enquanto as concentrações de ct-DNA variaram de 10 a 100. Para garantir resultados consistentes, cada experimento foi repetido em conjuntos de três ($n = 3$).

2.4 Previsão ADMETox in silico

O estudo empregou a ferramenta *Swiss ADME*, um software online, para conduzir uma análise *in silico* das propriedades ADMETox. Isso envolveu a avaliação de parâmetros relacionados à absorção, distribuição, metabolismo e excreção, bem como a semelhança com medicamentos e propriedades físico-químicas do composto 1. Além disso, o servidor pkCSM foi utilizado para realizar previsões sobre a toxicidade dos compostos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Síntese

A síntese do composto foi dividida em duas etapas distintas. A primeira etapa da reação foi realizada através cloreto de benzoila com o tiocianato de potássio utilizando acetona como solvente, consistindo em uma substituição nucleofílica (S_N2). Já a segunda etapa consistiu na adição nucleofílica do nitrogênio da amina ao carbono da tiouréia. Todos os compostos obtidos foram caracterizados por RMN de ^{13}C e 1H . O RMN de H e C mostram os principais deslocamentos da molécula 1, **Figura 3**.

3.2 Caracterização por Ressonância Magnética Nuclear de 1H e ^{13}C

Na **Figura 3**, está destacado no espectro de RMN de 1H os deslocamentos do H do núcleo aciltioureia em 11,71 e em 13,25 ppm, respectivamente, assim como o H fenólico que aparece em 12,08 ppm. Todos os outros sinais dos H aromáticos aparecem na região entre 7,11 à 9,81 ppm. No espectro de RMN de ^{13}C , o carbono carbonílico da molécula aparece na região de 178,06 ppm. Os sinais evidenciam a formação do composto 1.

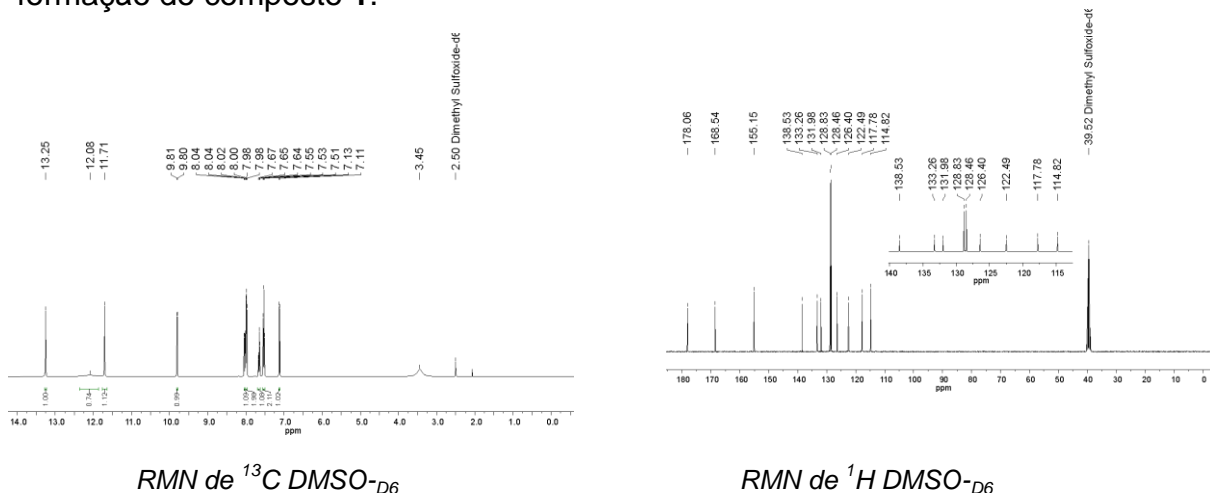


Figura 3. Espectro de RMN de 1H e ^{13}C do composto 1 em DMSO- D_6 .

3.3 Atividade antioxidante por ABTS⁺ e DPPH

Na avaliação da captura do radical livre DPPH, o composto 1 não apresentou significativo potencial antioxidante, não sendo possível determinar o IC_{50} .

Já na captura do cátion radical ABTS⁺ o composto por sua vez revelou atividade antioxidante com $IC_{50} = 25,36 \mu M$, indicando então seu potencial em inibir 50% do cátion radical ABTS⁺ nesta concentração. Tais resultados sugerem fortemente que este composto detém um potencial considerável para captura do radical ABTS⁺.

3.4 Interação com Ct-DNA

O DNA é o alvo farmacológico de muitos fármacos que estão atualmente em uso clínico ou que estão em experimentações clínicas avançadas. Pequenas moléculas podem interagir com o DNA e modificam sua estrutura podendo inibir seu perfeito funcionamento, atuando como drogas que auxiliam na cura ou controle de doenças. Nossos estudos demonstraram que o composto **1** apresenta fraca interação com o ct-DNA.

3.5 Previsão ADMETox in silico

A previsão *in silico* das propriedades ADMET revelou perfil satisfatório para este composto não violando a regra dos 5 de Lipinski.

4. CONCLUSÕES

Foi sintetizado e caracterizado uma molécula derivada da classe aciltioureas. Em ensaios de captura dos radicais ABTS⁺ e DPPH foi observado que o composto **1**, foi capaz de inibir até 97,88% do radical ABTS⁺ na concentração de 200 µM, com IC₅₀ = 25,36 µM. No ensaio DPPH o composto **1**, apresentou inabilidade antioxidante. Através de ensaios de interação com ct-DNA, foi observada fraca interação do composto, nas condições empregadas. Estudos *in silico* das propriedades ADME e avaliação de citotoxicidade e genotoxicidades estão em andamento. Porém, os estudos iniciais aqui apresentados da aplicação farmacológica do composto **1** oferecem uma perspectiva promissora no desenvolvimento de fármacos inovadores e eficazes.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. SAEED, A.; FLÖRKE, U. & ERBEN, M. F. "A review on the chemistry, coordination, structure and biological properties of 1-(acyl/aroyl)-3- (substituted) thioureas". J. Sulfur Chem., 35 (3): 318, 2014.
2. RAMOS, R.; STEVENS, A. M. P.; DE OLIVEIRA, T. D.; BATISTA, A. A.; CASTELLANO, E. E.; DUQUE, J.; SORIA, D. B.; FANTONI, A. C.; CORRÊA, R. S. & ERBEN, M. F. "Understanding the conformational changes and molecular structure of furoyl thioureas upon substitution". Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc., 176: 8, 201
3. MAHADEVAN, S.; PALANIANDAVAR, M. Spectroscopic and voltammetric studies on copper complexes of 2,9-dimethyl-1,10- phenanthrolines bound to calf thymus DNA. Inorganic Chemistry, v. 37, n. 4, p. 693-700, 1998.
4. SIRAJUDDIN, Muhammad; ALI, Saqib; BADSHAH, Amin. Drug–DNA interactions and their study by UV–Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, v. 124, p. 1- 19, 2013.
5. SULLIVAN, Lucas B; CHANDEL, Navdeep s. Mitochondrial reactive oxygen species and cancer. Cancer & Metabolism, [S.L.], v. 2, n. 1, p. 1-12, 28 nov. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/2049-3002-2-17>
6. KETCHEMEN, K. I. Y. et al. Crystal structures and physicochemical studies of some novel divalent and trivalent transition metal chelates of N-morpholine-N'-benzoylthiourea. Journal of Molecular Structure, v. 1229, 5 abr. 2021.