

SÍNTESE DE 1,2,3-TRIAZÓIS 4-ARIL-SUBSTITUÍDOS DO GLICEROL E INVESTIGAÇÃO DE SEU POTENCIAL CITOTÓXICO E ANTIVIRAL CONTRA SARS-CoV-2

Luiza Carvalheira Moreira¹, Mariana Belizario de Oliveira², Walter Cesar Celeri Bigui², Aidene de Fátima Camilo Faria³, Gisely Ferreira Moura³, Adilson Vidal Costa³, Vagner Tebaldi de Queiroz³

¹Universidade Federal de Viçosa/Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Av. PH Rolfs, S/N, Campus Universitário – 36570-090 – Viçosa – MG, Brasil, luiza.carvalheira@yahoo.com.br.

²Universidade Federal do Espírito Santo/Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde/Departamento Química, Avenida Fernando Ferrari, 29075-910 – Vitória-ES, Brasil. belizmary@hotmail.com, walter.bigui@edu.ufes.br.

³Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde/Departamento de Química e Física, Alto Universitário, S/N, Guararema – 29500-000 – Alegre – ES, Brasil, aideneclara@gmail.com, gisely.m.ferreira@gmail.com, avcosta@hotmail.com, vagner.queiroz@ufes.br.

Resumo

A drástica pandemia causada pelo SARS-CoV-2 incentivou a busca por compostos para uso clínico em pacientes com a infecção. Assim, este trabalho teve como objetivo sintetizar uma série de derivados do glicerol contendo núcleo 1,2,3-triazólico, através de reação do tipo *Click Chemistry*. A síntese dos triazóis foi realizada entre a azida (**3**) e alcinos terminais, utilizando uma quantidade catalítica de sulfato de cobre e ascorbato de sódio, álcool t-butílico e água como solventes. Foram obtidos cinco derivados triazólicos, com rendimentos que variaram entre 57 e 91%, suas estruturas foram elucidadas através de infravermelho e RMN de ¹H e de ¹³C. Todos produtos finais foram submetidos a avaliações de atividades citotóxica contra a linhagem de células Vero E6 e antiviral sobre SARS-CoV-2. Segundo a avaliação citotóxica, não foi observada toxicidade contra as células, confirmando sua segurança para seguir com a avaliação da atividade antiviral. Ao comparar com o controle positivo remdesivir, os triazóis **4p-4t** não tiveram uma atividade antiviral eficaz, sendo necessário novos ensaios utilizando o vírus ativo para avaliar efetivamente o potencial de inibição de replicação viral.

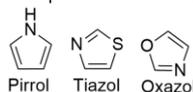
Palavras-chave: Azóis; Atividade biológica; Covid-19; Propano-1,2,3-triol.

Área do Conhecimento: Ciências Exatas e da Terra (Química).

Introdução

Compostos azólicos são substâncias heterocíclicas aromáticas nitrogenadas e que possuem um anel de cinco membros. Esta classe de compostos pode possuir um (ex.: pirrol) ou mais átomos de nitrogênios, e adicionalmente também podem conter átomos de enxofre (ex.: tiazol) ou oxigênio (ex.: oxazol) (Figura 1) (Melo *et al.*, 2006).

Figura 1 - Exemplos de compostos heterocíclicos aromáticos azólicos.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

Dentre os heterocíclicos azólicos encontram-se os 1,2,3-triazóis, que possuem em sua estrutura três átomos de nitrogênios viciniais. O interesse na pesquisa destes compostos tem aumentado

consideravelmente nos últimos anos, uma vez que tem demonstrado várias aplicações e uma gama de atividades biológicas: antiviral (Niu; Lu; Aisa, 2019), leishmanicida (Teixeira *et al.*, 2018), antituberculosa (Fernandes *et al.*, 2019), anti-HIV, anticancerígena e antibacteriana (Silva *et al.*, 2009; Peterson e Brian, 2010), contra a doença de Alzheimer (Dias *et al.*, 2018), fungicida (Costa *et al.*, 2017; 2020; Chen *et al.*, 2019), dentre outras. A presença de três átomos de nitrogênio na estrutura do 1,2,3-triazol, somada a sua aromaticidade e a riqueza de elétrons em seu sistema, faz com que estes compostos tenham facilidade em se ligar com uma vasta gama de enzimas e receptores biológicos por meio de ligações de hidrogênio, empilhamento π , ligações dipolo-dipolo, ligações de coordenação, efeito hidrofóbico e de van der Waals, ampliando sua relevância no âmbito da química medicinal (Zhou e Wang, 2012). Além disso, os 1,2,3-triazóis podem ser utilizados em estratégias de hibridação molecular, nas quais ocorre a conjugação de diferentes grupos farmacóforos gerando fármacos bifuncionais, viabilizando a síntese e descoberta de novos medicamentos (Astruc *et al.*, 2012; Li; Aneja; Chaiken, 2013).

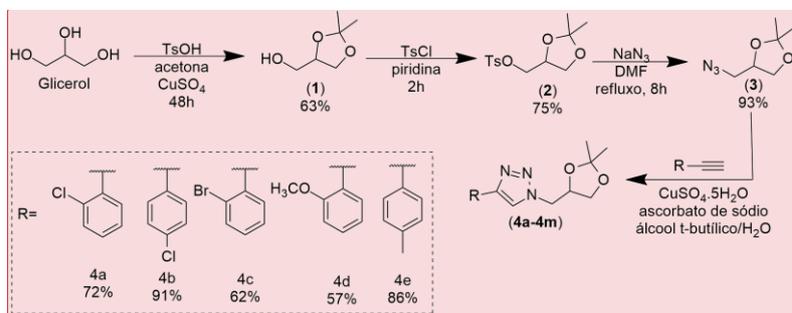
Em dezembro de 2019, uma infecção viral desconhecida foi identificada na China, se espalhando rapidamente por todo mundo. Em fevereiro de 2020, a OMS identificou o vírus como síndrome respiratória aguda grave coronavírus-2 (SARS-CoV-2). A infecção viral ficou conhecida como COVID-19 e em março de 2020, foi declarado o surto de coronavírus como uma pandemia global (Tan, 2022). Até o momento, no Brasil tem-se 38.846.238 casos confirmados e 712.720 óbitos (Ministério da Saúde, 2024). Embora a vacinação tenha desempenhado um papel central no controle e prevenção na propagação da COVID-19, não há nenhum medicamento antiviral específico disponível no tratamento da SARS-CoV-2. As estratégias de tratamento e vacinas visam bloquear a interação entre a proteína spike (S) do vírus e o receptor ACE2. O receptor ACE2 (enzima conversora de angiotensina 2) é uma proteína presente na superfície de várias células do corpo humano, incluindo células do trato respiratório, coração, rins e intestinos (Seliem *et al.*, 2021).

Neste trabalho, é relatada a síntese de 1,2,3-triazóis derivados do glicerol, bem como sua atividade antiviral contra o SARS-CoV-2. O glicerol é um dos produtos gerados na produção de biodiesel. O aumento da produção deste biocombustível resultou em um excesso de glicerol no mercado, tornando necessário o desenvolvimento de novas tecnologias para utilizar este excedente (Silva; Gonçalves; Mota, 2010). O glicerol é uma substância abundante e possui derivados que são materiais de partida para a síntese de compostos orgânicos importantes, como glicerofosfolípidios, beta-bloqueadores, prostaglandinas, PAF (fator de agregação plaquetária) e muitos outros.

Metodologia

Foram sintetizados cinco 1,2,3-triazóis (Figura 2), a partir do glicerol segundo metodologia detalhada por Costa *et al.*, (2017).

Figura 2 – Rota sintética para obtenção dos compostos 1,2,3-triazólicos (4p-4t) derivados do glicerol



Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

A avaliação da atividade antiviral foi realizada segundo metodologia publicada por Ferreira *et al.* (2012), na qual testou-se a sobrevivência de célula Vero E6 com superexpressão de receptor ACE2.

Comentado [A1]: Alterar a figura com o novo código dos triazóis

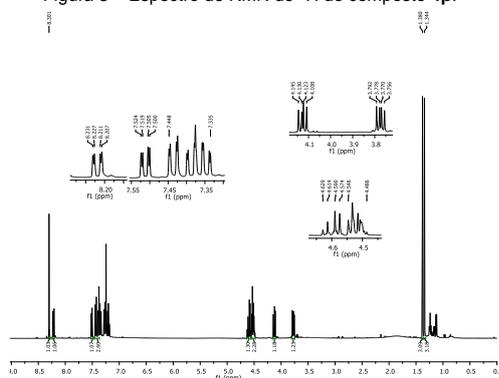
Utilizou-se ensaio colorimétrico do sal de tetrazólio (MTT) para determinar a viabilidade metabólica das células. As células foram adicionadas em placas de 96 poços contendo o meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI, Sigma), 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 10% de soro fetal bovino (SFB) previamente inativado por calor. Um total de 5×10^4 células por poço foram utilizadas. As células foram mantidas por 24 horas a 37 °C em 5% de CO₂. Posteriormente, uma mistura dos compostos **4p-4t**, com concentrações de 10 µg/mL ou 50 µg/mL, foi adicionada e as placas de petri foram incubadas por mais 48 horas nas mesmas condições empregadas anteriormente. Após este período, foram adicionados 10 µL de solução MTT (5,0 mg/mL) e incubou-se por 4h. A coloração da solução resultante foi mensurada em leitor de microplacas (SpectraMax M5 - Molecular Devices) em comprimento de onda de 570 nm. Todas as concentrações foram testadas em quadruplicatas.

A observação de atividade antiviral foi feita utilizando o pseudovírus com expressão de proteína S de SARS-CoV-2, como prescrito por Nie *et al.* (2020). As células Vero E6 superexpressoras de ACE2 foram adicionadas na densidade de 5×10^4 células em cada poço de placas de 96 poços resultando em um volume de 250 µL de meio RPMI suplementado com 10% de SFB. As placas foram mantidas a 37 °C, 5% de CO₂ por 24 h. Posteriormente, em cada poço foi adicionado 5×10^6 partículas de pseudovírus de SARS-Cov-2 (eENZYMÉ, Estados Unidos) composto de *replication-deficient Maloney murine Leukemia Virus* (MLV) expressando proteína S de SARS-CoV-2 na superfície. Após infecção com o vírus, os compostos foram adicionados nas concentrações de 10 µg/mL ou 50 µg/mL. Como controles positivos de atividade antiviral foram utilizados a molécula Remdesivir (C_{remd}) e um anticorpo monoclonal neutralizante contra *Spike protein* de SARS-CoV-2 (C_{ant}) (eENZYMÉ, Estados Unidos). As placas foram novamente mantidas a 37 °C, 5% de CO₂ durante 24 h. Após este período, 50 µL de substrato de luciferase (eENZYMÉ, Estados Unidos) foram adicionados e a detecção de sinal foi obtida em leitor de microplaca de luminescência (PerkinElmer). A porcentagem de infecção foi calculada pela razão de cada tratamento com o grupo controle não tratado. Os experimentos foram realizados em quadruplicatas.

Resultados

A síntese de cinco 1,2,3-triazóis derivados do glicerol, subproduto do biodiesel, ocorreu conforme rota sintética apresentada na Figura 2. Para a preparação dos triazóis **4p-4t**, empregou-se a metodologia desenvolvida por Meldal e Sharpless, na qual se utiliza sais de Cu (I) na catálise das reações de ciclo adição 1,3-dipolar entre azidas e alcinos terminais (reação *click*). Obteve-se de forma regioespecífica os 1,2,3-triazóis (**4p-4t**) com rendimentos que variaram entre 57 e 91%. Os compostos obtidos foram submetidos a caracterização por métodos espectroscópicos no infravermelho e ressonância magnética de ¹H e ¹³C. Na Figura 3 está apresentado o espectro de RMN de ¹H do triazol **4p**.

Figura 3 – Espectro de RMN de ¹H do composto **4p**.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor

Analisando o espectro de RMN de ^1H , destaca-se a presença do simpleto em δH 8,30 atribuído ao hidrogênio do anel triazólico. Além da presença dos dois duplos dupletos observados entre δH 3,75 a 4,14, ambos integrados para um hidrogênio, foram atribuídos aos hidrogênios metilênicos do acetal cíclico. Todos os outros sinais presentes no espectro estão de total acordo com a estrutura do triazol **4p** (Figura 2).

Os 1,2,3-triazóis **4p-4t**, apresentados na Figura 2 foram submetidos a avaliação de atividade citotóxica direta sobre células Vero E6 (Tabela 1). Os compostos testados não foram tóxicos às células, o que indica a possibilidade de serem utilizados em avaliação de atividade antiviral.

Tabela 1 - Atividade citotóxica dos compostos **4p a 4t** para células Vero E6 superexpressora de ACE2.

| Tratamentos | Viabilidade de Células Vero (%) - concentração 10 $\mu\text{g/mL}$ | Viabilidade de Células Vero (%) - concentração 50 $\mu\text{g/mL}$ |
|------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| Triazóis 4p-4t | 85,19 | 88,48 |
| Remdesivir | 91,28 | 83,14 |
| Anticorpo monoclonal anti-S protein SARS-CoV-2 | 70,35 | 56,95 |

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

Além da avaliação da atividade citotóxica, os compostos **4p-4t** também foram avaliados quanto a atividade antiviral utilizando o sistema de pseudovírus (Tabela 2).

Tabela 2 - Atividade antiviral contra pseudovírus expressor de proteína S de SARS-CoV-2 de pool de compostos **4p a 4t** para células Vero E6 superexpressora de ACE2.

| Tratamentos | Viabilidade de Células Vero (%) - concentração 10 $\mu\text{g/mL}$ | Viabilidade de Células Vero (%) - concentração 50 $\mu\text{g/mL}$ |
|------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| Triazóis 4p-4t | 80,96 | 86,98 |
| Remdesivir | 23,37 | 15,98 |
| Anticorpo monoclonal anti-S protein SARS-CoV-2 | 24,06 | 15,49 |

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

Os compostos **4p-4t** também foram testados para avaliar a capacidade de inibir a infecção viral utilizando o sistema de pseudovírus (Tabela 2). Embora os controles positivos tenham demonstrado que o sistema é funcional para triagem de compostos com atividade antiviral, os compostos **4p-4t** não apresentaram atividade de inibição da infecção viral nas concentrações avaliadas.

Discussão

Para a síntese de cinco derivados triazólicos, foi utilizado o glicerol como material de partida. Este composto foi convertido em acetal, através de uma catálise ácida, gerando o 2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metanol (**1**). A funcionalização da hidroxila do composto **1** ocorreu via mecanismo $\text{S}_{\text{N}}2$, produzindo o composto 2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metanol 4-metilbenzenosulfonato (**2**). A partir do composto **2** foi realizada inserção do grupo azido na estrutura do composto, produzindo o 4-(azidometil)-2,2-dimeril-1,3-dioxolano (**3**). A síntese de derivados triazólicos do glicerol foi realizada através de reação *click*, entre azida **3** e cinco alcinos comerciais, utilizando uma quantidade catalítica de sulfato de cobre e ascorbato de sódio, álcool *t*-butílico e água como solventes. O uso de sulfato de cobre como catalisador, torna esta reação regioselectiva, favorecendo a formação exclusiva do 1,2,3-triazol-1,4-dissubstituído, além de proporcionar um tempo reacional curto.

Os compostos testados não demonstraram eficácia na inibição viral ao serem aplicados no sistema de pseudovírus que expressa a proteína S do SARS-CoV-2. Este sistema possui a limitação de avaliar apenas a atividade inibitória no processo de infecção mediado pelo ACE2, que é o principal mecanismo associado ao SARS-CoV-2. Para uma análise mais completa, é necessário realizar outros testes diretamente com o vírus para investigar o potencial de inibição da replicação viral e a produção de cápsulas virais infectantes.

Conclusão

A rota sintética proposta para a síntese dos cinco compostos 1,2,3-triazólicos (**4p-4t**) derivados do glicerol se mostrou eficaz, considerando a facilidade para suas purificações e dos bons rendimentos obtidos (57-91%). Estes mesmos compostos (**4p-4t**) não demonstraram ação eficaz na avaliação antiviral nas concentrações realizadas. Porém, como apresentaram baixa atividade citotóxica, os compostos triazólicos sintetizados, ainda podem ser avaliados frente a outros mecanismos de inibição viral.

Referências

ASTRUC, D. *et al.* Click dendrimers and triazole-related aspects: Catalysts, mechanism, synthesis, and functions. A bridge between dendritic architectures and nanomaterials. **Accounts of Chemical Research**, v. 45, p. 630- 640, 2012.

CHEN, Y. *et al.* Bioactive-guided structural optimization of 1,2,3-triazole phenylhydrazones as potential fungicides against *Fusarium graminearum*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 164, p. 26-32, 2020.

COSTA, A. V. *et al.* Synthesis of novel glycerol-derived 1,2,3- triazole and evaluation of their fungicide, phytotoxic and cytotoxic activities. **Molecules**, v. 22, p.1666, 2017.

COSTA, A. V. *et al.* Synthesis of glycerol-derived 4-alkyl-substituted 1,2,3-triazoles and evaluation of their fungicidal, phytotoxic, and antiproliferative activities. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 31, p. 821-832, 2020.

DIAS, M. C. F. *et al.* Synthesis of 1,2,3-triazole derivatives of 4,4'-dihydroxybenzophenone and evaluation of their elastase inhibitory activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, p. 97-107, 2018.

FERNANDES, C. M. *et al.* Green synthesis of 1-benzyl-4-phenyl-1*H*-1,2,3-triazole, its application as corrosion inhibitor for mild steel in acidic medium and new approach of classical electrochemical analyses. **Corrosion Science**, v. 149, p. 185-194, 2019.

LI, H.; ANEJA, R.; CHAIKEN, I. Click chemistry in peptide-based drug design. **Molecules**, v. 18, p. 9797–9817, 2013.

MELO, J. O. F. *et al.* Heterociclos 1,2,3-triazólicos: histórico, métodos de preparação, aplicações e atividades farmacológicas. **Química Nova**, v. 29, p. 569-579, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, **Covid-19 no Brasil**. Disponível em: < https://infoms.saude.gov.br/extensions/covid-19_html/covid-19_html.html> Acesso em: 29 jul. 2024.

NIU, C.; LU, X.; AISA, H. A. Preparation of novel 1,2,3-triazole furocoumarin derivatives via click chemistry and their anti-vitiligo activity. **RSC Advances**, v. 9, p. 1671– 1678, 2019.

PETERSON, L. B.; BRIAN, S. J. Click chemistry to probe Hsp90: Synthesis and evaluation of a series of triazole-containing novobiocin analogs. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, p. 3957–3960, 2010.

SELIEM, I. A. *et al.* New quinoline-triazole conjugates: Synthesis, and antiviral properties against SARS-CoV-2. **Bioorganic Chemistry**, v. 114, 2021.

SILVA, F. C. da *et al.* Synthesis, HIV-RT inhibitory activity and SAR of 1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazole derivatives of carbohydrates. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 373-383, 2009.

SILVA, P. H. R.; GONÇALVES, V. L. C.; MOTA, C. J. A.; Glycerol acetals as anti-freezing additives for biodiesel. **Bioresource Technology**, v.101, p. 6225–6229, 2010.

TAN, A. Synthesis, spectroscopic characterization of novel phthalimides derivatives bearing a 1,2,3-triazole unit and examination as potential SARS-CoV-2 inhibitors via *in silico* studies. **Journal of Molecular Structure**, v. 1261, 2022.

TEIXEIRA, R. R. *et al.* Synthesis and leishmanicidal activity of eugenol derivatives bearing 1,2,3-triazole functionalities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 146, p. 274- 286, 2018.

ZHOU, C.; WANG, Y. Recent Researches in Triazole Compounds as Medicinal Drugs. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 239–280, 2012.

Agradecimentos

Os autores do presente trabalho agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES), a Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), ao Grupo de Estudo Aplicado em Produtos Naturais e Síntese Orgânica (GEAPS) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por todo apoio.