

SÍNTESE E ESTUDO CITOTÓXICO E ANTIVIRAL DE DERIVADOS 1,2,3-TRIAZÓLICOS OBTIDOS A PARTIR DE GLICEROL SOBRE SARS-CoV-2

Walter Cesar Celeri Bigui¹, Bianca de Oliveira Botelho³, William dos Santos Belarmino², Mariana Belizario de Oliveira¹, Rafael Augusto Tassan Siqueira², Adilson Vidal Costa², Vagner Tebaldi de Queiroz².

¹Universidade Federal do Espírito Santo/Centro de Ciências Exatas/Departamento de Química, Avenida Fernando Ferrari, 29075-910 – Vitória-ES, Brasil. walter.bigui@edu.ufes.br, belizmary@hotmail.com.

²Universidade Federal do Espírito Santo/Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde/Departamento Química e Física, Alto Universitário, s/n, Guararema - 29500-000 - Alegre-ES, Brasil. santoswilliam_s@hotmail.com, avcosta@hotmail.com, vagner.queiroz@ufes.br.

³Universidade Federal de Viçosa/Departamento de Medicina Veterinária, Av. PH Rolfs, S/N, Campus Universitário – 36570-090 – Viçosa-MG, Brasil, bianca.vital@ufv.br.

Resumo

A vacinação é a principal forma de controle da COVID-19, causada pelo agente etiológico SARS-CoV-2. Entretanto, diariamente ainda são relatados casos em todo o mundo. Dessa forma, ainda é necessário novas pesquisas com a finalidade de desenvolver novos medicamentos para o controle da doença. O objetivo do presente estudo foi sintetizar e avaliar o potencial citotóxico e antiviral de cinco triazóis sobre o SARS-CoV-2. Os derivados triazólicos foram sintetizados via reação de cicloadição azida-alcino catalisada por Cu(I). A atividade citotóxica dos compostos foi testada contra a linhagem de células Vero E6 e a atividade antiviral em um pseudovírus expressando a proteína S de SARS-CoV-2. Os compostos foram obtidos com rendimentos superiores a 70%. Não foi observada atividade citotóxica dos compostos, seguindo para realização da avaliação antiviral. Os triazóis não exerceram efeito inibitório contra o pseudovírus expresso pela proteína S de SARS-CoV-2, sendo necessário mais pesquisas em outras concentrações para avaliar o potencial desses compostos na inibição da replicação do SARS-CoV-2.

Palavras-chave: Compostos *N*-heterocíclicos. Covid 19. *Click chemistry*.

Área do Conhecimento: Ciências Exatas e da Terra - Química.

Introdução

Os coronavírus representam um conjunto de vírus responsáveis por causar doenças em animais e também em humanos. Conjunto este responsável por causar epidemias, a Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS-CoV) em 2002-2003 e Síndrome Respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV) em 2012 (Souza *et al.*, 2017). No final de 2019, um novo coronavírus surgiu na China, expandindo mundialmente e tornando-se um desafio global. O SARS-CoV-2, vírus que designou a doença do COVID-19 nomeada pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus, é responsável por mais de 775 milhões de casos e 7 milhões de mortes confirmadas, sendo que estes números continuam aumentando diariamente (WHO, 2024). A vacinação aplicada no controle da COVID-19 diminuiu significativamente o número de mortes e hospitalizações relacionadas à doença. Entretanto, ainda há a incidência de casos de COVID-19 registrados dia após dia, demonstrando que a vacinação não previne completamente o desenvolvimento do vírus. Ainda não foram desenvolvidos até o momento nenhum medicamento eficaz e aprovado para o controle da COVID-19, tornando a descoberta de novos medicamentos antivirais uma necessidade (Musa *et al.*, 2023).

A síntese de novos derivados triazólicos é uma alternativa promissora para o desenvolvimento de novos produtos, uma vez que apresentam vasta aplicabilidade e bioatividade, das quais destacam-se

fungicida (Costa *et al.*, 2020), herbicida (Wang *et al.*, 2021), bactericida (Angajala *et al.*, 2016), além do potencial antiviral (Musa *et al.*, 2023; Said *et al.*, 2021). Os triazóis são compostos que possuem em sua estrutura um anel com cinco membros contendo três átomos de nitrogênio vicinais, podendo existir na forma de dois isômeros estruturais: 1,2,3-triazóis e 1,2,4-triazóis (Melo *et al.*, 2006).

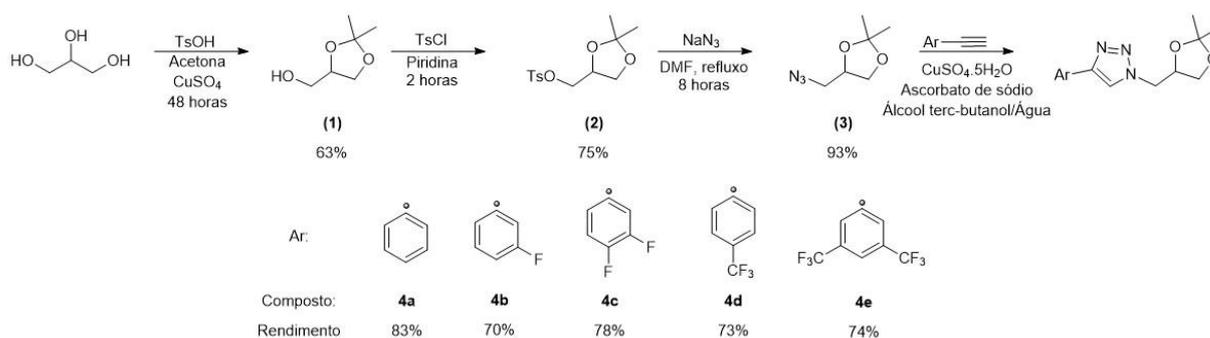
Para a síntese destes derivados triazólicos, o método mais empregado é a reação de cicloadição 1,3-dipolar entre uma azida orgânica e um alcino terminal catalisada por cobre (Costa *et al.*, 2017; 2020; Gonzales-Calderón *et al.*, 2016). A reação de cicloadição 1,3-dipolar catalisada por Cu(I) ocorre em temperaturas mais brandas, é rápida e regioseletiva, ou seja, sendo capaz de produzir somente o 1,2,3-triazol-1,4-dissubstituído com altos rendimentos (Meldal; Tornøe, 2008). O anel triazólico pode ser utilizado em combinação com outros grupos farmacóforos visando a obtenção de novos compostos mais eficazes e promissores, além de aumentar sua ação e/ou diminuir a toxicidade dos compostos puros (Haque *et al.*, 2017).

O glicerol é um subproduto gerado em excesso na produção de biodiesel. Este álcool é uma matéria-prima renovável podendo ser utilizada nas indústrias químicas e farmacêuticas, porém o uso convencional não é capaz de consumir o excesso de glicerol produzido, fazendo com que seu descarte indevido ocasiona impactos negativos ao meio ambiente. Dessa forma, novas pesquisas destinadas a diminuir este excesso produzido devem ser desenvolvidas (Monteiro *et al.*, 2018). Diante disso, este trabalho teve como objetivo realizar a síntese de cinco 1,2,3-triazóis-1,4- dissubstituídos, utilizando o glicerol como material de partida, e avaliar seu potencial citotóxico e antiviral sobre o pseudovírus expressando proteína S de SARS-CoV-2.

Metodologia

A síntese geral dos derivados triazólicos (**4k-4o**) seguiu a metodologia descrita por Barcelos *et al.* (2022) (Esquema 1).

Esquema 1 – Proposta geral de síntese dos triazóis (**4k-4o**) derivados do glicerol



Fonte: Os autores.

O teste citotóxico foi realizado utilizando células Vero E6 com superexpressão de receptor ACE2 tratadas com os derivados triazólicos sintetizados (Ferreira *et al.*, 2012). A viabilidade das células foi realizada por meio do ensaio colorimétrico do brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT). As células (5×10^4 células) foram adicionadas em placas de 96 poços contendo o meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) contendo penicilina (100 U mL^{-1}), estreptomicina ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) e 10% de soro fetal bovino (SFB). As células virais foram incubadas em estufa por 24 horas a 37°C com 5% de CO_2 . Posteriormente, uma solução contendo todos os derivados triazólicos nas concentrações de 10 ou $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ foi adicionada aos poços das placas e mantidas por mais 48 horas nas mesmas condições. Todas as concentrações foram testadas em quadruplicatas. Após este tempo, $10 \mu\text{L}$ de solução de MTT na concentração de $5,0 \text{ mg mL}^{-1}$ foi adicionado aos poços e incubado por mais 4 horas. Após o término das 4 horas, o meio de cultura foi removido e os sais sólidos formados foram dissolvidos em $100 \mu\text{L}$ de DMSO. A solução foi então analisada em um leitor de microplacas (SpectraMax M5 - Molecular Devices) em 570 nm .

A análise antiviral dos 1,2,3-triazóis (**4k-4o**) foi realizada a partir da utilização do pseudovírus expressando a proteína S de SARS-CoV-2, conforme descrito por Nie *et al.* (2020). As células Vero E6

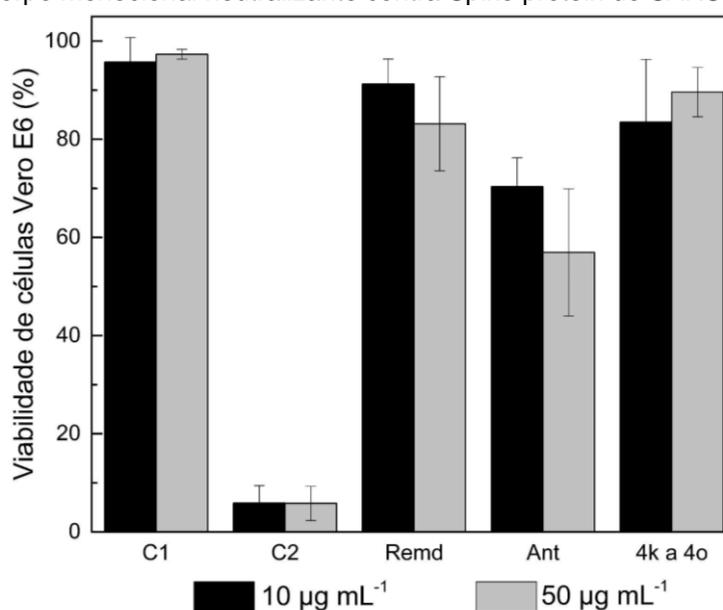
superexpressoras de ACE2 foram adicionadas em placas de 96 poços, com uma densidade de 5×10^4 células por poço, em um volume de 250 μL de meio RPMI suplementado com 10% de SFB. As placas foram incubadas a 37 °C e 5% de CO_2 por 24 horas. Em seguida, foram adicionadas 5×10^6 partículas de pseudovírus de SARS-CoV-2 (eENZYME, Estados Unidos), composto por *Maloney murine Leukemia Virus* (MLV) deficiente em replicação e expressando a proteína S de SARS-CoV-2 na superfície. Após a infecção viral, os compostos recém-sintetizados foram adicionados nas concentrações de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ou 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$. As placas foram incubadas novamente a 37 °C e 5% de CO_2 por mais 24 horas. Em seguida, foram adicionados 50 μL de substrato de luciferase (eENZYME, Estados Unidos) e a detecção do sinal foi realizada em um leitor de microplacas de luminescência (PerkinElmer). A porcentagem de infecção foi calculada comparando cada tratamento com o grupo controle não tratado. Como controles positivos de atividade antiviral, foram utilizados Remdesivir (Remd) e um anticorpo monoclonal neutralizante contra a proteína Spike do SARS-CoV-2 (Ant) (eENZYME, Estados Unidos). Os experimentos foram realizados em quadruplicatas.

Resultados

Por meio da rota sintética já estabelecida na literatura, os cinco derivados triazólicos foram obtidos em apenas quatro etapas reacionais, utilizando o glicerol, subproduto do biodiesel, como material de partida. Todos os compostos foram obtidos com rendimentos satisfatórios, sendo os 1,2,3-triazóis sintetizados com rendimentos superiores a 70%. Além disso, a estrutura química dos mesmos foram caracterizados por meio da espectroscopia no Infravermelho e Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e de ^{13}C e por espectrometria de massas (Barcelos *et al.*, 2022).

Na Figura 1, observa-se a análise da atividade citotóxica direta dos compostos triazólicos (**4k-4o**) sobre células Vero E6. Os resultados demonstram que os compostos não apresentaram toxicidade nas concentrações de 10 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e que podem ser avaliados quanto à atividade antiviral. Na concentração de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, os compostos sintetizados apresentaram valores maiores da viabilidade das células quando comparados ao produto comercial (remdesivir), tornando-os menos citotóxicos sobre as células Vero E6.

Figura 1 - Atividade citotóxica dos compostos **4k-4o** sobre células Vero E6 superexpressora de ACE2. Controles: C1 (DMSO 0,05% em meio de cultura); C2 (DMSO 10,00%); Remd (remdesivir) e Ant (anticorpo monoclonal neutralizante contra Spike protein de SARS-CoV-2).

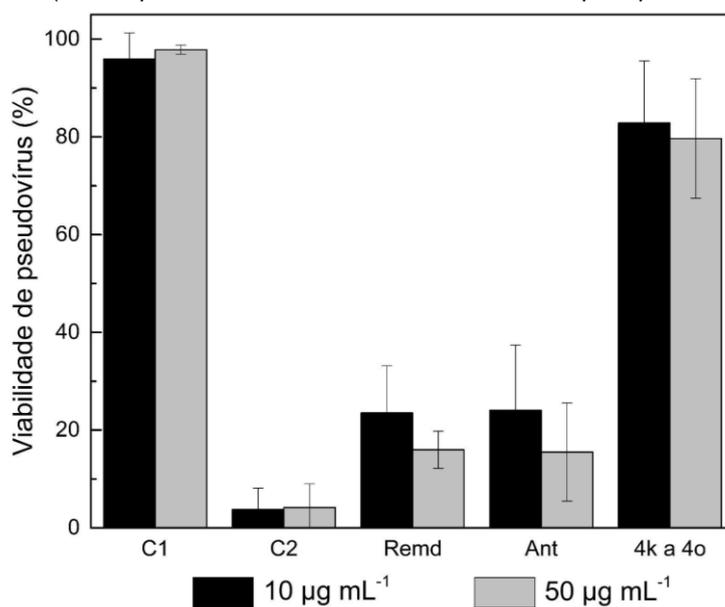


Fonte: Os autores.

Na Figura 2, observa-se a atividade antiviral dos compostos triazólicos (**4k-4o**) contra pseudovírus expressor de proteína S de SARS-CoV-2. Embora os controles positivos Remd e Ant na

concentração de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ tenham demonstrado capacidade de inibir a infecção viral em menos de 20%, os compostos **4k-4o** não apresentaram atividade de inibição da infecção viral (superior a 80%) nas concentrações avaliadas.

Figura 2 - Atividade antiviral dos compostos **4k-4o** contra pseudovírus expressor de proteína S de SARS-CoV-2. Controles: C1 (DMSO 0,05% em meio de cultura); C2 (meio de cultura sem o vírus); Remd (remdesivir) e Ant (anticorpo monoclonal neutralizante contra Spike protein de SARS-CoV-2).



Fonte: Os autores.

Discussão

A síntese dos derivados triazólicos (**4k-4o**) seguiu a metodologia de reação “*Click chemistry*” entre a azida orgânica (**3**) e diferentes alcinos terminais, utilizando o cobre (I) como catalisador da reação. Na reação de cicloadição, a utilização do cobre como catalisador promove um aumento de 10^7 vezes na velocidade da reação, além de favorecer a formação exclusiva do regioisômero 1,4-dissubstituído (Sharpless; Kolb; Finn, 2001). Dessa forma, no presente estudo a rota sintética utilizada para obtenção dos cinco derivados triazólicos se mostrou de fácil execução, com baixos tempos reacionais, capazes de ocorrer em baixas temperaturas e com bons rendimentos, sendo estes superiores a 70%. Costa *et al.* (2020) também realizaram a síntese de nove novos derivados triazólicos obtidos a partir do glicerol utilizando a *Click Chemistry*. Os triazóis foram obtidos com rendimentos variando entre 75% e 94%, confirmando assim a eficiência da reação click na obtenção de derivados triazólicos.

Os compostos sintetizados (**4k-4o**) foram avaliados quanto à sua citotoxicidade e atividade antiviral contra SARS-CoV-2. As análises indicaram que esses compostos não exibiram citotoxicidade em relação às células Vero E6 com superexpressão de ACE2, mostrando um perfil favorável em comparação com controles positivos Remdesivir e o anticorpo monoclonal neutralizante contra a proteína *Spike* do SARS-CoV-2. Em termos de atividade antiviral, os compostos foram testados contra um pseudovírus que expressa a proteína *Spike* do SARS-CoV-2 em concentrações de 10 e $50 \mu\text{g/mL}$. Os resultados demonstraram que os compostos não mostraram nenhuma atividade inibitória significativa contra a infecção viral nessas concentrações. Isso sugere que, embora os compostos triazólicos não sejam tóxicos, eles podem não inibir efetivamente a entrada ou replicação viral com base no teste empregado. Mais pesquisas são necessárias para avaliar o potencial desses compostos na inibição da replicação do SARS-CoV-2 e na produção de partículas virais infecciosas, como testes diretos com vírus vivo e ativo, essenciais para uma avaliação abrangente de sua eficácia antiviral.

Conclusão

A reação de cicloadição 1,3-dipolar, que se enquadra dentro do conceito de reação “Click Chemistry”, mostrou-se eficiente para síntese de derivados 1,2,3-triazólicos a partir do glicerol, sendo obtidos com altos valores de rendimento e alta seletividade. Além disso, a rota mostrou-se simples e de fácil execução, com apenas quatro etapas reacionais.

Os compostos triazólicos (**4k-4o**) não demonstraram inibição da infecção viral nas concentrações testadas. No entanto, como não apresentaram citotoxicidade, ainda é possível avaliar esses compostos em novas concentrações, além de estudar outros mecanismos de inibição de infecções virais.

Referências

- ANGAJALA, K. K. *et al.* Synthesis, anti-inflammatory, bactericidal activities and docking studies of novel 1,2,3-triazoles derived from ibuprofen using click chemistry. **SpringerPlus**, v. 5, p. 1-15, 2016.
- BARCELOS, F. F. *et al.* Synthesis of glycerol-fluorinated triazole derivatives and evaluation of their fungicidal activity. **Quím. Nova**, v. 45, n. 07, p. 788-796, 2022.
- 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. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 31, n. 4, p. 821-832, 2020.
- COSTA, A. V. *et al.* Synthesis of novel glycerol-derived 1,2,3-triazoles and evaluation of their fungicide, phytotoxic and cytotoxic activities. **Molecules**, v. 22, n. 10, p. 1666-1681, 2017.
- FERREIRA, R. A. *et al.* New naphthoquinones and an alkaloid with *in vitro* activity against *Toxoplasma gondii* RH and EGS strains. **Exp. Parasitol.**, v. 132, n. 4, p. 450-457, 2012.
- GONZÁLEZ-CALDERÓN, D. *et al.* Azide-enolate 1,3-dipolar cycloaddition in the synthesis of novel triazole-based miconazole analogues as promising antifungal agents. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 112, p. 60-65, 2016.
- HAQUE, A. *et al.* Synthesis, characterization, and pharmacological studies of ferrocene-1H-1,2,3-triazole hybrids. **J. Mol. Struct.**, v. 1146, p. 536-545, 2017.
- MELDAL, M.; TORNØE, C. W. Cu-catalyzed azide-alkyne cycloaddition. **Chem. Ver.**, v. 108, n. 8, p. 2952-3015, 2008.
- MELO, J. O. F. *et al.* Heterociclos 1,2,3-triazólicos: Histórico, métodos de preparação, aplicações e atividades farmacológicas. **Quím. Nova**, v. 29, n. 3, p. 569-579, 2006.
- MONTEIRO, M. R. *et al.* Glycerol from biodiesel production : Technological paths for sustainability. **Renew. Sustain. Energy Rev.**, v. 88, p. 109-122, 2018.
- MUSA, A. *et al.* Phenylpyrazolone-1, 2, 3-triazole hybrids as potent antiviral agents with promising SARS-CoV-2 main protease inhibition potential. **Pharmaceuticals**, v. 16, n. 3, p. 463, 2023.
- NIE, J. *et al.* Establishment and validation of a pseudovirus neutralization assay for SARS-CoV-2. **Emerg. Microbes & Infect.**, v. 9, n. 1, p. 680- 686, 2020.
- SAID, M. A. *et al.* New 1,2,3-Triazole scaffold schiff bases as potential anti-COVID-19: Design, synthesis, DFT-molecular docking, and cytotoxicity aspects. **Vaccines**, v. 9, n. 9, p. 1012, 2021.
- SHARPLESS, K. B.; KOLB, H. C.; FINN, M. G. Click Chemistry: Diverse chemical function from a few good reactions. **Angew. Chem. Int. Ed.**, v. 40, n. 11, p. 2004-2021, 2001.
- SOUZA, L. C. de. *et al.* SARS-CoV, MERS-CoV e SARS-CoV-2: Uma revisão narrativa dos principais coronavírus do século. **Braz. J. Health Rev.**, v. 4, n.1, p.1419-1439, fev. 2021.

SU, C. *et al.* Using gene expression database to uncover biology functions of 1,4- disubstituted 1,2,3-triazole analogues synthesized via a copper (I)-catalyzed reaction. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 132, p. 90–107, 2017

WANG, Y. *et al.* Design, synthesis, and herbicidal activity of thioether containing 1, 2, 4-triazole schiff bases as transketolase inhibitors. **J. Agric. Food Chem.**, v. 69, n. 40, p. 11773-11780, 2021.

WHO (World Health Organization). **Coronavirus disease (COVID-19)**. Disponível em: <https://data.who.int/dashboards/covid19/cases?n=c>. Acesso em: 29 jul. 2024.

Agradecimentos

Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (Fapes/CNPq nº 25/2022; Termos de outorga 039/2023). Os autores agradecem aos pesquisadores do Grupo de Estudo Aplicado em Produtos Naturais e Síntese Orgânica (GEAPS-UFES-CNPq) pelo apoio na estrutura e no aprendizado.