

## SÍNTESE E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL *In vitro* DE NOVOS DERIVADOS QUINOLIN-4-HIDRAZOTIAZOLIDINAS

Érica E. S. Rodrigues<sup>1\*</sup>, Paulo F. S. Santos-Júnior<sup>2</sup>, José B. Vieira-Neto<sup>3</sup>, Igor J. S. Nascimento<sup>2</sup>, Edeildo F. Silva-Júnior<sup>2</sup>, Manoel O. Moraes<sup>4</sup>, Carlos R. K. Paier<sup>4</sup>, Cláudia Pessoa<sup>4</sup>, Thiago M. Aquino<sup>5</sup>, João X. Araújo-Júnior<sup>6</sup>

1. Mestranda da Escola de Enfermagem e Farmácia (EENFAR) da UFAL.
2. Doutorando do Instituto de Química e Biotecnologia (IQB) da UFAL.
3. Mestrando em Farmacologia da UFC
4. Professor (a) Doutor (a) da Universidade Federal do Ceará (UFC)
5. Professor Doutor do Instituto de Química e Biotecnologia -UFAL / Co-orientador
6. Professor Doutor Escola de Enfermagem e Farmácia- UFAL/Orientador

### Resumo:

O câncer está entre as doenças de maior impacto mundial, o que torna a busca de alternativas terapêuticas emergencial. O presente trabalho objetivou, além de sintetizar uma nova série de derivados quinolin-4-hidrazotiazolidinas planejados para atividade antitumoral, realizar um aperfeiçoamento da metodologia de síntese por meio da sonicação. Os resultados mostraram que o emprego da sonicação conduziu a formação dos compostos com alto grau de pureza (>95%), rendimentos elevados (87-95%) e tempo de reação reduzido (20-55min), mostrando-se mais vantajoso que o método convencional, que mostrou rendimentos de 43-80%, em reações de 24-36h. Na análise da atividade biológica, as substâncias (LQM 168), (LQM 183) e (LQM 184) apresentaram redução do crescimento celular (RVC) elevada (>70%) nas linhagens celulares tumorais. Contudo, a substância (LQM 168) demonstrou um potencial citotóxico relevante frente à linhagem tumoral HL-60, apresentando  $CI_{50} = 2.4 \mu M$ , sendo assim a de maior potencial da série.

**Palavras-chave:** Sonoquímica, Anticâncer, Tiazolidina.

**Apoio financeiro:** FAPEAL, CNPq, CAPES.

### Introdução:

O câncer representa um grande impacto na saúde pública, sendo considerado a segunda causa de mortes mundiais, onde, somente no ano de 2015, mais de 8 bilhões de óbitos foram reportados (WHO, 2018). Embora diversos fármacos estejam disponíveis e diversas estratégias terapêuticas terem sido testadas e implementadas, a eficácia dos tratamentos atuais ainda é limitada, tornando esta doença uma preocupação global, sendo emergencialmente necessária a busca de substâncias seletivas para células cancerígenas (ASATI et al., 2014; ASATI et al., 2018).

Diante do cenário atual, as pesquisas relacionadas ao desenvolvimento de novos fármacos mostram-se essenciais, tornando a síntese orgânica voltada para fins terapêuticos uma ferramenta de extrema importância. Neste contexto, dentre o arsenal atual de estruturas químicas, os heterociclos demonstram-se potencialmente ativos frente à atividade anticâncer. Dentre estes, destacam-se o núcleo quinolinico, reportado na literatura como indutor de apoptose, inibidor do crescimento celular, inibidor da angiogênese e como agente intercalante de DNA (CHAVDA et al., 2010; KRAUSE et al., 2011; OAFZAL et al., 2014). Além deste, ressalta-se os derivados tazolidínicos, capazes de inibir a proliferação celular, uma vez que são agonistas do receptor nuclear PPAR $\gamma$  (GRILLIER-VUISOZ et al., 2012).

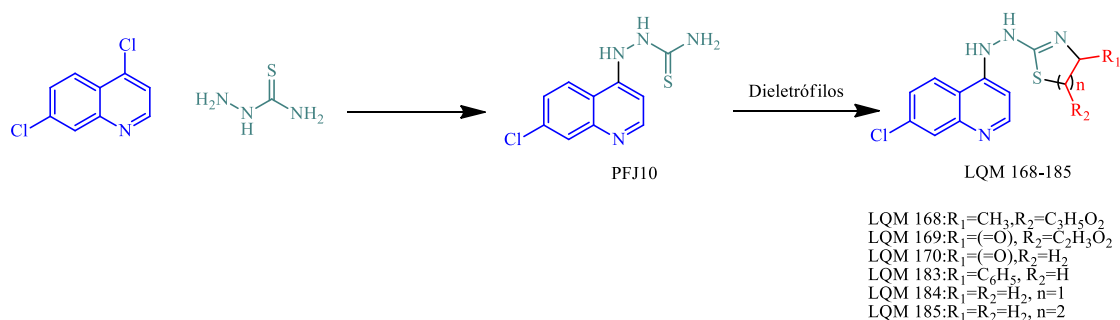
Tendo em vista o potencial farmacológico destes heterociclos, como estratégia de planejamento e desenvolvimento deste trabalho, adotou-se a hibridização molecular, constituindo-se como a união dos grupamentos farmacofóricos (TIETZE et al., 2003; VIEGAS-JUNIOR et al., 2007) para desenvolvimento de novas moléculas com direcionamento aos alvos biológicos envolvidos na patogênese do câncer.

Paralelo aos fins farmacológicos deste trabalho, visando aperfeiçoar as estratégias de obtenção dos compostos, utilizou-se, além dos métodos convencionais de síntese, o emprego da sonicação, com o intuito de promover a redução do tempo das reações químicas, subprodutos e elevar os rendimentos reacionais (BAZGIR et al., 2010; NI et al., 2010). Sendo assim, o presente trabalho tem por objetivo sintetizar e otimizar a obtenção de novos derivados quinolin-4-hidrazotiazolidinas planejados como potenciais agentes antitumorais.

### Metodologia:

A etapa inicial deste trabalho envolveu o processo de síntese dos compostos propostos por duas condições distintas, a convencional e a segunda sob irradiação de ultrassom, com o objetivo de otimizar a obtenção dos produtos planejados. Para isto, a rota de síntese foi realizada em duas etapas: a primeira consistiu na formação do intermediário (**PFJ10**), obtido pela substituição nucleofílica entre o heterociclo 4-7-dicloroquinolina e a tiossemicarbazida. O intermediário sintético (**PFJ10**) (1-(7-cloroquinolin-4-il) tiossemicarbazida) foi então submetido a reações de ciclizações com 6 diferentes di-eletrófilos (cloroacetoacetato de etila, anidrido maleico, 2-cloroacetato de etila, 2-bromoacetofenona, dibromoetano e dibromopropano) para obtenção dos compostos ciclizados da série quinolin-4-hidrazinotiazolidina (**LQM 168-185**), como mostrado na figura 1.

Figura 1: Rota geral de síntese.



Em seguida, foram determinadas as propriedades físico-químicas (ponto de fusão e grau de pureza), bem como caracterização estrutural de todos os compostos sintetizados. Para isto, os pontos de fusão das amostras foram mensurados em capilares abertos no equipamento MSTecnopon® PFMII Digital e a determinação do grau de pureza das amostras foi obtida por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada à luz ultravioleta visível (254 nm) utilizando o sistema isocrático (metanol 100%) ou acidificado com ácido fórmico (MeOH:0,1% AF) como fase móvel e coluna de fase reversa (C-18). As amostras foram analisadas com a concentração de 1mg/mL em corridas de 12-20 minutos, com volume de injeção de 5µL/min. A caracterização estrutural das amostras foi realizada através de Espectroscopia de infravermelho (KBr) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de hidrogênio (<sup>1</sup>H) e carbono treze (<sup>13</sup>C).

O potencial citotóxico dos compostos obtidos foi também investigado. Para tanto, o ensaio de citotoxicidade foi realizado *in vitro* em três linhagens de células cancerígenas (HL-60/leucêmica, PC-3/adenocarcinoma de próstata e SF-295 /glioblastoma) através do método MTT (MOSMAN, 1983). A redução da viabilidade celular das linhagens tumorais foi determinada sob tratamento com os compostos em concentração de 10µg durante 72 horas. Os compostos que apresentaram alta inibição da viabilidade celular (>70 %) em pelo menos uma linhagem de células foram selecionados para quantificação da concentração inibitória em 50 % da população celular (CI<sub>50</sub>).

### Resultados e Discussão:

A síntese dos compostos foi realizada através de duas condições experimentais, a convencional e a sob efeito de sonificação. Para isto, os parâmetros químicos (solvente, catalisadores e proporções) foram mantidos entre as mesmas reações, o que permitiu comparar a eficácia entre as metodologias. A síntese do intermediário 1-(7-cloroquinolin-4-il) tiossemicarbazida (PFJ10) foi obtido de modo eficaz, apresentando um alto rendimento (99%) no método convencional. As reações de ciclizações para obtenção dos compostos requeridos desenvolvidas na condição convencional conduziram a formação dos compostos com tempo de reação de 24-36h e rendimentos de 43-90%. Por outro lado, os compostos finais requeridos obtidos através da sonificação exibiram tempos de reações 20-55 min e rendimentos reacionais >87%. A maior efetividade na síntese observada na metodologia de sonificação é justificada pela colisão molecular superior às exercidas em reações de metodologia convencional (MASON, 2002), o que conduz a um tempo de reação menor e formação de menos subprodutos, o que justifica os resultados observados.

Os parâmetros físico-químicos demonstraram um alto grau de pureza entre os compostos (>95%) através da cromatografia líquida de alta eficiência. Tal padrão contribuiu para a caracterização estrutural dos compostos por IV e RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, onde foi possível confirmar a formação dos produtos, principalmente através da presença das bandas de absorção, dos sinais e deslocamentos químicos característicos para cada molécula.

A análise biológica dos protótipos foi iniciada pela avaliação da viabilidade celular, assim, o perfil citotóxico em linhagens de células cancerígenas foi avaliado *in vitro* como demonstrado na tabela 1.

Tabela 1: Citotoxicidade dos compostos em diferentes linhagens de células cancerígenas.

Cód.	Linhagem Celular					
	SF-295		HL-60		PC-3	
	RVC %	EPM	RVC %	EPM	RVC %	EPM
PFJ10	20.7	3.8	30.9	0.8	23.5	2.7
LQM 168	97.3	0.7	93.2	0.5	98.8	0.2
LQM 169	18.2	0.5	40.8	3.0	17.2	2.9
LQM 170	2.5	2.5	34.5	1.2	12.3	3.2
LQM 183	79.3	0.9	91.3	0.6	79.8	1.9
LQM 184	40.0	1.7	70.4	1.3	32.2	2.4
LQM 185	25.8	0.9	19.4	5.9	10.1	4.6

Os dados estão apresentados como percentuais de redução da viabilidade celular (RVC % ± EPM) obtidos pelo Programa GraphPad Prism versão 6.0, a partir de 2 experimentos independentes realizados em quadruplicata após 72 h de incubação.

Conforme demonstrado na tabela 1, os análogos ciclizados **LQM 168** e **LQM 183**, com aumento de volume hidrofóbico no anel tiazolidínico demonstraram uma alta redução da viabilidade celular nas três linhagens celulares estudadas. Por outro lado, o protótipo **LQM 184** (anel tiazolidínico não substituído) apresentou uma redução de viabilidade celular moderada em apenas uma das linhagens celulares (70,4% em HL-60). Deste modo, estes compostos foram selecionados para determinação da concentração inibitória 50 % e seletividade entre 4 linhagens de células tumorais, HCT-116 (carcinoma de cólon), PC3 (adenocarcinoma de próstata), SF-295 (glioblastoma) e HL-60 (leucêmica) e a célula não tumoral, L929 (Fibroblasto de tecido conectivo subcutâneo). A tabela 2 mostra os resultados obtidos.

**Tabela 2: Avaliação da citotoxicidade dos compostos em linhagens de células tumorais e não tumorais.**

Cód.	HCT-116	PC-3	HL-60	SF-295	L929
<b>LQM 168</b>	14,99 (14,01 – 16,03)	20,7 (18,3 – 23,2)	2,41 (2,02 – 2,87)	>27,62	25,32 (21,21 – 30,21)
<b>LQM 183</b>	17,74 (15,80 – 19,91)	>28,40	14,72 (12,72 – 17,04)	>28,40	>28,40
<b>LQM 184</b>	>35,97	>35,97	25,5 (20,5 – 31,3)	>35,97	>35,97
<b>DOX</b>	<b>0,12</b> (0,09- 0,17)	<b>0,76</b> (0,59-0,93)	<b>0,02</b> (0,01-0,02)	<b>0,24</b> (0,2-0,27)	<b>0,66</b> (0,49-0,83)

Os dados estão apresentados como valores de  $CI_{50}$  ou  $CE_{50}$  em  $\mu\text{M}$  e o intervalo de confiança. Obtidos por regressão não-linear pelo Programa GraphPad Prism versão 6.0, a partir de 2 experimentos independentes realizados em duplicata após 72 h (células de câncer e células não tumorais). Doxorubicina (DOX) foi utilizada como controle positivo.

Conforme observado na tabela 2, o composto (**LQM 184**) demonstrou menor seletividade dentre todas as linhagens, frente determinação das respectivas  $CI_{50}$ , sendo 25.5  $\mu\text{M}$  para HL-60, além de apresentar-se acima de 35  $\mu\text{M}$  para as demais linhagens (HCT, PC-3, SF295, bem como a não tumoral L929). De maneira semelhante, o composto (**LQM 183**) também não demonstrou relativa distinção entre os tipos de câncer, além de apresentar  $CI_{50}$  todas superiores a 14.72  $\mu\text{M}$ . Contudo, o composto (**LQM 168**), apresentou considerável seletividade frente à linhagem tumoral HL-60 ( $CI_{50}=2.41 \mu\text{M}$ ), sendo para as demais superior a 14.99  $\mu\text{M}$ .

Desse modo, o protótipo **LQM 168** demonstrou a melhor atividade atitumoral *in vitro* seletiva para o tipo de linhagem HL-60 (leucêmico), e também apresentou seletividade entre células tumorais e não tumorais ( $CI_{50}=25.32 \mu\text{M}$ ), tornando um composto promissor para elucidação do mecanismo de ação farmacológico.

### Conclusões:

O emprego da sonicação na metodologia de síntese conduziu a formação dos derivados quinolin-4-hidrazinotiazolidina com rendimentos entre 87-95%, somado a tempo reacional entre 20-55min e com elevado grau de pureza (>95%), mostrando-se mais eficaz que o método convencional de síntese, que demonstrou, por sua vez, entre 43-80%, entre 24-36h.

A avaliação citotóxica demonstrou que as substâncias (**LQM 168**), (**LQM 183**) e (**LQM 184**) apresentaram elevada atividade citotóxica contra uma das linhagens celulares de câncer humano utilizadas, onde as substâncias (**LQM 168**) e (**LQM 183**) destacaram-se por apresentar RCV > 70 % contra todas as linhagens testadas. Com isto, o composto (**LQM 168**) mostrou um potencial citotóxico seletivo à linhagem tumoral HL-60, apresentando  $CI_{50}=2.4 \mu\text{M}$ , sendo assim o mais potente frente às linhagens tumorais. Ressalta-se, ainda, que o referido composto apresentou  $CI_{50}=25.32 \mu\text{M}$  para células não tumorais (L929), demonstrando o potencial seletivo para linhagens tumorais.

### Referências bibliográficas

- ASATI, V., MAHAPATRA, D. K., BHARTI, S.K. Thiazolidine-2,4-diones as multi-targeted scaffold in medicinal chemistry: Potential anticancer agents. **European Journal of Medicinal Chemistry** V. 87, p. 814-833, 2014.
- ASATI, V.,BHARTI, S. K. Design, synthesis and molecular modeling studies of novel thiazolidine-2,4-dione derivatives as potential anti-cancer agents. **Journal of Molecular Structure**. V. 1154, p. 406-4017, 2018.
- BAZGIR, A., AHADI, S., GHAREMANZADEH, R., KHAVASI, H.R., MIRZAEI, P. Ultrasoundassisted one-pot, three-component synthesis of spiro[indoline-3,40-pyrazolo[3,4-b]pyridine]-2,60(10H)-diones in water. **Ultrason. Sonochem.** V. 17, p. 447, 2010.
- CHAVDA, S., BABU, B., YANOW, S.K., JARDIM, A., SPITHILL, T.W., KIAKOS, K., KLUZA, J., HARTLEY, J.A., LEE, M. A novel achiral seco-cyclopropylpyrido[e]indolone (CPyl) analog of CC-1065 and the duocarmycins: synthesis, DNA interactions, in vivo anticancer and anti-parasitic evaluation. **Bioorg. Med. Chem.**, v.18, p.5016-5024, 2010
- GRILLIER-VUISSOZ, I., MAZERBOURG, S., BOISBRUN, M., KUNTZ, S., CHAPLEUR, Y., FLAMENT, S. PPAR $\gamma$ -independent activity of thiazolidinediones: a promising mechanism of action for new anticancer drugs. **J. Carcinog. Mutagen**, S8-002, p.2157-2518, 2012.

KRAUSE, F.R., EICK, A., GRÜNERT, R., BEDNARSKI, P.J., WEISZ, K. In vitro anticancer activity and evaluation of DNA duplex binding affinity of phenyl-substituted indoloquinolines. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v.21, p.2380-2383, 2011.

MASON, T.J., D. PETERS, Practical Sonochemistry, second ed., **Ellis Horwood**, London, 2002.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunology Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

NI, C.-L., Song, X.-H., Yan, H., Song, X.-Q., Zhong, R.-G. Improved synthesis of diethyl 2,6-dimethyl-4-aryl-4H-pyran-3,5-dicarboxylate under ultrasound irradiation. **Ultrason. Sonochem**, v.17, p. 367, 2010.

TIETZE, L.F., BELL, H.P., Chandrasekhar, S. Natural product hybrids as new leads for drug Discovery. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 42, p.3996-4028, 2003.

WHO. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>> . Acesso em: 10 de fevereiro de 2018.

VIEGAS-JUNIOR, C., DANUELLO, A., DA SILVA, et al. Molecular hybridization: a useful tool in the design of new drug prototypes. **Current Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 1829-1852, 2007.