

1.06.03 - Química / Físico-química

ESTUDOS ESTRUTURAIS E DE INTERAÇÃO COM A ALBUMINA SÉRICA HUMANA DE ÁCIDOS 2-(R-BENZENOSULFONIL)AMINOBENZÓICOSBruna C. de J. Ribeiro^{1*}, Lucius F. O. B. Filho², Ligiane R. Gouvea³, Letícia R. de S. Teixeira⁴

1. Estudante do Instituto de Ciências Exatas - Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais (ICEx - UFMG)
2. Pesquisador do ICEx- UFMG - Departamento de Química
3. Professora do Instituto Federal de Minas Gerais - IFMG/*Campus* Betim
4. Professora do ICEx-UFMG - Departamento de Química/Orientadora

Resumo

Antibióticos da classe das sulfonamidas vêm sendo vastamente aplicados como agentes terapêuticos desde a sua descoberta em meados do século XX. Por sua estrutura versátil, o grupo sulfonamido pode ser combinado a outros grupos bioativos, buscando um efeito sinérgico. Deste modo, no presente trabalho, sintetizamos três derivados da R-benzenossulfonila (R = H, CH₃ ou Cl) com o ácido 2-aminobenzóico. Os produtos obtidos foram caracterizados por análise elementar (C,H,N) e termogravimétrica (TG/DTG), difração de raios-X de monocristal, ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H) e espectroscopia na região do infravermelho (IV). Os resultados confirmaram as estruturas propostas e a difração de raios X mostrou que os compostos estão na forma de dímeros. Estudos da interação dos três compostos obtidos com a albumina sérica humana (HSA), um importante alvo molecular para o transporte de fármacos, mostraram que a interação é moderada e ocorre através de um mecanismo estático.

Palavras-chave: sulfonamidas; antibióticos; difração de raios X.

Apoio financeiro: CNPq

Trabalho selecionado para a JNIC: UFMG

Introdução

Desde a sua descoberta, em meados do século XX, as sulfonamidas (Figura 1) vêm sendo amplamente utilizadas como agentes terapêuticos na medicina humana e veterinária [1]. Elas foram os primeiros compostos sintéticos com propriedades antibacteriana, introduzidos clinicamente em 1934, e apresentam atualmente cerca de 200 derivados em uso clínico com atividade contra bactérias *Gram*-positivas, algumas *Gram*-negativas e protozoários [2,3].

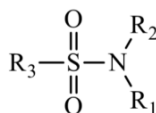


Figura 1 - Estrutura geral das sulfonamidas

Estes compostos são antagonistas metabólicos competitivos do ácido *p*-aminobenzóico (PABA), interferindo na inibição do metabolismo do ácido fólico, essencial para a síntese de precursores do RNA e DNA bacteriano [4].

Na literatura relata-se a aplicação de derivados de sulfonamidas para o tratamento de doenças como amigdalite [5] e infecções do trato urinário [6]. Além disso, por sua estrutura versátil, o grupo sulfonil pode ser combinado a outros grupos que apresentam atividade biológica. Como exemplo, derivados de sulfonamida com piperazina são conhecidos por apresentar vasta gama de atividades farmacológicas como antibacteriano, antiproliferativo, anti-HIV e antifúngico [4-7].

Deste modo, no presente trabalho, preparamos três derivados da R-benzenossulfonila (R = H, CH₃ ou Cl) com o ácido 2-aminobenzóico (Figura 2), com o objetivo de avaliar o efeito da inserção desse grupo na atividade antimicrobiana das sulfonamidas. Estudamos ainda a interação dos compostos preparados com a albumina sérica humana (HSA), um importante alvo molecular para o transporte de fármacos. Monocristais adequados para análise por difração de raios X dos três compostos foram obtidos e, desse modo, pudemos estudar as estruturas cristalográficas e empacotamento cristalino, e o efeito das variações dos grupos substituintes na interação com a HSA.

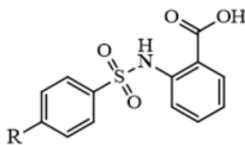


Figura 2 - Estrutura dos ácidos 2,R-sulfonilaminobenzóicos [R = H (HL1), CH₃(HL2) ou Cl (HL3)]

Metodologia

As sínteses de HL1, HL2 e HL3 foram feitas seguindo o procedimento descrito na literatura [8]. A um balão de reação adaptado com pHmetro, quantidades equimolares do ácido 2-aminobenzóico e dos cloretos de R-sulfonila foram adicionados a 30 mL de água destilada. O pH da mistura reacional foi mantido na faixa de 8,0 a 9,0 pela adição de uma solução saturada de Na_2CO_3 . Após total consumo dos reagentes, a solução foi acidificada até pH 2,0 com uma solução concentrada de ácido clorídrico. Os sólidos brancos formados foram filtrados, lavados com água e deixados em pressão reduzida até adquirir massa constante.

Os compostos foram caracterizados por análise elemental (C,H,N - PE 2400 CHN Elemental Analyzer/DQ-UFMG), análise termogravimétrica (TG/DTG - Termobalança Shimadzu TGA-5H/DQ-UFMG), ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H - Brucker DRX-400 Avance e Brucker DPX-200/Laboratório de Ressonância Magnética de Alta Resolução (Laremar)/DQ-UFMG), espectroscopia na região do infravermelho (IV - Mattson Instruments Galaxy 3000/DQ-UFMG) e espectrometria de massas com ionização electrospray (ESI-MS e ESI-MS/MS - DQ/UFMG).

Monocristais adequados para análise por difração de raios X dos ácidos 2,R-sulfonilaminobenzóicos foram obtidos por evaporação lenta à temperatura ambiente da solução de etanol contendo os compostos. As estruturas cristalográficas dos compostos foram determinadas no Departamento de Física da UFMG (LabCri) com a colaboração do Dr. Lucius F. Bomfim Filho. As medidas dos monocristais foram feitas em um difratômetro Oxford-Diffraction GEMINI/Agilent com fonte raios X $\text{MoK}\alpha$ ($\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$). O pacote de software CrysAlisPro foi usado para coleta e redução de dados. As estruturas foram resolvidas por métodos diretos usando SHELXS-97 e refinadas por mínimos quadrados de matriz completa em F^2 utilizando o SHELXL-2014. O programa Mercury versão 3.9 foi utilizado para obtenção das figuras.

Estudos de interação dos compostos com a albumina sérica humana (HSA) foram feitos por titulação fluorimétrica. Os espectros de fluorescência foram obtidos no espectrômetro CARY Eclipse – Varian (Agilent Technologies) do DQ/UFMG. Os compostos foram dissolvidos em DMSO na concentração de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (solução estoque). Em seguida, soluções de trabalho foram preparadas diluindo as soluções estoques em tampão tris-HCl ([tris-HCl] = 5 mM, [NaCl] = 50 mM, pH=7,2). A solução de albumina foi preparada pela dissolução da HSA em tampão tris-HCl. Nos experimentos, soluções de 3,0 mL da HSA foram colocadas sob constante agitação magnética em cubetas de quartzo. Alíquotas de 100 ou 50 μL da solução dos compostos em estudo foram tituladas a cada cinco minutos. Após o período de incubação, leituras da intensidade de fluorescência foram registradas na faixa de 305 a 560 nm, com excitação em 295 nm. As constantes de supressão foram calculadas usando a Equação de Stern-Volmer [9].

Resultados e Discussão

Os dados de análise elemental, análise termogravimétrica, ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) e espectroscopia na região do infravermelho (IV) confirmaram a obtenção dos compostos esperados. Nos espectros de RMN ^1H dos três compostos, a integração dos sinais dos hidrogênios foi convergente com a proporção de hidrogênio esperada. A inserção dos grupos R-sulfonil ao ácido 2-aminobenzóico levou a um deslocamento para campo baixo dos sinais relativos aos ácidos precursores nos espectros de RMN de ^1H . O deslocamento mais significativo foi do hidrogênio ligado ao nitrogênio nos ácidos. Isto é justificado, em parte, pela variação do grupo funcional relativo ao nitrogênio, inicialmente amínico e posteriormente amídico, deixando este hidrogênio mais desblindado. Os sinais do hidrogênio COOH , quando observados, apresentaram valores de deslocamento químico grandes em razão da ligação de hidrogênio intramolecular entre o grupo amídico (NH) e um dos oxigênios da carboxila. Esta ligação de hidrogênio intramolecular também acarretou um maior deslocamento químico do hidrogênio amídico. As estruturas cristalográficas de HL1, HL2 e HL3 foram determinadas por difração de raios-X de monocristais. As estruturas resolvidas e a numeração utilizada na identificação dos átomos são apresentadas na Figura 3.

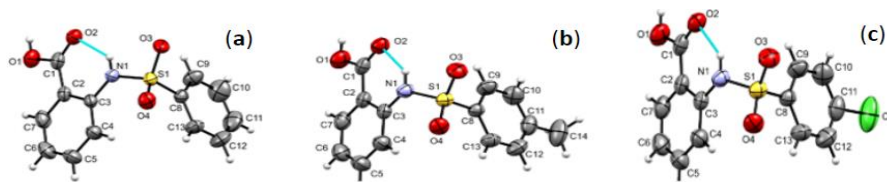


Figura 3- Representação ORTEP dos compostos a) HL1, b) HL2 e c) HL3 (elipsóides com 50% de probabilidade)

Observou-se que as estruturas de HL1, HL2 e HL3 se encontram em conformação similar (Figura 4a). Isso provavelmente se deve às ligações de hidrogênio intramoleculares $\text{N1-H1}\cdots\text{O2}$ e $\text{C4-H4}\cdots\text{O4}$ (Figura 4a) presentes nas moléculas, que reduziram a liberdade de rotação nas ligações simples, C3-N1 e S1-N1 . Nas estruturas dos compostos, duas moléculas adjacentes formaram um dímerocentrossimétrico $\text{R}_2^2(8)$ através de um par de ligações de hidrogênio $\text{O1-H1}\cdots\text{O2}$ (Figura 4b).

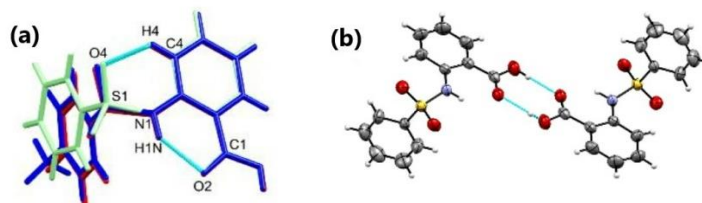


Figura 4 – (a) Comparação das unidades assimétricas dos compostos (em verde – HL1, em azul – HL2, em vermelho – HL3) e (b) Representação ORTEP do dímero do composto HL1 (50 % de probabilidade)

De modo a relacionar a variação estrutural dos novos ácidos e a sua interação com alvos biológicos e mecanismos de propagação em meio biológico, fez-se a escolha de avaliar a relação estrutural dos compostos e suas variações de grupo (H-, CH₃- e Cl-) com o estudo da interação com a albumina sérica humana (HSA). Em todos os casos, a supressão da emissão de fluorescência do Trp-214 e um deslocamento hipsocrômico foram observados após a adição das alíquotas dos compostos, o que indica a interação dos compostos com a albumina e a alteração do microambiente em torno do Trp-214, tornando-o mais hidrofóbico (Figura 5) [10].

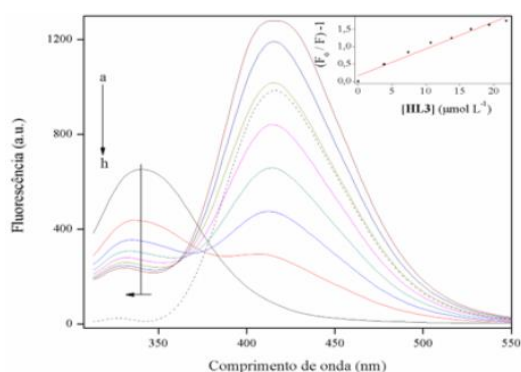


Figura 5 – Espectro de fluorescência do composto HL3 a 25°C. a: Curva da HSA sem adição do composto, b-h: adição do composto, linha tracejada: espectro do composto HL3. Inset: gráfico de Stern-Volmer da interação HL3-HSA em tampão Tris-HCl, pH 7,2.

Os valores das constantes de interação K_{sv} entre os ácidos e a HSA foram da ordem de grandeza de 10^4 L mol^{-1} , indicando que estes compostos apresentam uma força de ligação moderada com a proteína (Tabela 1). Os valores calculados para a constante k_q , referentes à eficiência de supressão ou acessibilidade ao agente supressor foram maiores do que a constante de velocidade de supressão limite por difusão controlada ($2,0 \times 10^{10} \text{ L mol}^{-1}$) [11]. Isto sugere que as interações entre estes compostos e a albumina ocorrem principalmente por meio do mecanismo estático.

Tabela 1 – Dados referentes ao tratamento matemático dos parâmetros fluorimétricos: constante de Stern-Volmer (K_{sv}), constante de supressão biomolecular (k_q), constante de ligação (k) e número de sítios de ligação por proteína associadas à interação compost-HSA (η).

Composto	K_{sv} ($\times 10^4 M^{-1}$)	K_q ($\times 10^{12} M^{-1} s^{-1}$)	R^a	K ($\times 10^3 M^{-1}$)	η	R^b
HL1	6,59	6,59	0,9998	0,13	0,408	0,9893
HL2	6,30	6,30	0,9975	2,88	0,705	0,9947
HL3	7,73	7,73	0,9861	4,31	0,726	0,9976

R^a e R^b correspondente aos coeficientes de correção para os valores de K_{sv} e k , respectivamente

Conclusões

Neste trabalho uma série de três compostos obtidos pela inserção do grupo R-benzenossulfonil com o ácido 2-aminobenzóico foi apresentada. A caracterização por termogravimetria e análise elementar de CHN indicou que os compostos são anidros. As análises cristalográficas apresentaram características intrínsecas à série, onde as ligações de hidrogênio intramoleculares afetam diretamente a conformação e a interação intermolecular dos compostos. As estruturas apresentaram ligações de hidrogênio intramoleculares N1–H1N...O2 e C4–H4...O4 que reduziram a liberdade de rotação nas ligações simples, C3–N1 e S1–N1 fazendo com que as estruturas da série se encontrassem em conformação similar.

A interação dos ácidos com a HSA acarretou uma supressão da emissão de fluorescência do Trp-214 e um deslocamento hipsocrômico indicando uma mudança no microambiente em torno do Trp-214, tornando-o mais hidrofóbico. A força de ligação entre os compostos com a HSA foi dada como moderada pelos valores da constante de interação K_{sv} , além de inferir que o mecanismo estático foi predominante na interação.

Referências bibliográficas

- [1]. N. Pastor-Navarro, A. Maquieira, R. Puchades, **Analytical and Bioanalytical Chemistry** 395 (2009) 907.
- [2]. H.X. Dai, A.F. Stepan, M.S. Plummer, Y.H. Zhang, J.Q. Yu, **Journal of the American Chemistry Society** 133 (2011) 7222.
- [3]. S.L. Górnaiak, Quimioterápicos. In: H.S. Spinosa, S. L. Górnaiak, M.M. Bernardi, **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 36 (2006) 453-456.
- [4]. Y. Deng, B. Li, T. Zhang, **Environmental Science & Technology** 52 (2018) 3854.
- [5]. A. Achari, D.O. Somers, J.N. Champness, P.K. Bryant, J. Rosemond, D.K. Stammers, **Nature Structural & Molecular Biology** 4 (1997) 490.
- [6]. A. Mahmmoud, T. Akram, E.B. Lima, **Journal of Molecular Structure** 1108 (2016) 496.
- [7]. J. Wang, S. Wang, **Applied Microbiology and Biotechnology** 102 (2018) 3573.
- [8]. X. Deng, N.S. Mani, **Green Chemistry** 8 (2006) 835.
- [9]. J.R. Lakowicz, **Principles of Fluorescence Spectroscopy**, 3ª ed., Springer Science, 2006.
- [10]. S. Naveenraj, S. Anandan, **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews** 14 (2013) 14.
- [11]. M.B. Moreira, D.S. Fraciscato, K.F.C. Toledo, J.R.B. Souza, H.S. Nakatani, V.R. Souza, **Química Nova** 38 (2015) 227.