

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO DE N(4)-PARA-TOLUILTIOSSEMICARBAZONAS E DE SEUS COMPLEXOS DE FE(III) E DE N-4-METIL-TIOSSEMICARBAZONAS E SEUS COMPLEXOS DE MN(II) EXPOSTOS À *Artemia sp*

Alunos: Mariana G. Milani
Orientadores: Roberta L. Ziolli

Resumo

Tiossemicarbazonas e seus complexos metálicos possuem significativa atividade *in vitro* frente a várias linhagens de células tumorais humanas. Sabe-se que tiossemicarbazonas derivadas da piridina, que contém o sistema quelante tridentado (N-N-S), são mais ativas como antitumorais que os derivados bidentados (N-S). Sabe-se ainda que tiossemicarbazonas com grupos volumosos no nitrogênio terminal apresentam maior atividade antitumoral do que aquelas não substituídas. Nesse trabalho avaliamos os potenciais citotóxicos de 2-formilpiridina p-toluiltiossemicarbazona (H2Fo4pT) e 2-acetilpiridina p-toluiltiossemicarbazona (H2Ac4pT) assim como de seus complexos de Fe(III) utilizando *Artemia sp*. Essas tiossemicarbazonas contêm o sistema quelante tridentado (N-N-S) e um substituinte volumoso (p-toluil) no nitrogênio terminal. Avaliamos também os potenciais citotóxicos de complexos de Mn(II) derivados de N-4-metil-4-nitrobenzaldeído-tiossemicarbazona (H4NO₂Fo4M), N-4-metil-4-nitrobenzofenona-tiossemicarbazona (H4NO₂Bz4M) e de N-4-metil-4-nitroacetofenona-tiossemicarbazona (H4NO₂Ac4M) utilizando *Artemia sp*. Essas tiossemicarbazonas contêm o sistema quelante bidentado (N-S). O ligante H2Ac4pT apresentou menor valor de CL_{50; 48h} que seu respectivo complexo indicando que a complexação leva a uma menor citotoxicidade do composto. O contrário foi observado para o ligante H2Fo4pT que apresentou maior valor de CL_{50; 48h} que seu respectivo complexo. Entre os dois complexos de Fe(III) estudados o [Fe(H2Fo4pT)Cl₃] parece ser o mais promissor (CL_{50; 48h} = 0,94 mg L⁻¹). Os ligantes H4NO₂Fo4M, H4NO₂Bz4M e H4NO₂Ac4M não foram testados devido à baixa solubilidade, mas seus complexos de Mn(II) foram testados e o mais promissor parece ser o [Mn(H4NO₂Bz4Me)₂Cl₂] (CL_{50; 48h} = 17,40 mg L⁻¹). Testes preliminares indicam que as tiossemicarbazonas e seus complexos de Fe(III) e de Mn(II) têm atividade citotóxica, sugerindo que poderiam igualmente apresentar ação antitumoral.

Introdução

Artemia sp é um crustáceo da ordem Anostraca (sem carapaça) que vive em lagos de água salgada e salinas de todo o mundo, estando adaptada para sobrevivência em corpos de água que sofrem grandes variações sazonais, podendo tolerar salinidades que flutuam de 3,5 a 70 ‰.

Por ser amplamente utilizada como alimento vivo para peixes e outros crustáceos, seus ovos podem ser encontrados com facilidade em lojas de aquaristas. Além disso, os ovos não eclodidos são metabolicamente inativos, e podem ser conservados por longos períodos se mantidos desidratados e de preferência em vácuo e a baixas temperaturas (IPIMAR). Quando

rehidratados os ovos de *Artemia sp* eclodem em cerca de 24 horas, se em condições ambientais adequadas, chegando à fase adulta com 20 a 30 dias de vida. Esse ciclo de vida relativamente curto favorece seu uso em testes de toxicidade aguda e crônica.

O ensaio de toxicidade aguda com *Artemia sp* é um teste rápido, de baixo custo, eficiente e que requer uma pequena quantidade de amostra (2 – 20 mg). A simplicidade desse teste, que não requer métodos assépticos, nem equipamentos especiais, favorece sua utilização rotineira, podendo ser desenvolvido no próprio laboratório [9].

McLaughlin e al. (1998) relatam que esse ensaio tem boa correlação com atividade citotóxica em alguns tumores humanos sólidos e levou à descoberta dos *Annonaceous acetogenins* como nova classe de agentes antitumorais ativos. Os mesmos autores observaram que os valores de ED₅₀ encontrados para citotoxicidade, em geral eram 1/10 dos valores de LC₅₀ encontrados nos testes realizados com *Artemia sp*, sugerindo que tal teste pode ser utilizado como uma primeira análise do potencial citotóxico de novos compostos.

Nesse trabalho utilizamos *Artemia sp* para verificar o potencial citotóxico de N(4)-para-toluitiossemicarbazonas e de seus complexos de Fe(III) e de complexos de Mn(II) derivados de N-4-metil-tiossemicarbazonas.

As tiossemicarbazonas e seus complexos metálicos apresentam um amplo perfil farmacológico e constituem uma importante classe de compostos cujas propriedades têm sido extensivamente estudadas na Química Medicinal e, especificamente, na Química Medicinal Inorgânica, em razão de sua capacidade quelante e do papel da coordenação no seu mecanismo de ação. As tiossemicarbazonas são hoje a segunda classe mais importante de compostos antitumorais depois dos derivados do *cis*-diaminodicloroplatina(II), o cisplatina [1]. Sabe-se que tiossemicarbazonas derivadas da piridina, que contém o sistema quelante tridentado (N-N-S), são mais ativas como antitumorais que os derivados bidentados (N-S). Sabe-se ainda que tiossemicarbazonas com grupos volumosos no nitrogênio terminal apresentam maior atividade antitumoral do que aquelas não substituídas. Desse modo, preparamos tiossemicarbazonas tridentadas (N-N-S) derivadas de 2-formil e 2-acetilpiridina contendo o substituinte p-toluil no nitrogênio terminal (Figura 1) e seus complexos de Fe(III) a partir de FeCl₃.6H₂O. Os complexos obtidos são octaédricos do tipo [Fe(H₂Fo4pT)Cl₃] (1) e [Fe(H₂Ac4pT)Cl₃] (2) (Figura 2).

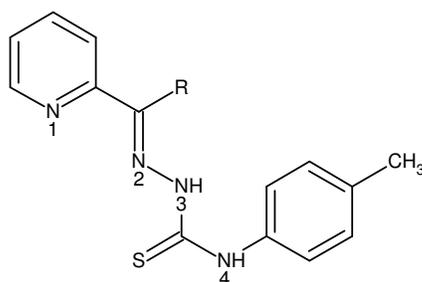


Figura 1: N(4)-para-toluitiossemicarbazonas derivadas de 2-formil (R = H, H₂Fo4pT) e 2-acetil (R = CH₃, H₂Ac4pT).

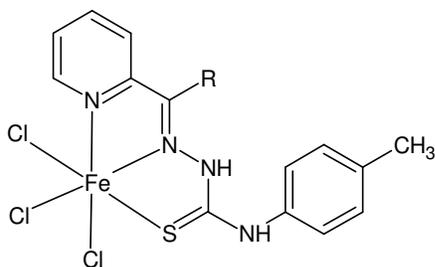


Figura 2 - Complexos de Fe(III) de N(4)-para-toluitiossemicarbazonas (R=H e CH₃).

Preparamos também tiossemicarbazonas bidentadas (N-S) derivadas de 4-nitrobenzaldeído, 4-nitrobenzofenona e 4-nitroacetofenona (Figura 3) e seus complexos de Mn(II) a partir de MnCl₂.4H₂O. Os complexos obtidos são [Mn(H4NO₂Fo4Me)₂Cl₂] (**3**), [Mn(H4NO₂Bz4Me)₂Cl₂] (**4**) e [Mn(H4NO₂Ac4Me)₂Cl₂] (**5**) (Figura 4).

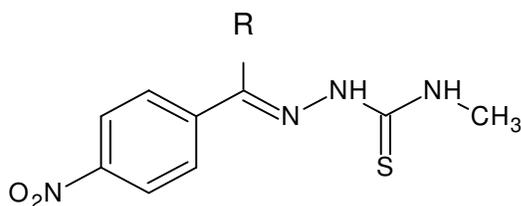


Figura 3 - N-4-metil-tiossemicarbazona derivadas de 4-nitrobenzaldeído (R=H, H4NO₂Fo4M), 4-nitrobenzofenona (R=C₆H₅, H4NO₂Bz4M) e 4-nitroacetofenona (R= CH₃, H4NO₂Ac4M).

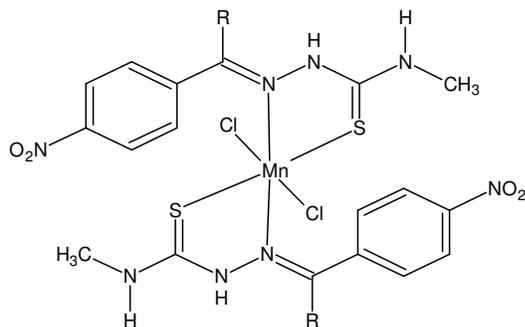


Figura 4 - Complexos de Mn(II) de N-4-metil-tiossemicarbazonas (R=H, C₆H₅ e CH₃)

Materiais e métodos

A metodologia utilizada para os ensaios de toxicidade utilizando *Artemia sp* foi baseada em Meyer et al.(1982), em Nascimento et al. (1999) e nas normas da CETESB-SP (1991).

Incubação

Em um recipiente retangular de 13,0 x 8,0 x 7,0 cm, com uma divisória contendo furos de aproximadamente 0,02 cm de espessura espaçados por 0,5 cm e distribuídos uniformemente, foram adicionados 350 mL de solução de sal marinho sintético (Red Sea Salt). O recipiente foi colocado dentro de uma incubadora iluminada por uma lâmpada fluorescente. Em um dos lados desse recipiente, adicionou-se cerca de 46 mg de cistos de *Artemia sp*, tomando-se o cuidado para que os mesmos não ultrapassassem a divisória. A parte do sistema contendo os cistos de *Artemia sp* foi coberta com papel alumínio, para que os organismos, ao nascerem, fossem atraídos pela luz do outro lado do sistema, forçando-os a atravessar a divisória. Tal procedimento visa uma homogeneização das condições físicas dos organismos-teste. A incubação foi feita por um período de 48 horas. Durante todo o ensaio a temperatura foi monitorada.

Exposição

Após o período de incubação, os organismos-testes (náuplios de *Artemia sp*) foram expostos às drogas de interesse por 48 horas, utilizando-se tubos de ensaio graduados, cada um contendo 10 náuplios de *Artemia sp*, previamente selecionados. Os testes foram feitos em triplicata para cada concentração de cada composto. Além disso, cada droga foi testada, no mínimo, três vezes, totalizando um mínimo de 9 ensaios por concentração do composto.

Determinou-se a faixa de concentração a ser testada, buscando sempre a maior concentração em que se observasse 0% de mortalidade e a menor concentração em que se deflagrasse 100% de mortalidade. As demais concentrações foram distribuídas dentro desse limite [10], de modo a obter a $CL_{50; 48h}$ (concentração letal para 50% da população em 48h) do composto testado.

As soluções dos compostos a serem testadas foram preparadas em 1 a 3% de DMSO (dimetilsulfóxido) e avolumadas com solução salina. Os testes para o controle também foram realizados em triplicata, utilizando-se uma solução de DMSO 1 a 3% diluído em solução salina.

Os controles foram utilizados também para se ter certeza de que a mortalidade observada nos náuplios de *Artemia sp* foi resultante da toxicidade aos compostos e não devido à falta de alimentação [3].

Contagem

Após 48 horas de exposição, foi feita a contagem de náuplios vivos e mortos, sendo considerados vivos todos aqueles que apresentassem qualquer tipo de movimento quando observados próximos a uma fonte luminosa por 10 segundos. Só foram considerados válidos os testes nos quais o controle apresentou uma mortalidade igual ou inferior a 10 % da população. Os resultados foram submetidos a tratamento estatístico utilizando o PROBIT, o qual forneceu os valores de $CL_{50; 48h}$.

Resultados e Discussão

A Tabela 1 mostra, para as N(4)-para-toluitiossemicarbazonas e seus complexos de Fe(III), e a Tabela 2 mostra, para os complexos de Mn(II) derivados de N-4-metil-tiossemicarbazonas, os valores de $CL_{50; 48h}$ e os limites de confiança obtidos da média das triplicatas para cada ensaio de toxicidade, assim como, a média dos valores de $CL_{50; 48h}$, o desvio padrão e a covariância (%) obtidos em cada composto.

Observa-se que, em geral, não houve grandes variações nos valores de $CL_{50; 48h}$ entre as replicatas de um mesmo composto. Os coeficientes de variação entre as replicatas variaram entre 0,01 e 4,12% para as N(4)-para-toluitiossemicarbazonas e seus complexos de Fe(III) e entre 4,78 e 14,78% para os complexos de Mn(II) derivados de N-4-metil-tiossemicarbazonas.

Sabe-se pela literatura que os resultados dos testes de toxicidade variam consideravelmente. Em trabalho desenvolvido com *Lytechinus variegatus* [7] foi encontrado um coeficiente de variação de 40,3% entre testes de toxicidade realizados com embriões. Outros autores relatam índices de variação em torno de 30%. Portanto, os índices de variação obtidos nesse trabalho são considerados muito bons, indicando que a metodologia utilizada forneceu dados que podem ser considerados repetíveis.

Tabela 1 - $CL_{50; 48h}$ para as N(4)-para-toluitiossemicarbazonas e seus complexos de Fe(III)

Composto	$CL_{50; 48h}$ (mg L ⁻¹)	Limite de confiança
H2Fo4pT	6,15	4,06 < CL < 8,4
	7,89	6,04 < CL < 9,43
	8,27	6,47 < CL < 9,77
Média $CL_{50; 48h} \pm DP$	7,44 ± 1,13	
CV (%)	1,28 %	
H2Ac4pT	1,44	1,19 < CL < 1,92
	1,31	1,03 < CL < 1,55
	1,31	1,03 < CL < 1,55
Média $CL_{50; 48h} \pm DP$	1,35 ± 0,08	
CV (%)	0,01 %	
[Fe(H2Fo4pT)Cl₃] (1)	0,75	1,13 < CL < 3,57
	0,95	0,16 < CL < 1,95
	1,14	0,29 < CL < 0,16
Média $CL_{50; 48h} \pm DP$	0,94 ± 0,0,19	
CV (%)	3,67 %	
[Fe(H2Ac4pT)Cl₃] (2)	2,63	1,27 < CL < 3,99
	2,32	1,13 < CL < 3,57
	2,24	0,86 < CL < 4,12
Média $CL_{50; 48h} \pm DP$	2,40 ± 0,20	
CV (%)	4,12 %	

$CL_{50; 48h}$ = concentração letal para 50% da população em 48h, DP= desvio padrão, CV=covariância

Tabela 2 - $CL_{50; 48h}$ para os complexos de Mn(II) derivados de N-4-metil-tiossemicarbazonas

Composto	$CL_{50; 48h}$ (mg L ⁻¹)	Limite de confiança
[Mn(H4NO₂Fo4Me)₂Cl₂] (3)	44,08	
	48,27	

	49,48
Média CL_{50; 48h} ± DP	47,28 ± 2,83
CV (%)	8,03%
[Mn(H4NO₂Bz4Me)₂Cl₂] (4)	18,65
	14,88
	18,68
Média CL_{50; 48h} ± DP	17,40 ± 2,19
CV (%)	4,78%
[Mn(H4NO₂Ac4Me)₂Cl₂] (5)	28,36
	18,66
	19,18
	25,55
	24,74
MÉDIA CL_{50; 48h} ± DP	24,46 ± 3,85
CV (%)	14,78%

CL_{50; 48h} = concentração letal para 50% da população em 48h, DP= desvio padrão, CV=covariância

A Tabela 3 resume os resultados mostrando o valor médio de CL_{50; 48h} para as N(4)-para-toluitiossemicarbazonas. Os ligantes H2Fo4pT e H2Ac4pT mostraram-se tóxicos nas concentrações de 7,44 mg L⁻¹ e 1,35 mg L⁻¹, respectivamente. Os complexos (1) e (2) apresentaram toxicidade nas concentrações de 0,94 mg L⁻¹ e 2,40 mg L⁻¹, respectivamente.

A Tabela 4 resume os resultados mostrando o valor médio de CL_{50; 48h} para os complexos de Mn(II) derivados de N-4-metil-tiossemicarbazonas. Os complexos (3), (4) e (5) apresentaram toxicidade nas concentrações de 47,28 mg L⁻¹, 17,40 mg L⁻¹ e 24,46 mg L⁻¹, respectivamente.

Quanto menor o valor de CL_{50; 48h}, mais tóxico é o composto frente a um organismo-teste, e maior é sua atividade citotóxica, sugerindo maior potencial como antitumoral.

Tabela 3 - CL_{50; 48h} (valor médio) para as N(4)-para-toluitiossemicarbazonas e seus complexos de Fe(III)

Composto	CL _{50; 48h} (mg L ⁻¹)*
H2Fo4pT	7,44 ± 1,13
[Fe(H2Fo4pT)Cl ₃] (1)	0,94 ± 0,19
H2Ac4pT	1,35 ± 0,08
[Fe(H2Ac4pT)Cl ₃] (2)	2,40 ± 0,20

CL_{50; 48h} = concentração letal para 50 % da população em 48h

*valor médio

Tabela 4 - CL_{50; 48h} (valor médio) para os complexos de Mn(II) derivados de N(4)-para-toluitiossemicarbazonas

Composto	CL _{50; 48h} (mg L ⁻¹)*
[Mn(H4NO ₂ Fo4Me) ₂ Cl ₂] (3)	47,28 ± 2,83
[Mn(H4NO ₂ Bz4Me) ₂ Cl ₂] (4)	17,40 ± 2,19
[Mn(H4NO ₂ Ac4Me) ₂ Cl ₂] (5)	24,46 ± 3,85

CL_{50; 48h} = concentração letal para 50 % da população em 48h
*valor médio

Podemos comprovar com resultados que as tiossemicarbazonas que contém o sistema quelante tridentado (N-N-S) são mais ativas como antitumorais que os derivados bidentados (N-S). E ainda que tiossemicarbazonas com grupos volumosos no nitrogênio terminal apresentam maior atividade antitumoral do que aquelas não substituídas.

Os compostos estudados apresentam significativa toxicidade aguda frente à *Artemia sp.*, em baixas concentrações, quando comparados ao Lapachol que é a droga de referência (CL_{50; 48h} = 68 mg L⁻¹) [8]. O complexo [Fe(H₂Fo₄pT)Cl₃] é o mais ativo com CL_{50; 48h} = 0,94 mg L⁻¹ e é o mais promissor como antitumoral.

Conclusão

Testes utilizando *Artemia sp.* indicam que as N(4)-para-toluitiossemicarbazonas e seus complexos de Fe(III) e os complexos de Mn(II) derivados de N-4-metil-tiossemicarbazonas têm atividade citotóxica, sugerindo que poderiam igualmente apresentar ação antitumoral.

Referências

- 1 - Beraldo H, Gambino D (2004). The Wide Pharmacological Versatility of Semicarbazones, Thiosemicarbazones and Their Metal Complexes. *Mini-Reviews on Medicinal Chemistry* 4, 159.
- 2 - CETESB. São Paulo (1991). Água do Mar – Teste de Toxicidade Aguda com *Artemia*. Norma Técnica L5.021, São Paulo.
- 3 - Carballo JL, Hernández-Inda ZL, Pérez P, García-Grávelalos MD (2002). A comparison between two brine shrimp assays to detect *in vitro* citotoxicity in marine natural products. *BMC Biotechnology* 2:17.
- 4 - McLaughlin JL, Rogers LL, Anderson JE (1998). The Use of Biological Assays to Evaluate Botanicals, *Drug Information Journal* 32: 513-524.
- 5 - Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DE, McLaughlin JL (1982). Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *Journal of Medicinal Plant Research*, 45, p.31-34.
- 6 - Nascimento IA, Araújo MMS (1999). Testes Ecotoxicológicos Marinhos: Análise de Sensibilidade. *Ecotoxicology and Environmental Restoration*, 2(1): 41-47.
- 7 - Nipper MG, Prosperi VA, Zamboni NS (1993). Toxicity testing with coastal species of southeastern Brazil. Echinoderm sperm and embryos. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 50: 646-452.

- 8 - Santos Pimenta LPS, Pinto GB, Takahashi JA, Silva LGF, Boaventura MAD (2003). Biological screening of Annonaceous Brazilian Medicinal Plants using *Artemia salina* (Brine Shrimp Test), *Phytomedicine* 10, 209.
- 9 - Siqueira JM, Bomm MD, Pereira NFG, Garcez WS, Boaventura MAD (1998). Estudo Fitoquímico de *Unonopsis lindmanii* –Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* Leach. *Revista Química Nova* 21(5).
- 10 - Veiga LF, Vital NA, Portela MR, Oliveira FF (1989). Avaliação de faixa de sensibilidade de *Artemia salina* ao Lauril Sulfato de Sódio. Rio de Janeiro. PETROBRÁS/CENPES/SUPESQ/DITER, 64p. il. (Projeto 04.05.27).