

Síntese e atividade antituberculose de derivados 3,5-dinitrofenilhidrazônicos

Synthesis and antituberculosis activity of 3,5-dinitrophenylhydrazonic derivatives

RESUMO

Diego Daniel Rodrigues Insaurralde
Diegoinsaurralde@alunos.utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, Paraná, Brasil

Tamires Leite Valverde
leitevalverde@gmail.com
Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil

Fábio Vandresen
Fabiovandresen@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, Paraná, Brasil

Regiane Bertin de Lima Scodro
regianebertin@gmail.com
Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil

Recebido: 19 ago. 2019.

Aprovado: 01 out. 2019.

Direito autoral: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



Atualmente a Química Medicinal está fortemente ligada a formação de compostos farmacêuticos capazes de combater agentes patológicos, sendo fruto de seu estudo, compostos derivados N-acilhidrazônicos, que possuem fortes indicativos para este propósito. Após sintetizá-los, eles serão analisados através dos parâmetros de Lipinski, cujos resultados poderão indicar se terão potencial farmacológico ou não, assim, justificando possíveis investimentos para a continuidade desta pesquisa. Até o momento, os resultados foram satisfatórios, levando à caracterização espectroscópica de 9 compostos N-acilhidrazonas derivados de compostos carbonílicos. Os derivados foram submetidos a ensaios farmacológicos frente à *Mycobacterium tuberculosis*, na qual houve resultados satisfatórios, pois obteve-se CIM abaixo de 250 µg/mL.

PALAVRAS-CHAVE: *Mycobacterium tuberculosis*, Química Medicinal, n-acilhidrazonas, ácido 3,5-dinitrobenzoico

ABSTRACT

Currently, Medicinal Chemistry is strongly linked to the formation of pharmaceutical drugs capable of fighting pathological agents, being the result of its study, compounds derived from N-acylhydrazones, which have strong indicators for this purpose. After synthesizing them, the derivatives will be analyzed with a set of Lipinski's rules that define their own potential or not, as well as justify the investments to control this research. The results have been satisfactory, leading to spectroscopy characterization of nine compounds. The derivatives were submitted to pharmacological evaluation against *Mycobacterium tuberculosis*, there was satisfactory results that will be discussed in this Project.

KEYWORDS: *Mycobacterium tuberculosis*, N-acylhydrazones, medicinal chemistry, 3,5-dinitrobenzoic acid.

INTRODUÇÃO

Compostos N-acilhidrazônicos são substâncias de significativo interesse da área de Química Medicinal por se destacarem pelo amplo perfil de atividades farmacológicas desempenhadas, como por exemplo: anti-bacteriana, anti-*Mycobacterium tuberculosis*, antitumoral, anti-inflamatória, anti-*Trypanosoma cruzi* e anti-*Leshmania amazonensis*. Nas últimas duas décadas observou-se que as

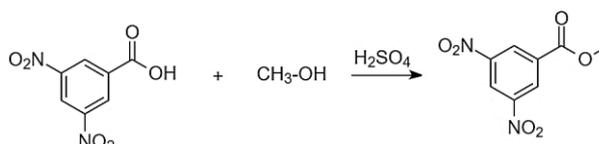
acilhidrazonas são versáteis e promissoras em se tratando da concepção de novos medicamentos. Portanto, em relação a Química Medicinal possui um leque muito grande de possibilidades, devido principalmente, infinidade de combinações farmacológicas. (THOTA, Sreekanth; RODRIGUES, Daniel A.; PINHEIRO, Pedro de Sena M.; LIMA, Lídia M.; FRAGA, Carlos A.M.; BARREIRO, Eliezer J, 2018, p. 2797-2806).

A metodologia empregada neste projeto para a síntese de N-acilhidrazonas se dividirá em 3 etapas: esterificação do ácido 3,5-dinitrobenzóico, formação da acilhidrazida e formação das N-acilhidrazonas. Após a síntese, os compostos formados serão avaliados de acordo com a regra do 5 de Lipinski que tem como objetivo determinar se estes possuem características farmacológicas que permitam uma melhor absorção pelo organismo, possibilitando assim, tomada de decisão em relação a investimentos futuros para mais pesquisas. Os compostos formados serão avaliados por espectroscopia, a fim de caracterizá-los para garantir que o produto formado seja realmente o desejado. Serão realizadas as análises por Infravermelho, RMN de ^{13}C (Ressonância Magnética Nuclear de Carbono), RMN de ^1H (Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio.) Além disso, os compostos irão ser encaminhados para ensaios farmacológicos, na qual, verificou a capacidade de inibir a *Mycobacterium tuberculosis*.

METODOLOGIA

Na primeira etapa, ocorre a esterificação do ácido carboxílico com álcool, no caso, utilizou-se o ácido 3,5-dinitrobenzóico e metanol utilizando ácido sulfúrico como catalisador, em refluxo sob agitação e aquecimento a 70°C , levando à formação do éster 3,5-dinitrobenzoato de metila, conforme figura 1.

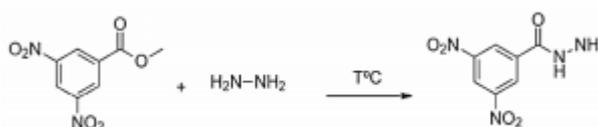
Figura 1 – Esterificação do ácido 3,5-dinitrobenzóico



Fonte: Autores

Na segunda etapa, para a formação da acilhidrazida, utilizou-se o éster sintetizado para reagir com hidrazina, solubilizando-os em metanol, mantendo sob refluxo com agitação e aquecimento em torno de $55-60^\circ\text{C}$, formando a acilhidrazida, conforme figura 2.

Figura 2 – Formação da acilhidrazida ($T^\circ\text{C} = 55-60^\circ\text{C}$).

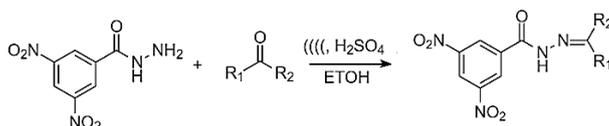


Fonte: Autores.

Para a terceira etapa, foram selecionados os compostos carbonílicos da tabela 1 para reação com a acilhidrazida, sendo utilizado o mesmo método de reação para todos. De acordo com a literatura, verificou-se um método mais eficaz para síntese

de compostos orgânicos, irradiação por ultrassom (MARTINES, Marco Antonio Utrera; DAVOLOS, Marian Rosaly; JAFELICCI JUNIOR, Miguel, 2000, p.252). Para reação, solubilizou-se a acilhidrazida com o reagente selecionado em etanol, em catálise ácida com H₂SO₄, o meio reacional foi exposto à irradiação de ultrassom em torno de 10-12 minutos, assim, formando a acilhidrazona, conforme figura 3.

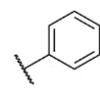
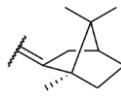
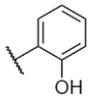
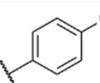
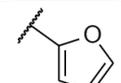
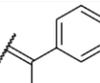
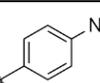
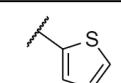
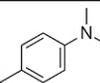
Figura 3 – Formação da acilhidrazona via catálise ácida utilizando ultrassom.



Fonte: Autores.

Na figura 3 para R₁: H se aldeído, e CH₃ se cetona. Para R₂ segue a tabela 1.

Tabela 1 – Grupos carbonílicos R₂

A1		A4		A7	
A2		A5		A8	
A3		A6		A9	

AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BACTERIANAS

A atividade anti-Mtb foi determinada frente à cepa de referência Mtb H37Rv pelo método Resazurin Microtiter Assay Plate (REMA) onde as N-acilhidrazonas sintetizadas foram solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO) e diluídas ordenadamente em série em meio de cultura 7H9 enriquecido com ácido oleico, dextrose, albumina e catalase (OADC) nas concentrações em µg/mL. Já a solução de isoniazida foi preparada utilizando-se água deionizada estéril seguido de diluições em meio de cultura. A cepa padrão H37Rv foi cultivada em Middlebrook 7H9-OADC a 37 °C por 15-21 dias, diluídas e acrescentados 100 µL em cada orifício da placa com determinadas concentrações. Após este período, as placas foram reveladas com solução de resazurina 0,02 %, reincubadas e realizado leitura visual após 24 h. Seguindo a mesma metodologia, os testes foram estendidos para outras condições de crescimento, sendo 7H9 acrescido com 4 % de albumina de soro bovino (ASB) e com 10 % de soro fetal bovino (SFB) (Palomino, 2002).

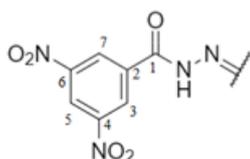
RESULTADOS E DISCUSSÃO

A regra de 5 de Lipinski determina se o composto terá uma melhor absorção e permeabilidade ao corpo humano. Para isso é determinado que os seguintes fatores sejam respeitados: HBD ≤ 5; HBA ≤ 10; MM ≤ 500 g mol⁻¹ e LogP ≤ 5. Os valores desses parâmetros de cada molécula foram extraídos utilizando o software Osiris, e montado a seguinte tabela 2:

Tabela 2 – Propriedades Lipinski das acilhidrazonas

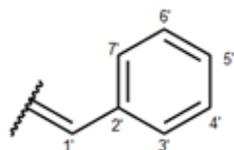
Cód.	MM	HBA	HBD	Mol LogP	Mol LogS	Mol PSA	Violações	Muta-gênico	Tumori-gênico
A1	314,26	9	1	1,36	-4,64	133,10	0	Não	Não
A2	348,70	9	1	1,96	-5,38	133,10	0	Não	Não
A3	359,25	12	1	0,44	-5,10	178,92	1	Não	Não
A4	360,37	9	1	1,94	-5,15	133,10	0	Não	Não
A5	304,22	10	1	0,55	-4,32	146,24	0	Sim	Não
A6	320,28	9	1	1,23	-4,65	161,34	0	Não	Não
A7	330,26	10	2	1,01	-4,34	153,33	0	Não	Não
A8	328,28	9	1	1,30	-5,00	133,10	0	Não	Não
A9	357,33	10	1	1,25	-4,68	136,34	0	Não	Sim

Fonte: Osiris.

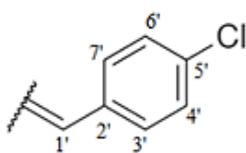


Os valores analisados na tabela acima, indicam que todos, exceto A3 atende todos os parâmetros de Lipinski, mas, isso não descarta testes farmacológicos futuros, uma vez que 1 violação apenas não é fator determinante por se tratar de valor teórico. Com isso é possível indicar que, todas as moléculas analisadas, há forte indício de absorção pelo organismo humano.

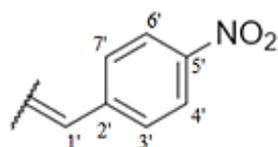
A análise espectroscópica de infravermelho, RMN de ^1H e RMN de ^{13}C , correspondente as moléculas seguem abaixo:



A1: (E)-N'-Benzilideno-3,5-dinitrobenzohidrazida; Aspecto físico: sólido branco; F.M: $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_5$; M.M (g/mol): 314.26; rend.: 64,28%; p.f.: 274°C; IR (4000-400 cm^{-1}) ν (cm^{-1}): 1662 (C=O), 3178 (N-H), 1627 (N=C), 1530(as) e 1341(s) (-NO₂). RMN ^1H (DMSO-d₆, 400MHz) δ (ppm): 9,10 (s, 2H, 3,7); 9,00 (mp, 1H, 5); 8,48 (s, 1H, 1'); 7,78 (mp, 2H, 3',7'); 7,49 (mp, 3H, 4',5',6')

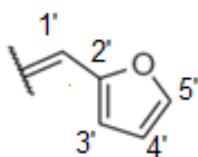


A2: (E)-N'-4-clorobenzilideno-3,5-dinitrobenzohidrazida; Aspecto físico: sólido branco; F.M: $\text{C}_{14}\text{H}_9\text{N}_4\text{O}_5\text{Cl}$; M.M (g/mol): 348.70; rend.: 90,73%; p.f.: 275,5°C; IR (4000-400 cm^{-1}) ν (cm^{-1}): 1650 (C=O), 3194 (N-H), 1614 (N=C), 1530(as) e 1344(s) (-NO₂), 1088 (C-Cl_{ar}). RMN ^1H (DMSO-d₆, 400MHz) δ (ppm): 12,49 (s, 1H, N-H); 9,13 (s, 2H, 3,7); 9,01 (t, J=1,97 Hz, 1H, 5); 8,50 (s, 1H, 1'); 7,81 (d, J=8,27 Hz, 2H, 4',6'); 7,56 (d, J=8,08 Hz, 2H, 3',7'). ^{13}C (75 MHz, DMSO-d₆) δ 159,63 (1C, 1); 148,83 (1C, 5'); 148,69 (2C, 4,6); 136,34 (1C, 2); 135,53 (1C, 1'); 133,28 (1C, 2'); 129,53 (2C, 3',7'); 129,50 (2C, 4',6'); 128,41 (2C, 3,7); 121,82 (1C, 5)

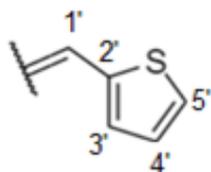


A3: (E)-N'-4-nitrobenzilideno-3,5-dinitrobenzohidrazida; Aspecto físico: sólido branco; F.M: $\text{C}_{14}\text{H}_9\text{N}_5\text{O}_7$; M.M (g/mol): 359.25; rend.: 95,42%; p.f.: 243°C; IR (4000-400 cm^{-1}) ν (cm^{-1}): 1665 (C=O), 3225 (N-H), 1589 (N=C), 1513(as) e 1342(s) (-NO₂). RMN ^1H (DMSO-d₆, 400MHz) δ (ppm): 12,70 (s, 1H, N-H); 9,14 (s, 2H, 3,7); 9,02 (t, J=1,97 Hz, 1H, 5); 8,61 (s, 1H, 1'); 8,34 (d, J=8,74 Hz, 2H, 4',6'); 8,05 (d, J=8,79 Hz, 2H, 3',7'). ^{13}C (75 MHz, DMSO-d₆) δ 159,91 (1C, 1); 148,69 (2C, 4,6); 148,65 (1C, 5'); 147,65 (1C, 2'); 140,56 (1C, 1'); 136,11 (1C, 2); 128,83 (2C, 3',7'); 128,50 (2C, 3,7); 124,60 (2C, 4',6'); 121,97 (1C, 5)

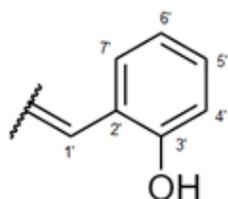
A5: (E)-N'-Furanil-3,5-dinitrobenzohidrazida; Aspecto físico: sólido branco; F.M: $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_4\text{O}_6$; M.M (g/mol): 304.22; rend.: 37,48%; p.f. 246°C-deg; IR (4000-400 cm^{-1}) ν (cm^{-1}): 1651 (C=O), 3173 (N-H), 1630 (N=C), 1533(as) e 1343(s)



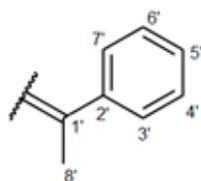
(-NO₂), 1290 δ(C-O-C). RMN¹H (DMSO-d₆, 400MHz) δ (ppm): 12,37 (s, 1H, N-H); 9,11 (s, 2H, 3,7); 9,01 (s, 1H, 5); 8,38 (s, 1H, 1'); 7,92 (mp, 1H, 5'); 7,04 (mp, 1H, 3'); 6,69 (mp, 1H, 4'). ¹³C (75 MHz, DMSO-d₆) δ 159,43 (1C, 1); 149,48 (1C, 2'); 148,70 (2C, 4,6); 146,25 (1C, 5'); 139,70 (1C, 1'); 136,39 (1C, 2); 128,34 (2C, 3,7); 121,60 (1C, 5); 115,28 (1C, 3'); 112,86 (1C, 4').



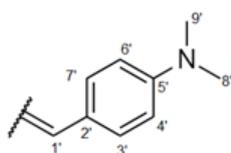
A6: (E)-N'-Tiofenil-3,5-dinitro-benzohidrazida; Aspecto físico: sólido branco; F.M: C₁₂H₈N₄O₅S; M.M (g/mol): 320.29; rend.: 42,12%; IR (4000-400 cm⁻¹) v (cm⁻¹): 1652 (C=O), 3177 (N-H), 1627 (N=C), 1530(as) e 1339(s) (-NO₂), 836 (C-S-C). RMN¹H (DMSO-d₆, 400MHz) δ (ppm): 12,38 (s, 1H, N-H); 9,11 (s, 2H, 3,7); 9,01 (s, 1H, 5); 8,71 (s, 1H, 1'); 7,75 (mp, 1H, 5'); 7,57 (mp, 1H, 3'); 7,19 (mp, 1H, 4'). ¹³C (75 MHz, DMSO-d₆) δ 159,33 (1C, 1); 148,69 (2C, 4,6); 145,13 (1C, 2'); 139,00 (1C, 1'); 136,44 (1C, 2); 132,42 (1C, 3'); 130,25 (1C, 5'); 128,50 (1C, 4'); 128,33 (2C, 3,7); 121,73 (1C, 5).



A7: (E)-N'-2-hidroxibenzilideno-3,5-dinitrobenzohidrazida; Aspecto físico: sólido branco; F.M: C₁₄H₁₀N₄O₆; M.M (g/mol): 330.25; rend.: 71,05%; p.f. 256°C; IR (4000-400 cm⁻¹) v (cm⁻¹): 1691 (C=O), 3102 (N-H), 1616 (N=C), 1532(as) e 1348(s) (-NO₂), 3336 (OH). RMN¹H (DMSO-d₆, 400MHz) δ (ppm): 12,59 (s, 1H, N-H); 9,14 (d, J=2,20 Hz, 2H, 3,7); 8,99 (mp, 1H, 5); 8,72 (s, 1H, 1'); 7,63 (mp, 1H, 7'); 7,33 (mp, 1H, 5'); 6,94 (mp, 2H, 4',6'). ¹³C (75 MHz, DMSO-d₆) δ 159,28 (1C, 1); 157,87 (1C, 3'); 149,55 (1C, 1'); 148,68 (2C, 4,6); 135,99 (1C, 2); 133,03 (1C, 5'); 132,44 (1C, 7'); 128,34 (2C, 3,7); 121,81 (1C, 5); 119,98 (1C, 4'); 119,19 (1C, 2'); 116,88 (1C, 6')



A8: (E)-N'-1-feniletilideno-3,5-dinitrobenzohidrazida; Aspecto físico: sólido branco; F.M: C₁₄H₁₀N₄O₆; M.M (g/mol): 328.28; rend.: 44,11%; IR (4000-400 cm⁻¹) v (cm⁻¹): 1657 (C=O), 3177 (N-H), 1627 (N=C), 1528(as) e 1344(s) (-NO₂), 2969 (CH_{sp}³). RMN¹H (DMSO-d₆, 400MHz) δ (ppm): 11,39 (s, 1H, N-H); 9,08 (s, 2H, 3,7); 9,01 (mp, 1H, 5); 7,80 (mp, 2H, 3', 7'); 7,48 (mp, 2H, 4',6'), 7,37 (mp, 1H, 5'); 2,4 (s, 1H, 8'). ¹³C (75 MHz, DMSO-d₆) δ 160,57 (1C, 1); 158,41 (1C, 1'); 148,43 (2C, 4,6); 138,19 (1C, 2'); 137,15 (1C, 2); 130,57 (1C, 5'); 130,37 (2C, 3',7'); 128,91 (2C, 3,7); 127,11 (2C, 4',6'); 121,47 (1C, 5); 15,64 (1C, 8')



A9: (E)-N'-4-dimetilaminobenzilideno-3,5-dinitrobenzohidrazida; Aspecto físico: sólido branco; F.M: C₁₆H₁₅N₅O₅; M.M (g/mol): 357.32; rend.: 71,55%; IR (4000-400 cm⁻¹) v (cm⁻¹): 1655 (C=O), 3218 (N-H), 1590 (N=C), 1537(as) e 1337(s) (-NO₂), 1228 (C-N). RMN¹H (DMSO-d₆, 400MHz) δ (ppm): 12,15 (s, 1H, N-H); 9,11 (mp, 2H, 3,7); 8,99 (mp, 1H, 5); 8,36 (s, 1H, 1'); 7,60 (mp, 2H, 3', 7'); 6,78 (mp, 2H, 4',6'), 7,37 (s, 1H, 5'); 2,4 (s, 1H, 8'); 4,00 (s, 6H, 8',9')

As N-acilhidrazonas apresentaram, segundo as análises de IR, RMN de ¹H e ¹³C, os principais picos e bandas que comprovam a estrutura proposta: N-H: δ(11,39-12,70 ppm), hidrogênio imínico: δ(7,90-8,72 ppm) e carbono imínico: δ(135,53-158,41 ppm), e a banda de IR C=N: v (1589-1630 cm⁻¹).

Os dados dos ensaios da atividade farmacológica frente a *Mycobacterium tuberculosis* encontra-se na tabela 3.

Tabela 3 – Resultado de atividade farmacológica frente a *Mycobacterium tuberculosis*

Cód.	H ₃₇ Rv CIM (µg/mL)	CC 50 J774A.1 (µg/mL)	IS
A1	3,9	36,6	9,38
A2	0,24	-	-
A3	N.S	-	-
A4	0,24	140	583,3
A5	7,8	-	-
A6	3,9	-	-
A7	62,5	-	-
A8	0,48	-	-
A9	N.S	-	-

N.S: Não solubilizou Fonte: Autores.

A concentração inibitória mínima (CIM) para bons resultados precisa estar abaixo de 250 µg/mL, o que indica que todos os compostos analisados são promissores para possíveis fármacos contra a tuberculose, destacando os compostos A2, A4 e A8, com CIM inferior a 1. Como parâmetro, a isoniazida, fármaco utilizado hoje no mercado possui CIM entre 1 a 0,007 µg/mL. Composto A4 apresentou citotoxicidade frente a célula de macrófagos J774A.1, na concentração de 140 µg/mL e índice de seletividade de 583,3, indicando esta ser uma promissora molécula como futura candidata a fármaco antituberculose.

AGRADECIMENTOS

UTFPR-LD, UEM e CNPq.

REFERÊNCIAS

PALOMINO, J. C.; MARTIN, A.; CAMACHO. M.; GUERRA, H., SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother*, v. 46, n. 8, p. 2720-2722, 2002.

MARTINES, Marco Antonio Utrera; DAVOLOS, Marian Rosaly; JAFELICCI JUNIOR, Miguel. O efeito do ultra-som em reações químicas. *Química Nova* [online]. 2000, vol.23, n.2, p. 251-256.

THOTA, Sreekanth; RODRIGUES, Daniel A.; PINHEIRO, Pedro de Sena M.; LIMA, Lídia M.; FRAGA, Carlos A.M.; BARREIRO, Eliezer J. N-Acylhydrazones as drugs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, Volume 28, issue 17, 2018, p. 2797-2806.