

Síntese e avaliação de atividade antibacteriana de N-acilhidrazonas derivadas do ácido salicílico

Synthesis and antibacterial activity evaluation of N-acylhydrazones from salicylic acid

RESUMO

O objetivo desta pesquisa científica realizada na área da química medicinal é propor a síntese, caracterização e a avaliação farmacológica de N-acilhidrazonas derivadas do ácido salicílico, visto que essas substâncias possuem potencial antibacteriano reportados. Tais compostos são produtos formados da reação de um éster salicilato com hidrazina, seguida da reação da salicilhidrazida resultante com um composto carbonilado, seja aldeído ou cetona. As reações foram realizadas sob ultrassom e catálise ácida resultando nos derivados N-acilhidrazônicos. Após a síntese, a caracterização dos compostos obtidos foi realizada através da determinação do ponto de fusão e de análises espectroscópicas de infravermelho e ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de carbono. Além disso, as propriedades físico-químicas dos compostos foram analisadas com base nos parâmetros de Lipinski, podendo assim identificar o potencial de atividade de cada substância. Finalmente, os compostos sintetizados foram encaminhados para avaliação de atividade anti-*Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv, e os resultados foram satisfatórios, já que para os compostos avaliados, quatorze dos dezoito compostos apresentaram-se ativos frente à *M. tuberculosis* H₃₇Rv. Com relação à toxicidade, os ensaios ainda estão em fase de avaliação.

PALAVRAS-CHAVE: Ácido salicílico. Salicilhidrazida. N-acilhidrazonas. Atividade anti-*Mycobacterium tuberculosis*.

Guilherme Silva Teixeira
guilhermeteixeira@alunos.utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 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

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

Vanessa Guimarães. Alves Olher
Vanessa.olher@ifpr.edu.br
Instituto Federal do Paraná, Paranavaí, Paraná, Brasil

Recebido: 19 ago. 2019.

Aprovado: 01 out. 2019.

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



ABSTRACT

The aim of this scientific research carried out in the area of medicinal chemistry is to propose the synthesis, characterization and pharmacological evaluation of N-acylhydrazones derived from salicylic acid, since these have antibacterial potential reported. These compounds are products formed from the reaction of a salicylate ester with hydrazine and then by reaction of the resulting salicylhydrazide with a carbonyl compound (aldehyde or ketone). These reactions were performed under ultrasonic and acid catalysis leading to N-acylhydrazone derivatives. After synthesizing, the characterization of the formed compounds was performed by determining the melting point and spectroscopic analyzes of infrared spectroscopy, nuclear magnetic resonance of hydrogen and carbon-13. In addition, the physicochemical properties of the compounds were analyzed based on the Lipinski parameters, thus being able to identify the activity potential of each specific substance. Finally, the synthesized compounds were sent for evaluation of anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity, and the results were satisfactory, since for fourteen of eighteen from

the evaluated compounds were active against *M. tuberculosis* H₃₇Rv, except for N-acylhydrazone. Regarding toxicity, the tests are still under evaluation.

KEYWORDS: Salicylic acid. Salicylhydrazide. N-acylhydrazones. Anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity.

INTRODUÇÃO

Química medicinal é o estudo de interesse para descoberta, desenvolvimento, caracterização e interpretação das ações biológicas de substâncias moleculares em relação a interferência de suas propriedades químicas e físico-químicas no efeito farmacológico. (Wermuth, C. G., 2008).

O objeto de estudo desse projeto são as N-acilhidrazonas derivadas do ácido salicílico, produtos da reação entre uma N-acilhidrazida e um composto carbonilado, seja aldeído ou cetona. Os compostos N-acilhidrazônicos são moléculas orgânicas caracterizadas pela presença do grupamento -NH-N=CH- e pelo sítio doador C=O em suas estruturas moleculares, os quais configuram flexibilidade e versatilidade a essas moléculas. (ANGELUSIU, M.V., 2010, p. 2055). O grupo das N-acilhidrazona (NAH) também é considerada uma estrutura privilegiada, estando presente em muitos compostos com diversas atividades farmacológicas (DA SILVA, T. F.; JÚNIOR, W. B.; ALEXANDRE-MOREIRA, M. S., 2015). Entre as atividades atribuídas aos derivados de NAH, antibacteriana, antituberculose, os anti-inflamatórios e analgésicos são recorrentes (PALOMINO, J. C.; MARTIN, A.; CAMACHO. M.; GUERRA, H., SWINGS, J.; PORTAELS, F., p. 2720-2722, 2002).

Após a obtenção sintética dos compostos, foram realizados experimentos de caracterização espectroscópica das moléculas, e também ensaios de avaliação de atividade anti-*Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv.

METODOLOGIA

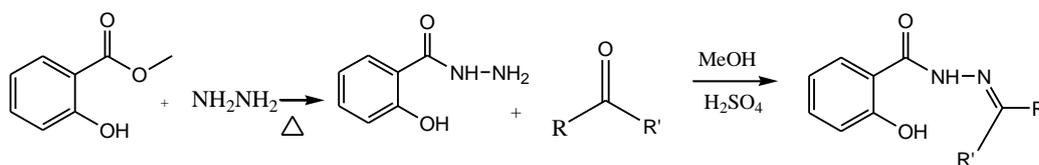
SÍNTESE DE 2-HIDROXIBENZILHIDRAZIDA

Antes da obtenção sintética das N-acilhidrazonas, foram realizadas reações de formação da salicilhidrazida, através da reação do éster salicilato de metila com hidrazina (80%), na proporção estequiométrica 1:3. A melhor condição observada para a reação foi na presença de etanol como solvente e refluxo. Após formado, o produto foi filtrado à vácuo, lavado com água, e o rendimento apresentado foi de 72,6%

SÍNTESE DE N-ACILHIDRAZONAS

A reação de formação das acilhidrazonas baseia-se na reação da acilhidrazida com quantidade equimolar de aldeídos (derivados de benzaldeídos) e cetonas (derivados de acetofenona, cânfora, isatina, etilpiruvato de etila), sob o catálise ácida (1 gota de ácido sulfúrico concentrado), utilizando 15 mL de metanol P.A. e realizando agitação via ultrassom. O tempo de agitação variou a cada reação, indo de 170 s à 1920 s. Segue abaixo a reação genérica (Figura 1).

Figura 1 - Rota geral de síntese para obtenção dos derivados N-acilhidrazônicos.



Fonte: próprio autor

A caracterização dos derivados obtidos foi realizada por determinação do ponto de fusão (aparelho digital de Ponto de Fusão da Microquímica modelo MQAPF-32 com faixa de fusão de 0 a 350°C), espectroscopia na região do infravermelho (espectrofotômetro FT-IR Spectrometer Spectrum Two, Perkin Elmer, acoplado ao acessório de reflexão total atenuada (ATR/FTIR) sendo as medidas realizadas no intervalo de 4000 a 400 cm^{-1}) e por ressonância magnética nuclear de ^1H e de ^{13}C (Bruker operando em 400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C , utilizando DMSO-d_6 como solvente deuterado).

AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIBACTERIANAS

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada pelo método de REMA (Resazurin Microtiter Assay Plate) descrito por Palomino e col. (Palomino, et al. 2002). As concentrações dos derivados avaliados variaram de 250 a 1,9 $\mu\text{g/mL}$, utilizando a isoniazida como fármaco de referência na concentração de 1,0 a 0,007 $\mu\text{g/mL}$.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS SINTETIZADOS

A caracterização, identificação e análise dos compostos sintetizados foi feita pela determinação do ponto de fusão, espectroscopia na região do infravermelho e ressonância nuclear magnética de carbono (RMN ^{13}C) e de hidrogênio (RMN ^1H), com auxílio dos programas computacionais: *ChemDraw*, *ACD/RMN Processor* e *Spectragryph*. Na tabela 1 a seguir, estão 4 das 17 N-acilhidrazonas sintetizadas e a salicilhidrazida.

Tabela 1 – N-acilhidrazonas sintetizadas e salicilhidrazida

Código	Estrutura
H1	
H2	

Código	Estrutura
H3	
H4	
Salicilhidrazida	

Fonte: Autores

H1: aspecto físico: sólido bege; F.M: $C_{14}H_{11}N_3O_4$; M.M (g/mol): 285,25; rend.: 87,81%; p. f.: 212,0-217,0°C; IR (4000-400 cm^{-1}) ν (cm^{-1}): 3209 (N-H), 1632 (C=O), 1596 (C=N), 3062 (O-H), 1525/1345 (NO_2). RMN 1H (DMSO- d_6 , 400MHz) δ (ppm): 8,87 (s, 1H, H-C=N), 12,18 (s, 1H, N-H), 11,75 (s, 1H, O-H), H_{Ar} : 6,98 (m, 2H), 7,46 (t, J=8,0 Hz, 1H), 7,70 (t, J=7,61 Hz, 1H), 7,84 (t, J=7,68 Hz, 1H), 7,89 (d, J=7,68 Hz, 1H), 8,10 (d, J=8,13 Hz, 1H), 8,14 (d, J=7,68 Hz, 1H). RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100MHz) δ (ppm): 165,69 (1C, C=O), 159,98 (1C, C_{Ar} -OH), 148,78 (1C, C=N), 144,36 (1C, C_{Ar} - NO_2), 116,37 – 135,41 (10C, C_{Ar}).

H2: aspecto físico: sólido branco; F.M: $C_{13}H_9FN_2O_2$; M.M (g/mol): 258,25; rend.: 86,51%; p.f.: 235,1-242,2°C; IR (4000-400 cm^{-1}) ν (cm^{-1}): 3259 (N-H), 1604 (C=O), 1556 (C=N), 2922 (O-H), 1231, 1150 (C-F). RMN 1H (DMSO- d_6 , 400MHz) δ (ppm): 8,46 (s, 1H, H-C=N), 11,85 (s, 1H, N-H), 11,83 (s, 1H, O-H), H_{Ar} : 6,98 (m, 2H), 7,32 (m; 2H), 7,45 (m, 1H), 7,83 (m; 2H), 7,89 (dd; J=7,9, 1,3 Hz; 2H). RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100MHz) δ (ppm): 165,19 (1C, C=O), 159,35 (1C, C_{Ar} -OH), 148,05 (1C, C=N), 144,93 (1C, C_{Ar} -F), 116,33-140,56 (10C, C_{Ar}).

H3: aspecto físico: sólido branco; F.M: $C_{12}H_{10}N_2O_2S$; M.M (g/mol): 246,05; rend.: 81,90%; p.f.: 251,0-253,7°C; IR (4000-400 cm^{-1}) ν (cm^{-1}): 3248 (N-H), 1605 (C=O), 1556 (C=N). RMN 1H (DMSO- d_6 , 400MHz) δ (ppm): 8,63 (s, 1H, H-C=N), 11,81 (s, 1H, N-H), H_{Ar} : 6,95 (m, 2H), 7,14 (m; 1H), 7,45 (m, 2H), 7,65 (d; J=4,75 Hz; 1H), 7,84 (d; J=7,97 Hz; 1H). RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100MHz) δ (ppm): 165,04 (1C, C=O), 159,11 (1C, C_{Ar} -OH), 144,34 (1C, C=N), 139,10 (1C, C_{Ar} -S), 134,35 (1C, N=C- C_{Ar} -S), 116,45-131,95 (7C, C_{Ar}).

H4: aspecto físico: sólido branco; F.M: $C_{16}H_{15}N_2O_3$; M.M. (g/mol): 284,31; rend.: 61,52%; p. f.: 194,6 – 197,8°C; IR (4000-400 cm^{-1}) ν (cm^{-1}): 1601 (C=O), 3266 (N-H), 1550 (N=C), 3011(O-H), 1235/1029 (C-O). RMN 1H (DMSO- d_6 , 400MHz) δ (ppm): 11,27 (s, 1H, N-H), 11,84 (sl, 1H, O-H), 3,80 (s, 3H, O- CH_3), 2,30 (s, 3H, N=C- CH_3), H_{Ar} : 6,98-7,04 (m, 1H), 7,42 (t, J=7,65 Hz, 1H), 6,98-7,04 (m, 1H), 8,00 (d, J=8,31 Hz, 1H), 7,00 (d, J=8,8 Hz, 2H), 7,80 (d, J=8,5 Hz, 2H). RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , TMS, 100MHz) δ (ppm): 162,53 (1C, C=O), 157,02 (1C, C_{Ar} -OH), 152,97 (1C, C=N), 14,23 (1C, N=C- CH_3), 55,70 (1C, O- CH_3), 114,22-138,65 (11C, C_{Ar}).

As N-acilhidrazonas apresentaram, segundo as análises de RMN de 1H , deslocamentos químicos (δ), em ppm, correspondentes às estruturas moleculares

esperadas. Alguns dos sinais característicos que evidenciam e comprovam a formação dos compostos propostos, estão na faixa de 11,27/12,18 ppm – 1H, singleto, correspondente ao hidrogênio ligado ao nitrogênio da amida e ao hidrogênio ligado ao oxigênio fenólico; em 8,46/8,87 ppm – 1H, singleto, correspondente ao hidrogênio ligado ao carbono imínico; em 6,95/8,14 ppm, correspondente aos hidrogênios ligados ao anel aromático; além das ligações características de cada composto. Os principais sinais típicos do RMN de ¹³C, que comprovam e evidenciam a formação dos compostos propostos, estão na faixa de 162,53/165,69 ppm, correspondentes ao carbono da carboxila; em 157,02/159,98 ppm, correspondentes aos carbonos do sistema aromático ligado à hidroxila; em 144,34/152,97 ppm, correspondentes ao carbono imínico; em 114,22/140,56 ppm, correspondentes aos carbonos aromáticos; além das ligações características de cada composto, por exemplo a acilhidrazona derivada do 4-fluorbenzaldeído (código H2), na qual há a ligação de um carbono aromático com o átomo de flúor.

ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS

Para análise de dados, decidiu-se estudar as propriedades químicas e físico-químicas e seus parâmetros descritos por Lipinski, utilizando os softwares *Molinspiration* e *Molsoft*. Com base nos dados, apresentados na tabela 2, o único valor que ultrapassa o recomendado é o ClogP do tiofenoacilhidrazona (H3), que é maior que 5. Para os demais derivados os valores observados estão dentro dos parâmetros recomendados para execução das atividades farmacológicas.

Tabela 2 – Parâmetros de Lipinski e atividade frente à *M. tuberculosis* para os compostos N-acilhidrazônicos

Código	CIM (µg/mL)	HBA	HDB	Mol LogP	Mol LogS (mol/L)	Mol PSA (Å ²)	Violações
H1	>250	7	2	3.50	-3.78	107.51	0
H2	3,9	4	2	3.75	-3.98	61.69	0
H3	1,9	4	2	5.17	-5.74	61.69	1
H4	3,9	5	2	2.81	-3.69	68.42	0
Salicilhidrazida	3,9	4	4	6.81	-1.67	75.35	0

Fonte: Autores

Em relação à avaliação de atividade anti-*Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv, a determinação de concentração inibitória mínima (CIM), Tabela 2, foi determinada com ensaios utilizando metodologia REMA, de acordo com procedimento descrito por Palomino et. al. 2002. Em trabalhos anteriores foi verificado a potencialidade frente à H₃₇Rv de alguns derivados N-acilhidrazônicos do ácido salicílico. Neste trabalho, pode-se verificar (Tabela 3) que em especial o derivado H3 apresentou CIM muito promissora. Em geral, moléculas puras que possuem CIM inferior a 15 µg/mL são candidatas ao desenvolvimento de moléculas para o combate à tuberculose. Com isso, apenas H1 estaria descartada neste

momento. Porém, ensaios complementares como citotoxicidade, sinergismo com fármacos e mecanismos de ação são importantes e estão sendo providenciados.

CONCLUSÕES

Até o presente momento, foram sintetizadas 17 substâncias derivadas N-acilhidrazonas do ácido salicílico e destas, todas foram completamente caracterizadas por dados físicos e espectroscópicos, os quais confirmaram suas estruturas. Com relação à avaliação da atividade anti-*M. tuberculosis*, os compostos ensaiados mostraram CIM promissoras. Assim, pretende-se realizar estudo visando a correlação estrutura atividade para todos os compostos sintetizados, além de complementar os ensaios de CIM e citotoxicidade, além de investigar possível sinergismo farmacológico envolvendo os derivados potencialmente mais ativos e fármacos já utilizados no tratamento da tuberculose.

REFERÊNCIAS

- ANGELUSIU, M. V., et al. **New Cu (II), Co (II), Ni (II) complexes with aroyl-hydrazone based ligand. Synthesis, spectroscopic characterization and in vitro antibacterial evaluation.** *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2010, 45.5, p. 2055-2062.
- DA SILVA, T. F.; JÚNIOR, W. B.; ALEXANDRE-MOREIRA, M. S. **Novel Orally Active Analgesic and Anti-Inflammatory Cyclohexyl-N-Acylhydrazone Derivatives.** *Molecules*, n. 20, 2015.
- LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J.; *Adv. Drug Delivery Rev.* 2001, 46, 3.
- 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.
- VEBER, D. F.; JOHNSON, S. R.; CHENG, H. Y.; SMITH, B. R.; WARD, K. W.; KOPPLE, K. D. J. **Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates.** *Med. Chem.* 2002, 45, 2615. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12036371>. Acesso em: 15 ago. 2018.
- WERMUTH, C. G.; *The Practice of Medicinal Chemistry*, Third. Wermuth, C. G., ed.; Elsevier Ltd., 2008.

AGRADECIMENTOS

UTFFPR, UEM, CNPQ