

Síntese de N-acilhidrazonas e compostos heterocíclicos com potencial de atividade anti-*Mycobacterium tuberculosis* derivados da isoniazida

Synthesis of N-acilhydrazones and heterocyclic compounds with potential anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity derived from isoniazid.

RESUMO

Danillo Yuji Namba
Dan_namba@hotmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, Paraná, Brasil

Eloisa Gibin Sampiron
elogibin@gmail.com
Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brasil

Vanessa G. Alves-Olher
elogibin@gmail.com
Instituto Federal do Paraná, Paranaíba, Paraná, Brasil

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

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

A necessidade de elaboração e desenvolvimento de novos fármacos que possam substituir os já existentes, tem impulsionado o trabalho e o aumento de pesquisas de vários medicamentos contra os diversos agentes patológicos. Um dos focos da pesquisa é a isoniazida, principal pró-fármaco para o combate à tuberculose em conjunto com outros três: pirazinamida, etambutol e rifampicina. A substância tem capacidade comprovada de atacar bactérias, contudo, o tratamento está se tornando ineficiente já que as bactérias podem vir a criar resistência, inativando o fármaco. O presente estudo visa a síntese em ultrassom de N- acilhidrazonas por meio da reação de isoniazida com diferentes aldeídos e cetonas, e a avaliação do potencial antituberculose frente à *Mycobacterium tuberculosis* dos derivados sintetizados com a tentativa de obter procedentes ativos tal qual a isoniazida, porém, com inferior citotoxicidade. Após a síntese das N-acilhidrazonas, os compostos formados foram avaliados de acordo com a regra do 5 de Lipinski que tem como objetivo determinar parâmetros *in silico* para verificar as características farmacológicas que permitem avaliar suas potencialidades farmacológicas como uma melhor absorção pelo organismo, assim, tomando uma decisão em relação a investimentos futuros para mais pesquisas. Os compostos formados foram caracterizados por técnicas espectroscópicas tais como IV e RMN, a fim de caracterizá-los para garantir que o produto formado é realmente o desejado. Os derivados sintetizados apresentaram resultados promissores na triagem para avaliação da atividade anti-*M.tuberculosis*, onde todos os compostos apresentaram MIC inferior a $1,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para cepa padrão H₃₇Rv e alguns derivados mostram-se também ativos frente a cepas resistentes aos antibióticos usualmente usados no tratamento da tuberculose.

PALAVRAS-CHAVE: Isoniazida. *Mycobacterium tuberculosis*. N-Acilhidrazonas.

ABSTRACT

The need for the elaboration and development of new drugs that may replace the existing ones, has driven the work and the increase of research of several drugs against the various pathological agents. One focus of the research is isoniazid, the main drug for the fight against tuberculosis together with three others: pyrazinamide, ethambutol and rifampicin. The substance has a proven ability to attack bacteria, however treatment is becoming inefficient as bacteria can build resistance by inactivating the drug. The present study aims at the synthesis using ultrasound of N-acylhydrazones by the reaction of isoniazid with different aldehydes and ketones, evaluating the antituberculosis potential against mycobacterium tuberculosis of the synthesized derivatives in an attempt to obtain active ingredients such as isoniazid, but with lower cytotoxicity. After the synthesis of N-

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.



acylhydrazones, the desired compounds were evaluated according to Lipinski's rule of 5 which aims to determine *in silico* parameters to verify the pharmacological characteristics that allow to evaluate their pharmacological potentialities as a better gastrointestinal absorption, thus making a decision regarding future investments for further research. The synthesized compounds were characterized by spectroscopic techniques as IR and NMR in order to determine them to ensure that the formed product is really the desired one. The derivatives showed promising screening results for the evaluation of anti-*M.tuberculosis* activity, where all compounds presented MIC below $1.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ for standard strains H₃₇Rv and some derivatives are also active against resistant strains.

KEYWORDS: Isoniazid. *Mycobacterium tuberculosis*. N-acylhydrazones.

INTRODUÇÃO

A química medicinal, segundo a IUPAC, é uma vertente da área da química envolvidas com aspectos biológicos, medicinais e farmacêuticas cujo objetivo é descobrir, inventar e avaliar compostos biologicamente ativos e interpretar a nível molecular seu modo de ação, e por fim, estabelecer as relações de estrutura e atividade (WERMUTH et al., 1998, p. 1138).

Com base nessa ciência, com a crise nas indústrias farmacêuticas e a necessidade de inovação, iniciou-se estudos sobre a síntese de compostos farmacológicos para o combate de diferentes patologias como no caso a *Mycobacterium tuberculosis*.

A isoniazida ou também ácido isocotínico hidrazida, desempenha um importante papel de combate à tuberculose onde também pode ser associada a outros fármacos como a pirazinamida, etambutol e rifampicina a fim de se obter uma maior eficiência no combate à doença. Ainda estudos apontam a isoniazida como uma pró-droga que se converte na sua forma ativa pelas enzimas micobacterial catalase-peroxidase, prevenindo o sistema FAZ-II (fatty acid synthase II) de produzir ácidos graxos de cadeia longa, precursores para o desenvolvimento e crescimento da bactéria (CARDOSO et al., 2009).

Dessa forma, o presente estudo visa a síntese de derivados da isoniazida através modificação e inserção de um grupamento imínico com diferentes substituintes, avaliando assim o potencial antituberculose frente à *Mycobacterium tuberculosis* dos compostos sintetizados com a tentativa de se obter moléculas bioativas tal qual a isoniazida, porém com inferior citotoxicidade.

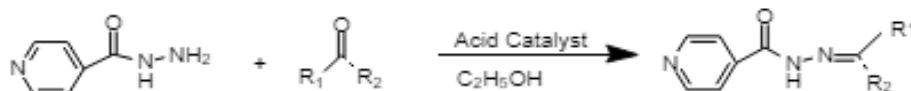
METODOLOGIA

SÍNTESE DE N-ACILHIDRAZONAS

A metodologia aplicada neste projeto consiste na reação da isoniazida previamente sintetizada com aldeídos ou cetonas específicas como reagentes, em solvente orgânico, geralmente álcool em catálise ácida usando ultrassom. Inicialmente, realizou-se a pesagem e a quantificação estequiométrica 1:1 de isoniazida e derivados carbonílicos. Foi realizada então, a solubilização desses compostos com auxílio da irradiação em ultrassom durante 12 minutos com 10 mL

de etanol. Em seguida, foi adicionado 1 gota de ácido sulfúrico concentrado para que ocorresse a catálise ácida, e a reação foi mantida no ultrassom durante 10 minutos. Após o término da reação, esperou-se o solvente evaporar e o produto desejado cristalizar. Os produtos foram obtidos como sólidos e estes lavados com uma mistura de hexano e Acetato de Etila (1:1). Por fim, estes foram filtrados e levados à estufa, assim determinou-se o ponto de fusão e rendimento.

Figura 1 – Rota geral de síntese para obtenção dos derivados N-fenilacetilhidrazônicos



Fontes: Autores.

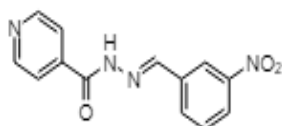
A caracterização das N-Acilhidrazonas foi realizada pela espectroscopia de infravermelho, realizada na Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Londrina, utilizando um espectrofotômetro FT-IR Spectrometer Spectrum Two, Perkin Elmer, acoplado ao acessório de reflexão total atenuada (ATR/FTIR) sendo as medidas feitas no intervalo de 4000 a 400 cm^{-1} , e por ressonância magnética nuclear de ^1H e de ^{13}C utilizando o dimetilsulfóxido deuterado (DMSO- d_6) como solvente e tetrametilsilano (TMS) como referência de deslocamento padrão. A frequência foi de 400 MHz para próton e 100 MHz para ^{13}C .

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 substâncias 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 $\mu\text{g/mL}$. 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).

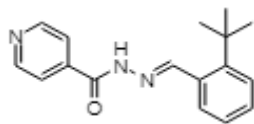
RESULTADOS E DISCUSSÕES

Com o auxílio dos programas computacionais: *ACD/RMN Processor*, *Spectragryph* e *ChemDraw* foi feita a caracterização, identificação e análise dos fármacos sintetizados na qual foi determinado a espectroscopia na região do infravermelho e ressonância nuclear magnética de carbono (RMN ^{13}C) e hidrogênio (RMN ^1H).

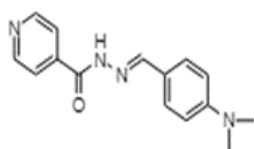


INZ01: aspecto físico: sólido bege-escuro; F.M: $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_3$; M.M (g/mol):270,25; rend.: 90,6%; p. f.: 223,9 °C; IR (4000-400 cm^{-1}) v (cm^{-1}): 3430 (N-

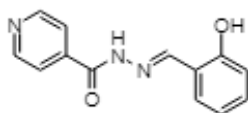
H), 1665 (C=O), 1581 (C=N), 3032 (C-H_{ar}), 1529 (NO₂). RMN ¹H (DMSO-d₆, 400MHz) δ (ppm): 12,34 (s, 1H), 8,81(d, J=5,3 Hz, 2H) 8,58(s, 1H), 8,57(s, 1H), 8,28(d, 1H, J= 8,31 Hz), 8,18(d, 1H, J= 7,83 Hz), 7,85(d, 2H, J= 7,85Hz), 7,77(t, J= 4,7 e 4,3 Hz) 13C (75 MHz, DMSO-d₆) δ 162.3, 150.7, 147.1, 140.7, 136.35, 134.9, 130.55, 125.0, 122.1, 121.6.



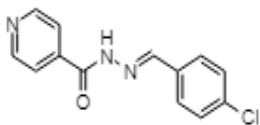
INZ02: aspecto físico: sólido marrom; F.M: C₁₅H₁₆N₃O₁; M.M (g/mol):268,32; rend.: 72,2%; p. f.: 224,1 °C; IR (4000-400 cm⁻¹) ν (cm⁻¹): 3425 (N-H), 1656 (C=O), 1553 (C=N), 3032 (C-H_{ar}), 2939 (C-H_{alifático}). RMN ¹H (DMSO-d₆, 400MHz) δ (ppm): 12,04 (s, 1H), 8,80(d, J=5,3 Hz, 2H) 8,46(s, 1H), 7,84(d, 2H, J= 5,2 Hz), 7,70(d, 2H, J= 8,31 Hz), 7,68 (d, 2H, J= 8,31 Hz), 7,50(d, 2H, J= 8,31 Hz), 7,48(d, 2H, J= 8,31Hz), 1,29 (s, 9H). 13C (75 MHz, DMSO-d₆) δ 162.3, 153.72, 150.77, 149.53, 141.02, 131.79, 127.62, 127.16, 126.16, 123.61, 122,05, 35.80, 31.40.



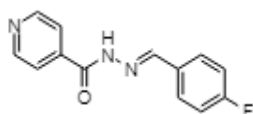
INZ03: aspecto físico: sólido branco; F.M: C₁₇H₁₉N₃O₁; M.M (g/mol): 281,36; rend.: 66,7%; p. f.: 201,5 °C; IR (4000-400 cm⁻¹) ν (cm⁻¹): 3383 (N-H), 1662 (C=O), 1589 (C=N), 3179 (C-H_{ar}), 2836 (N-C-H_{alifático}). RMN ¹H (DMSO-d₆, 400MHz) δ (ppm): 11,79 (s, 1H), 8,78(d, J=5,3 Hz, 2H) 8,33(s, 1H), 7,83(d, 2H, J= 5,3 Hz), 7,55(d, 1H, J= 8,31 Hz), 6,75 (d, 1H, J= 8,31 Hz). 13C (75 MHz, DMSO-d₆) δ 161.47, 152.17, 150.55, 155.38, 141.49, 129.15, 122.04, 121.67, 112.25, 39.97.



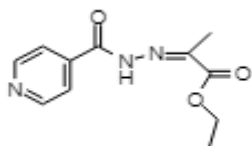
INZ04: aspecto físico: sólido amarelo-gema; F.M: C₁₃H₁₁N₃O₂; M.M (g/mol): 241,25; rend.: 94,25%; p. f.: 216,01 °C; IR (4000-400 cm⁻¹) ν (cm⁻¹): 3346 (N-H), 1681 (C=O), 1568 (C=N), 3180 (C-H_{ar}). RMN ¹H (DMSO-d₆, 400MHz) δ (ppm): 12,37 (s, 1H), 8,87(d, 2H, J=5,87 Hz) 8,41(s, 1H), 7,62(d, 1H, J= 6,85 Hz), 7,37(d, 2H, J= 5,87 Hz), 7,33 (d, 1H, J= 8,31 Hz), 6,94 (t, 1H, J= 8,31 e 4,1 Hz) 6,92(d, 1H, J=8,85 Hz) . 13C (75 MHz, DMSO-d₆) δ 161.3, 157.95, 149.64, 149.4, 142.04, 132.32, 129.6, 122.74, 119.5, 119.17, 116.93.



INZ06: aspecto físico: sólido branco; F.M: C₁₃H₁₀ClN₃O₁; M.M (g/mol):259,7; rend.: 48,05%; p. f.: = 185,8 °C; IR (4000-400 cm⁻¹) ν (cm⁻¹): 3472 (N-H), 1670 (C=O), 1594 (C=N), 3014 (C-H_{ar}). RMN ¹H (DMSO-d₆, 400MHz) δ (ppm): 12,14 (s, 1H), 8,80(d, 2H, J=5,87 Hz) 8,47(s, 1H), 7,83 (d, 2H, J= 6,11 Hz), 7,79(d, 2H, J= 8,56 Hz), 7,54 (d, 2H, J= 8,31 Hz) . 13C (75 MHz, DMSO-d₆) δ 162.15, 150.82, 148.15, 140.85, 133.46, 135.33, 132.32, 129.48, 129.38, 122,01.



INZ07: aspecto físico: sólido amarelo; F.M: C₁₃H₁₀FN₃O₁; M.M (g/mol):243,24; rend.: 46,5 %; p. f.: = 184,35 °C; IR (4000-400 cm⁻¹) ν (cm⁻¹): 3495 (N-H), 1667 (C=O), 1597 (C=N), 3065 (C-H_{ar}). RMN ¹H (DMSO-d₆, 400MHz) δ (ppm): 12,22 (s, 1H), 8,89(d, 2H, J=5,87 Hz) 8,50(s, 1H), 8,01 (d, 2H, J= 5,87 Hz), 7,83(m, 2H, J= 8,81, 5,6 e 4,1 Hz), 7,35 (m, 2H, J= 8,31, 5,6 e 4,1 Hz) . 13C (75 MHz, DMSO-d₆) δ 162.6, 161.44, 150.3, 148.85, 143.7, 131.02, 130.08, 130.0, 123.06, 116.36 (d, J= 22,1 Hz).



INZ09: aspecto físico: sólido bege claro; F.M: C₁₁H₁₃N₃O₃; M.M (g/mol):235,24; rend.: 20,2 %; p. f.: = 162,85 °C; IR (4000-400 cm⁻¹) ν (cm⁻¹): 3416 (N-H), 1676 (C=O), 1552 (C=N), 3100 (C-H_{ar}). RMN ¹H (DMSO-d₆, 400MHz) δ (ppm): 11,18(s, 1H), 8,79(d, 2H, J=6,36 Hz) 7,81(m, 2H, J= 5,38 Hz), 4,23(s, 2H), 2,17 (s, 3H), 1,26 (s, 3H) . 13C (75 MHz, DMSO-d₆) δ 166.56, 164.77, 150.75, 123,41, 61.70, 39.95, 14.48.

Segundo as análises de RMN de ¹H, as N-acilhidrazonas apresentaram deslocamentos químicos (δ), em ppm, com sinais característicos que evidenciam e comprovam a possível formação dos compostos propostos. Os principais sinais estão aproximadamente em 11,5-12,5 ppm – 1H, singlete, correspondente ao hidrogênio ligado ao nitrogênio adjacente à carbonila; os singletos 8,3 -8,6 ppm

que refere ao hidrogênio íminico, ou seja, ligada ao carbono que possui ligação dupla com o nitrogênio; e os picos associados aos hidrogênios presente em anéis aromáticos entre 7-8 ppm. Nota-se ainda que no caso da INZ09, o sinal característico é dado em 4,23 e 1,26 ppm referente aos hidrogênios do grupo alquil ligados ao oxigênio do éster. Os sinais típicos do RMN ^{13}C de uma maneira geral são em 161 -165 ppm do carbono da carbonila da amida; e em 149-151 ppm do carbono íminico, ou seja que apresenta uma ligação dupla com o nitrogênio.

ATIVIDADE FARMACOLÓGICAS

Na análise de dados foi decidido estudar as propriedades químicas e físico-químicas e seus parâmetros descritos por Lipinski, utilizando o software *Osiris* e *molinspiration*, representados na tabela 1.

Tabela 1 – Parâmetros de Lipinski dos compostos N-acilhidrazônicos.

Código	HBA	HDB	Mol LogP	Mol LogS	Mol PSA (Å ²)	Violações
INZ01	7	1	1,28	-3,39	100,17	N/A
INZ02	4	1	3,78	-4,09	54,35	N/A
INZ03	5	1	2,10	-2,96	57,59	N/A
INZ04	5	2	1,86	-2,63	74,58	N/A
INZ06	4	1	2,81	-3,66	54,35	N/A
INZ07	4	1	2,30	-3,24	54,35	N/A
INZ09	6	1	0,54	-1,79	80,65	N/A

Fonte: *Osiris* e *Molinspiration*

Com base nos dados, todos os compostos apresentaram-se adequados para execução de atividades farmacológicas, e assim estão de acordo com a regra dos 5 de Lipinski. ($\text{HBD} \leq 5$; $\text{HBA} \leq 10\text{MM}$; $\leq 500 \text{ g/mol}$; $\text{LogP} \leq 5$). Com relação à determinação de concentração inibitória mínima (CIM), foi utilizado cepas de bactérias-padrão: *H₃₇Rv* e cepas resistentes aos antibióticos como isoniazida, rifampicina, etambutol e estroptomicina: 49, 23, 19RP, 18, 71A, 64 e 3614. Os resultados estão presentes na tabela 2 abaixo.

Tabela 2 – Concentração inibitória mínima (CIM) dos compostos sintetizados.

	CIM (µg/mL)							
	INZH	INZ01	INZ02	INZ03	INZ04	INZ06	INZ07	INZ09
<i>H₃₇Rv</i>	0,06	0,48	0,12	0,24	0,48	0,24	0,48	0,06
49	0,03	0,24	0,015*	0,06	0,015*	0,12	0,12	0,03
23	4	250	7,8	15,6	31,25	15,6	15,6	3,9
19RP	4	125	7,8	7,8	62,5	7,8	15,6	3,9

18	4	125	7,8	7,8	31,25	15,6	15,6	1,9
71A	4	125*	15,6	15,6	31,25*	15,6	15,6	-
64A	4	125*	3,9	3,9	31,25	3,9	7,8	1,9
3614	4	125*	3,9*	15,6	31,25	15,6	7,8	7,8

INH=isoniazida (fármaco padrão). Fonte: Autores.

Com base nos dados do ensaio anti-*M.tuberculosis*, todos os derivados sintetizados apresentaram MIC inferior a 1,0µg/mL para a cepa padrão H₃₇Rv (MIC's inferiores a 15 são considerados promissores) e para a cepa 49, uma cepa susceptível. Para as cepas resistentes (23 a 3614) os derivados INZ02, INZ03 e IN09 mostraram-se os mais ativos, conseguindo efetivamente reduzir o crescimento bacteriano de cepas bacterianas resistentes aos fármacos comumente usados no tratamento da tuberculose. Para confirmação da potencialidade destas moléculas como protótipos de fármacos para TB ensaios de citotoxicidade e sinergismo estão em desenvolvimento.

CONCLUSÃO

O trabalho apresenta a caracterização de 7 dos 14 derivados das N-acilhidrazonas, onde pode se afirmar que as sínteses foram efetuadas com êxito. Em relação a atividade farmacológica, os fármacos sintetizados apresentaram resultados prévios muito satisfatórios e promissores para as cepas bacterianas testadas até o momento. Não obstante, pretende-se ainda realizar a caracterização dos demais derivados e dos compostos heterocíclicos e avaliar seus ensaios farmacológicos, a fim de verificar se estes são potencialmente mais ativos e menos citotóxicos que os já utilizados no tratamento de tuberculose.

REFERÊNCIAS

WERMUTH, C. G.; GANELLIN, C. R.; LINDBERG, P.; MITSCHER, L. A.; Glossary of terms used in medicinal chemistry, IUPAC Recommendations 1998, Pure and Applied Chemistry 70, 1129-1143. IUPAC, 1998, p. 1138.

PALOMINO J., et al. Resazurin Microtiter Assay Plate: Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in Mycobacterium tuberculosis. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 46, n. 8, p. 2720-2722, 2002.

CARDOSO, H.S.; ASSIS, J.V.; M.V. Química Nova, 2009, 32 (6), 1557-1560.

DOS ANJOS SANTOS, V. L.; GONSALVES, A. A.; ARAÚJO, C. R. M. Abordagem didática para o desenvolvimento de moléculas bioativas: regra dos cinco de lipinski e preparação de heterociclo 1,3,4-oxadiazol em forno de micro-ondas doméstico. Química Nova [online]. 2017, vol. XY, n.00, p. 1-6.