

Síntese e avaliação das atividades anti-*Mycobacterium tuberculosis* de N-acilhidrazonas derivados do ácido 2-tiofenocarboxílico

Synthesis and avaluation of anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity of N-acylhidrazones derived from 2-thiophenecarboxylic acid

RESUMO

O uso inadequado de fármacos para tratamento da tuberculose origina uma linhagem de microrganismos superresistentes, o que demanda a busca por novos tratamentos quimioterápicos. Diante disso, o objetivo desta pesquisa é a síntese de N-acilhidrazonas derivadas do ácido 2-tiofenocarboxílico. Para a síntese das N-acilhidrazonas, foi obtido o 2-tiofenocarboxilato de metila que, quando submetido à reação com hidrazina (80%) sob agitação magnética à temperatura ambiente, resultou no composto chave: a 2-tiofenocarboxihidrazida. A partir da hidrazida, foram obtidos nove compostos resultantes da condensação da mesma com uma série de benzaldeídos sob ultrassom e catálise ácida, e sob agitação à temperatura ambiente. As propriedades físico-químicas foram obtidas pela análise dos parâmetros de Lipinski, que sugeriu um potencial farmacológico. Para a caracterização dos compostos, foram feitas análises espectroscópicas na região do infravermelho e por ressonância magnética nuclear de carbono (^{13}C) e hidrogênio (^1H) e determinação de ponto de fusão. Foi feita também a análise da atividade biológica para verificar a ação inibitória e bactericida referente à *Mycobacterium tuberculosis*, onde apenas dois compostos apresentaram MIC < 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

PALAVRAS-CHAVE: Acilhidrazida. N-acilhidrazonas. Atividade antibacteriana.

Rafaela Yukari Miyauti dos Santos
rafaelayukarim@gmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, Paraná, Brazil

Dayane Cristina Batista Leal
Dayane_leal2004@hotmail.com
Universidade Estadual de Maringá, 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

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.



ABSTRACT

The inappropriate use of drugs on tuberculosis treatment results on the emergence of resistant microorganisms, which urges the search for new chemotherapeutic drugs. Therefore, the aim of this research consists on the synthesis of N-acylhydrazonic compounds derivatives from 2-thiophenecarboxylic acid. To obtain the ester 2-(carbomethoxy)thiophene, the acid was submitted to reaction with hydrazine (80%) under magnetic stirring at room temperature. Once the carbohydrazide was obtained, another nine compounds wer sythesized from the condensation of it with benzadehydres under ultrasound stirring and acid catalysis and under magnetic stirring at room temperature. The physicochemical propeties were obtained from the analysis of the Lipinski parameters, which suggested a potencial pharmacogological activity. Characterization of the compounds occurred by dtermining the fusion point, infrared spectroscopy and

nuclear magnetic resonance of carbon (RMN¹³C) and hydrogen (RMN¹H) spectroscopy. Biological activity was also analyzed to verify inhibitory action against *Mtb*, where only two compounds showed MIC < 250µg/mL.

KEYWORDS: Acylhydrazide. N-acylhydrazones. Antibacterial activity.

INTRODUÇÃO

A despeito dos avanços na química medicinal, a tuberculose, transmitida pelo *Mycobacterium tuberculosis*, ainda é uma das doenças infectocontagiosas que mais ocasiona mortes no Brasil. O uso inadequado dos fármacos para tratamento da doença origina uma linhagem de microrganismos super-resistentes, o que demanda a busca por novos tratamentos quimioterápicos que sejam eficazes contra a *Mtb* (Quím. Nova, Vol. 35, No. 8, 2012).

As N-acilhidrazonas são moléculas caracterizadas pela presença do grupamento imina (-NH-N=CH-) e pelo grupo funcional (C=O) em sua estrutura, o que confere a elas importantes propriedades farmacológicas e ações antiviral, antiparasitária, antimicrobiana, analgésica, anti-inflamatória, entre outras ações biológicas (Quím. Nova, Vol. 35, No. 8, 2012). A metodologia mais comum para a síntese de N-acilhidrazonas consiste na condensação de acilhidrazidas com cetonas ou aldeídos sob catálise ácida. (MASCARELLO, A. 2012).

Neste contexto, visando auxiliar no tratamento da tuberculose, propõe-se a síntese de N-acilhidrazonas derivadas do 2-tiofenocarboxihidrazida para avaliação da citotoxicidade e do potencial farmacológico anti-*Mycobacterium tuberculosis*.

METODOLOGIA

SÍNTESE DE 2-TIOFENOCARBOXILATO DE METILA

Para obtenção do éster que deu origem à estrutura central (hidrazida) dos compostos N-acilhidrazônicos, foi aplicada a metodologia da esterificação de Fischer: ao meio reacional contendo ácido 2-tiofenocarboxílico e etanol, numa proporção estequiométrica de 1:30, foram adicionados 2mL de ácido sulfúrico (catalisador). A reação foi mantida sob agitação, aquecimento e refluxo, com temperatura entre 60 e 70°C por, aproximadamente, 18 horas; o rendimento final foi de 71,6%.

SÍNTESE DE 2-TIOFENOCARBOXIHIDRAZIDA

Para a síntese da molécula de partida dos derivados N-acilhidrazônicos, o éster obtido anteriormente foi submetido à reação com a hidrazina (80%) numa

proporção estequiométrica de 1:3. O solvente utilizado foi o metanol (5mL) e a reação foi mantida sob agitação magnética, aquecimento com temperatura entre 60° e 70°C e refluxo por 4 horas; em seguida, permaneceu mais 10 horas sob agitação magnética à temperatura ambiente. O produto foi filtrado e lavado com água, apresentando um rendimento de 49,7%.

SÍNTESE DE N-ACILHIDRAZONAS

Dispondo de 2-tiofencarboxihidrazida e de diferentes benzaldeídos, foi obtida uma série de N-acilhidrazonas. Foram empregadas duas metodologias: (a) por agitação via ultrassom e (b) agitação magnética à temperatura ambiente por um período de 4 a 6 horas. Em ambas as metodologias, a relação estequiométrica foi de 1:1, o solvente utilizado foi o metanol (10mL) e como catalisador, foi adicionada uma gota de ácido sulfúrico.

Para caracterizar os derivados e elucidar a estrutura dos compostos obtidos, foram feitas análises espectroscópicas na região do infravermelho (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 (Bruker operando em 400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C , utilizando DMSO- d_6 como solvente deuterado), além da determinação do ponto de fusão através do aparelho digital de Ponto de Fusão da Microquímica modelo MQAPF-32 com faixa de fusão de 0 a 350°C.

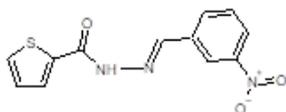
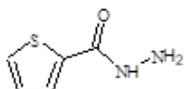
AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTITUBERCULOSE

Os derivados N-acilhidrazônicos obtidos foram submetidos à avaliação da atividade anti-*Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv (ATCC 27294), que foi realizada pelo método *Resazurin Microtiter Assay Plate* (REMA).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

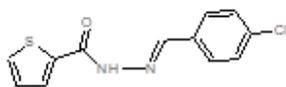
A caracterização, elucidação da estrutura e análise dos compostos foi feita pela determinação dos pontos de fusão, obtenção dos espectros na região do infravermelho e por ressonância magnética nuclear de próton (RMN ^1H) e de carbono (RMN ^{13}C). Os softwares utilizados para análise dos espectros foram: *ChemDraw*, *ACD/RMN Processor* e *Spectragryph*.

H1: aspecto físico: sólido branco; F.M: C₅H₆N₂OS; M.M (g/mol): 142,15; rend.: 49,7%; p. f.: 136-138°C; IR (4000-400 cm^{-1}) ν (cm^{-1}): 3194 (N-H), 1616 (C=O), 3112 (N-H₂). RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400MHz) δ (ppm): 4,46 (s, 2H, NH₂); 9,76 (s, 1H, NH), H_{ar}: 7,73 (dd, 1H, J = 5,0 1,0 Hz), 7,13 (dd, 1H, J = 4,7 e 1,4Hz), 7,71 (dd, 1H, J = 3,7 e 1,2Hz). RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100MHz) δ (ppm): 161,7 (1C, C=O), 138,8 (1C, C=N), 128, C_{Ar}: 130,8, 127,9, 128,4.

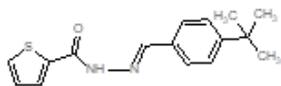


H2: aspecto físico: sólido branco; F.M: C₅H₆N₃O₃S; M.M. (g/mol): 275,29; rend.: 95,33%; p. f.: 208-211,5°C; IR (4000-400 cm^{-1}) ν (cm^{-1}): 858 (C-NO₂), 1641

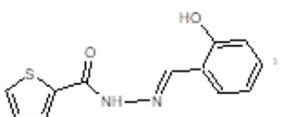
(C=O), 3157 (N-H), 1602 (N=C). RMN ¹H (DMSO-d₆, 400MHz) δ (ppm): 12,14/12,09 (s, 2H, N-H); 8,61/8,56 (s, 2H, N=CH); H_{ar}: 8,28 (m), 8,26 (m), 8,0 (m), 7,92 (m). RMN ¹³C (DMSO-d₆, 100MHz) δ (ppm): 148,75 (1C, C=N), 161,95 (1C, C=O).



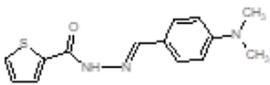
H3: aspecto físico: sólido branco; F.M: C₁₂H₉N₂OClS; M.M. (g/mol): 264,74; rend.: 77,5%; p. f.: 215-218°C; IR (4000-400cm⁻¹) v (cm⁻¹): 1632 (C=O), 3146 (N-H), 1600 (N=C), 1085 (Ar-Cl). RMN ¹H (DMSO-d₆, 400MHz) δ (ppm): 11,95/11,91 (s, 2H, N-H), 8,43 (s, 1H, N=CH), H_{ar}: 7,93 (m), 7,83 (m), 8,1 (d, 2H, J_{HH} = 22,25). RMN ¹³C (DMSO-d₆, 100MHz) δ (ppm): 161,82 (2C, C=O), C_{Ar}: 129,51-129,27, 135,46-134,96; 146,69 (1C, N=C).



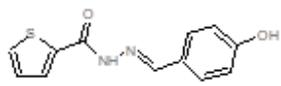
H4: aspecto físico: sólido marrom; F.M: C₁₆H₁₈N₂O₂S; M.M. (g/mol): 268,40; rend.: 95,88%; p. f.: 172,6-174°C; IR (4000-400cm⁻¹) v (cm⁻¹): 2962 (C-H_{sp³}), 1651 (C=O), 3165 (N-H), 1603 (N=C). RMN ¹H (DMSO-d₆, 400MHz) δ (ppm): 11,80 (s, 1H, N-H), H_{ar}: 7,51 (m, 2H), 7,7 (m, 2H); 8,42/8,10 (s, 2H, N=CH), 1,30 (3H, CH₃ terci-butil). RMN ¹³C (DMSO-d₆, 100MHz) δ (ppm): 131,98 (1C, C=O), 127,50/126,25 (2C, N=C), 35,80 (1C, C-(CH₃)₃), 31,42 (3C, -CH₃).



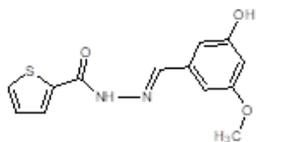
H5: aspecto físico: sólido branco; F.M: C₁₂H₁₀N₂O₂S; M.M. (g/mol): 246,29; rend.: 81,78%; p. f.: 166-168°C; IR (4000-400cm⁻¹) v (cm⁻¹): 1660 (C=O), 3101 (N-H), 1606 (N=C), 1202 (C-O), 3252 (Ar-OH). RMN ¹H (DMSO-d₆, 400MHz) δ (ppm): 12,14/11,75 (s, 2H, N-H), H_{ar}: 7,94 (m, 1H), 7,89 (m, 1H), 7,88 (m, 1H), 7,28 (m, 1H), 7,56 (m, 1H), 7,24 (m, 1H); 8,64/8,46 (s, 2H, N=CH). RMN ¹³C (DMSO-d₆, 100MHz) δ (ppm): 158,06/157,81 (2C, C=O), 148,3 (C_{Ar}-OH), C_{Ar} (1C): 132,62, 131,92, 129,79, 128,72, 126,61, 119,99, 119,25, 116,86; 138,3 (1C, N=C).



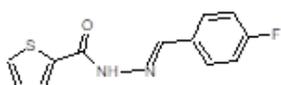
H6: aspecto físico: sólido branco; F.M: C₁₄H₁₅N₃O₂S; M.M. (g/mol): 273,36; rend.: 40,75%; p. f.: 200-201°C; IR (4000-400cm⁻¹) v (cm⁻¹): 1644 (C=O), 3149 (N-H), 1594 (N=C), 1352/1309 (2C, C-N). RMN ¹H (DMSO-d₆, 400MHz) δ (ppm): H_{ar}: 7,97 (m), 7,91 (m), 7,85 (m), 7,81 (m), 7,61 (m), 7,59 (m), 7,56 (m), 7,54 (m); 8,03 (s, 1H, N=CH); 2,95/2,51 (6H, s, N(CH₃)₃). RMN ¹³C (DMSO-d₆, 100MHz) δ (ppm): 161,45 (1C, C=O), C_{Ar} (1C): 135,27, 134,99, 129,06, 127,05; 145,49 (2C, N=C); 121,77 (2C, N-(CH₃)₂).



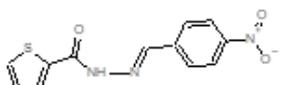
H7: aspecto físico: sólido branco; F.M: C₁₃H₁₂N₂O₃S; M.M. (g/mol): 276,32; rend.: 93,74%; p. f.: 216°C; IR (4000-400cm⁻¹) v (cm⁻¹): 1638 (C=O), 3262 (N-H), 1588 (N=C), 1288/1267, 1038/1028 (Ar-O-CH₃), 3523 (O-H).



H8: aspecto físico: sólido amarelo; F.M: C₁₂H₁₀N₂O₂S; M.M. (g/mol): 246,29; rend.: 62,45%. RMN ¹H (DMSO-d₆, 400MHz) δ (ppm): 11,83 (s, 1H, N-H), H_{ar}: 7,83 (m), 7,60 (m), 7,72 (m), 7,58 (m), 6,85 (m), 6,83 (m), 6,81 (m), 6,79 (m); 8,01 (s, 1H, N=CH). RMN ¹³C (DMSO-d₆, 100MHz) δ (ppm): 159,87/158,73 (2C, C=O), 149,21 (C_{Ar}-OH), 135,38 (2C, N=C).



H9: aspecto físico: sólido branco; F.M: C₁₂H₉FN₂O; M.M. (g/mol): 248,28; rend.: 56,96%; IR (4000-400cm⁻¹) v (cm⁻¹): 1645 (C=O), 3151 (N-H), 1612 (N=C), 1151 (C-F).



H10: aspecto físico: sólido branco; F.M: C₁₂H₉N₃O₃; M.M. (g/mol): 273,36; rend.: 55,1%; IR (4000-400cm⁻¹) v (cm⁻¹): 1644 (C=O), 3284 (N-H), 1579 (N=C), 843 (C-NO₂), 1505/1329 (N=O). RMN ¹H (DMSO-d₆, 400MHz) δ (ppm): 12,17/12,14 (s, 2H, N-H), H_{ar}: 8,38 (m), 8,36 (m), 8,22 (m), 8,17 (m), 8,14 (m), 8,02 (m); 8,85 (s, 2H, N=CH). RMN ¹³C (DMSO-d₆, 100MHz) δ (ppm): 162,12 (C=O), 148,28 (N=C).

Analisando os sinais dos espectros de RMN de ^1H , foi possível comprovar a formação dos derivados N-acilhidrazônicos devido à presença dos deslocamentos químicos característicos (δ), em ppm. O deslocamento correspondente ao hidrogênio ligado ao nitrogênio adjacente à carbonila se encontra na faixa de 12,17/11,75 ppm – 2H, singleto; 8,85/8,01 ppm – 2H, singleto, correspondente ao hidrogênio ligado ao carbono imínico; 8,28/6,79 ppm – multipletos correspondentes aos hidrogênios do anel benzila. Alguns deslocamentos foram duplicados devido a formação de isômeros E-Z provenientes da rotação do hidrogênio da ligação imínica (N=C-H); os sinais característicos de RMN ^{13}C do carbono desta ligação se encontram em 149,49/126,25 ppm, enquanto do carbono da carbonila de amida se encontra em 159,87/131,98 ppm.

ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS

Para avaliação do potencial farmacológico dos compostos, através dos softwares *Molsoft*, *Molinspiration* e *OSIRIS Property Explorer*, foram obtidas as propriedades físicas e químicas expressas nos parâmetros de Lipinski. De acordo com a regra dos 5, todos os compostos, todos os compostos mostraram-se promissores para estudo *in vitro*.

Tabela 1 – Parâmetros de Lipinski dos derivados N-acilhidrazônicos

Código	HBA	HDB	Mol LogP	Mol LogS	Mol PSA (Å^2)	Violações
H2	6	1	2,15	-3,69	69,70	N/A
H3	3	1	3,67	-4,23	69,70	N/A
H4	3	1	4,65	-5,17	89,93	N/A
H5	4	2	2,72	-2,82	72,94	N/A
H6	4	1	2,96	-3,60	99,16	N/A
H7	5	2	2,65	-3,11	89,93	N/A
H8	4	2	2,72	-3,13	69,70	N/A
H9	3	1	3,17	-3,79	72,94	N/A
H10	4	1	2,96	-3,77	115,52	N/A

Fonte: OSIRIS *Property Explorer* (2019)

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada frente à cepa de referência *Mtb* H₃₇Rv através do método *Resazurin Microtiter Assay Plate* (REMA), de acordo com Palomino et. al (2002), em triplicata, em dias diferentes.

Tabela 1 – Dados de Concentração Inibitória Mínima dos compostos sintetizados

CIM ($\mu\text{g/mL}$)

Código	Placa 1	Placa 2	Placa 3
H1	62,50	> 250	> 250
H2	> 250	> 250	> 250
H3	> 250	> 250	> 250
H4	7,90	3,95	7,90
H5	62,50	31,25	62,50
H6	> 250	> 250	250
H7	125	250	> 250
H8	> 250	> 250	250
H9	31,25	250	> 250
H10	7,90	15,62	15,62

Fonte: Autores (2019)

As moléculas que apresentaram os resultados mais promissores foram H4 (4-terc-butil) H9 (4-nitro), em especial H3 com CIM 3,95-7,90 μ g/mL. Moléculas que na triagem para cepas padrão H₃₇Rv apresentam CIM inferior a 15,0 μ g/mL são potenciais candidatos a novos fármacos anti-TB. Contudo, ensaios complementares como citotoxicidade, índice de seletividade, sinergismo e mecanismos de ação também devem ser verificados.

CONCLUSÕES

Dos 9 derivados N-acilhidrazônicos sintetizados, apenas dois se mostraram promissores frente à *Mtb*: os compostos H4 e H9, com valores de CIM entre 3,95 e 7,9 μ g/mL. Além disso, a carbohidrazida não apresentou atividade anti-*Mtb* em dois ensaios, que deverá ser confirmado em novos estudos. Assim, pretende-se aprofundar o estudo dos compostos promissores para melhorar a eficiência da atividade e identificar novos compostos com potencial farmacológico para o tratamento da tuberculose.

REFERÊNCIAS

CACHIBA, T. H.; CARVALHO, B. D.; CARVALHO, D. T. **Síntese e avaliação preliminar da atividade antibacteriana e antifúngica de derivados N-acilhidrazônicos**. Quím. Nova, São Paulo, v. 35, n. 8, p. 1566-1569, 2012.

MASCARELLO, A. **A busca racional por moléculas bioativas em modelos de diabetes, leucemia e tuberculose**. 2012. 185 f. Tese (Doutorado em Química) – Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, SC, 2012.