



Síntese e avaliação de atividade antituberculose de derivados N-acilhidrazônicos do timol

Synthesis and evaluation of antituberculosis activity of N-acylhydrazone thymol derivatives

Lincoln Herholz Ferraretto*, Fábio Vandresen†,

RESUMO

Neste trabalho propõe-se a síntese, caracterização, análise de parâmetros ADME/T e avaliação da atividade antituberculose de N-acilhidrazonas derivados do timol. Os compostos alvo foram sintetizados pela O-alkilação com cloroacetato de metila seguido pela substituição nucleofílica com hidrazina e a condensação com compostos carbonílicos (aldeídos ou cetonas) sob catálise ácida. A caracterização das moléculas sintetizadas decorreu-se por espectroscopia de infravermelho. Os parâmetros de ADME/T foram coletados na plataforma online Osiris property explorer e condicionados à regra dos cinco de Lipinski. Obteve-se 7 de 11 compostos previstos com rendimentos da etapa final de reação entre 95% e 43%, onde, ainda precisam ser caracterizados via ressonância magnética nuclear para assim avaliar a atividade antituberculose. As propriedades físico-químicas das moléculas geraram resultados promissores para ADME/T, em que, de todos os compostos só houve uma violação da regra de Lipinski. Espera-se com base neste trabalho e outras fontes da literatura que estes compostos tendam a ser biologicamente ativos contra a *M.tuberculosis*, entretanto, deseja-se ao futuro verificar a atividade microbiológica assim como seus possíveis efeitos toxicológicos.

Palavras-chave: Tuberculose, Síntese orgânica, Biomoléculas.

ABSTRACT

This work proposes the synthesis, characterization, analysis of ADME/T parameters, and evaluation of the antituberculosis activity of N-acylhydrazones derived from thymol. Target compounds were synthesized by O-alkylation with methyl chloroacetate followed by nucleophilic substitution with hydrazine and condensation with carbonyl compounds (aldehydes or ketones) under acid catalysis. The characterization of the synthesized molecules was carried out by infrared spectroscopy. ADME/T parameters were collected on the Osiris property explorer online platform and conditioned to Lipinski's rule of five. We obtained 7 out of 11 predicted compounds with yields of the final step of reaction between 95% and 43%, where they still need to be characterized by nuclear magnetic resonance to evaluate the antituberculosis activity. The physicochemical properties of the molecules generated promising results for ADME/T, in which, of all compounds, there was only one violation of Lipinski's rule. Based on this work and other sources in the literature, it is expected that these compounds tend to be biologically active against *M.tuberculosis*, however, it is intended in the future to verify the microbiological activity as well as its possible toxicological effects.

Keywords: Tuberculosis, Organic Synthesis, Biomolecules.

1 INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma doença de origem microbiana causada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis* sendo comumente conhecida por afetar principalmente os pulmões. Sua transmissão ocorre pelo ar através da fala, tosse e espirros, onde gotículas emitidas pela pessoa infectada transportam os bacilos para um novo indivíduo. A TB acarreta cerca de 10 milhões de casos por ano, onde destes, 1,5 milhões de pessoas não resistem, tornando assim, uma das doenças infecciosas que mais causam mortes no mundo (WHO, 2020).

O tratamento da TB a princípio é baseado no uso dos chamados fármacos de primeira escolha constituído pela isoniazida, pirazinamida, etambutol e rifampicina. Devido ao grande tempo de tratamento, muitos pacientes ao já perceberem uma melhora no quadro clínico interrompem prematuramente a utilização dos antibióticos, gerando deste modo um dos motores para o aparecimento das novas cepas multirresistentes (MDR-TB) e extremamente resistentes (XDR-TB) aos fármacos já utilizados (NOUGUEIRA, 2012).

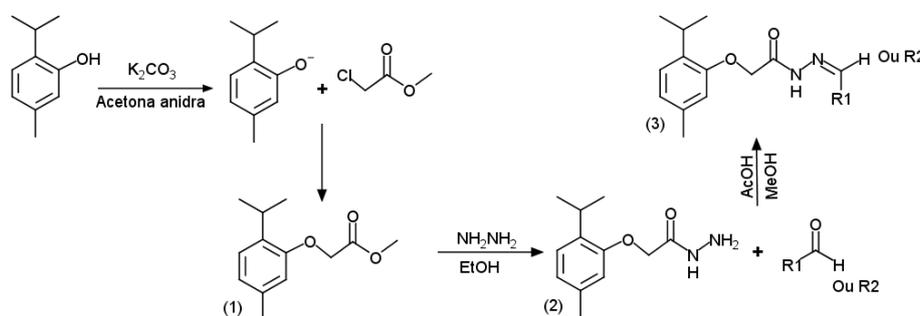
Na literatura, encontra-se bons resultados de atividade anti-TB para o timol (um monoterpene fenólico presente em várias ervas) (ANDRADE-OCHOA, 2015) e também de N-acilhidrazonas (caracterizado por um nitrogênio ligado a uma carbonila e à um nitrogênio imínico) em geral (PAVAN, 2010), portanto, seriam híbridos de N-acilhidrazonas derivadas do timol potenciais fármacos contra TB? Para responder tal questionamento este estudo propõe sintetizar, caracterizar, analisar parâmetros físico-químicos e avaliar a possível ação anti-TB destes híbridos.

2 MÉTODOS

2.1 Síntese

O preparo das moléculas esquematizado na figura 1 teve como base uma rota de síntese presente na literatura (RAJPUT; BAGUL; BENDRE, 2017).

Figura 1 – Metodologia realizada para obtenção dos derivados N-acilhidrazônicos com unidade timol. R₁, R₂ = alquil, aril.



Fonte: Autoria própria (2020).

Nas etapas de formação de (2-isopropil-5-metilfenoxi) acetato de metila (1) e (2-isopropil-5-metilfenoxi) aceto-hidrazida (2), obteve-se rendimento de 88% e 28% respectivamente, enquanto no preparo das N-acilhidrazonas de timol (3) utilizando os compostos carbonilados: 4-nitrobenzaldeído, 4-clorobenzaldeído, 4-



hidroxibenzaldeído, 4-tercutilbenzaldeído, 4-metoxibenzaldeído e 4-fluorbenzaldeído, gerou-se 95%, 81%, 43%, 85%, 85% e 79% de rendimento respectivamente.

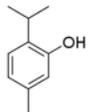
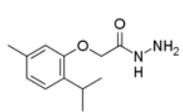
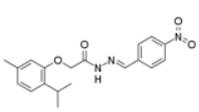
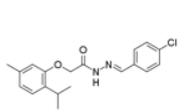
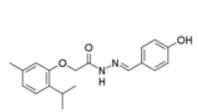
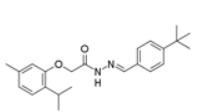
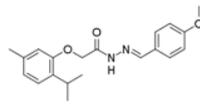
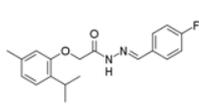
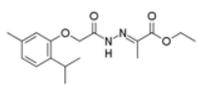
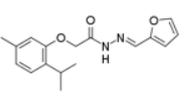
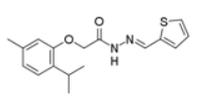
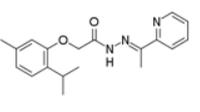
2.2 Equipamentos

Os espectros de infravermelho foram realizados na Universidade Tecnológica Federal do Paraná campus Londrina utilizando um espectrofotômetro de marca Perkin Elmer modelo Spectrum Two acoplado a um modulo de reflexão total atenuada (ATR/FTIR) que atua de 4000 a 400 cm^{-1} .

2.3 Parâmetros *in silico* (ADME/T)

O estudo molecular voltado a absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADME/T) das moléculas alvo em relação ao ser humano foi realizado na plataforma online OSIRIS Property Explorer. Esta abordagem possibilita prever a possibilidade da administração oral destes protótipos à fármaco baseando-se na regra dos cinco elaborada por Christopher Lipinski (1997). A figura 2 apresenta as moléculas que foram propostas para o este estudo.

Figura 2 – Moléculas propostas para o estudo.

					
Timol	AHT01	THZ01	THZ02	THZ03	THZ04
					
THZ05	THZ06	THZ07	THZ08	THZ09	THZ10

Fonte: Aatoria própria (2021).

3 RESULTADOS

3.1 Síntese

Foram sintetizados 8 compostos de 11 propostos. Os rendimentos em geral foram satisfatórios com exceção nas preparações de (2-isopropil-5-metilfenoxi) aceto-hidrazida (AHT01) e N' - [(4-Hidroxifenil) metileno] -2-(2-isopropil-5-metilfenoxi) acetohidrazida (THZ03) com 28% e 43% de rendimento respectivamente. Referente à AHT01, foi notado via métodos espectroscópicos a presença de timol em meio ao produto na reação de formação de (2-isopropil-5-metilfenoxi) acetato de metila, mostrando assim que esta etapa inicial do processo requer maiores cuidados principalmente em relação a presença de umidade, onde pode ser proveniente até mesmo da condensação da umidade do ar que entra no balão durante o refluxo. Já em relação



à THZ03, como o grupo hidroxil é um forte doador de elétrons para o anel aromático, acaba diminuindo a eletrofilicidade da carbonila, dificultando assim a reação. Outra possível explicação para este caso é a maior afinidade da molécula por solventes polares, perdendo certa parte do produto durante a etapa de purificação.

3.2 Dados espectroscópicos

2-isopropil-5-metilfenol (timol): IV(ATR): (OH) 3226, (CH_{Alifático}) 2960; ¹H RMN(400MHz, CDCl₃): δ_H 1.30(6H, d, J=7.2Hz), 2.33(3H, s), 3.23(1H, hep, J=7.2Hz), 4.79(1H, s), 6.62(1H, s), 6.80(1H, d, J=8.0Hz), 7.15(1H, d, J=8.0Hz); ¹³C RMN(100MHz, CDCl₃): δ_C 20.9, 22.7, 26.7, 116.1, 121.7, 126.3, 131.4, 136.6, 152.5.

(2-isopropil-5-metilfenoxi) acetato de metila (1): IV(ATR): (CH_{Alifático}) 2963, (C=O) 1743; ¹H RMN(400MHz, CDCl₃): δ_H 1.31(6H, m), 2.35(3H, s), 3.46(1H, m), 3.88(3H, s), 4.72(2H, s), 6.63(1H, s), 6.84(1H, d, J=7.6Hz), 7.19(1H, d, J=7.6Hz); ¹³C RMN(100MHz, CDCl₃): δ_C 21.3, 22.8, 26.7, 52.3, 65.7, 112.4, 122.5, 126.3, 134.7, 136.4, 155.0, 170.1(C=O).

2-(2-isopropil-5-metilfenoxi) aceto-hidrazida (AHT01): IV(ATR): (NH) 3322, (CH_{Alifático}) 2955, (C=O) 1675; ¹H RMN(400MHz, CDCl₃): δ_H 1.25(6H, d, J=6.8Hz), 2.34(3H, s), 3.27(1H, hep, J=6.8Hz), 3.99(2H, s, NH₂), 4.60(2H, s), 6.62(1H, s), 6.85(1H, d, J=8.0Hz), 7.15(1H, d, J=8.0Hz), 7.77(1H, s, NH); ¹³C RMN(100MHz, CDCl₃): δ_C 21.2, 22.9, 26.7, 67.4, 112.7, 122.9, 126.3, 133.9, 136.9, 154.1, 169.0(C=O).

2-(2-Isopropil-5-metilfenoxi) -N'- [(4-nitrofenil) metileno] aceto-hidrazida (THZ01): IR(ATR): (NH) 3116, (C=O) 1684, (C=N) 1616, (NO₂) 1523, (NO₂) 1339; ¹H RMN(400MHz, DMSO-d₆): δ_H 1.17(6H, d, J=7.2Hz), 2.27(3H, s), 3.33(1H, hep, J=7.2Hz), 4.70(2H, s), 6.68(1H, m), 6.72(1H, m), 7.08(1H, m), 7.98(2H, d, J=8.8Hz), 8.12(1H, s, HC=N), 8.27(2H, d, J=8.8Hz), 11.6(1H, s, NH); ¹³C RMN(100MHz, DMSO-d₆): δ_C 21.4, 23.1, 26.5, 65.5, 112.8, 121.8, 124.4, 126.1, 128.3, 133.7, 136.1, 140.8, 141.8(C=N), 148.2, 155.6, 170.1(C=O).

N'- [(4-clorofenil) metileno] -2- (2-isopropil-5-metilfenoxi) acetohidrazida (THZ02): IR(ATR): (NH) 3090, (C=O) 1678, (C=N) 1610, (Cl) 786.

N'- [(4-Hidroxifenil) metileno] -2- (2-isopropil-5-metilfenoxi) acetohidrazida (THZ03): IR(ATR): (OH) 3214, (NH) 3068, (C=O) 1655, (C=N) 1607.

2-(2-Isopropil-5-metilfenoxi) -N'- {[4- (2-metil-2-propanil) fenil] metileno} aceto-hidrazida (THZ04): IR(ATR): (NH) 3087, (C=O) 1698, (C=N) 1610.

2-(2-Isopropil-5-metilfenoxi) -N'- (4-metoxibenzilideno) acetohidrazida (THZ05): IR(ATR): (NH) 3082, (C=O) 1695, (C=N) 1605.

N'- [(4-Fluorofenil) metileno] -2- (2-isopropil-5-metilfenoxi) aceto-hidrazida (THZ06): IR(ATR): (NH) 3076, (C=O) 1672, (C=N) 1616, (F) 1229.



3.3 Dados de ADME/T

As moléculas para o estudo foram submetidas ao software OSIRIS gerando as previsões de propriedades e toxicidade presentes no quadro 1 e tabela 1.

Quadro 1 - Risco molecular de gerar efeitos indesejáveis.

Composto	Mutagênico	Tumorigênico	Irritante	Efeito reprodutivo
Timol	Alto	Baixo	Baixo	Alto
AHT01	Baixo	Alto	Baixo	Baixo
THZ01	Alto	Alto	Baixo	Baixo
THZ02	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo
THZ03	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo
THZ04	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo
THZ05	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo
THZ06	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo
THZ07	Baixo	Baixo	Baixo	Médio
THZ08	Alto	Baixo	Baixo	Médio
THZ09	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo
THZ10	Médio	Baixo	Baixo	Baixo

Fonte: Autoria própria (2021).

Em geral, com exceção de timol, AHT01, THZ01, THZ07, THZ08 e THZ10, apresentou-se baixa probabilidade de toxicidade, gerando assim bons indícios para uso farmacológico.

Com base na regra dos 5 de Lipinski, define-se um bom candidato à administração oral, moléculas que possuem: massa molar inferior a 500 g/mol; TPSA (área da superfície polar) menor que 140Å^2 ; 5 ou menos doadores de ligação de hidrogênio; 10 ou menos aceptores de ligação de hidrogênio; cLogP (coeficiente de partição octanol/água) igual ou menor que 5; menos que 10 ligações rotativas.

Tabela 1 - Dados das propriedades moleculares.

Composto	Massa molar (g/mol)	Aceptor de ligações H	Doador de ligações H	Ligações rotativas	cLogP	TPSA (Å^2)	Druglikeness	Drug-score
Timol	150,22	1	1	1	2,84	20,23	-3,02	0,18
AHT01	222,29	4	2	4	1,09	64,25	-8,31	0,29
THZ01	355,39	7	1	7	3,39	96,51	-8,60	0,15
THZ02	344,84	4	1	6	4,91	50,69	2,40	0,68
THZ03	326,39	5	2	6	3,96	70,92	1,82	0,76
THZ04	366,50	4	1	7	5,89	50,69	-1,55	0,35
THZ05	340,42	5	1	7	4,24	59,92	1,82	0,73
THZ06	328,39	4	1	6	4,41	50,69	0,71	0,65
THZ07	320,29	6	1	8	2,65	76,99	-3,96	0,37
THZ08	300,36	5	1	6	3,50	63,83	1,68	0,39
THZ09	316,42	4	1	6	4,17	78,93	3,26	0,79
THZ10	325,41	5	1	6	3,30	63,58	0,68	0,58

Fonte: Autoria própria (2021).



Sobre a administração oral, apenas o composto THZ04 violou uma das restrições de Lipinski, resultando em geral bons candidatos em termos de ADME. Já em relação a druglikeness e drug-score, destaca-se THZ09, THZ03 e THZ05. Vale apenas ressaltar que todos estes parâmetros discutidos neste subtópico são previsões baseadas em similaridade com um banco de dados, deste modo, não expressão fielmente a realidade.

Com relação ao ensaio antituberculose a única molécula avaliada foi a N-acilhidrazida AHT01. O ensaio foi realizado pelo método REMA para a cepa padrão de *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv. O resultado obtido foi de 1,9 µg.mL⁻¹, o que é considerado um resultado promissor considerando que moléculas com MIC (Concentração inibitória mínima) inferior a 10 µg.mL⁻¹ são consideradas moléculas potenciais como futuros fármacos antituberculose.

4 CONCLUSÃO

Necessita-se ainda a síntese de 4 N-acilhidrazonas juntamente com suas respectivas caracterizações via espectroscopia de infravermelho e RMN, para só assim, complementar os ensaios de verificação da atividade biológica. As previsões de ADME/T revelam bons indícios de atividade, administração e toxicidade para a maioria dos compostos, com ênfase para o composto THZ09 que apresentou os melhores resultados. A MIC apresentada pela N-acilhidrazida no ensaio antituberculose encoraja a continuidade do trabalho visando a obtenção de moléculas com potencial ação frente ao crescimento do bacilo causador da tuberculose.

AGRADECIMENTOS

Deixo meus agradecimentos à Fundação Araucária pela bolsa concedida, assim como ao meu orientador Fábio Vandresen e a instituição UTFPR pela oportunidade de realizar este trabalho.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE-OCHOA, Sergio et al. Quantitative structure-activity relationship of molecules constituent of different essential oils with antimycobacterial activity against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis*. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 15, n. 1, p. 332, 2015.
- LIPINSKI, Christopher A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced drug delivery reviews**, v. 23, n. 1-3, p. 3-25, 1997.
- NOGUEIRA, Antônio Francisco et al. Tuberculose: uma abordagem geral dos principais aspectos. **Rev. Bras. Farm.**, v. 93, n. 1, p. 3-9, 2012.
- PAVAN, Fernando R. et al. Thiosemicarbazones, semicarbazones, dithiocarbazates and hydrazide/hydrazones: Anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity and cytotoxicity. **European journal of medicinal chemistry**, v. 45, n. 5, p. 1898-1905, 2010.
- RAJPUT, Jamatsing D.; BAGUL, Suresh D.; BENDRE, Ratnamala S. Design, synthesis, biological screenings and docking simulations of novel carvacrol and thymol derivatives containing acetohydrazone linkage. **Research on Chemical Intermediates**, v. 43, n. 8, p. 4893-4906, 2017.
- WHO, Global. **Global tuberculosis report 2020**. Glob. Tuberc. Rep. 2020.