

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE QUÍMICA

LICENCIATURA EM QUÍMICA

BRUNO HENRIQUE MARTARELLO REZENDE

**SALICIL-HIDRAZONAS: ESTUDO *IN SILICO*, SÍNTESE E
AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTITUBERCULOSE**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO 2

LONDRINA

2022

BRUNO HENRIQUE MARTARELLO REZENDE

**SALICIL-HIDRAZONAS: ESTUDO *IN SILICO*, SÍNTESE E
AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTITUBERCULOSE**

**Salicyl-hydrazones: *In silico* study, synthesis and biological evaluation
anti-tuberculosis**

Trabalho de Conclusão de Curso 2
apresentado como requisito parcial à
obtenção do título de Licenciado em
Química da Universidade Tecnológica
Federal do Paraná, Câmpus Londrina.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Vandresen.

LONDRINA

2022



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

Esta licença permite compartilhamento, remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, mesmo para fins comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es). Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



Ministério da Educação

Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Câmpus Londrina

Departamento Acadêmico de Química

Coordenação do Curso de Licenciatura em Química

TERMO DE APROVAÇÃO

BRUNO HENRIQUE MARTARELLO REZENDE

SALICILHIDRAZONAS: ESTUDO *IN SILICO*, SÍNTESE E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTITUBERCULOSE

Trabalho de Conclusão de Curso 2 apresentado no dia 16 de Dezembro de 2022 como requisito para obtenção do título de Licenciado em Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, câmpus Londrina. O(a) candidato(a) foi arguido(a) pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Prof. Renato Márcio Ribeiro Viana

(UTFPR – Departamento Acadêmico de Química)

Prof. Antônio Laverde Júnior

(UTFPR – Departamento Acadêmico de Química)

Prof. Fábio Vandresen - Orientador

(UTFPR – Departamento Acadêmico de Química)

AGRADECIMENTOS

Ao orientador, Prof. Dr. Fábio Vandresen, pelos ensinamentos e pela paciência ao longo da escrita deste trabalho.

A toda a equipe do Laboratório de Bacteriologia Médica da Universidade Estadual de Maringá, pela realização dos ensaios de atividade biológica.

A Universidade Tecnológica Federal do Paraná, pela possibilidade de realização deste trabalho, bem como todos os servidores que tiveram uma colaboração fundamental em minha formação.

A Universidade Estadual de Londrina, pela parceria que possibilitou a realização das análises de RMN.

Aos meus pais, Eliel e Valdenice, pelo apoio, pela inspiração e pelas palavras de carinho e motivação ao longo desta jornada.

A minha irmã, Juliana, pelos puxões de orelha quando necessário.

Aos meus avós, Orlando, Valdete, Antônio Valentin e Maria Inez, pelo aprendizado e pelo suporte fundamental em minha permanência no curso.

Aos meus amigos, pelo amparo e incentivo nos momentos de dificuldade.

Os enigmas do universo só lentamente
se revelam à nossa investigação.
Existem questões às quais o homem,
atualmente, não pode nos dar
respostas, mas, o trabalho científico
constitui o único caminho que pode nos
levar a um verdadeiro conhecimento da
realidade externa a nós.

(FREUD, 1927)

RESUMO

A tuberculose é uma doença infecciosa milenar causada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis* que ainda apresenta um alto índice de contaminação e de óbitos especialmente na última década. O tratamento é de caráter poli quimioterápico, envolvendo substâncias que apresentam alta toxicidade, especialmente devido ao tempo de exposição a algumas delas, visto que o tratamento é longo. Diante dessas diversidades é grande o número de indivíduos que abandonam o tratamento que visa a eliminação do bacilo e é comum o surgimento de cepas multirresistentes aos antibióticos utilizados na terapêutica, expondo a necessidade de buscar novos compostos com potencial antituberculose e com menor toxicidade durante o período que ocorre o tratamento. As salicil-hidrazonas são moléculas bioativas frequentemente reportadas como substâncias com ação antibacteriana e anti-inflamatória na literatura, motivando estudos de compostos derivados dessas moléculas. Assim, o presente trabalho apresenta a síntese de duas salicil-hidrazonas (2-Furaldeído salicil-hidrazona (SH10) e 2-Tiofenocarboxaldeído salicil-hidrazona(SH11)), a partir do ácido salicílico, com vistas para a avaliação da atividade anti-*Mycobacterium tuberculosis* e a execução de estudos de predição de parâmetros físico-químicos *in silico*. Os compostos foram obtidos com rendimentos variando de 34,34% a 57,06%. A caracterização dos compostos foi realizada com a utilização de espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^1H e de ^{13}C e por espectroscopia na região do infravermelho. A investigação dos parâmetros *in silico* foram realizadas para uma série de 17 salicil-hidrazonas (SH1-SH17) com uso dos softwares *OSIRIS Property Explorer*®, *SwissADME*®, *PASS Online*® e *Molinspiration*®, que forneceram dados das propriedades físico-químicas acerca da capacidade de biodisponibilidade oral, ação toxicológica, predições de atividades farmacológicas e bioatividade. A avaliação da atividade antituberculose das salicil-hidrazonas SH1-SH17 foi realizada com a cepa padrão H₃₇Rv e cepas resistentes aos fármacos utilizados na quimioterapia da tuberculose visando a identificação de potenciais novos fármacos que possam atuar satisfatoriamente como agentes antituberculose. As salicil-hidrazonas mais ativas contra a cepa padrão H₃₇Rv de *M. tuberculosis*: MIC de 3,8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (SH11), 7,9 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (SH10), 15,6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (SH13 e SH14) e 31,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (SH8, SH12, SH15 e SH16). A salicil-hidrazona SH11 mostrou um perfil igualmente ativo contra duas cepas resistentes de *M. tuberculosis* e ainda melhores resultados (MIC de 1,95 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) para a maioria das cepas resistentes testadas. Por fim, apesar de não ser conhecido o mecanismo de ação ou os alvos moleculares para as moléculas propostas, foi observado que quando inserido substituintes heterocíclicos se resulta em uma melhora da atividade.

Palavras-chave: Tuberculose. Salicil-hidrazona. *In silico*. Atividade antituberculose.

ABSTRACT

Tuberculosis is an ancient infectious disease caused by the bacillus *Mycobacterium tuberculosis*, which still has a high rate of contamination and deaths, especially in the last decade. The treatment is multi-chemotherapeutic, involving substances that are highly toxic, especially due to the time of exposure to some of them, since the treatment is long. In view of these diversities, a large number of individuals abandon the treatment aimed at eliminating the bacillus, and the emergence of strains that are multiresistant to the antibiotics used in therapy is common, exposing the need to seek new compounds with anti-tuberculosis potential and with less toxicity during the period which treatment takes place. Salicyl-hydrazones are bioactive molecules frequently reported as substances with antibacterial and anti-inflammatory action in the literature, motivating studies of compounds derived from these molecules. Thus, the present work presents the synthesis of two salicyl-hydrazones (2-Furaldehyde salicyl-hydrazone(SH10) and 2-Tiophenecarboxaldehyde salicyl-hydrazone (SH11)), from salicylic acid, with a view to evaluating the anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity and carrying out *in silico* physicochemical parameters prediction studies. The compounds were obtained in yields ranging from 34.34% to 57.06%. The characterization of the compounds was performed using ^1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy and infrared spectroscopy. The investigation of the *in silico* parameters was carried out for a series of 17 salicyl-hydrazones (SH1-SH17) using the OSIRIS Property Explorer®, SwissADME®, PASS Online® and Molinspiration® software, provided data on the physicochemical properties about the capacity for oral bioavailability, toxicological action, predictions of pharmacological activities and bioactivity. The evaluation of the anti-tuberculosis activity of salicyl-hydrazones SH1-SH17 was carried out with the standard H37Rv strain and strains resistant to the drugs used in tuberculosis chemotherapy, aiming at identifying potential new drugs that can satisfactorily act as antituberculosis agents. The most active salicyl-hydrazones against the standard H37Rv strain of *M. tuberculosis*: MIC of $3.8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (SH11), $7.9 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (SH10), $15.6 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (SH13 and SH14) and $31.25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (SH8, SH12, SH15 and SH16). Finally, although the mechanism of action or the molecular targets for the proposed molecules is not known, it was observed that when inserted heterocyclic substituents it results in an improvement of the activity.

Keywords: Tuberculosis. Salicyl-hydrazone. *In silico*. Anti-tuberculosis activity.

LISTA DE FIGURAS

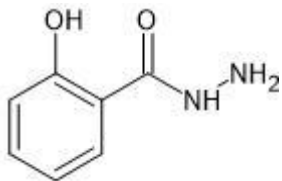
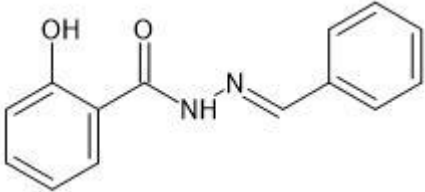
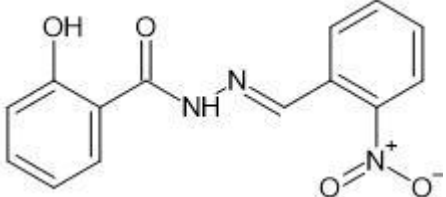
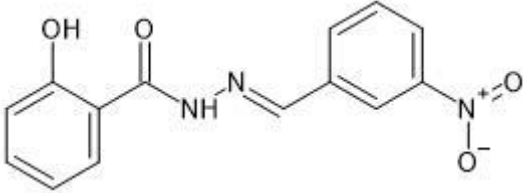
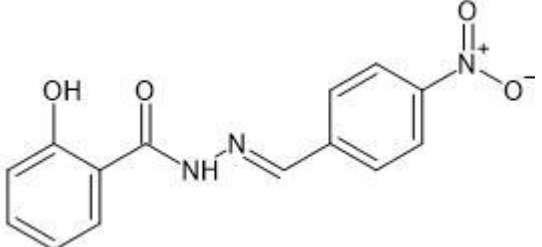
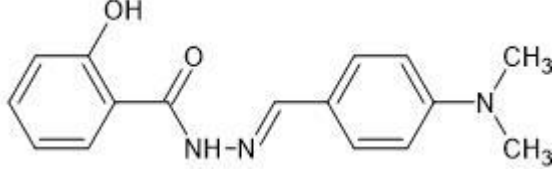
Figura 1 - Fármacos da primeira linha de tratamento da tuberculose.....	10
Figura 2 - Estrutura geral da N-acil-hidrazona.....	12
Figura 3 - Síntese de N-acil-hidrazona.....	13
Figura 4 - Síntese de N-acil-hidrazona em solução de DMF.....	13
Figura 5 - Derivados hidrazônicos no tratamento da tuberculose.....	14
Figura 6 – Acilhidrazonas com potencial antituberculose.....	15
Figura7 – Estrutura geral da salicilhidrazona.....	15
Figura 8 – Derivado salicil-hidrazônico com atividade antituberculose.....	16
Figura 9 – Esquema de síntese geral de salicil-hidrazona.....	18
Figura 10 – Salicil-hidrazonas derivadas do furfural (SH 10) e 2-tiofeno carboxaldeído (SH11) que serão sintetizadas para complementação da série.....	19
Figura 11 – Compostos estudados neste trabalho.....	23
Figura 12 – Gráfico <i>boiled egg</i> para os compostos estudados.....	25
Figura 13 – Síntese do salicilato de metila.....	31
Figura 14 – Síntese da salicil-hidrazida.....	32
Figura 15 – Mecanismo geral de síntese de salicil-hidrazonas.....	33
Figura 16 – Espectro IV do salicilato de metila.....	35
Figura 17 – Espectro IV da 2-Hidroxibenzohidrazina (SH1).....	36
Figura 18 – Espectro IV da 2-Furaldeido salicil-hidrazona (SH10).....	36
Figura 19 – Espectro IV do 2-Tiofenocarboxaldeído salicil-hidrazona (SH11).....	37
Figura 20 – Espectro de RMN 1 H expandido da 2-Furaldeido salicil-hidrazona (SH10).....	37
Figura 21 – Espectro de RMN 1 H geral da 2-Furaldeido salicil-hidrazona (SH10).....	38
Figura 22 – Espectro de RMN 13 C expandido da 2-Furaldeido salicil-hidrazona (SH10).....	38
Figura 23 – Espectro de RMN 13 C geral da 2-Furaldeido salicil-hidrazona (SH10).....	38
Figura 24 – Espectro de RMN 1 H expandido da 2-Tiofenocarboxaldeído salicil-hidrazona (SH11).....	39

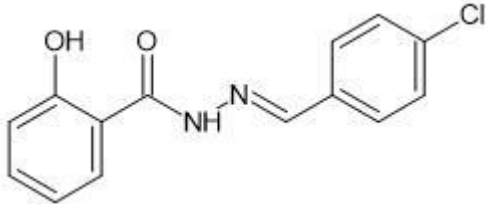
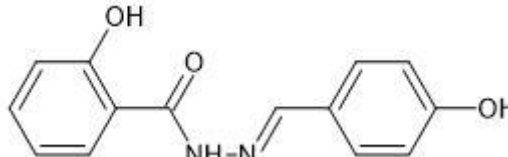
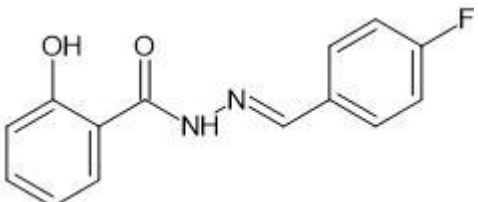
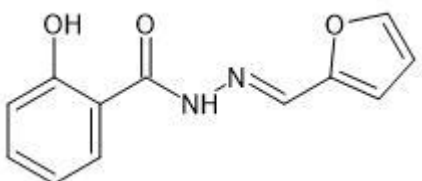
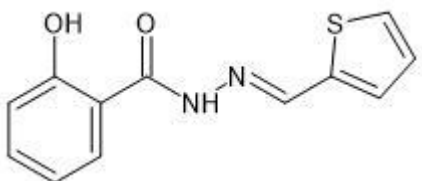
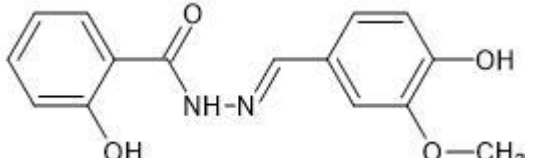
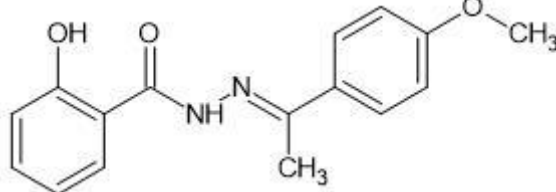
Figura 25 – Espectro de RMN 1 H geral da 2-Tiofenocarboxaldeído salicilhidrazona.....	39
Figura 26 – Espectro de RMN 13 C expandido da 2-Tiofenocarboxaldeído salicilhidrazona (SH11).....	40
Figura 27 – Espectro de RMN 13 C geral da 2-Tiofenocarboxaldeído salicilhidrazona (SH11).....	40
Figura 28 – Identificação dos carbonos da SH11.....	40

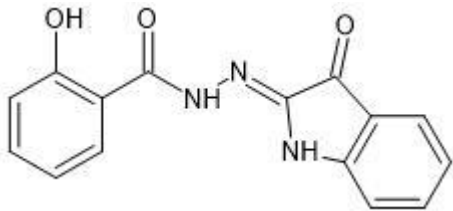
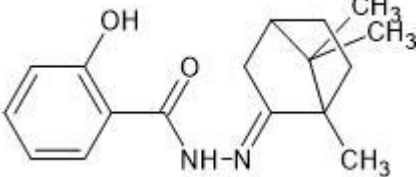
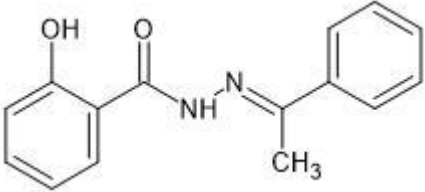
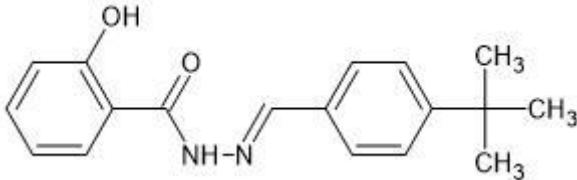
LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1 – Parâmetros de Lipinski e Veber avaliados in silico e parâmetros de previsão do perfil de absorção por membranas para as substâncias estudadas</i>	24
<i>Tabela 2 – Parâmetros drugscore, druglikness e ação toxicológica avaliados in silico</i>	26
<i>Tabela 3 – Predições de atividade farmacológica para as substâncias estudadas</i>	27
<i>Tabela 4 – Previsão in silico de bioatividade para as salicil-hidrazonas</i>	29
<i>Tabela 5 – Aspecto físico, temperatura do ponto de fusão e rendimento das salicil-hidrazonas sintetizadas para complementação da série</i>	34
<i>Tabela 6 - Dados de RMN de ¹H e ¹³C da 2-Tiofenocarboxaldeído salicil-hidrazona (SH11) (Carbonos identificados na figura 28)</i>	40
<i>Tabela 7 – Dados de concentração inibitória mínima (MIC) em µg.mL⁻¹ e µM, citotoxicidade para linhagens J774.A1 e MRC-5 em µg.mL⁻¹ e índice de seletividade para a salicilhidrazida (SH1) e salicil-hidrazonas (SH2 – SH17) ...</i>	42
<i>Tabela 8 – Concentração inibitória mínima (MIC) em µg/mL e µM da substância SH-11 para cepas resistentes à múltiplos fármacos antituberculose</i>	43

LISTA DE COMPOSTOS

Código/Composto	Nomenclatura Sistemática e Fórmula Molecular
SH1 	2-Hidroxibenzohidrazida $C_7H_8N_2O_2$
SH2 	(z)-N'-benzilideno-2-hidroxibenzohidrazida $C_{14}H_{12}N_2O_2$
SH3 	2-hidroxi-N-[(Z)-(2-nitrofenil)metilideno amino]benzamida $C_{14}H_{11}N_3O_4$
SH4 	2-hidroxi-N-[(Z)-(3-nitrofenil)metilideno amino]benzamida $C_{14}H_{11}N_3O_4$
SH5 	2-hidroxi-N-[(Z)-(4-nitrofenil)metilideno amino]benzamida $C_{14}H_{11}N_3O_4$
SH6 	N-[(Z)-[4-(dimetilamino)fenil]metilideno amino]-2-hidroxibenzamida $C_{16}H_{17}N_3O_2$

<p>SH7</p> 	<p>N-[(Z)-(4-clorofenil)metilideno amino]-2-hidro-xibenzamida</p> <p>$C_{14}H_{11}ClN_2O_2$</p>
<p>SH8</p> 	<p>2-Hidroxi-N'-[(Z)-(4-hidroxifenil)metilideno]benzohidrazida</p> <p>$C_{14}H_{12}N_2O_3$</p>
<p>SH9</p> 	<p>N-[(Z)-(4-fluorofenil)metilideno amino]-2-hidro-xibenzamida</p> <p>$C_{14}H_{11}FN_2O_2$</p>
<p>SH10</p> 	<p>Ácido 2-hidroxi benzoico (2E)-2-(2-furanilmetileno)hidrazida</p> <p>$C_{12}H_{10}N_2O_3$</p>
<p>SH11</p> 	<p>Ácido 2-hidroxi benzoico (2E)-2-(2-tienilmetileno)hidrazida</p> <p>$C_{12}H_{10}N_2O_2S$</p>
<p>SH12</p> 	<p>N'-(3-Metoxi-4-hidroxi benzilideno)-2-hidroxi-benzohidrazida</p> <p>$C_{15}H_{14}N_2O_4$</p>
<p>SH13</p> 	<p>2-hidroxi-N-[(Z)-1-(4-metoxifenil)etilideno amino]benzamida</p> <p>$C_{16}H_{16}N_2O_3$</p>

<p>SH14</p> 	<p>Ácido 2-hidroxibenzoico 2-(3-oxo-3<i>H</i>-indol-2-il)hidrazida</p> <p>$C_{15}H_{11}N_3O_3$</p>
<p>SH15</p> 	<p>Ácido 2-hidroxibenzoico 2-(1,7,7-trimetilbicyclo[2.2.1]hept-2-ilideno)hidrazida</p> <p>$C_{17}H_{24}N_2O_2$</p>
<p>SH16</p> 	<p>Ácido 2-hidroxibenzoico-(2<i>E</i>)-2-(1-feniletilideno)hidrazida</p> <p>$C_{15}H_{14}N_2O_2$</p>
<p>SH17</p> 	<p>N'-{(Z)-[4-(tert-butil)fenil]metilideno}-2-hidroxi-benzohidrazida</p> <p>$C_{18}H_{20}N_2O_2$</p>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	6
2 JUSTIFICATIVA	7
3 REFERENCIAL TEÓRICO	8
3.1 TUBERCULOSE	8
3.2 TRATAMENTO DA TUBERCULOSE	9
3.3 BUSCA DE NOVOS COMPOSTOS COM AÇÃO ANTITUBERCULOSE	11
3.4 ACIL-HIDRAZONAS COMO MOLÉCULAS BIOATIVAS	12
4 OBJETIVOS	16
4.1 OBJETIVO GERAL	16
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
5 MATERIAIS E MÉTODOS	17
5.1 REAGENTES E SOLVENTES	17
5.2 INSTRUMENTAÇÃO	17
5.3 SÍNTESE	17
5.3.1 Síntese do Salicilato de Metila	18
5.3.2 Síntese da Salicil-hidrazida (SH 1).....	18
5.3.3 Síntese das N-salicil-hidrazonas (SH 2-17).....	18
5.4 AVALIAÇÃO <i>IN SILICO</i>	20
5.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI- <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	20
5.6 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE	21
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
6.1 ESTUDOS <i>IN SILICO</i>	22
6.1.1 Previsão da biodisponibilidade oral e perfil de absorção por membranas	22
6.1.2 Previsão de atividade farmacológica.....	27

6.1.3 Previsão de bioatividade	29
6.2 SÍNTESE	31
6.3 ANÁLISE ESPECTRAL E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL	34
6.4 ATIVIDADE BIOLÓGICA	41
7 CONCLUSÕES	43
8 PERSPECTIVAS.....	44
REFERÊNCIAS.....	45

1 INTRODUÇÃO

Desde os primórdios da humanidade, vivemos em conjunto com diferentes organismos, que possuem diferentes mecanismos de sobrevivência. Dentre os diferentes organismos, existem aqueles que estabelecem relações parasitárias, extraindo recursos de seu hospedeiro para sua própria manutenção, como as bactérias.

As bactérias são organismos unicelulares, identificados pela primeira vez por van Leeuwenhoek por volta dos anos 1670, com a invenção do microscópio. Mas foi somente no século XIX que se levantou a hipótese de as bactérias serem organismos patogênicos (GUIMARÃES, MOMESSO, PUPO, 2010).

O pesquisador Paul Ehrlich, conhecido como o pai da quimioterapia, desenvolveu o primeiro antibiótico de origem sintética, o salvarsan (PATRICK, 2005), usado no tratamento da sífilis. Apesar dos avanços na química sintética, o tratamento de infecções bacterianas se tornou notável com a descoberta da penicilina em 1928, por Alexander Fleming (NICOLAOU, MONTAGNON, 2008). Assim, começa a caminhar a química medicinal.

A Química Medicinal é a área mais importante do ponto de vista de desenvolvimento de novos fármacos. Ela compreende a síntese ou isolamento de compostos com atividade biológica, a elucidação ou confirmação da estrutura, a caracterização das propriedades físico-químicas, a determinação da atividade biológica, a exploração desta atividade ao nível molecular e o estudo das relações entre estrutura química e atividade biológica (MONTANARI, 1993).

Atualmente, a classe dos antibióticos está no topo da lista das medicações mais prescritas no mundo, um fato que pode ser responsável pelo desenvolvimento da resistência bacteriana (MARQUIOTI, LANES, DE CASTRO, 2015). Segundo a Organização Mundial da Saúde, em 2020, estima-se que ocorreram por volta de 1,5 milhões de óbitos ocasionados apenas por um único patógeno, o bacilo da tuberculose (*Mycobacterium tuberculosis*). Desses óbitos, 689 mil eram homens, 416 mil mulheres e cerca de 208 mil crianças, além de 214 mil indivíduos portadores do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), sendo estudado como um grupo a parte (WHO/OMS, 2021). Estes valores

refletem um aumento no número de óbitos diante do observado nos últimos anos, segundo a mesma agência. Em relação ao número de casos diagnosticados, foram 9,9 milhões de pessoas, indicando uma pequena diminuição comparado a 2019 (WHO/OMS, 2021). O aumento no número de mortes, e a diminuição de casos de tuberculose diagnosticados, podem ser justificados pela interrupção e/ou dificuldade de acesso aos serviços de atendimento especializado, que se mostraram fragilizados durante a pandemia de COVID-19, segundo dados da OMS.

Não obstante ao simples mecanismo de transmissão do agente causador da tuberculose, através de gotículas pelo ar (WILDNER *et al.*, 2011), a doença mostrou evoluções quanto a resistência aos fármacos atualmente usados no tratamento da doença (DALCOLMO, ANDRADE, PICON, 2007; ROCHA *et al.*, 2020; FERREIRA *et al.*, 2011) o que reforça a necessidade de elaboração de novas substâncias com potente ação bactericida e que simultaneamente consiga inibir as novas cepas resistentes.

Considerando que as salicil-hidrazonas são substâncias que possuem grande potencial farmacológico (GLINMA *et al.*, 2015; ABDU-ALLAH *et al.*, 2017; ALAM, CHOI, LEE, 2016), em especial no tratamento da tuberculose (ABDUH-ALLAH *et al.*, 2017), neste trabalho serão abordados estudos que visam a síntese, caracterização estrutural e avaliação da atividade antituberculose de derivados contendo a unidade salicílica. Este estudo buscará subsídios para um possível uso de novas substâncias no tratamento de tuberculose, ao propor novos candidatos a fármacos antituberculose que atuem de forma menos tóxica que os disponíveis atualmente e com maior eficácia contra cepas padrão e resistentes da tuberculose.

2 JUSTIFICATIVA

O interesse no desenvolvimento de novos compostos com potencial ação antituberculose pode ser explicado pelo elevado número de casos de tuberculose (TB) observados nos últimos anos. Inclui-se ainda o fato de que aumentou o número de casos da doença durante a pandemia da COVID-19

(ALENE, WANGDI, CLEMENTS, 2020). Além disso, o longo período exigido para o tratamento e a alta reincidência da doença ocasionados por fatores provocados pelo seu abandono pode resultar no surgimento de cepas resistentes e multirresistentes aos fármacos utilizados na quimioterapia da tuberculose.

Paralelamente, as co-infecções TB-HIV e TB-COVID-19 resultaram em um elevado número de óbitos e a alta toxicidade dos fármacos utilizados no tratamento convencional que podem refletir em efeitos colaterais severos ao paciente também podem ser considerados motivos de interesse para o desenvolvimento de moléculas bioativas ou realocação de fármacos para o tratamento da TB.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 TUBERCULOSE

A tuberculose (TB) é uma doença antiga, com os primeiros relatos vindo desde o antigo Império Egípcio. Estudos de antigas múmias e esqueletos humanos mostram que a TB tem afetado a humanidade por milhares de anos (HERSHKOVITZ *et al.*, 2015). A doença alcançou proporções quase epidêmicas rapidamente nas sociedades em rápida urbanização e industrialização da Europa e América do Norte nos séculos XVII e XIX (HERSHKOVITZ *et al.*, 2015).

A tuberculose é causada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) (WHO, 2020). A transmissão ocorre por via aérea pela inalação de aerossóis produzidos pela pessoa infectada e portadora da TB pulmonar ativa, por meio de tosse, espirro ou fala (WILDNER *et al.*, 2011). Vários fatores ambientais reduzem as probabilidades de as partículas infectantes serem inaladas: as correntes de ar dispersando as partículas no ambiente, a luz ultravioleta (sol) e a radiação gama que destrói os bacilos. Se a inalação acontecer, esses indivíduos passam a ser chamados de infectados.

A doença geralmente afeta os pulmões (TB pulmonar), mas pode afetar outras regiões. A maioria das pessoas (cerca de 90%) que desenvolvem a

doença são adultos, com mais casos entre homens do que mulheres. (WHO, 2020).

Segundo a OMS, aproximadamente um quarto da população mundial está infectada com *M. tuberculosis*, que equivale a cerca de 2 bilhões de pessoas, porém, apenas uma pequena parcela (5-10%) desenvolverá a doença ao longo da vida. Entretanto, a probabilidade de o indivíduo desenvolver TB aumenta muito pela co-infecção com HIV, além dos indivíduos que já possuem fatores de risco, como desnutrição, diabetes, tabagismo e alcoolismo (WHO, 2020; ROSEMBERG, TARANTINO, 2002).

Apesar dos avanços no desenvolvimento de medicamentos para o tratamento da TB, altos números de contaminados ainda podem ser observados. De acordo com a OMS, estima-se que cerca de 1,3 milhão de pessoas morreram devido ao contágio por *M. tuberculosis* em 2020. Esse é o mesmo número de mortos que se tinha há 15 anos, segundo a mesma agência (WHO, 2021).

Para efeito de comparação, dados da OMS do ano anterior, em 2019, apontam que o número de mortos pela TB alcançavam 1,4 milhão de pessoas (WHO, 2020).

3.2 TRATAMENTO DA TUBERCULOSE

Segundo Nogueira *et al.*, (2012), a tuberculose é uma doença infectocontagiosa grave, porém curável em quase 100% dos casos quando tratado de forma correta. O objetivo do tratamento é eliminar todos os bacilos tuberculosos, anulando as fontes de infecção.

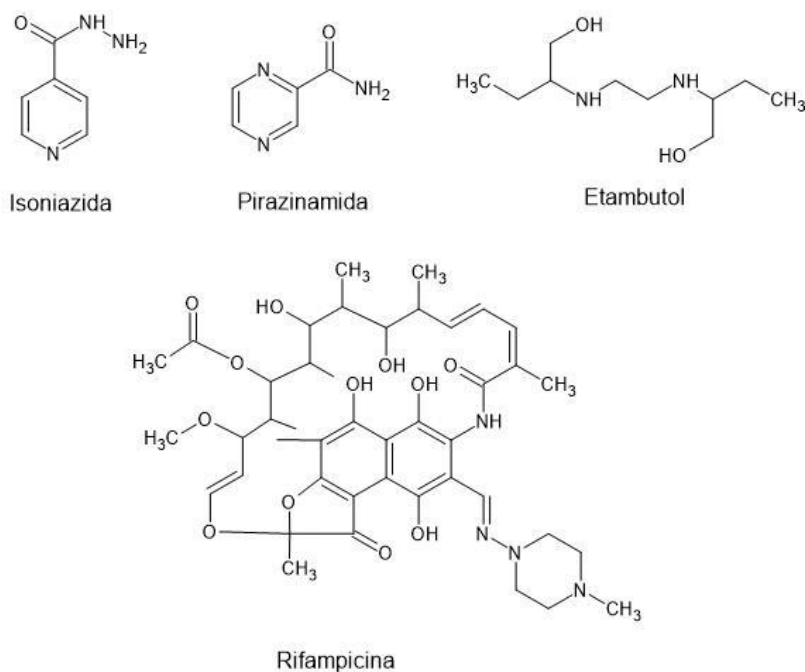
Sobre a eficácia da vacina contra a tuberculose:

Embora a vacina disponível para a doença, a BCG (Bacilo de Calmette-Guérin), previna o desenvolvimento de TB fatal em crianças e jovens, sua eficácia de proteção contra a doença pulmonar em adultos é questionável. Nenhuma outra vacina eficaz para reduzir a incidência da moléstia em adultos encontra-se, atualmente, disponível. Portanto, a principal estratégia para o controle da disseminação dessa doença é o tratamento com quimioterapia (NOGUEIRA *et al.*, 2012).

Dentro do tratamento quimioterápico podem ser elencados os medicamentos mais tradicionais, como a isoniazida - INH (BALCELLS *et al.*, 2006; Johnsson *et al.*, 1995), a rifampicina - RIF (GROBBELAAR *et al.*, 2019; TELENTI *et al.*, 1993), a pirazinamida - PZA (STEELE, DES PREZ, 1988; JUREÉN *et al.*, 2008), e o etambutol – EMB (PINTO, 2010; ALCÂNTARA *et al.*, 2019) (Figura 1).

O início do tratamento é marcado pelo uso concomitante desses fármacos, que juntos podem reduzir consideravelmente a carga bacilar e interromper de forma efetiva a cadeia de transmissão da doença. Durante os dois primeiros meses do tratamento é administrado diariamente doses desses quatro fármacos. Essa primeira fase é denominada de fase de ataque. Nos quatro meses seguintes, fase denominada de manutenção do tratamento, são utilizados apenas a isoniazida e a rifampicina. (BRASIL, 2019).

Figura 1 – Fármacos da primeira linha de tratamento da tuberculose



Fonte: Autoria própria

A quimioterapia antituberculose enfrenta diversos obstáculos tais como a longa duração do tratamento, a falta de informação e de acompanhamento e os diversos efeitos colaterais tais como náuseas, vômitos, asma, alterações visuais, cegueira, entre outros (NOGUEIRA *et al.*, 2012). A resistência ao tratamento convencional e o alto índice de abandono do tratamento podem levar ao

surgimento de cepas resistentes (MDR-TB) e multirresistentes (XDR-TB) do bacilo da tuberculose.

Como o esquema convencional de tratamento pode não se mostrar eficaz para essas cepas, o período de tratamento pode aumentar e outros fármacos de segunda linha podem também ser incorporados ao tratamento. O esquema poli quimioterápico utilizado no tratamento da MDR-TB, por exemplo, é realizado por um período de 18 a 24 meses. Devido ao maior período de tratamento e aos fármacos utilizados, verifica-se o aumento dos efeitos adversos e do número de abandonos do tratamento (BRASIL, 2019).

Nesse caso, o abandono do tratamento pode levar ao surgimento de cepas extensivamente resistentes (XDR-TB, do inglês, *extensively drug-resistant TB*). Bacilos dessa cepa são resistentes a fármacos como isoniazida e rifampicina e também a fármacos da segunda linha como as fluorquinolonas (levofloxacino, ciprofloxacino), bedaquilina e linezolida (WHO, 2021).

Além disso, os medicamentos disponíveis não asseguram a eliminação total da bactéria, sendo possível que, apesar da cura clínica, o bacilo permaneça em estado latente dentro de macrófagos, o que pode levar futuramente ao aparecimento de novas cepas, inclusive multirresistentes (MDR) e extensivamente resistentes (XDR-TB) (RAMOS *et al.*, 2008).

3.3 BUSCA DE NOVOS COMPOSTOS COM AÇÃO ANTITUBERCULOSE

Levando em conta os diversos problemas relacionados ao tratamento da TB, tais como os diversos efeitos colaterais, altos índices de resistência do bacilo, e longo tempo de terapia, a busca por novas opções terapêuticas têm aumentado ao longo do tempo. Desse modo, diversos grupos de pesquisa têm estudado novas substâncias com promissora atividade anti-TB.

De acordo com Koul *et al.*, (2011), para que uma substância possa fazer parte do esquema de tratamento para tuberculose, ela deve apresentar propriedades e características específicas: diminuir o tempo de duração do tratamento, ser ativo contra as formas resistentes e multirresistentes do bacilo, não apresentar reação-cruzada com medicamentos anti-HIV e simplificar o esquema de tratamento.

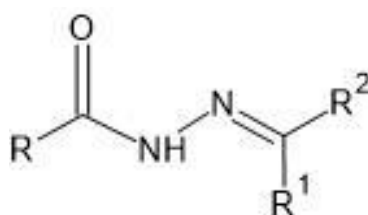
No entanto, há uma grande dificuldade em descobrir novas substâncias promissoras candidatas a fármacos anti-TB, pois muitas das vezes as moléculas

apresentam-se promissoras nas triagens *in vitro*, no entanto, estudos aprofundados revelam resultados não satisfatórios para essas substâncias, principalmente em estudos *in vivo*.

3.4 ACIL-HIDRAZONAS COMO MOLÉCULAS BIOATIVAS

Moléculas que possuem o grupo N-acil-hidrazona (Figura 2) tem sido reportada na literatura como sendo um potencial grupamento farmacofórico atuante como agente antibacteriano (LANNES, 2010; TOMAS *et al.*, 2017; FERRARETTO, VANDRESEN, 2021; SOUZA *et al.*, 2020), o que motiva o desenvolvimento de moléculas dessa classe de substância como possíveis candidatos fármacos antituberculose.

Figura 2 - Estrutura geral da N-acil-hidrazona



*R, R¹, R²: grupos substituintes, podem ser átomos de hidrogênio (H), radicais aromáticos, alifáticos, entre outros radicais orgânicos.

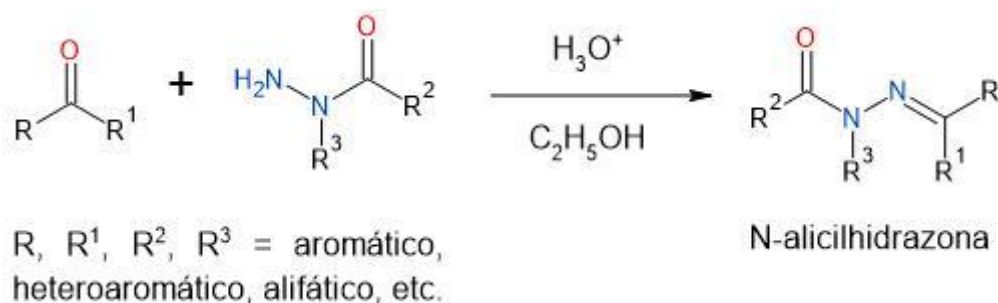
Fonte: Autoria própria

Além das atividades antimicrobianas, muitos estudos destacam ainda a importante atividade anti-inflamatória das N-acil-hidrazonas (FREITAS *et al.*, 2017; CORDEIRO *et al.*, 2020). Essa ação farmacológica atribuída a esta classe de molécula bioativa é importante nesse contexto, uma vez que a tuberculose é uma doença pulmonar crônica caracterizada por uma inflamação persistente e causa danos substanciais ao tecido pulmonar.

De acordo com Thota *et al.*, (2018), a versatilidade de N-acil-hidrazonas na química medicinal é baseada em sua facilidade de síntese, visto que geralmente são produzidas por meio de uma reação de condensação entre

aldeídos ou cetonas com hidrazida ou acil-hidrazida. A reação pode ser realizada com catálise ácida com uso de ácidos próticos e de ácidos de Lewis, mas também há relatos de reações sem catálise (Figura 3).

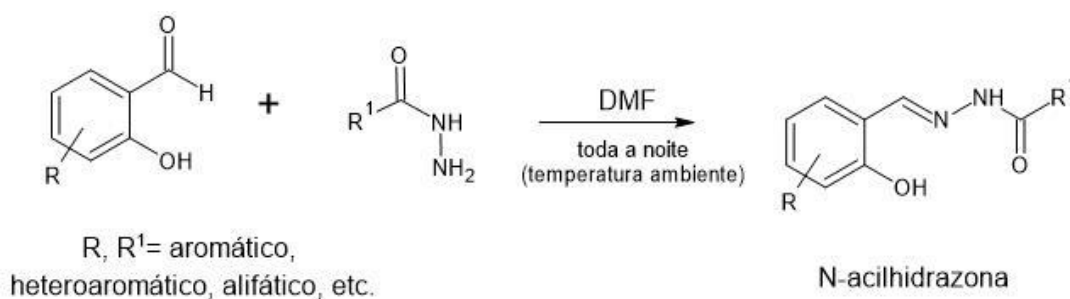
Figura 3: Síntese de N-acil-hidrazona



Fonte: Autoria própria

Melnyck *et al.*, (2006), traz um método de síntese de N-acil-hidrazonas em que uma solução de aldeído em DMF (N,N-dimetilformamida) é adicionado a uma solução de hidrazida ou acil-hidrazida em DMF e deixado em temperatura ambiente ao longo de uma noite, resultando em compostos com rendimento acima de 85% (Figura 4).

Figura 4 - Síntese de N-acil-hidrazona em solução de DMF



Fonte: Autoria própria baseado em Melnyck *et al* (2006)

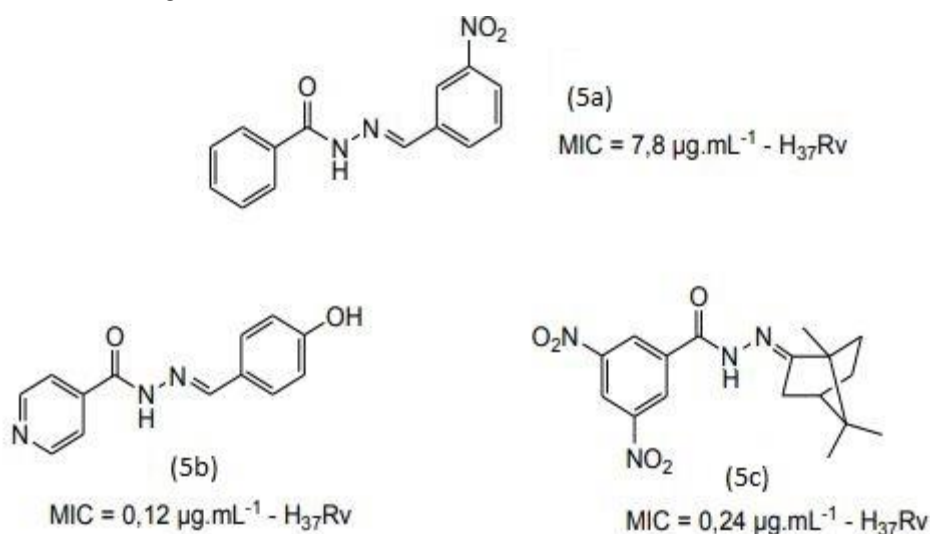
Levando em consideração as propriedades biológicas das N-acilhidrazonas, em particular a atividade antituberculose, diversos grupos de pesquisa estão procurando sintetizar novos derivados contendo esse grupo, por meio de modificações em sua estrutura química. Recentemente, nosso grupo de

pesquisas reportou a obtenção e a ação antituberculose de derivados N-acilhidrazônicos como benzohidrazonas, isonicotilhidrazonas e 3,5-dinitrobenzoilhidrazonas (Figura 5).

O derivado 3-nitrobenzilideno-benzohidrazida (5a) apresentou uma concentração inibitória mínima de $7,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para a cepa padrão H₃₇Rv de *M. tuberculosis* (SAMPIRON, *et al.*, 2021). Dentre os derivados isonicotilhidrazônicos, o 4-hidroxibenzilideno-isonicotilhidrazida (5b) apresentou uma potente ação anti-*Mycobacterium tuberculosis* com MIC de $0,12 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para a cepa padrão e variando de $0,06$ a $7,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para cepas resistentes desse bacilo. Além disso, esse derivado apresentou ação inibitória seletiva para a espécie *M. tuberculosis*, uma vez que os ensaios biológicos realizados com micobactérias de outras espécies do gênero *Mycobacterium* e com bactérias gram-positivas e gram-negativas apresentaram resultados com MIC muito superiores (>250 e $>500 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (SAMPIRON, *et al.*, 2019).

Entre os derivados 3,5-dinitrobenzoilhidrazônicos, destaca-se o análogo contendo a unidade do terpeno natural cânfora (5c) com MIC = $0,24 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para cepa padrão e de $0,12 - 0,24 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para cepas resistentes (VALVERDE *et al.*, 2022). Vale ressaltar também que os derivados isonicotilhidrazônicos e 3,5-dinitrobenzoilhidrazônicos apresentaram, de maneira geral, baixa citotoxicidade para macrófagos J774A.1, indicando seletividade para *Mtb*.

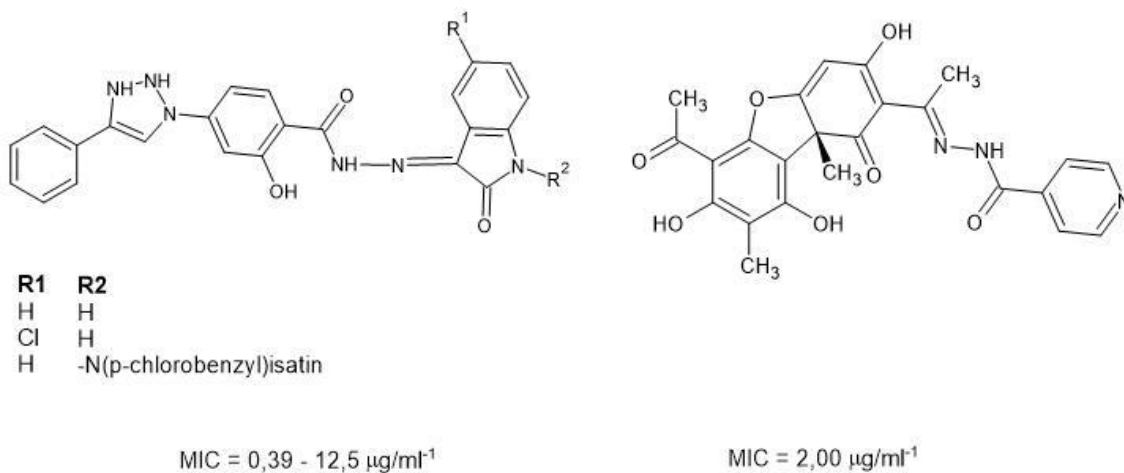
Figura 5 – Derivados hidrazônicos no tratamento da tuberculose



Fonte: Adaptado de SAMPIRON *et al.*, 2021 e VALVERDE *et al.*, 2022.

Tomas *et al.*, (2017) relataram resultados de MIC = 2,00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para cepa padrão H37Rv e de 64,00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para cepas resistentes de *M. tuberculosis* (Figura 6).

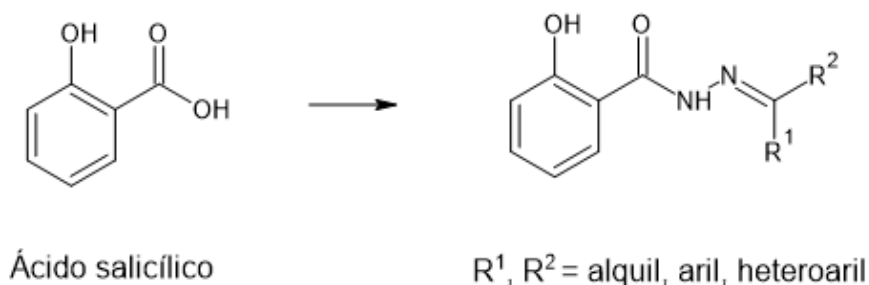
Figura 6 – Acil-hidrazonas com potencial antituberculose



Fonte: Autoria própria

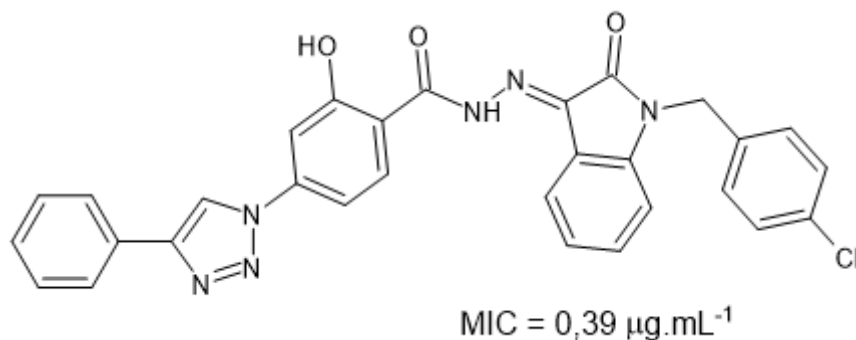
Uma outra estrutura possível para obtenção de derivados *N*-acil-hidrazônicos é usando o ácido salicílico (Figura 7) (ABDU-ALLAH *et al.*; Alam M *et al.*). Alguns derivados (Figura 8) já foram reportados na literatura com ação antituberculose em ensaios preliminares de atividade biológica. (ABDU-ALLAH *et al.*, 2017).

Figura 7 – Estrutura geral da salicil-hidrazona



Fonte: Autoria própria

Figura 8 - Derivado salicil-hidrazônico com atividade antituberculose



Fonte: Autoria própria

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Sintetizar, caracterizar e avaliar as propriedades *in silico* e a atividade anti-*Mycobacterium tuberculosis* de uma série de *N*-salicil-hidrazonas (SH) derivadas do ácido salicílico.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- realizar a síntese do salicilato de metila a partir da esterificação do ácido salicílico com metanol;
- realizar a síntese da salicil-hidrazida (SH 1) a partir do salicilato de metila;
- complementar a obtenção de uma série de *N*-acilhidrazonas derivadas do ácido salicílico (SH 2-17) realizando a síntese de dois derivados utilizando a salicil-hidrazida com aldeídos heterocíclicos: furfural (SH 10) e 2-tiofenocarboxaldeído (SH 11);
- caracterizar os 2 derivados obtidos por técnicas espectroscópicas (FT-IR e RMN de ^1H e ^{13}C);
- avaliar as propriedades físico-químicas de todos os derivados da série (17 compostos) por métodos *in silico*;

- avaliar a atividade *in vitro* das salicil-hidrazonas (SH 2-17) frente a cepa padrão de *M. tuberculosis* (H₃₇Rv).

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 REAGENTES E SOLVENTES

As sínteses foram executadas usando os reagentes: ácido salicílico, 2-furaldeído, 2-tiofeno-carboxaldeído, metanol e ácido sulfúrico. Todos reagentes e solventes são grau P.A. e foram usados sem purificação prévia.

A Cromatografia em camada delgada (CCD) foi realizada utilizando sílica gel em folha de alumínio e revelada em vapor de iodo.

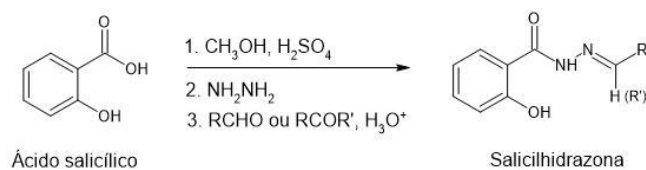
5.2 INSTRUMENTAÇÃO

A caracterização dos derivados sintetizados será realizada por determinação do ponto de fusão (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 feitas no intervalo de 4000 a 400 cm⁻¹) e por ressonância magnética nuclear de ¹H e de ¹³C (Bruker, operando em 400 MHz para ¹H e 100 MHz para ¹³C, utilizando DMSO-d₆ como solvente deuterado.

5.3 SÍNTESE

Para obtenção das salicil-hidrazonas (SH 10 e SH11) foram necessárias 3 etapas a partir do ácido salicílico (Figura 9).

Figura 9 – Esquema de síntese geral de salicil-hidrazona



1. esterificação do ácido salicílico (síntese do salicilato de metila); 2. síntese da salicil-hidrazida (SH 1); síntese das salicil-hidrazonas (SH 10 e SH 11).

Fonte: Autoria própria

5.3.1 Síntese do Salicilato de Metila

O salicilato de metila foi obtido a partir da esterificação de Fisher entre ácido salicílico e metanol utilizando ácido sulfúrico como catalisador e refluxo a 60°C. Em um balão de fundo redondo de 250 mL foi adicionado 1 eq. do ácido salicílico (0,1 mol), 15 eq. de metanol (1,5 mol / 61 mL) e 2 mL de ácido sulfúrico concentrado. A mistura foi levada ao aquecimento sob refluxo a 60°C durante 3 horas. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada utilizando hexano:acetato de etila 30% como eluente e revelada com iodo ressublimado.

5.3.2 Síntese da Salicil-hidrazida (SH 1)

A síntese da salicil-hidrazida (2-hidroxibenzilhidrazida) foi realizada através da reação do éster salicilato de metila com hidrazina (80%). Em um balão de fundo redondo de 100 mL foi adicionado 1 eq. do salicilato de metila (0,2 mmol), 3 eq. da hidrazina hidrato a 80% (0,6 mmol / 2,14 mL), 20 mL de etanol. A mistura foi mantida sob refluxo a 80°C por 2 horas e a reação foi acompanhada por CCD (eluente: hexano/acetato de etila 30%) e revelada com iodo ressublimado.

5.3.3 Síntese das *N*-salicil-hidrazonas (SH 2-17)

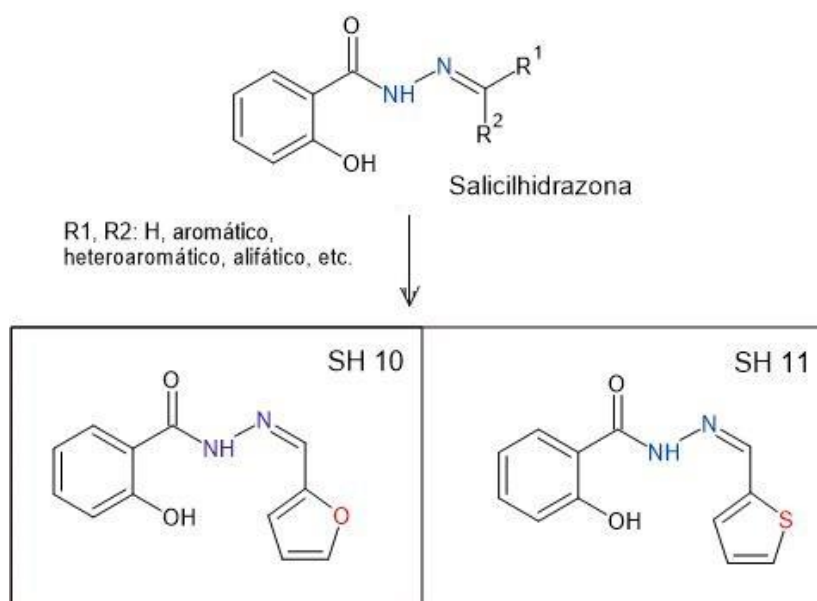
A reação de formação das acil-hidrazonas (Figura 10) baseia-se na reação da salicil-hidrazida com quantidade equimolar de aldeídos e cetonas. Os aldeídos utilizados foram o furfural e o 2-tiofenocarboxaldeído. A reação foi

realizada sob catálise ácida (1 gota de ácido sulfúrico concentrado), utilizando metanol e refluxo. OBS: neste trabalho foram sintetizados apenas os derivados utilizando os aldeídos: furfural (SH 10) e 2-tiofenocarboxaldeído (SH 11), sendo que os demais compostos, derivados salicil-hidrazônicos que serão investigados, foram obtidos em trabalho anterior (TEIXEIRA, 2019).

Em um frasco erlenmeyer de 100 mL foram adicionados 100 mg (1,1 mmol) da salicil-hidrazida (SH 1) e 1,1 mmol de 2-furaldeído ou 2-tiofeno carboxaldeído. Após isso foi adicionado 20 mL de álcool metílico e mantida agitação até solubilização dos reagentes. Em seguida, foi adicionada 1 gota de ácido sulfúrico 25% e manteve-se a reação por agitação em sistema de ultrassom por aproximadamente 20 minutos à temperatura ambiente. A mistura foi deixada para descansar e após a precipitação do produto foi filtrada e a água-mãe da filtração foi reservada para uma nova cristalização.

A reação foi acompanhada por CCD em placas de sílica utilizando o sistema hexano:acetato de etila 30% como eluente. Após finalizada a reação, os produtos foram filtrados, lavados com álcool etílico absoluto e água destilada, e após secagem em estufa foram calculados os rendimentos.

Figura 10: Salicil-hidrazonas derivadas do furfural (SH 10) e 2-tiofeno carboxaldeído (SH11) que serão sintetizadas para complementação da série



Fonte: Autoria própria

5.4 AVALIAÇÃO *IN SILICO*

A previsão dos parâmetros físico-químicos para todos os compostos foi realizada por meio dos softwares Osiris Property Explorer®, SwissADME® e Molinspiration®. As propriedades de ADMET, o perfil de absorção por membranas e previsão de potencial toxicidade foram previstas para auxiliar no planejamento dos compostos, de modo a auxiliar na escolha dos grupos doadores e retiradores de elétrons que compõem a série de moléculas. Os principais parâmetros a serem investigados são os de Lipinski (Massa Molecular, lipofilicidade (log P), número de átomos doadores e receptores de ligação de hidrogênio), Veber (área de superfície polar – TPSA e número de ligações rotáveis), entre outros. Além disso, foi avaliada a probabilidade de atividade (Pa) antituberculose e antimicobacteriana da salicil-hidrazida e das salicil-hidrazonas utilizando o software Pass Online®.

5.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-*Mycobacterium tuberculosis*

O ensaio de avaliação da atividade antituberculose foi realizado em parceria com o laboratório de microbiologia do Departamento de Biomedicina da Universidade Estadual de Maringá (UEM-PR). A concentração inibitória mínima (CIM ou MIC) dos derivados sintetizados foi determinada utilizando a cepa padrão de *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294) e para alguns isolados clínicos resistentes à múltiplos fármacos pelo método colorimétrico *Resazurin microtiter assay plate* (REMA), em placa de microtitulação, como descrito por Palomino et al., 2002. Os compostos foram diluídos em DMSO (Amresco) e foram realizadas diluições em série em meio Middlebrook 7H9 (Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA) suplementado com ácido oleico, albumina bovina, dextrose e catalase (OADC).

As concentrações dos derivados variaram de 250 a 1,9 µg/ml. A isoniazida foi utilizada como fármaco de referência nas concentrações de 1,0 a 0,007 µg/ml. A CIM é interpretada como a concentração mais baixa que impedir a mudança de cor do composto testado. Controles de esterilidade do meio de cultura, do fármaco de referência, dos compostos sintetizados bem como o controle de crescimento bacteriano com e sem DMSO a 2,5% (v/v) serão incluídos em todos os ensaios. Os ensaios serão realizados em triplicata (PALOMINO et al., 2002).

5.6 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE

O ensaio de avaliação da citotoxicidade das salicil-hidrazonas mais ativas foi realizado em parceria com o laboratório de microbiologia do Departamento de Biomedicina da Universidade Estadual de Maringá (UEM-PR) e foi expressa em termos de concentração da substância que reduz a viabilidade celular a 50% (CC₅₀).

A citotoxicidade (CC₅₀) dos derivados sintetizados foi determinada utilizando células de linhagem de fibroblastos fetais de pulmão humano MRC-5 (ATCC CCL-171) descongeladas e cultivadas em meio DMEM (Vitrocell®) e RPMI (Vitrocell®), respectivamente, enriquecidos com 10% de soro fetal bovino e acrescidos de sulfato de gentamicina (50 mg/L) e anfotericina B (2 mg/L).

As células foram cultivadas em garrafas e incubadas à 35 °C com 5% de CO₂ até atingir a confluência celular. Um volume de $2,5 \times 10^5$ células/mL de MRC-5 e $1,0 \times 10^6$ células/mL de J774A.1 foram semeados em microplaca de 96 orifícios, com volume final de 100 µL, incubadas por 24h à 37 °C com 5% CO₂ para permitir a adesão celular.

Após este período, os compostos foram acrescentados às placas num intervalo de diluição de 0,39-100 µg/mL com incubações de 24h, 48h e 72h à 35 °C e 5% de CO₂, em meios ausentes de antibiótico e antimicótico. Após esse período, foram adicionados 50µL de 0,01% de resazurina (solubilizada em água destilada e estéril) e, após 3h, a leitura de fluorescência foi realizada utilizando-se o leitor Synergy H1 (Biotek®). O valor de CC₅₀ foi definido como a menor concentração das salicil-hidrazonas em que 50% das células permaneceram viáveis (PAVAN et al., 2010b).

As linhagens de células de macrófagos murinos J774A.1 (ATCC TIB-67), foram cultivadas em meio RPMI 1640 com L-glutamina (Sigma-Aldrich) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco). Primeiro, os macrófagos foram separados do frasco de cultura usando um raspador de células. Em seguida, o experimento foi realizado de maneira similar ao mencionado para células MRC-5.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 ESTUDOS *IN SILICO*

Os compostos estudados (Figura 11) serão tratados por siglas (SH1-SH17), que representam cada uma das salicil-hidrazonas aqui abordadas, isso será feito de modo a haver maior dinamismo da discussão, em detrimento da utilização do nome sistemático dos compostos.

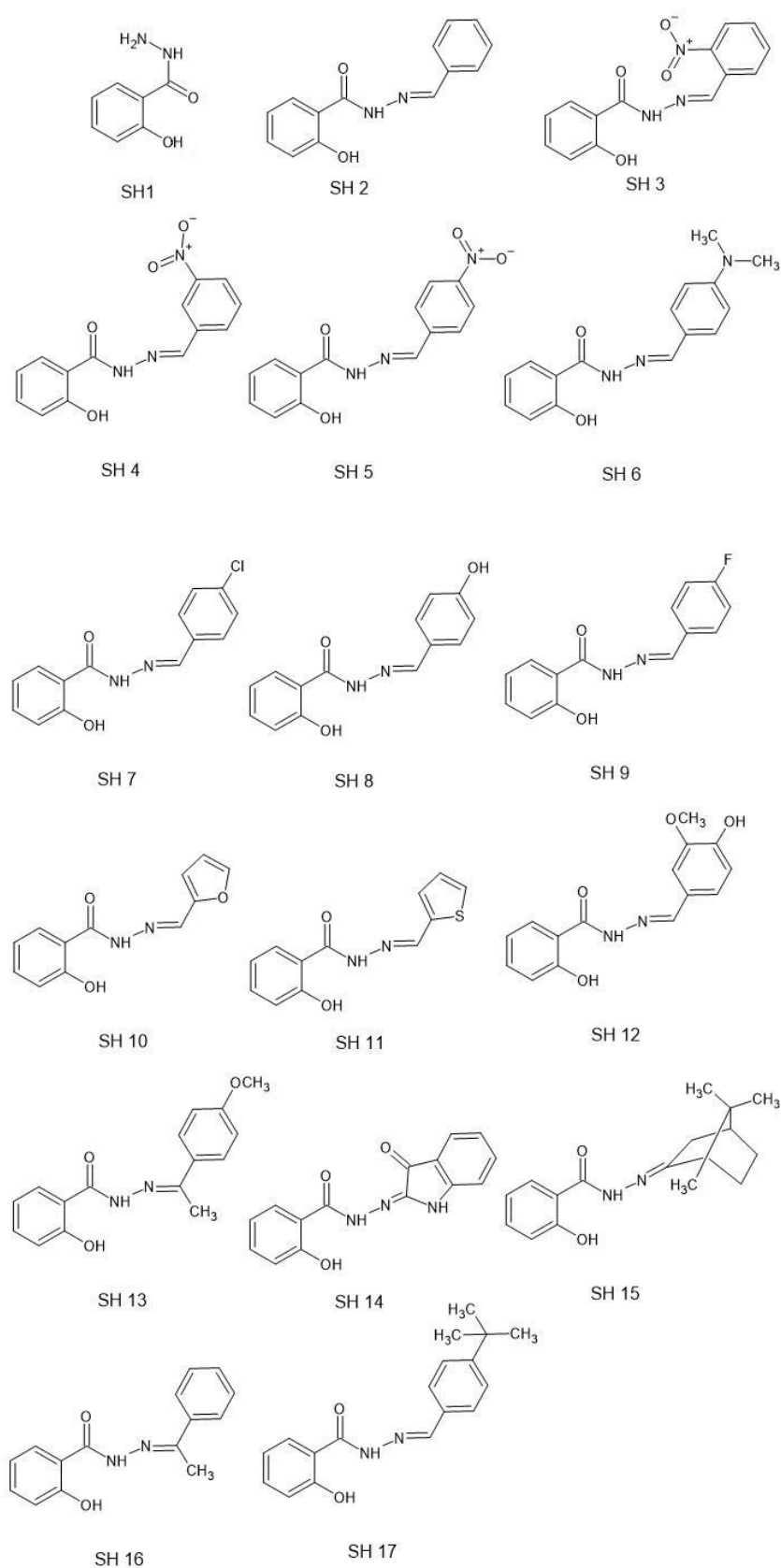
6.1.1 Previsão da biodisponibilidade oral e perfil de absorção por membranas

A avaliação preditiva *in silico* da biodisponibilidade oral dos compostos estudados foi tratada por meio da regra dos cinco de Lipinski com o uso do software OSIRIS Property Explorer®. Assim, foram avaliados parâmetros como lipofilicidade (LogP), massa molecular (MM), número de átomos receptores (nHa) e doadores (nHb) de ligação de hidrogênio. O uso do software SwissADME® possibilitou ainda a previsão de parâmetros adicionais, tais como a solubilidade (Log S) do composto, absorção gastrointestinal humana (HIA) e capacidade de penetração da barreira hematoencefálica (BBB), com o propósito de prever o perfil de absorção em membranas pelos compostos estudados.

O dados de todos os parâmetros físico-químicos analisados acerca dos compostos sintetizados neste trabalho e no trabalho correlacionado (TEIXEIRA, 2019) se encontra na tabela 1. A biodisponibilidade oral humana se refere à porção administrada da substância que chega à corrente sanguínea do paciente, e encontra seu receptor-alvo e exerce o efeito terapêutico (LIPINSKI et al., 1997).

Os resultados das predições demonstraram que os compostos atendem às regras de Lipinski e Veber, o que sugere uma boa biodisponibilidade oral para todos os compostos estudados. A figura 11 apresenta os compostos investigados neste trabalho.

Figura 11- Compostos estudados neste trabalho



Fonte: Autoria própria

A solubilidade dos compostos orgânicos costuma ser representada por LogS, em que S expressa a concentração do composto em mol.L⁻¹. Valores acima de -1 são associados a moléculas mais polares, como açúcares e pequenos peptídeos, que demonstram baixa permeabilidade de membrana na ausência de transporte ativo, mas não se mostram problemáticos (JORGENSEN; DUFFY, 2002).

Valores de logS entre -4 e -1 indicam moléculas moderadamente polares e que em geral representam as moléculas com melhor perfil de permeação por membranas plasmáticas. As salicil-hidrazonas apresentaram valores de logS entre -5,08 (SH17) e -3,01 (SH10) indicando que são moléculas de polaridade média e de alta absorção gastrointestinal.

A salicil-hidrazida (SH1) apresentou uma maior solubilidade (log S -1,43) provocada pela presença do grupo polar hidrazida (-CONHNH₂). Isso ocorreu também com o fármaco padrão isoniazida (log S -0,56), que também apresenta o grupo hidrazida ligado a um anel piridínico.

Tabela 1: Parâmetros de Lipinski e Veber avaliados in silico e parâmetros de previsão do perfil de absorção por membranas para as substâncias estudadas

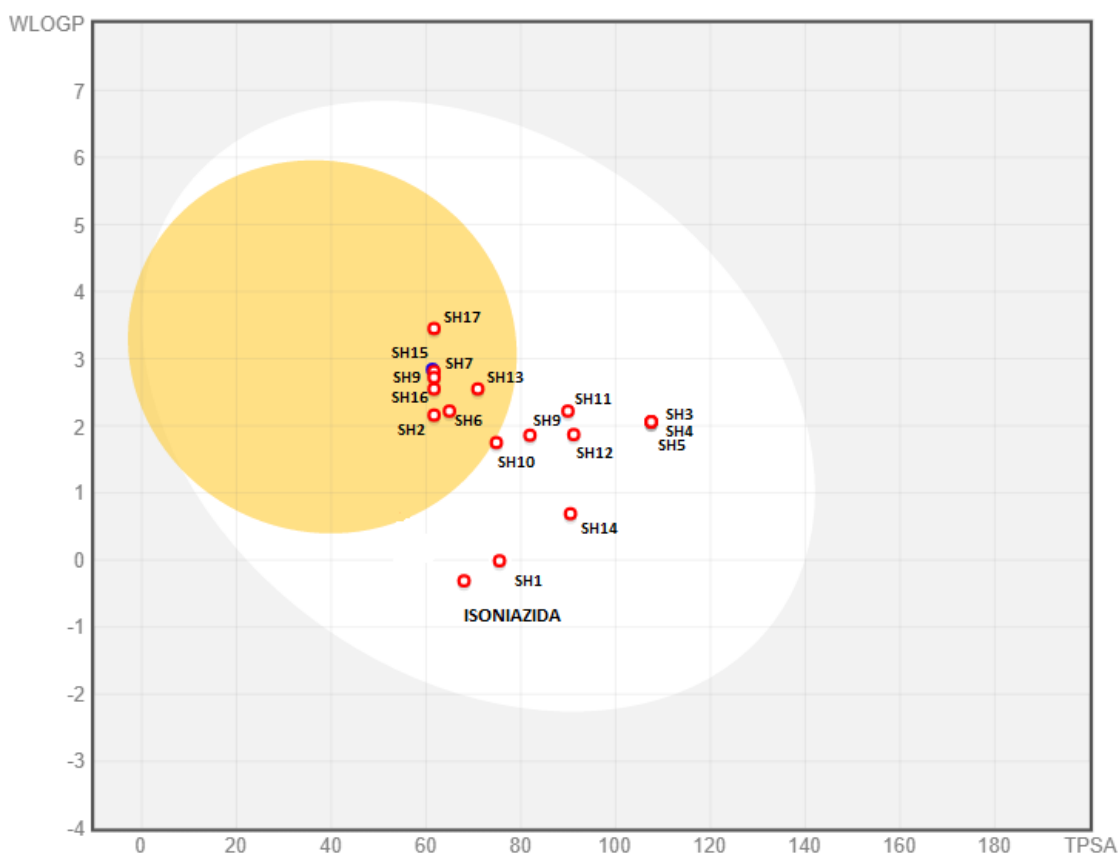
Substância	LogP	nHa	nHb	MM	TPSA	NLR	LogS	GI	BBB
Isoniazida	-1,02	4	2	137,14	68,01	1	-0,56	Alta	-
SH1	1,20	4	3	152,15	75,35	1	-1,43	Alta	-
SH2	2,86	4	2	240,26	61,69	3	-3,80	Alta	+
SH3	1,93	7	2	285,26	107,51	4	-3,96	Alta	-
SH4	1,93	7	2	285,26	107,51	4	-3,96	Alta	-
SH5	1,93	7	2	285,26	107,51	4	-3,96	Alta	-
SH6	2,75	5	2	283,33	64,93	4	-3,95	Alta	+
SH7	3,46	4	2	274,71	61,69	3	-4,32	Alta	+
SH8	2,51	5	3	256,26	81,92	3	-3,59	Alta	-
SH9	2,96	4	2	258,25	61,6	3	-3,89	Alta	+
SH10	2,04	5	2	230,22	74,83	3	-3,01	Alta	-
SH11	2,72	4	2	246,29	89,93	3	-3,50	Alta	-
SH12	1,78	6	3	324,21	91,15	4	-3,37	Alta	-
SH13	2,72	5	2	284,31	70,92	4	-3,72	Alta	+
SH14	1,48	6	3	281,27	90,79	2	-3,57	Alta	-
SH15	2,64	4	2	286,37	61,69	2	-3,94	Alta	+
SH16	2,79	4	2	254,29	61,69	3	-3,69	Alta	+
SH17	4,44	4	2	296,37	61,69	4	-5,08	Alta	+

Fonte: Osiris Property Explorer® e SwissADME®

Podem ser observados que alguns compostos possuem a capacidade de penetrar a barreira hematoencefálica, como descrito na tabela 1. Todos os compostos possuem alta absorção gastrointestinal (GI ou HIA) como mostrado no gráfico *boiled egg* (Figura 12).

A região branca no gráfico engloba os compostos que possuem capacidade de permeação na membrana gastrointestinal, enquanto a região amarela engloba aqueles que possuem capacidade de permeação da membrana hematoencefálica. Algumas substâncias podem ser observadas em ambas as regiões. O gráfico relaciona a lipofilicidade (logP) dos compostos, com a área de superfície sobre os átomos (TPSA).

Figura 12: Gráfico *boiled egg* para os compostos estudados



Fonte: SwissADME®

A membrana hematoencefálica (BBB) é um importante componente da rede de comunicação que conecta o sistema nervoso central e os tecidos periféricos, além de funcionar como uma interface, limitando e regulando a troca de substâncias entre sangue e o sistema nervoso central (BANKS, 2010).

Parâmetros como *Drugscore*, *Druglikeness* e Toxicidade foram considerados neste estudo. A avaliação *in silico* através do *software* para a ação toxicológica das moléculas compreende a predição dos efeitos: mutagênico (M), tumorogênico (T), irritante (I) e aqueles relacionados ao sistema reprodutor (E.R.).

Tabela 2: Parâmetros drugscore, druglikeness e ação toxicológica avaliados *in silico*

Substância	Drugscore	Druglikeness	Toxicidade
Isoniazida	0,06	-5,06	M**, T**, I**, ER**
SH1	0,30	-5,54	T**
SH2	0,92	4,35	-
SH3	0,50	-2,72	-
SH4	0,62	-0,80	-
SH5	0,47	-5,84	-
SH6	0,54	3,41	T**
SH7	0,88	5,23	-
SH8	0,93	4,60	-
SH9	0,91	3,54	-
SH10	0,57	4,32	M**
SH11	0,93	6,00	-
SH12	0,74	4,82	T*
SH13	0,91	3,65	-
SH14	0,95	4,98	-
SH15	0,60	-0,53	-
SH16	0,91	3,58	-
SH17	0,68	1,05	-

Nota: M = mutagênico, T= teratogênico, I = irritante, ER = efeito reprodutor; (-) toxicidade ausente, (*) toxicidade média, (**) toxicidade alta

Fonte: *Osiris Property Explorer®* e *SwissADME®*

O valor de *drug-score* é obtido ao combinar dados registrados de *drug-likeness*, lipofilicidade, solubilidade, massa molecular e riscos de toxicidade em um só parâmetro usado para predizer o potencial de compostos que eventualmente se tornem candidatos a novos fármacos (MACEDO; FILHO; ANDRADE, 2013).

Valores positivos para *drug-score* entre 0,1 e 1,0 sugerem que na molécula contém grupos farmacofóricos, ou seja, que são encontrados em fármacos usuais. Valores positivos para *drug-likeness* sugerem que no composto contém principalmente fragmentos que estão presentes na maioria dos fármacos usuais.

Os resultados para as moléculas estudadas mostram valores de *drug-score* entre 0,30 a 0,93, e valores em sua grande parte positivos para *drug-likeness* variando de -5,84 a 6,00 para as salicil-hidrazonas e -5,84 para a salicil-hidrazida (SH5).

6.1.2 Previsão de atividade farmacológica

Com uso do software PASS Online®, foram realizadas as previsões das atividades farmacológicas para os compostos estudados, ao analisar a probabilidade da molécula ser ativa (Pa) ou inativa (Pi) em uma escala de 0 a 1. Na tabela 3 é possível observar as previsões das salicil-hidrazidas para atividade antituberculose e antimicobacteriana.

Tabela 3: Previsões de atividade farmacológica para as substâncias estudadas

Substância	Atividade	Pa	Pi
Isoniazida	Antituberculose	0,810	0,003
Isoniazida	Antimicobacteriano	0,798	0,004
SH1	Antituberculose	0,791	0,003
SH1	Antimicobacteriano	0,775	0,004
SH2	Antituberculose	0,839	0,003
SH2	Antimicobacteriano	0,822	0,004
SH3	Antituberculose	0,818	0,003
SH3	Antimicobacteriano	0,791	0,003
SH4	Antituberculose	0,921	0,002
SH4	Antimicobacteriano	0,884	0,002
SH5	Antituberculose	0,921	0,002
SH5	Antimicobacteriano	0,885	0,003
SH6	Antituberculose	0,780	0,003
SH6	Antimicobacteriano	0,780	0,003

SH7	Antituberculose	0,823	0,003
SH7	Antimicobacteriano	0,817	0,004
SH8	Antituberculose	0,836	0,003
SH8	Antimicobacteriano	0,818	0,004
SH9	Antituberculose	0,784	0,003
SH9	Antimicobacteriano	0,785	0,004
SH10	Antituberculose	0,919	0,002
SH10	Antimicobacteriano	0,891	0,003
SH11	Antituberculose	0,733	0,004
SH11	Antimicobacteriano	0,732	0,005
SH12	Antituberculose	0,848	0,003
SH12	Antimicobacteriano	0,844	0,003
SH13	Antituberculose	0,722	0,004
SH13	Antimicobacteriano	0,720	0,005
SH14	Antituberculose	0,822	0,003
SH14	Antimicobacteriano	0,810	0,004
SH15	Antituberculose	0,389	0,034
SH15	Antimicobacteriano	0,311	0,074
SH16	Antituberculose	0,744	0,004
SH16	Antimicobacteriano	0,714	0,005
SH17	Antituberculose	0,796	0,003
SH17	Antimicobacteriano	0,774	0,004

Fonte: Pass Online®

Quanto ao valor P_a para atividade antituberculose do fármaco padrão Isoniazida (P_a : 0,810), as moléculas estudadas que apresentaram maior potencial farmacológico para tal ação são respectivamente as estruturas SH4 (0,921), SH5 (0,921), SH10 (0,919), SH12 (0,848), SH8 (0,836), SH2 (0,839), SH14 (0,822) e SH3 (0,818). Em comparação com o fármaco padrão Isoniazida, as moléculas destacadas superaram seu valor P_a .

Quanto ao valor P_i , as moléculas em estudo apresentaram uma média de 0,005 para antituberculose, e para antimicobacteriana apresentaram a média de 0,008, valores deslocados principalmente pela molécula SH15.

Para ambos os parâmetros são valores adequados, visto que se espera uma maior probabilidade do composto ser ativo do que inativo. Neste caso, é

possível observar valores de Pi significativamente baixos em relação aos valores Pa.

6.1.3 Previsão de bioatividade

Os dados de bioatividade das salicil-hidrazonas foram previstos através do software Molinspiration® e são elencados na Tabela 4. Em suma, uma molécula com pontuação de bioatividade maior que 0,00 tem probabilidade de exibir atividade biológica significativa, ao passo que valores entre -0,50 e 0,00 serão razoavelmente ativas e por fim, valores abaixo de -0,50, é provável que ela seja inativa.

Assim, os parâmetros que foram analisados são relacionados aos receptores acoplados à proteína G (GPCR), aos moduladores de canais iônicos (ICM), aos inibidores da quinase (KI), aos ligantes de receptores nucleares (NRL), aos inibidores de protease (PI) e aos inibidores de outras enzimas (EI).

Tabela 4: Previsão *in silico* de bioatividade para as salicil-hidrazonas

Substância	GPCR	ICM	KI	NRL	PI	EI
Isoniazida	-1,39	-1,45	-1,05	-2,33	-1,23	-0,66
SH1	-1,29	-1,31	-1,19	-1,73	-1,17	-0,63
SH2	-0,61	-0,86	-0,67	-0,69	-0,87	-0,47
SH3	-0,65	-0,83	-0,71	-0,52	-0,81	-0,60
SH4	-0,60	-0,82	-0,62	-0,59	-0,80	-0,53
SH5	-0,59	-0,81	-0,62	-0,59	-0,79	-0,51
SH6	-0,41	-0,78	-0,41	-0,45	-0,66	-0,40
SH7	-0,53	-0,82	-0,61	-0,63	-0,83	-0,48
SH8	-0,49	-0,79	-0,55	-0,54	-0,76	-0,41
SH9	-0,52	-0,83	-0,55	-0,58	-0,81	-0,45
SH10	-0,91	-1,04	-1,06	-1,18	-1,17	-0,74

SH11	-0,94	-1,21	-1,05	-1,11	-1,05	-0,67
SH12	-0,45	-0,82	-0,47	-0,53	-0,72	-0,42
SH13	-0,44	-0,80	-0,66	-0,37	-0,54	-0,36
SH14	-0,29	-0,57	-0,30	-0,74	-0,33	-0,32
SH15	-0,23	-0,76	-0,94	-0,64	-0,55	-0,32
SH16	-0,52	-0,81	-0,77	-0,46	-0,64	-0,37
SH17	-0,31	-0,63	-0,41	-0,29	-0,55	-0,35

Fonte: Molinspiration®

Dentre as várias famílias de receptores de membrana, a superfamília de receptores acoplados à proteína G se destaca. A ativação destes receptores desempenha um papel importante em muitos processos fisiológicos (e.g. neurotransmissão, crescimento, metabolismo e diferenciação celular, secreção e defesa imunológica), sendo assim alvos terapêuticos de mais de 50% dos fármacos vendidos no mundo inteiro. (HOELZ *et al*, 2013).

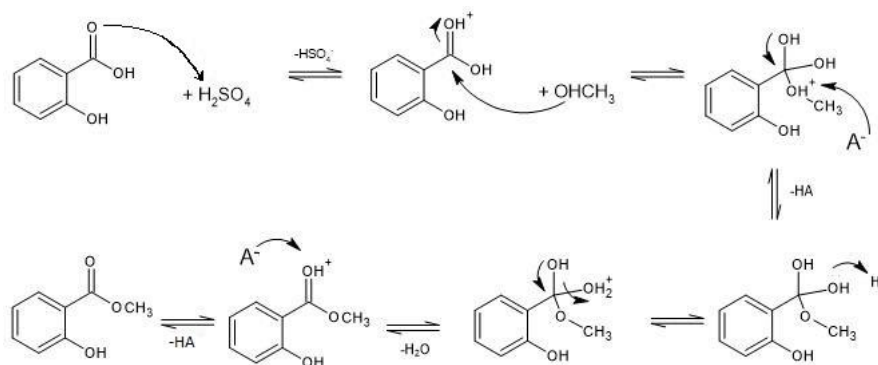
Nenhum valor positivo pode ser observado na coluna referente a GPCR, sugerindo que nenhum dos compostos investigados tem alta probabilidade de ser ativador deste receptor. Ainda para GPCR, as moléculas SH6, SH8, SH12, SH13 e SH17 apresentam probabilidade razoável de ativar o receptor relacionado à proteína G.

Para o receptor ICM, apenas a molécula SH15 apresenta probabilidade de ser ativadora, com valor de -0,26. Para o receptor KI, as moléculas SH6, SH14, SH12 e SH17 apresentam probabilidade de serem ativadoras, com valores de -0,32 a -0,41. Para o receptor NRL, as moléculas SH6, SH13, SH15, SH16, SH17 apresentam probabilidade de serem ativadoras, com valores de -0,33 a -0,49. Para o receptor PI, apenas as moléculas SH14 e SH15 apresentam probabilidade de serem ativadoras, com valores de -0,33 e -0,07, respectivamente. Para o receptor EI, as moléculas SH2, SH6, SH7, SH8, SH9, SH12, SH13, SH14, SH15, SH16, SH17 apresentam probabilidade de serem ativadoras, com valores entre -0,14 e -0,48.

6.2 SÍNTESE

A obtenção das salicil-hidrazonas iniciou-se com a esterificação do ácido salicílico com metanol na presença de ácido sulfúrico como catalisador (Figura 13).

Figura 13: Síntese do salicilato de metila



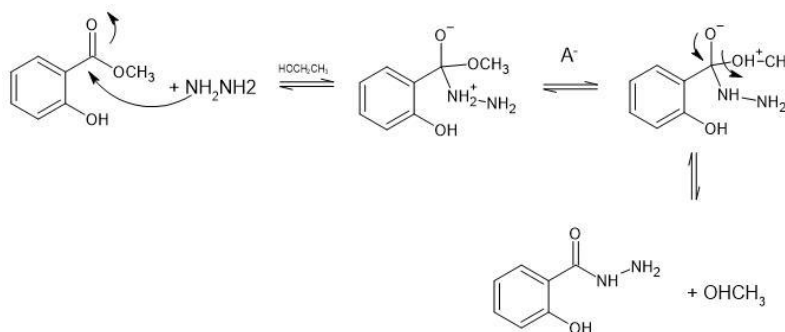
Fonte: Autoria própria

O mecanismo inicia com a catálise da reação, ao adicionar ácido sulfúrico. Este é adicionado com objetivo de deslocar a densidade de carga da região, tornando o carbono da carbonila mais eletrofílico. Assim, o metanol age como nucleófilo e realiza o ataque ao carbono da carbonila e o par de elétrons é novamente deslocado, equilibrando as cargas presentes.

A transferência de próton é realizada pelo próprio solvente, que tem caráter básico suficiente para isso, de modo a promover um bom grupo abandonador (H_2O). Ao passo que a água é eliminada, o par de elétrons situado no oxigênio da carbonila retorna e reestabelece a dupla ligação. Uma base presente retira o próton do oxigênio da carbonila, fornecendo o produto da reação (salicilato de metila).

Em seguida, o salicilato de metila reagiu com hidrazina, formando a salicil-hidrazida, precursora da salicil-hidrazona (Figura 14).

Figura 14: Síntese da salicil-hidrazida



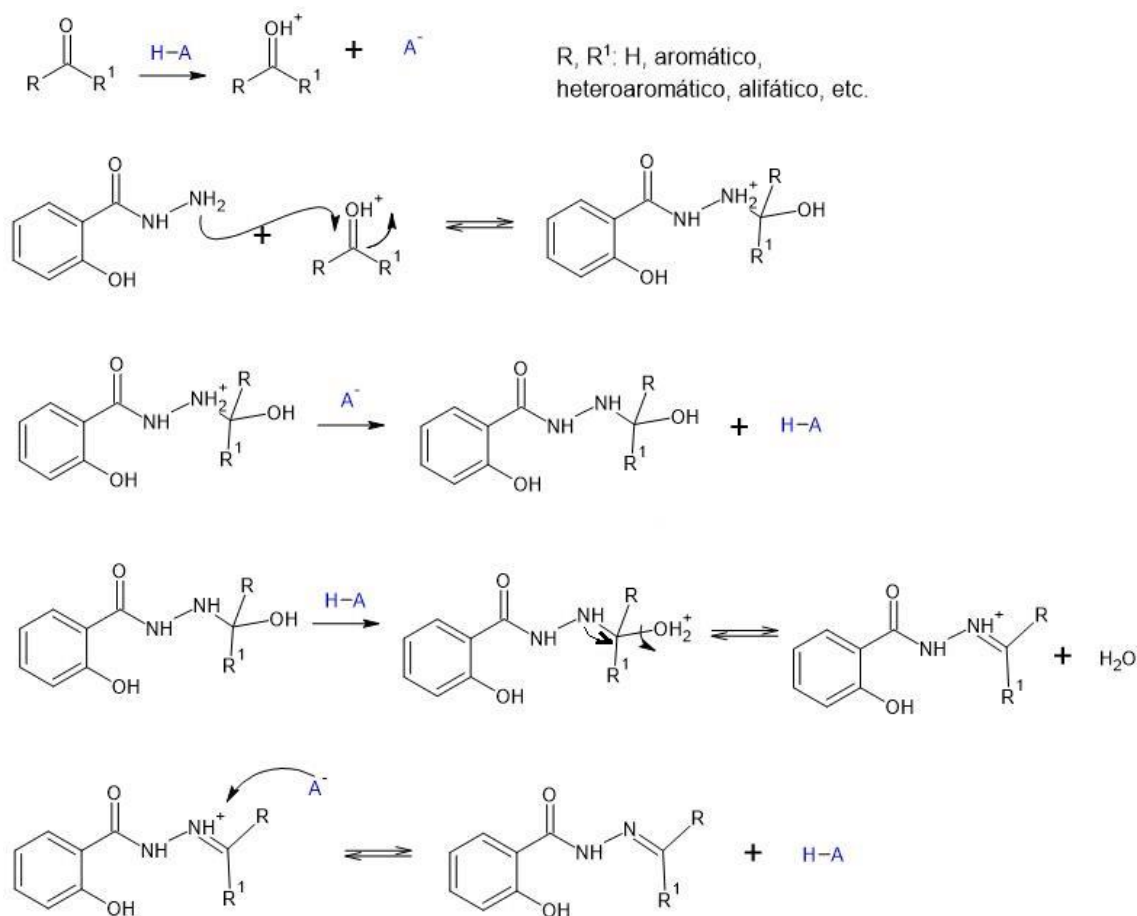
Fonte: Autoria própria

A reação parte de um ataque nucleofílico a partir de um dos átomos de nitrogênio da hidrazina ao carbono da carbonila do éster sintetizado anteriormente. O par de elétrons do oxigênio da carbonila é deslocado e o carbono estabilizado. Uma base presente no meio (metanol, visto que este é o solvente) realiza a transferência do próton de modo a formar um bom grupo abandonador. Com a eliminação do metanol, obtemos então o produto final da reação, a salicil-hidrazida.

Por fim, foram sintetizadas as salicil-hidrazonas. A reação segue uma via de condensação entre aldeídos ou cetonas na presença da salicil-hidrazida em meio alcoólico e usando um ácido de forma a catalisar a reação.

O mecanismo reacional (Figura 15) inicia-se com a protonação do átomo oxigênio da carbonila que origina o intermediário íon oxônio. Em seguida ocorre o ataque nucleofílico do nitrogênio N-1 da salicil-hidrazida, que perde uma molécula de água formando o íon imínio que e em seguida, após a sua desprotonação, forma-se a salicil-hidrazona (SOLOMONS; FHYHLE, 2002).

Figura 15: Mecanismo geral de síntese de salicil-hidrazonas



Fonte: Autoria própria

Os produtos da reação foram obtidos após a evaporação do solvente e os precipitados foram lavados com água destilada, filtrados e deixados para secar em temperatura ambiente. A água mãe (resíduo obtido da filtração) foi separada, para confirmar se haveria a formação de mais sólidos precipitados, apenas para fins de cálculo do rendimento da reação.

Os rendimentos reacionais variaram de 34,34% a 57,06% para as salicil-hidrazonas (sem considerar possíveis sólidos precipitados na água residual da reação). O ponto de fusão dos compostos foi obtido com aquecimento próximo à faixa de fusão controlada, em 2,0 °C.min⁻¹. Os dados obtidos estão informados na tabela 5. Na tabela também é possível observar os dados de rendimento e aspecto físico dos compostos obtidos.

Tabela 5: Aspecto físico, temperatura do ponto de fusão e rendimento das salicil-hidrazonas sintetizadas para complementação da série

Composto	Aspecto físico	Faixa de Fusão (°C)	Rendimento (%)
SH1	Sólido branco	146,6 - 148,8	34,34
SH10	Sólido cinza	227,0 – 229,5	57,06
SH11	Sólido amarelo	250,1 – 252,6	55,06

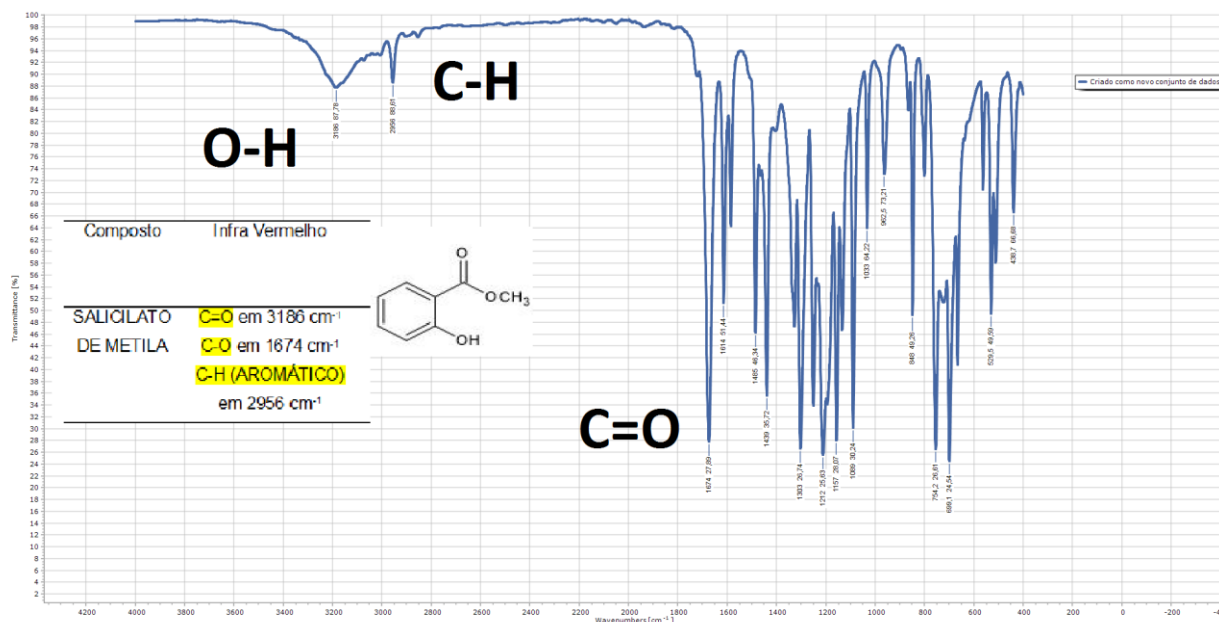
Fonte: Autoria própria

6.3 ANÁLISE ESPECTRAL E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL

As salicil-hidrazonas sintetizadas neste trabalho (SH1, SH10 e SH11) foram caracterizadas por técnicas de absorção no infravermelho (IV), e técnicas de ressonância magnética nuclear (RMN) unidimensionais (^1H e ^{13}C).

O salicilato de metila foi obtido como um óleo de odor forte bastante característico com um rendimento de 56 %. Sua estrutura foi caracterizada pelo espectro de infravermelho (Figura 16) onde foram observadas as bandas de estiramento de ligação referente ao grupo -OH em 3186 cm^{-1} , em 1674 cm^{-1} pode ser observado o estiramento referente à carbonila, e em 2956 cm^{-1} , se observa o estiramento referente aos fragmentos -CH aromáticos.

Figura 16: Espectro IV do salicilato de metila

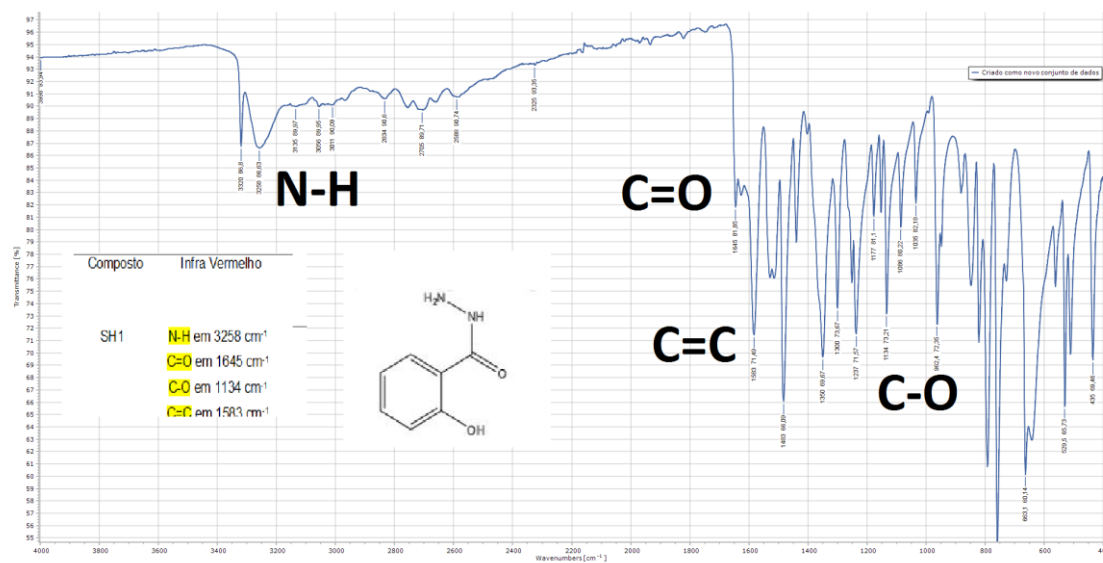


Fonte: SpectraGryph®

A salicil-hidrazida (SH-1) foi obtida como um sólido branco com rendimento de 34,34% e intervalo de fusão de 146,6-148,8°C (lit. 143-146°C, SETYAVATI et al, 2017).

No espectro no infravermelho (Figura 17) foi observado banda de estiramento de ligação N-H em 3258 cm⁻¹, banda de carbonila de amida em 1645 cm⁻¹ além de banda de estiramento de ligação C-O e C=C de anel aromático em 1134 e 1583 cm⁻¹, respectivamente.

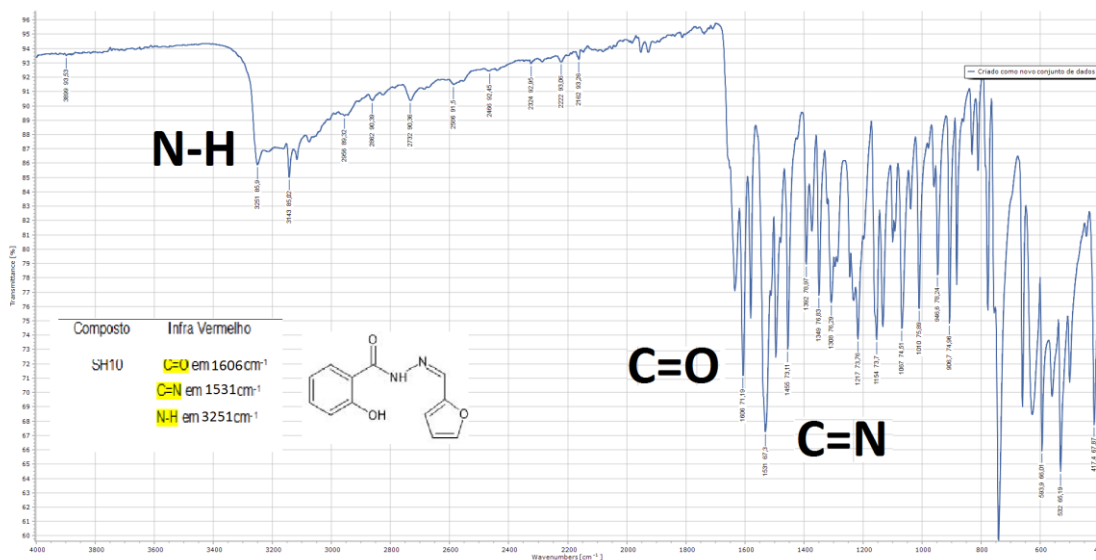
Figura 17: Espectro IV da 2-Hidroxibenzohidrazina (SH1)



Fonte: SpectraGryph®

A salicil-hidrazona SH10 foi obtida como um sólido cinza com rendimento de 57,06%. No espectro de IV (figura 18) da substância SH-10 (derivado 2-furano) foram observadas as bandas típicas de estiramento de ligação C=O, imina (C=N) e N-H em 1606 cm^{-1} , 1531 cm^{-1} e 3251 cm^{-1} respectivamente.

Figura 18: Espectro IV da 2-Furaldeido salicil-hidrazona (SH10)

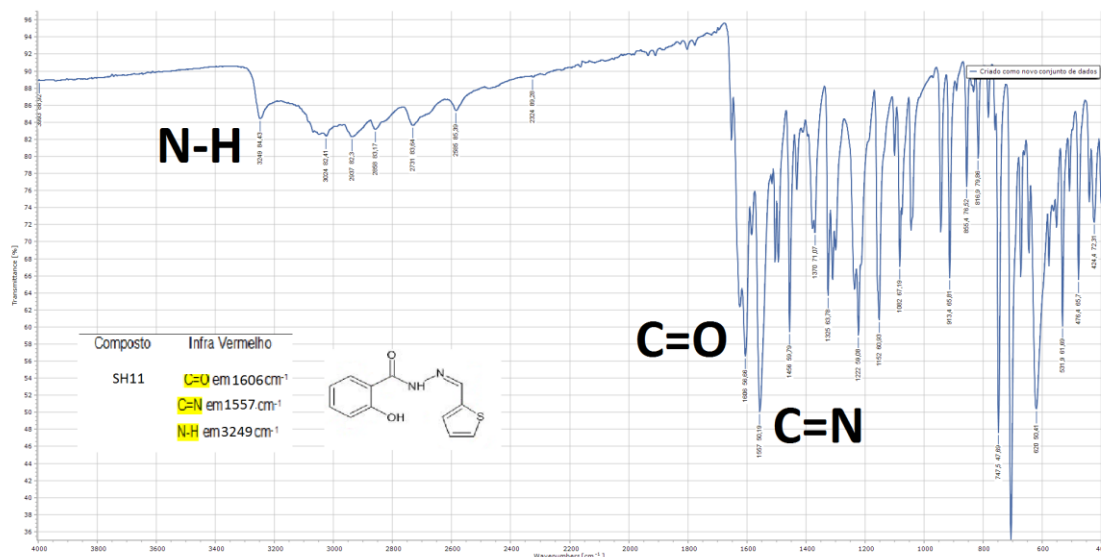


Fonte: SpectraGryph®

A salicil-hidrazona SH11 foi obtida como um sólido amarelo com rendimento de 55,06%. No espectro de IV (figura 19) da substância SH-11 (derivado 2-tiofeno carboxaldeído) foram observadas as bandas típicas de

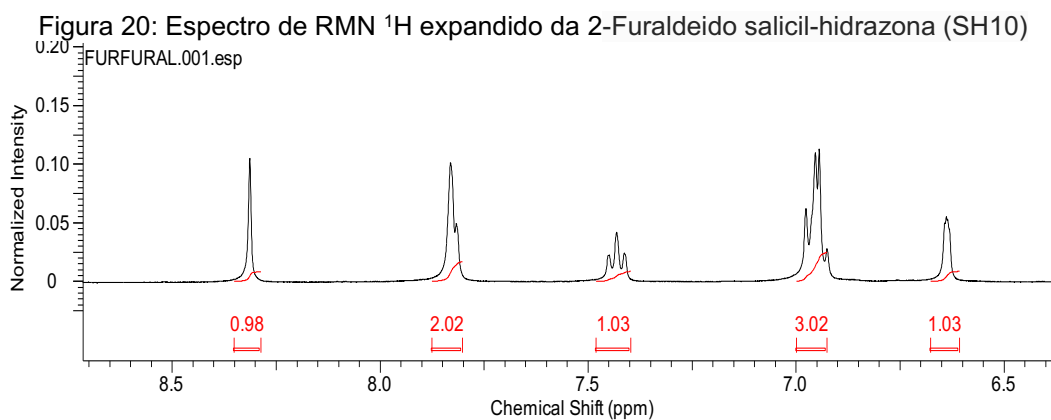
estiramento de ligação C=O, imina (C=N) e N-H em 1606 cm^{-1} , 1557 cm^{-1} e 3249 cm^{-1} respectivamente.

Figura 19: Espectro IV do 2-Tiofenocarboxaldeído salicil-hidrazona (SH11)

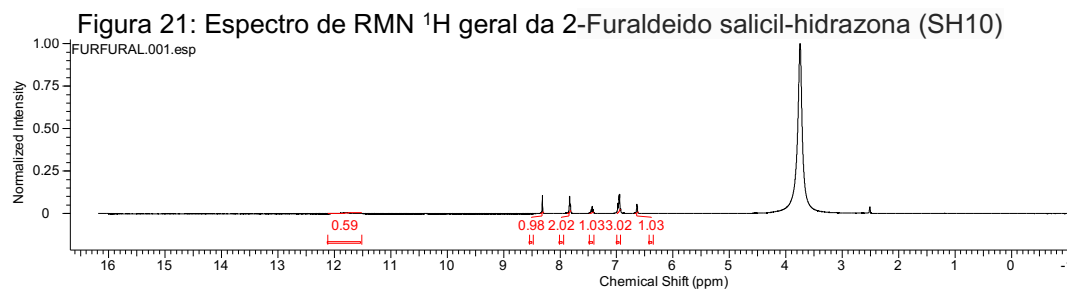


Fonte: SpectraGryph®

No espectro de RMN de ^1H da SH10 (Figura 20) foram verificados dois simples em δ_{H} 11,82 e 8,62 atribuídos aos hidrogênios ligados ao nitrogênio (N-H) e ao hidrogênio do grupo imínico (H-C=N), respectivamente. Os sinais dos hidrogênios do anel da parte salicílica encontram-se em δ_{H} 7,50, enquanto que os sinais dos hidrogênios do anel furânico foram visualizados em δ_{H} 6,95 ppm.

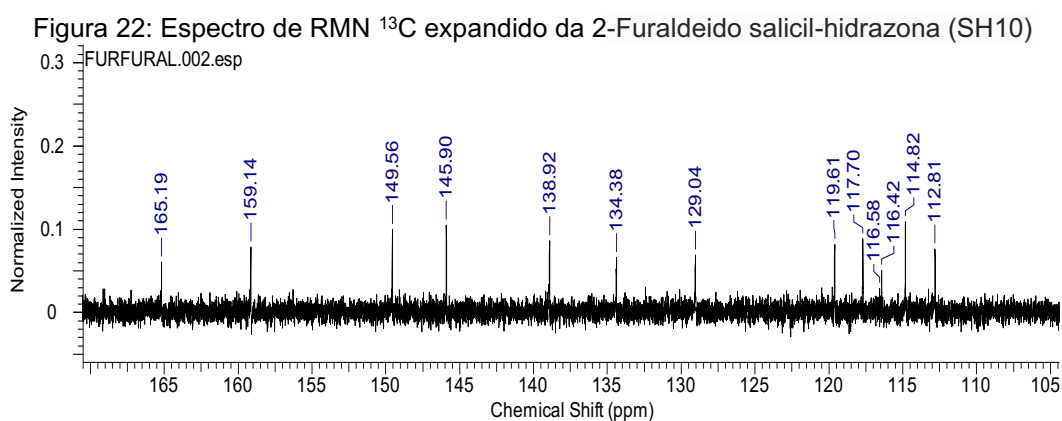


Fonte: Autoria própria

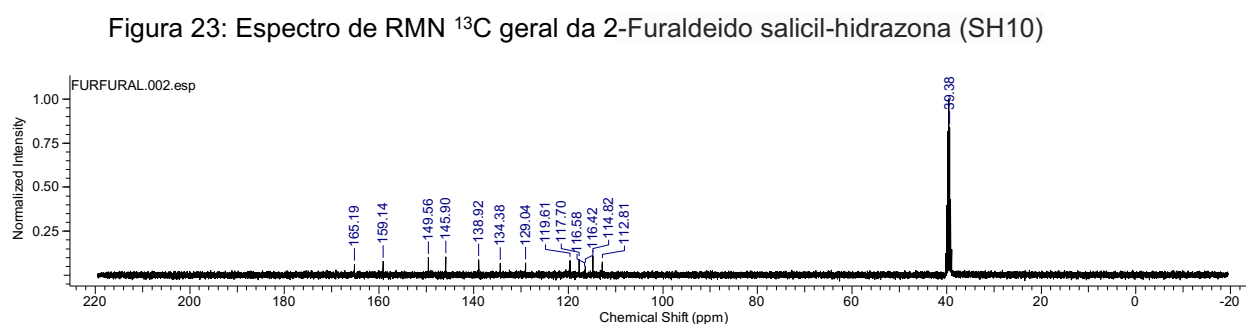


Fonte: Autoria própria

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 22) destacam-se os sinais do grupo carbonila em δ_c 165.19 ppm, do carbono imínico (C=N) em δ_c 138,92 ppm e do carbono ligado ao grupo hidroxila fenólica em δ_c 159.14 ppm. Os carbonos do anel furânicos foram atribuídos aos sinais observados em δ_c 129,04; 145,90; 138,92; e 134,38 ppm. Os dados estão condizentes com os observados na literatura (ALSAEEDI, *et al.* 2015).



Fonte: Autoria própria

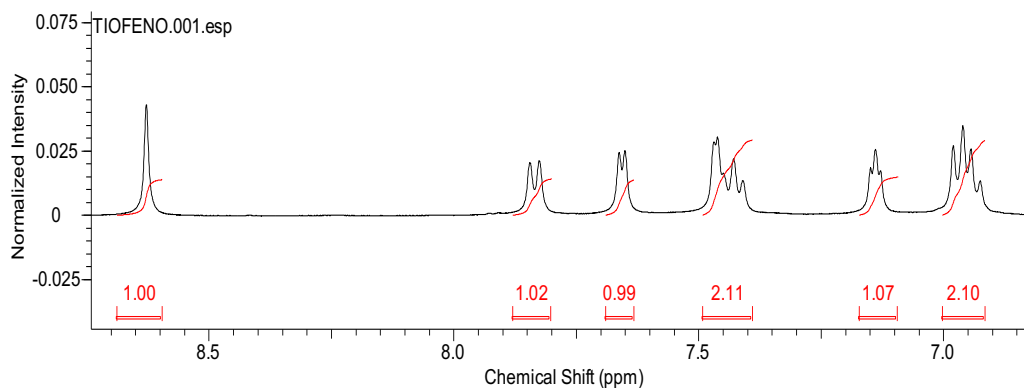


Fonte: Autoria própria

Para a SH11, o espectro de RMN de ^1H (Figura 24) foram verificados dois simples em δ_H 11,79 e 8,6 atribuídos aos hidrogênios ligados ao nitrogênio (N-H) e ao hidrogênio do grupo imínico (H-C=N), respectivamente. Os sinais dos

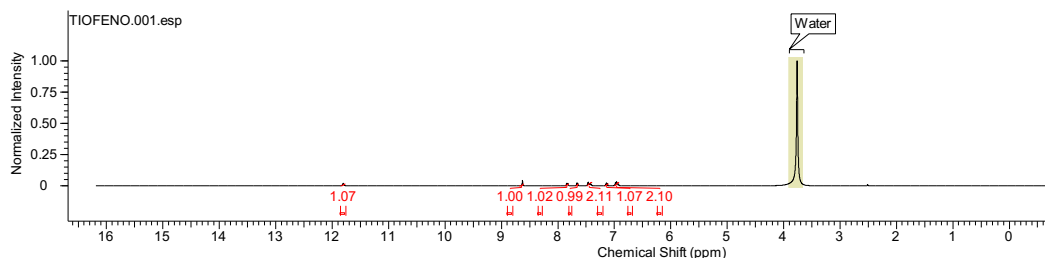
hidrogênios do anel da parte salicílica encontram-se em δ_H 7,46, enquanto que os sinais dos hidrogênios do anel tiofênico foram visualizados em δ_H 6,93 ppm.

Figura 24: Espectro de RMN 1H expandido da 2-Tiofenocarboxaldeído salicil-hidrazona (SH11)



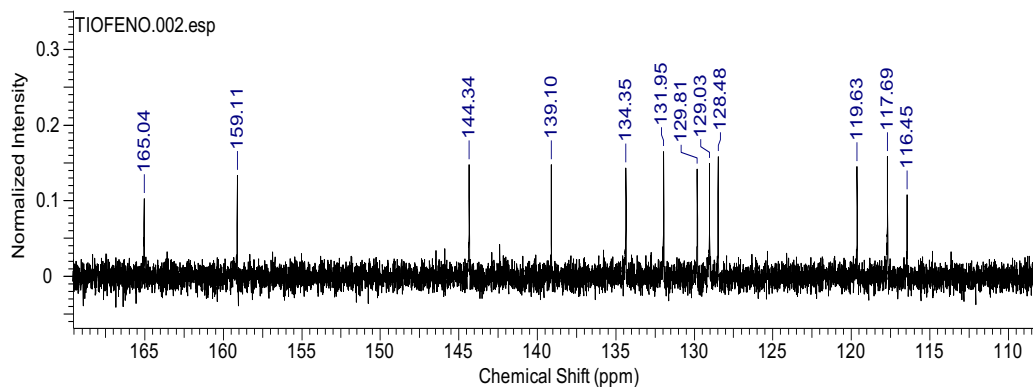
Fonte: Autoria própria

Figura 25: Espectro de RMN 1H geral da 2-Tiofenocarboxaldeído salicil-hidrazona (SH11)

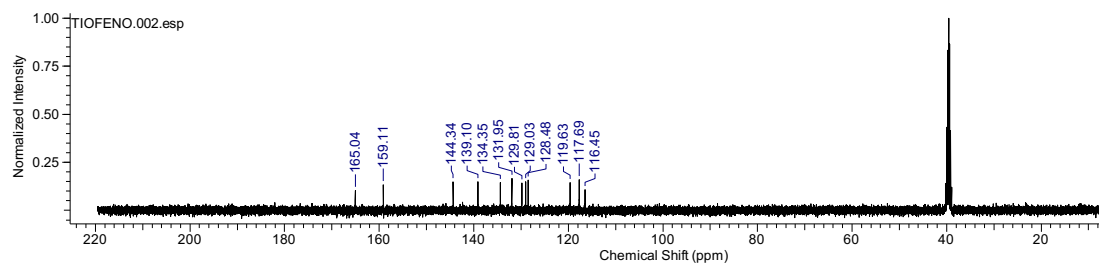


Fonte: Autoria própria

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 26) destacam-se os sinais do grupo carbonila em δ_C 165.04 ppm, do carbono imínico (C=N) em δ_C 139,10 ppm e do carbono ligado ao grupo hidroxila fenólico em δ_C 159.11 ppm. Os carbonos do anel tiofênico foram atribuídos aos sinais observados em δ_C 129,03 ,144,34, 131,95 e 128,48 ppm.

Figura 26: Espectro de RMN ^{13}C expandido da 2-Tiofenocarboxaldeído salicil-hidrazona (SH11)

Fonte: Autoria própria

Figura 27: Espectro de RMN ^{13}C geral da 2-Tiofenocarboxaldeído salicil-hidrazona (SH11)

Fonte: Autoria própria

Figura 28: Identificação dos carbonos da SH11



Fonte: Autoria própria

Tabela 6: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da 2-Tiofenocarboxaldeído salicil-hidrazona (SH11)
(Carbonos identificados na figura 28)

H/C	Autoria	Literatura*	Autoria	Literatura*
	^1H (δ (ppm), J (Hz), multiplete)	^1H (δ (ppm), J (Hz), multiplete)	^{13}C (δ (ppm))	^{13}C (δ (ppm))
1 (H-C=N)	8,62 (s, 1H)	-	138,82	139,39
2	-	-	129,53	129,88

3	7,46 (d, J = 2,7, 1H)	7,50 (d, J = 3,68, 1H)	144,06	144,30
4	7,13 (t, J = 4,4, 1H)	7,16 (t, J = 4,4, 1H)	131,86	131,98
5	7,64 (d, J = 4,9, 1H)	7,71 (d, J = 5,12, 1H)	128,75	129,05
1' (C=O)	-	-	164,76	165,12
2'	-	-	116,16	116,51
3'	6,97 (d, J = 8,14, 1H)	6,98 (d, J = 8,8, 1H)	128,20	128,50
4'	7,41 (t, J = 7,4, 1H)	7,44 (t, J = 8,08, 1H)	119,35	119,50
5'	6,93 (t, J = 7,5, 1H)	7,46 (d, J = 2,7, 1H)	134,07	134,35
6'	7,87 (d, J = 7,80, 1H)	7,87 (d, J = 8,08, 1H)	117,41	117,82
7'	-	-	158,82	159,49
NH	11,79 (s, 1H)	11,82 (s, 1H)	-	-

*Valores de referência baseados em ALSAEEDI, et al. 2015)

Fonte: Autoria própria

6.4 ATIVIDADE BIOLÓGICA

As salicil-hidrazonas sintetizadas neste trabalho e no trabalho correlacionado (TEIXEIRA, 2019), foram submetidas ao ensaio biológico contra a cepa padrão H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis* além, disso, a SH11 foi testada contra cepa resistente da bactéria.

A isoniazida (INH) foi utilizada como fármaco padrão no ensaio e apresentou MIC de 0,06 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. A isoniazida foi escolhida devido a sua disponibilidade comercial. A tabela 6 apresenta os resultados experimentais de modo a facilitar a comparação dos dados obtidos. A coluna de MIC em μM tem por objetivo diferenciar os compostos que deram MIC semelhante.

Tabela 8: Dados de concentração inibitória mínima (MIC) em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e μM , citotoxicidade para linhagens J774.A1 e MRC-5 em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e índice de seletividade para a salicil-hidrazida (SH1) e salicil-hidrazonas (SH2 – SH17).

Substância	MIC H ₃₇ Rv ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	MIC H ₃₇ Rv (μM)	CC ₅₀ J774.A1($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	IS*	CC ₅₀ MRC-5 ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	IS**
Isoniazida	0,06	0,43	-	-	-	-
SH1	250	1643,12	-	-	-	-
SH2	>250	>1040,54	-	-	-	-
SH3	>250	>876,39	-	-	-	-
SH4	>250	>876,39	-	-	-	-
SH5	>250	>876,39	-	-	-	-
SH6	>250	>882,363	-	-	-	-
SH7	>250	>910,05	-	-	-	-
SH8	31,25	121,94	-	-	-	-
SH9	>250	>968,05	-	-	-	-
SH10	<u>7,8</u>	33,88	249,60	32,00	-	-
SH11	<u>3,9</u>	15,83	600,02	153,85	163,80	42,00
SH12	31,25	96,39	-	-	-	-
SH13	15,6	54,87	-	-	-	-
SH14	15,6	55,06	-	-	-	-
SH15	31,25	108,36	-	-	-	-
SH16	31,25	122,89	-	-	-	-
SH17	>250	>843,54	-	-	-	-

MIC (CIM) = concentração inibitória mínima; CC₅₀ = cito toxicidade; IS (índice de seletividade) = CC₅₀/MIC; - (não avaliado).

Fonte: Autoria própria

Entre as salicil-hidrazonas estudadas, os compostos SH10 e SH11 se mostraram os mais ativos com MIC 7,8 e 3,9 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. Esses compostos possuem o anel heterocíclico em comum, sendo a única diferença o heteroátomos presente (SH10 –O; SH11 –S).

Os compostos SH13 e SH14, que ambos mostraram valores de MIC 15,6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, possuem um grupo anisol, relatado em fármacos (SANTOS, *et al.* 2021), devido ao grupo metoxi; já em SH14, a presença do grupo oxindol também já foi relatada em fármacos (SILVA, *et al.* 2008).

A tabela 9 apresenta os valores obtidos dos testes da salicil-hidrazona SH11 testada contra a cepa resistente da bactéria. Os isolados

clínicos são cepas de *M. tuberculosis* obtidos de pacientes internados no HU da UEM em Maringá.

Tabela 9: Concentração inibitória mínima (MIC) em µg/mL e µM da substância SH-11 para cepas resistentes à múltiplos fármacos antituberculose.

Isolados clínicos	Perfil de resistência	CIM (µg/mL)	CIM (µM)
71 ^a	INHR, RIFR, PZAR	-	
73 ^a	INHR, RIFR, PZAR	1,95	7,91
3614	INHR, RIFR, EMBR, ETHR, SMR	1,95	
1BM	INHR	-	
2BM	SMR	1,95	
3BM	INHR, RIFR	1,95	
BRF04	INHR	3,9	15,83
18	INHR, RIFR, EMBR	3,9	
47S	SMR	1,95	
4250	INHR	1,95	

INHR = isoniazida, RIFR = rifampicina, PZAR = pirazinamida, EMBR = etambutol, SMR = estreptomicina, ETHR = etionamida

Fonte: Autoria própria

A salicil-hidrazona SH11 mostrou um perfil igualmente ativo contra duas cepas resistentes de *M. tuberculosis* e ainda melhores resultados para a maioria das cepas resistentes testadas. Algo bastante significativo ao compararmos com fármacos padrão de tratamento contra a tuberculose, que apresentam dificuldade para agir contra determinadas variantes do microorganismo.

7 CONCLUSÕES

Os compostos estudados foram submetidas aos ensaios *in silico* de modo a prever a biodisponibilidade oral, perfil de absorção por membranas, ação toxicológica, atividade farmacológica e de bioatividade, os parâmetros físico-químicos obtidos foram satisfatórios. Isso aponta que grande parte das substâncias estudadas podem ser bons candidatos a fármacos, visto que os resultados se aproximam dos valores observados em fármacos padrão de tratamento contra a tuberculose.

Os compostos foram sintetizadas por metodologia de obtenção de simples aplicação e versatilidade, apresentando ao final rendimentos satisfatórios em sua grande maioria.

Os dados espectrais estudados foram assinalados com base na literatura. Quanto à atividade antituberculose, alguns compostos apresentaram melhores resultados frente a cepa padrão H37Rv de *M. tuberculosis*, com MIC de 3,8 (SH11), 7,9 (SH10), 15,6 (SH13 e SH14) e 31,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (SH8, SH12, SH15 e SH16).

Apesar de não ser conhecido o mecanismo de ação ou os alvos moleculares para as moléculas propostas, foi observado que ao inserir substituintes heterocíclicos, resultou nos melhores resultados da atividade. Desta forma, este trabalho contribuiu com a investigação de novos candidatos a fármacos para o tratamento da tuberculose, tendo em vista o bom perfil das atividades biológicas encontrado em boa parte das salicil-hidrazonas.

8 PERSPECTIVAS

Os resultados apresentados neste trabalho em união a investigações futuras podem promover avanços ainda mais significativos na busca por novos fármacos antituberculose.

As moléculas mais promissoras também poderão ser submetidas à ensaios em conjunto com fármacos utilizados com objetivo de tratar pacientes contaminados pela tuberculose.

REFERÊNCIAS

ABDU-ALLAH, Hajjaj H. M. *et al.*, Synthesis and anti-mycobacterial activity of 4-(4-phenyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)salicylhydrazones: revitalizing an old drug. **Archives of Pharmacal Research**, v. 40, n. 2, p. 168-179, 2017.

ALCÂNTARA, Romário M. *et al.*, Frequência da resistência ao etambutol por Mycobacterium Tuberculosis: Uma revisão de literatura. **Revista Eletrônica Acervo Científico**, v. 7, p. e1979, 2019.

ALAM, M. S.; CHOI, S.; Lee, D. Synthesis, anticancer, and docking studies of salicyl-hydrazone analogues: A novel series of small potent tropomyosin receptor kinase A inhibitors. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 1, p. 289-396, 2017.

ALENE, K. A.; WANGDI, K.; CLEMENTS, A. C. A. Impact of the COVID-19 Pandemic on Tuberculosis Control: An Overview. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 5, n. 3, p. 123-131, 2020.

ALSAEEDI, H, S. *et al.* Synthesis and investigation of antimicrobial activity of some nifuroxazide analogues. **Asian Journal of Chemistry**, v. 27, n.10, p. 3639-3646, 2015.

BALCELLS, Maria E. *et al.* Isoniazid Preventive Therapy and Risk for Resistant Tuberculosis. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 5, p. 744-751, 2006.

BANKS, William A. Blood-brain barrier as a regulatory interface. **Forum Nutr.** V. 63, p.102-10, 2010.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil**. 2 ed. Brasília: Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, 2019.

CORDEIRO, N. M. *et al.* New 2-amino-pyridinyl-*N*-acylhydrazones: Synthesis and identification of their mechanism of anti-inflammatory action. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 123, p. 109739, 2020.

DALCOLMO, M. P.; ANDRADE, M. K. N.; PICON, P. D. Tuberculose multirresistente no Brasil: histórico e medidas de controle. **Rev Saúde Pública**, V. 41(Supl. 1):34-42, 2007.

FERRARETO, L. H.; VANDRESSEN, F. Síntese e avaliação de atividade antituberculose de derivados *N*-acilhidrazônicos do timol. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA DA UTFPR, 26., 2021, Guarapuava: UTFPR, 2021. . Anais eletrônicos... Londrina: UTFPR, 2017. Disponível em: <<https://eventos.utfpr.edu.br/sicite/sicite2021/paper/view/7764>>. Acesso em: 29 abr. 2022.

FERREIRA, Kuitéria R. *et al.* Portadores de tuberculose multirresistente em um centro de referência: perfil sócio-demográfico e clínico-epidemiológico. **Rev Esc Enferm USP**; v. 45(Esp. 2):1685-9, 2011.

FREITAS, R. H. C. N. *et al.* Discovery of naphthyl-*N*-acylhydrazones p38 α MAPK inhibitors with *in vivo* anti-inflammatory and anti-TNF- α activity. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 91, n. 2, p. 391–397, 2017.

FREUD, S. O futuro de uma ilusão. **O mal-estar na civilização e outros trabalhos**. Volume XXI, 1927.

GLINMA, Bienvenu *et al.* Synthesis and trypanocidal activity of salicylhydrazones and *p*-tosylhydrazones of *S*-(+)-carvone and arylketones on African trypanosomiasis. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 5, n.6, p. 1-7, 2015.

HESRSHKOVITZ, Israel. *et al.* Tuberculosis origin: The Neolithic scenario. **Tuberculosis**, v. 95, n. (s)1, p. 122-126, 2015.

GROBBELAAR, Melanie. *et al.* Evolution of rifampicin treatment for tuberculosis. **Infection, Genetics and Evolution**, 74, 2019.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M.T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Quím. Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

HOELZ, Lucas V. B. *et al.* Receptores Acoplados à Proteína G. **Rev. Virtual Quim.**, v. 5, n. 5, 2013.

JOHNSSON, K.; KING, D. S.; SCHULTZ, P.G. Studies on the Mechanism of Action of Isoniazid and Ethionamide in the Chemotherapy of Tuberculosis. **Journal of the American Chemical Society**, 117, p. 5009-5010, 1995.

JORGENSEN, William L.; DUFFY, Erin M. Prediction of drug solubility from Structure, **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p. 355-366, 2002.

JUREÉN, Pontus. *et al.* Pyrazinamide resistance and pncA gene mutations in Mycobacterium tuberculosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.52, n. 5, p. 1852-1854, 2008.

KOUL, Anil. *et al.* The challenge of new drug discovery for tuberculosis. **Nature**, v. 469, n. 7331, p. 483-490, 2011.

LANNES, A. C. **Cepas bacterianas: susceptibilidade a derivados da classe acilhidrazona em amostras do Hospital Universitário Antonio Pedro.** Dissertação (Mestrado) Curso de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal Fluminense. Niterói, 2010. Disponível em: <<https://app.uff.br/riuff/handle/1/10771>>. Acesso em: 29 mai. 2022.

LIMA, T. R. Síntese de Novos Derivados Híbridos do Ácido Acetil Salicílico (AAS). Monografia (Graduação em Farmácia e Bioquímica) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista. São Paulo, 2017.

LIPINSKI, C. A. *et al.* Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Adv. Drug Delivery Rev.**, v.23, p. 3-25, 1997.

MACEDO, K. G.; FILHO, C. C. M.; ANDRADE, C. H. Avaliação *in silico* da toxicidade de fármacos. **XII Encontro Nacional de Professores de Química Farmacêutica.** 2013.

MARQUIOTI, C. M. J.; LANES, L. C.; CASTRO, G. F. P. Uso irracional de antibióticos na infância: contribuição do profissional farmacêutico para a promoção da saúde. **Rev Transformar** [Internet]. 2015.

MELNYCK, Patricia. *et al.* Design, synthesis and in vitro antimalarial activity of an acylhydrazone library. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, n. 1, p. 31-35, 2006.

NICOLAOU, K. C.; MONTAGNON, T.; *Molecules that Changed the World*. **Wiley-VCH: Weinheim**, 2008, cap. 13.

NOGUEIRA, Antônio F. *et al.* Tuberculose: uma abordagem geral dos principais aspectos. **Rev Bras Farm.** v. 93, n. 1, 2012.

PALOMINO, J. C. *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.

PINTO, L. S. R. **Síntese, atividade antibacteriana e farmacocinética pré-clínica de pró-fármaco do etambutol com potencial terapêutico para meningite tuberculosa**. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista. Araraquara, 2010. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/96243>>. Acesso em: 17 mai. 2022.

ROCHA, Paula S. S. *et al.* Avaliação da evolução clínica de pacientes portadores de Tuberculose Resistente a Múltiplos Medicamentos. **Research, Society and Development**, v.9, n. 10, 2020.

ROSEMBERG, J., TARANTINO A. B. Tuberculose. In: Tarantino AB. **Doenças pulmonares**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.294-380, 2002.

SAMPIRON, E. G. *et al.* Hydrazone, benzohydrazones and isoniazid-acylhydrazones as potential antituberculosis agents. **Future Microbiology**, v. 14, n.11, p. 981-994, 2019.

SAMPIRON, E. G. *et al.* *In Vitro* and *In Silico* Evaluations of Anti-*Mycobacterium tuberculosis* Activity of Benzohydrazones Compounds. **Microbial Drug Resistance**, v. 27, n. 11, p. 1564-1577, 2021.

SANTOS, G. C. *et al.* A química por trás dos medicamentos distribuídos pelo programa farmácia popular no Brasil: rotas sintéticas, relação estrutura-atividade e perspectivas futuras. **Quím. Nova**, v. 44, n. 10, p. 1280-1299, 2021.

SILVA, B. V. *et al.* Synthesis of Ferrocenyl Oxindole Compounds with Potential Anticancer Activity. **J. Braz. Chem. Soc.**, Vol. 19, No. 7, 1244-1247, 2008.

SOLOMONS, Graham T. W.; FRYHLE, Craig B. Química Orgânica. 7a ed. Rio de Janeiro: **LTC**. v. 2, 2002.

RAMOS, Daniela F. *et al.* Investigation of the antimycobacterial activity of 36 plant extracts from the brazilian Atlantic Forest. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 4, p. 669-674, 2008.

SOUZA, Débora C. M. *et al.* SÍNTESE, ATIVIDADE ANTILEISHMANIA E CITOTÓXICA DE HIDRAZONAS DERIVADAS DE ALDEÍDOS NATURAIS.

TARANTINO, Affonso B.; ROSEMBERG, José. Tuberculose: Doenças pulmonares. 5. ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, p.294-380, 2002.

TEIXEIRA, G. S. **Síntese e avaliação da atividade anti-*Mycobacterium tuberculosis* de derivados salicilhidrazônicos.** Relatório de Iniciação Científica, 43p., Londrina, 2019.

TELENTI, Amalio. *et al.* An expanded definition of the adult respiratory distress syndrome. **The Lancet**, v. 341, p. 647-650, 1993.

Setyawati, A., Wahyuningsih, T. D., & Purwono, B. Synthesis and characterization of novel benzohydrazide as potential antibacterial agents from natural product vanillin and wintergreen oil. **AIP Conference Proceedings 1823**, p. 02012-1, 2017.

STEELE, M. A.; DES PREZ, R. M. The Role of Pyrazinamide in Tuberculosis Chemotherapy. **CHEST**, v. 94, n. 4, p. 845-850, 1988.

THOTA, Sreekanth. *et al.* N-Acylhydrazones as drugs. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 28, n. 17, p. 2797-2806, 2018.

TOMAS, Melissa. B. *et al.* Síntesis de acil-hidrazona a partir del ácido úsnico e isoniazida y su actividad anti-*Mycobacterium tuberculosis*. **Rev. Colom. Quim.** [online], v. 46, n. 3, p. 17-21, 2017.

VALVERDE, T. L. *et al.* 3,5-dinitrobenzoylhydrazone derivatives as a scaffold for antituberculosis drug development. **Future Microbiology**, v. 17, n. 4, p. 267-280, 2022.

WILDNER, L. M. *et al.* Micobactérias: epidemiologia e diagnóstico. **Rev. Patologia Tropical.**, Goiás, v. 40, n. 3, p. 207-229, 2011.

WHO, World Health Organization. **Global tuberculosis report 2020**. Genebra, 2020. Disponível em <https://www.who.int/publications/i/item/9789240013131> . Acesso em: 3 mai. 2022.

WHO, World Health Organization. **Global tuberculosis report 2021**. Genebra, 2021. Disponível em <https://www.who.int/publications/i/item/9789240037021>. Acesso em: 1 jun. 2022.