



Síntese e Avaliação da atividade antimicrobiana e da hepatotoxicidade in vitro de acil-hidrazonas derivadas da Isoniazida

Palavras-Chave: isoniazida, resistência, tuberculose

Autoras:

Camila Cavalleiro Frias, Instituto de Química

Prof^a. Dr^a Wanda Pereira Almeida (orientadora), Faculdade de Ciências Farmacêuticas

INTRODUÇÃO:

A resistência bacteriana aos antibióticos utilizados para o tratamento de infecções é uma preocupação mundial, considerada como uma ameaça global pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Dessa forma, estudos com a finalidade de desenvolver novos fármacos que possam atuar frente às chamadas superbactérias, são muito importantes no contexto atual. Grande parte destes microrganismos causam infecções graves que afetam em especial pacientes hospitalizados em unidades de tratamento intensivo.

A Isoniazida é considerada a base do regime terapêutico da doença Tuberculose, pois apresenta especificidade, eficácia e baixo custo. Com base nisso, valores terapêuticos dessa molécula, derivados de isoniazida, são uma alternativa aos fármacos convencionais. A sua potência é bastante significativa e é o motivo pelo qual continua fazendo parte de protocolos terapêuticos, apesar de sua elevada hepatotoxicidade¹. A toxicidade deste fármaco está associada à formação de metabólitos tóxicos. A Isoniazida é substrato para uma enzima denominada N-acetiltransferase (NAT). Duas isoformas, NAT1 e NAT2 são conhecidas, sendo que a última participa ativamente da acetilação de fármacos. O metabólito acetilado é susceptível à hidrólise gerando o ácido nicotínico e a N-acetil-hidrazina, que é novamente um substrato para a N-acetiltransferase. A diacetil-hidrazina é apontada como principal promotora de acidose metabólica ou de hepatite crônica, face ao tratamento prolongado. A N-acetil-hidrazina pode ainda sofrer reação de hidroxilação mediada ou pela FMO ou CYP 450, formando uma N-hidroxi-hidrazida, gera espécies eletrofílicas (íon acílio ou a espécie radicalar equivalente), que se combinam com biomacromoléculas². Os acetiladores lentos podem sofrer com os efeitos adversos do uso desse fármaco, pois o tempo de meia vida ($t_{1/2}$) praticamente triplica se comparado a acetiladores rápidos. Com o aumento da concentração de Isoniazida, nefrite periférica e sintomas de Lúpus eritematoso podem acometer os acetiladores lentos. Por isso, identificamos a possibilidade de diminuir a nucleofilicidade do grupo amino da Isoniazida, transformando-a em derivados que conservem parte de sua estrutura, reconhecida como farmacóforo.

Embora existam muitas lacunas sobre o mecanismo de ação da Isoniazida (INH), a proposta mais aceita³. A INH é um pró-fármaco bioprecursor, e deve ser ativada por uma enzima da micobactéria – a KatG, uma catalase-peroxidase férrica. Essa ativação resulta na formação de uma espécie radicalar (INH•) que forma um aduto com o NADH (INH-NADH). A formação deste, bloqueia a redução de ácidos graxos insaturados, uma vez que a principal enzima envolvida no crescimento

da cadeia de ácidos graxos – a enoil ACP-redutase, é NADH-dependente. Assim, a biossíntese de ácidos micólicos, componentes essenciais da parede celular bacteriana, é bloqueada.

Em virtude disso, o presente projeto tem como objetivo sintetizar e avaliar o perfil antimicrobiano de acil-hidrazonas derivadas da Isoniazida frente a um painel de cepas bacterianas. A escolha dos substituintes da porção imínica da acil-hidrazona deverá privilegiar a lipossolubilidade, aumentando a permeabilidade na célula bacteriana. Os anéis aromáticos podem ser heterociclos e à medida em que os substituintes R1 e R2 variam, é possível obter série de derivados, que é importante para estudos de relação estrutura-atividade. Por fim, realizar estudo de citotoxicidade em linhagem de célula hepática.

METODOLOGIA:

Método de síntese das acil-hidrazonas

A um balão de fundo redondo adicionou-se 2 mmol de isoniazida (hidrazida ou ftalimida) e o aldeído aromático, em proporção equimolar. Em seguida, acrescentou-se 6 mL de metanol e 0,6 mL de dimetilformamida, seguindo a rota sintética descrita na figura 2. A mistura resultante foi mantida sob agitação magnética e refluxo, em torno de 65°C. A reação foi monitorada por cromatografia em camada delgada (CCD). Ao fim da reação, a mistura reacional foi filtrada em funil de Büchner e o sólido lavado com metanol. Após ter sido coletado, o material foi seco inicialmente à temperatura e à pressão ambiente e, posteriormente, a vácuo. Os compostos obtidos foram purificados por recristalização.

Caracterização dos compostos sintetizados

Os compostos foram caracterizados por espectroscopia de infravermelho, de ressonância magnética nuclear (^1H e ^{13}C), e Espectrometria de Massa (EM). As análises por difração de Raios-X foram realizadas em um Difrátômetro de Raio-X de monocristal Bruker, modelo Apex Duo.

Cálculo da Lipofilicidade

Para fins de seleção dos substituintes (R1), os compostos foram desenhados na plataforma do SwissADME e os coeficientes de partição foram calculados. Os compostos mais lipofílicos foram sintetizados⁴.

Painel antimicrobiano

O painel antimicrobiano inclui alguns isolados clínicos e ATCC (American Type Culture Collection (ATCC). Agar Mueller–Hinton e caldo Mueller–Hinton⁵ foram utilizados como meio de cultura para determinar as zonas de inibição ($1,0 \times 10^8$ UFC/mL), seguindo as especificações do National Committee for Clinical Laboratory Standards⁶. Os compostos foram testados pelo método de difusão em disco⁷. Resumidamente, o inóculo diluído da bactéria foi espalhado nas placas de agar. Os discos estéreis foram impregnados com soluções em concentrações variáveis dos compostos. Um disco sem o composto foi usado como controle negativo. Cloranfenicol e Vancomicina foram utilizados como controles positivos para as cepas G + e G-, respectivamente. Após incubação de 24 h a 37 °C, a atividade foi medida pela zona de inibição do crescimento (halo). Os experimentos foram realizados em triplicata, e supervisão do Prof. Dr. Marcelo Lancellotti (FCF-Unicamp).

Estudo de citotoxicidade in vitro pelo método MTT⁸

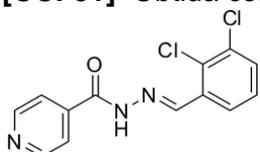
Os ensaios de citotoxicidade foram realizados com as linhagens celulares M059J (células tumorais gliais humanas), Vero (células de rim de macaco) e 3T3 (fibroblasto de camundongo), na densidade de 1×10^5 céls/mL, por poço, em meio RPMI 1640. Os ensaios foram realizados no Labiotec da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Unicamp. As placas de 96 poços foram incubadas a 37°C, em estufa umidificada com 5% de CO_2 , por 24h. Após esse período, a troca de meio foi realizada e os compostos adicionados em triplicata, com um gradiente de concentração de 5 a 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Após 24h de incubação, o meio foi removido e cada poço lavado três vezes com 0.1 mL de PBS pH 7,4. Após a lavagem, 0,2 mL do meio RPMI 1640 contendo o corante MTT

(brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio), na concentração de 0.5 mg·mL⁻¹ é adicionado. A placa será novamente incubada por 3h na temperatura de 37°C. Após esse período, o meio é removido a partir da solubilização com etanol. As placas são agitadas por 10 min e a absorbância para cada poço medida, utilizando-se o espectrofotômetro ELx800 Absorbance Microplate Reader (BioTek, USA), em 570 nm. Para o cálculo do IC₅₀(concentração inibitória mínima letal para 50% das células), as concentrações foram transformadas em mM e plotadas com os correspondentes percentuais de inibição. O cálculo é realizado no programa Origin 8.1. Além das linhagens celulares citadas acima, foi utilizada a linhagem HepG2. Essa linhagem é uma linhagem celular imortalizada de tecido hepático (câncer). Incluímos neste estudo, para avaliar a hepatotoxicidade dos derivados de Isoniazida, um fármaco hepatotóxico.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Foram sintetizadas e caracterizadas um grupo de 13 compostos, dos quais 2 são inéditos. As moléculas foram organizadas com a nomenclatura CCF. Um grupo de moléculas sintetizadas e suas respectivas caracterizações estão descritas abaixo.

[CCF01] Obtida como um sólido branco, sem purificação adicional. **Rendimento:** 80%.



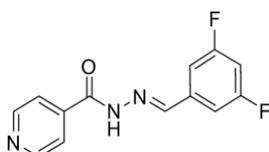
IV (ATR, $\nu_{\text{máx}}$, cm⁻¹): 3186 (N–H), 1685 (C=O);

RMN-¹H (250 MHz, DMSO-d₆, ppm): δ 12,36 (s, 1H, NH-C=O), 8,91 (s, 1H, imina), 8,82 (d, 2H, J = 5,6 Hz, H-Py), 8,01 (dd, 1H, J = 1,3 e 7,8 Hz, H-Ar), 7,85 (d, 2H, J = 6 Hz, H-Py), 7,76 (dd, 1H, J = 1,3 e 8 Hz, H-Ar), 7,49 (t, 1H, J = 8 Hz, H-Ar).

RMN-¹³C (125 MHz, DMSO-d₆, ppm): δ 162,25 (C=O), 150,89 (2 x CH-Py), 145,17 (CH=N), 140,56 (C-Py), 134,25 (C-Ar), 132,90 (CCl-Ar), 132,36 (CCl-Ar), 131,70 (CH-Ar), 129,07 (CH-Ar), 126,10 (CH-Ar), 122,00 (2 x CH-Py).

EM (ESI+): calculado para C₁₃H₉Cl₂N₃O (M+H⁺) = 294,0201. Encontrado = 294,0217.

[CCF09] Obtida como um sólido amarelo claro, recristalizado com etanol e hexano. **Rendimento:** 71%



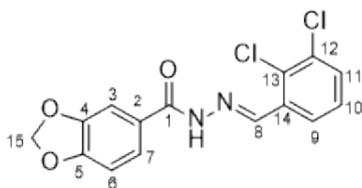
IV (ATR, $\nu_{\text{máx}}$, cm⁻¹): 3201 (N–H), 1687 (C=O), 1305 (C–F).

RMN-¹H (400 MHz, DMSO-d₆, ppm): δ 12,13 (s, 1H, NH-C=O), 8,79 (d, 2H, J = 5,6 Hz, H-Py), 8,49 (s, 1H, imina), 7,81 (s, 2H, H-Py), 7,44 (s, 1H, H-Ar), 7,28 (t, 2H, J = 8,4 Hz, H-Ar).

RMN-¹³C (125 MHz, DMSO-d₆, ppm): δ 164,10 (CF-Ar, J_{C-F} = 12,5 Hz), 162,37 (C=O), 162,14 (CF-Ar, J_{C-F} = 12,5 Hz), 150,85 (2 x CH-Py), 146,88 (CH=N), 140,64 (C-Py), 138,35 (C-Ar, J_{C-F} = 8,75 Hz), 122,02 (2 x CH-Py), 110,51 (2 x CH-Ar, J_{C-F} = 6,25 Hz), 105,99 (CH-Ar, J_{C-F} = 25 Hz).

EM (ESI+): calculado para C₁₃H₉F₂N₃O (M+H⁺) = 262,1. Encontrado = 262,4.

[CCF12] Obtida como um sólido branco. **Rendimento:** 93%



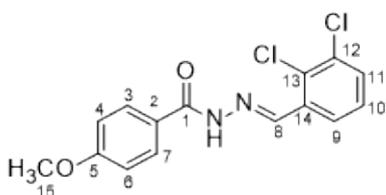
IV (ATR, $\nu_{\text{máx}}$, cm^{-1}): 3222 (N-H), 1648 (C=O).

RMN-¹H (500 MHz, DMSO-d₆, ppm): δ 12,00 (s, 1H, NH-C=O-1), 8,86 (s, 1H, -N=CH-8), 7,98 (d, 1H, J = 8 Hz, H-9), 7,71 (dd, 1H, J = 8 Hz e 1 Hz, H-11), 7,56 (d, 1H, J = 8 Hz, H-10), 7,47 (d, 1H, J = 3 Hz, H-3), 7,46 (t, 1H, J = 8 Hz, H-7), 7,07 (d, 1H, J = 8 Hz, H-6), 6,14 (s, 2H, CH₂-15).

RMN-¹³C (125 MHz, DMSO-d₆, ppm): δ 162,75 (C=O-1), 150,88 (CH=N-8), 147,95 (CO-4), 143,47 (CO-5), 134,60 (CCl-13), 132,83 (CCl-12), 131,92 (CH-9), 131,41 (CH-11), 128,93 (CH-10), 127,22 (C-2), 125,89 (CH-3), 123,50 (C-14), 108,56 (CH-7), 108,10 (CH-6), 102,37 (CH₂-15).

EM (ESI+): calculado para C₁₅H₁₀Cl₂N₂O₃ (M+H⁺) = 337,0147. Encontrado = 337,0151.

[CCF13] Obtida como um sólido branco, recristalizado com acetona. **Rendimento:** 94%



IV (ATR, $\nu_{\text{máx}}$, cm^{-1}): 3216 (N-H), 1646 (C=O).

RMN-¹H (400 MHz, DMSO-d₆, ppm): δ 12,05 (s, 1H, NH-C=O-1), 8,88 (s, 1H, -N=CH-8), 7,99 (d, 1H, J = 7,2 Hz, H-9), 7,94 (d, 2H, J = 8,4 Hz, H-3,7), 7,72 (dd, 1H, J = 1,6 Hz e 8 Hz, H-11), 7,47 (t, 1H, J = 8 Hz, H-10), 7,08 (d, 2H, J = 9,2 Hz, H-4,6), 3,85 (s, 3H, CH₃).

RMN-¹³C (125 MHz, DMSO-d₆, ppm): δ 163,10 (C=O-1), 143,26 (CH=N-8), 134,67 (C-OCH₃-5), 132,82 (CCl-Ar-13), 131,89 (CCl-Ar-12), 131,37 (C-Ar-14), 130,14 (CH-9), 128,97 (2 x CH-3,7), 125,91 (CH-11), 125,47 (C-2), 114,28 (2 x CH-4,6), 55,94 (CH₃-15).

EM (ESI+): calculado para C₁₅H₁₂Cl₂N₂O₂ (M+H⁺) = 323,0354. Encontrado = 323,0330.

CONCLUSÕES:

No período de vigência da bolsa foram sintetizados 13 acil-hidrazonas, dos quais 2 são inéditas. Estes compostos foram submetidos a purificação a partir da técnica de recristalização e caracterizados por espectroscopia de Infravermelho e de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

de 1H e de 13C, confirmando as estruturas esperadas. Os rendimentos químicos variaram de 23 a 94%, sendo que os compostos apresentando o núcleo piridínico foram os obtidos em menor rendimentos.

A avaliação do efeito antimicrobiano e os estudos de citotoxicidade, a partir do painel antimicrobiano e estudo de citotoxicidade in vitro pelo método MTT, descritos na metodologia, estão sendo concluídas. Dessa forma, os resultados correspondentes a essas atividades não constam neste resumo.

BIBLIOGRAFIA

1. Wu, Y.; Ding, X.; Yang, Y. et al. Optimization of biaryloxazolidinone as promising antibacterial agents against antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant gram-positive bacteria. *Euro J Med Chem.*, 2020, 185, 11187. [10.1016/j.ejmech.2019.111781](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111781).
2. Williams DA. Drug Metabolism. In: Lemke TL, Williams DA, Roche VF, Zito SW. *Foye's Principles of Medicinal Chemistry*. 7^a ed. Baltimore: Lippincott Williams and Wilkins, 2013.
3. Unissa, A. N.; Subbian, S.; Hanna, L. E.; Selvakumar, N. Overview on mechanisms of isoniazid action and resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Genet Evol*, 2016, 45, 474-492. [10.1016/j.meeqid.2016.09.004](https://doi.org/10.1016/j.meeqid.2016.09.004).
4. Daina, A.; Michielin, O.; Zoete, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci Rep.*, 2017, 7, 42717. [10.1038/srep42717](https://doi.org/10.1038/srep42717).
5. Ferreira de Lima, M. R.; de Souza Luna, J.; Feitosa dos Santos, A., et al. Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. *J. Ethnopharmacol*, 2005, 105, 137-147. [10.1016/j.jep.2005.10.026](https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.10.026).
6. (a) CLSI (2006a), Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, Sixteenth Informational Supplement, CLSI document M100-S16, The Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, USA, 188 pp.; (b) National Committee for Clinical Laboratory Standards, Performance Standards Antimicrobial Susceptibility Testing, Fifth Informational Supplement, NCCLS Document M100-S5 (ISBN 1-56238-249-7), NCCLS, Villanova, PA, 1994.
7. Bauer, A. W.; Kirby, W. M. M.; Sherris, J. C.; Turch, M. *Am. J. Clin. Pathol.*, 1966, 45 493-496.
8. Liu, Y., Peterson, D. A., Kimura, H., Schubert, D. Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *J. Neurochem.*, 1997, 69, 581-593. [10.1046/j.1471-4159.1997.69020581.x](https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1997.69020581.x).