



Síntese de moléculas híbridas usando núcleos 3,4-metilenodioxi e piridina análogas à piperina

Synthesis of hybrid molecules using 3,4-methylenedioxy and pyridine nuclei analogous to piperine

João Pedro Oliveira Pereira¹, Fábio Vandresen²

RESUMO

Neste trabalho, foi realizada a síntese de 8 moléculas híbridas, 4 acilhidrazonas (ACH) e 4 chalconas (CHC), com os núcleos 3,4-metilenodioxi e 4-piridina, análogas à piperina e a isoniazida, com o intuito de obter possíveis candidatos a fármacos contra tuberculose. As metodologias de síntese propostas para os híbridos foram alcançadas, obtendo rendimentos de 51,19% a 91,42%. Os híbridos foram caracterizados por espectroscopia de infravermelho e ressonância magnética nuclear para comprovar a estrutura molecular. Adicionalmente, foram realizados estudos *in silico* da biodisponibilidade oral, efeitos toxicológicos e atividade contra o bacilo da tuberculose, onde todos os híbridos mostraram boa disponibilidade oral, baixos efeitos tóxicos, e alta probabilidade de atividade, com destaque para a ACH03, que obteve o melhor resultado ($P_a=0,861$) entre os híbridos, a ACH02 apresentou resultados promissores ($MIC=0,9 \mu\text{g.mL}^{-1}$) em testes de concentração inibitória mínima frente à cepa padrão H₃₇Rv ao bacilo *Mycobacterium tuberculosis*.

PALAVRAS-CHAVE: Isoniazida; híbridos; piperina; tuberculose.

ABSTRACT

In this work, the synthesis of 8 hybrid molecules was carried out, 4 acylhydrazones (ACH) and 4 chalcones (CHC), with the nuclei 3,4-methylenedioxy and 4-pyridine, analogous to piperine and isoniazid, with the aim of obtaining possible drug candidates against tuberculosis. The proposed synthesis methodologies for the hybrids were achieved, obtaining yields of 51.19% to 91.42%. The hybrids were characterized by infrared spectroscopy and nuclear magnetic resonance to confirm the molecular structure. Additionally, *in silico* studies of oral bioavailability, toxicological effects and activity against tuberculosis bacillus were carried out, where all hybrids showed good oral availability, low toxic effects, and high probability of activity, with emphasis on ACH03, which obtained the best result ($P_a=0.861$) between the hybrids, the ACH02 showed promising results ($MIC=0.9 \mu\text{g.mL}^{-1}$) in minimum inhibitory concentration tests against the H₃₇Rv standard strain of *Mycobacterium tuberculosis*.

KEYWORDS: Isoniazid; hybrid; piperine; tuberculosis.

INTRODUÇÃO

Desde sempre, a humanidade sofre com inúmeras enfermidades e mesmo com o avanço tecnológico e desenvolvimento de novos fármacos, a longa exposição de um remédio contra uma determinada doença, faz com que muitas delas desenvolvam um mecanismo de resistência, diminuindo ou mesmo inutilizando a atividade de muitos fármacos (VIDAL, 2022). Isso ocorre com a tuberculose, doença causada pela micobactéria *Mycobacterium tuberculosis*, que é um patógeno intracelular aeróbico, que necessita de oxigênio para crescer e se multiplicar, portanto se estabelecendo principalmente no pulmão (CAMPOS, 2006).

Dessa forma, pesquisas relacionadas a uma substância presente na pimenta-do-reino, piperina, apresentou resultados positivos anti-*Mycobacterium tuberculosis*, em específico, atuando como inibidora de bombas de efluxos (BEs), mecanismo responsável

¹ Bolsista do PIVICT/UTFPR. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, PR, Brasil. E-mail: joaop.2002@alunos.utfpr.edu.br. ID Lattes: 8962579016320572.

² Docente do Departamento de Química. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, PR, Brasil. E-mail: fabiovandresen@utfpr.edu.br. ID Lattes: 8780109652880703.



por bombear para fora da micobactéria, os fármacos que as adentram. Quando ministrada em conjunto com fármacos como a isoniazida (INH) e rifampicina (RIF) que atualmente são disponibilizados para o tratamento, diminuiu as concentrações inibitórias mínimas (CIM), ou seja, diminuindo a quantidade do fármaco utilizado no tratamento. (MONTAHOLI et al, 2018). Assim, é proposto nesse estudo sintetizar moléculas bioativas híbridas contendo grupos acilhidrazona (ACHs) e chalcona (CHCs), análogas à piperina e alguns fármacos contra tuberculose, como a isoniazida, a fim de obter possíveis moléculas que atuem como fármacos e inibidoras de BE, correlacionando suas estruturas químicas que apresentam atividade farmacológica.

MATERIAIS E MÉTODOS

Instrumentação

Os equipamentos utilizados nas sínteses foram: Cuba de ultrassom da marca Cristofoli, agitador magnético da marca Fisatom, balança analítica da marca Shimadzu com precisão de 0,1 mg, micropipeta da marca Jetta com graduação de 100-1000 μ L e termômetro digital da marca Thermo modelo 100 Spit 300. Já para as análises de FT-IR foram realizadas em um espectrofotômetro IV de marca PerkinElmer, do modelo UATR Two usando o módulo ATR; e as análises do RMN de ^1H e ^{13}C foram realizados em um espectrômetro Bruker operando a 400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C .

Síntese

Para sintetizar as moléculas híbridas desejadas inicialmente foi necessário a obtenção do piperonal, a qual foi utilizada a metodologia descrita abaixo pela oxidação a partir do álcool piperonílico.

Primeiramente, foi adicionado 4,139 g (19,2 mmol) de clorocromato de piridínio (PCC) e 4,151 g de sílica em um almofariz e misturado. A mistura foi transferida para um balão de fundo redondo. Em seguida, foi adicionado 30 ml de diclorometano mantendo em agitação. Então foi adicionado 1,461 g (9,6 mmol) de álcool piperonílico mantendo a mistura reacional sob agitação por 1 hora. O progresso da reação foi acompanhado com o uso de cromatografia planar usando de acetato de etila e hexano 4:1. O meio reacional, foi diluído com 50 mL de éter etílico e então foi realizada a filtração à vácuo utilizando uma camada de sílica de 2 cm. A porção líquida foi levada para um funil de separação com 50 mL de água destilada. À fase orgânica separada, foi adicionado cloreto de cálcio anidro como agente secante. O produto foi obtido através de filtração simples e lavagem com água.

Para as ACHs, a metodologia utilizada foi a mesma para todas as moléculas, variando a quantidade de solvente utilizada para solubilizar os reagentes e o uso de aldeídos e cetonas dos grupos 3,4-metilenodioxo e 4-piridina. Para a ACH02, primeiramente foi adicionado 0,1296 g (1 mmol) de isoniazida em um erlenmeyer que então foi solubilizada com 12 mL de etanol. Depois, foi adicionado 0,1594 g (1 mmol) de 3,5-metilenodioxiacetofenona em um béquer, que foi solubilizada em 8 mL de etanol e transferida para o meio reacional. O sistema então foi acidificado com 5 gotas de ácido acético. A solução então foi encaminhada para um equipamento de agitação em banho ultrassônico, onde permaneceu em agitação à temperatura ambiente por 40 minutos. Para verificar o fim da reação, foi aplicado a cromatografia de camada delgada (CCD) com 4:1 de acetato de etila e metanol como eluente e iodo para revelação. O precipitado formado foi filtrado e lavado com água.



Também para as CHCs, todas as sínteses foram realizadas de forma análoga a descrita abaixo, variando somente a quantidade de solvente utilizada para solubilizar os reagentes. Para a CHC02, foi adicionado 90 μL (1 mmol) de 4-formilpiridina em um balão de fundo redondo. Então foi adicionada 1 mL de NaOH 8% à solução. O sistema foi resfriado até uma faixa de temperatura de 0 a 5 $^{\circ}\text{C}$. Depois, foi adicionado 0,1641 g (1 mmol) de 3,5-metilenodioxiacetofenona em um béquer, que foi solubilizada com 8 mL de etanol e transferida gota a gota ao meio reacional. O sistema foi mantido em agitação magnética até a formação de um precipitado ou verificação por CCD de 2:2 de acetato de etila e hexano como eluente e iodo para revelação. O precipitado formado foi filtrado e lavado com água.

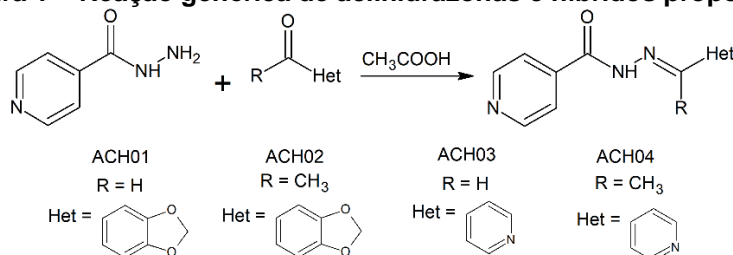
Estudo in silico

O estudo in silico da predição da atividade biológica e biodisponibilidade e as propriedades físico-químicas das moléculas foi realizado a partir dos *softwares*: OSIRIS Property Explorer, SwissADME e Pass Online.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Para a formação de uma ACH, a reação genérica ocorre com uma hidrazida (isoniazida) e uma cetona ou aldeído como reagentes, formando um intermediário, que com a acidificação do meio reacional auxilia na eliminação de uma molécula de água e formando a ligação imínica (C=N) que caracteriza esse grupo, como mostra a Figura 1 abaixo.

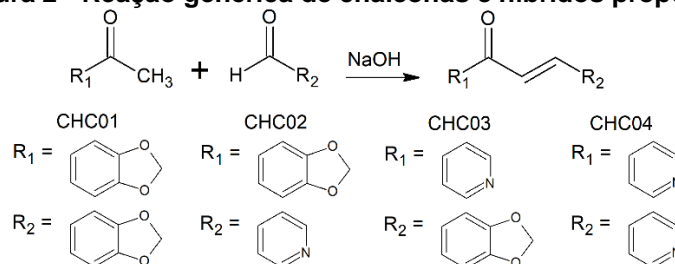
Figura 1 – Reação genérica de acilhidrazonas e híbridos propostos



Fonte: Autoria própria (2023)

Já a reação genérica para formação de uma CHC, consiste em uma cetona ou aldeído com hidrogênio α , que é desprotonado com uma base forte formando um intermediário de carga negativa chamado íon enolato, que ataca o centro reativo da outra cetona ou aldeído, a base então novamente desprotona a posição α , favorecendo a ressonância eliminando uma molécula de água e formando uma ligação C=C conjugada com a carbonila (sistema α,β -insaturado), como mostra a Figura 2 abaixo.

Figura 2 - Reação genérica de chalconas e híbridos propostos



Fonte: Autoria própria (2023).



Caracterização

Molécula ACH01 N'-[(E)-(2H-1,3-benzodioxol-5-il)metileno]piridino-4-carbohidrazida: Cristais brancos; Rendimento: 80,99% (0,1086 g); IV (ATR): ν (cm^{-1}) = 3172 (N-H_{est}); 1677 (C=O); 1559 e 1447 (C-C_{aro}); 1285 (C-N_{aro}); 1255 e 1026 (C-O); 687 (N-H_{def}); RMN ¹H (DMSO-d₆, 400 MHz): δ (ppm) = 11,97 (s, N-H, 1H); 8,78 (d, J=5,9 Hz, H_{Pir}, 2H); 8,37 (s, H-C=N, 1H); 7,81 (d, J=5,9 Hz, H_{Pir}, 2H); 7,32 (s, H_{Het}, 1H); 7,20 (d, J=8,1 Hz, H_{Het}, 1H); 7,01 (d, J=7,8 Hz, H_{Het}, 1H); 6,11 (s, O-CH₂-O, 2H); RMN ¹³C (DMSO-d₆, 100 MHz): δ (PPM) = 161,41 (C=O); 150,29; 149,36; 148,78; 148,03; 140,54; 128,39; 123,65; 121,48; 108,51; 105,20; 101,62.

Molécula ACH02 N'-[(1E)-1-(2H-1,3-benzodioxol-5-il)etileno]piridino-4-carbohidrazida: Cristais amarelos; Rendimento: 83,19% (0,2227 g); IV (ATR): ν (cm^{-1}) = 3244 (N-H_{est}); 1698 (C=O); 1646 (C=N); 1539 e 1488 (C-C_{aro}); 1275 (C-N_{aro}); 1245 e 1036 (C-O); 685 (N-H_{def}); RMN ¹H (DMSO-d₆, 400 MHz): δ (ppm) = 10,97 (s, N-H, 1H); 8,755 (d, J=5,1 Hz, H_{Pir}, 2H); 7,795 (d, J=5,4 Hz, H_{Pir}, 2H); 7,44 (s, H_{Het}, 1H); 7,38 (d, J=9,0 Hz, H_{Het}, 1H); 6,98 (d, J=8,1 Hz, H_{Het}, 1H); 6,08 (s, O-CH₂-O, 2H); 2,32 (s, H₃C-C=N, 3H); RMN ¹³C (DMSO-d₆, 100 MHz): δ (PPM) = 162,07 (C=O); 149,88; 148,59; 147,41; 147,36; 141,02; 131,84; 121,66; 121,25; 107,75; 106,01; 101,28; 14,66 (H₃C-C=N).

Molécula ACH03 N'-[(E)-(piridin-4-il)metileno]piridino-4-carbohidrazida: Cristais brancos; Rendimento: 73,58% (0,1415 g); IV (ATR): ν (cm^{-1}) = 3445 (N-H_{est}); 1682 (C=O); 1664 (C=N); 1552 e 1413 (C-C_{aro}); 1287 (C-N_{aro}); 700 (N-H_{def}); RMN ¹H (DMSO-d₆, 400 MHz): δ (ppm) = 12,36 (s, N-H, 1H); 8,815 (d, J=5,9 Hz, H_{Pir}, 2H); 8,68 (d, J=5,9 Hz, H_{Het}, 2H); 8,46 (s, H-C=N, 1H); 7,84 (d, J=5,9 Hz, H_{Pir}, 2H); 7,705 (d, J=5,9 Hz, H_{Het}, 2H); RMN ¹³C (DMSO-d₆, 100 MHz): δ (PPM) = 161,81 (C=O); 150,24; 150,18; 146,42; 140,99 (C=N); 139,94; 121,40; 120,95.

Molécula ACH04 N'-[(1E)-1-(piridin-4-il)etileno]piridino-4-carbohidrazida: Cristais brancos; Rendimento: 91,42% (0,1727 g); IV (ATR): ν (cm^{-1}) = 3518 (N-H_{est}); 1688 (C=O); 1540 e 1412 (C-C_{aro}); 1281 (C-N_{aro}); 695 (N-H_{def}); RMN ¹H (DMSO-d₆, 400 MHz): δ (ppm) = 11,24 (s, N-H, 1H); 8,785 (d, J=3,7 Hz, H_{Pir}, 2H); 8,665 (d, J=4,2 Hz, H_{Het}, 2H); 7,81 (m, H_{Pir} e H_{Het}, 4H); 2,40 (s, H₃C-C=N, 3H); RMN ¹³C (DMSO-d₆, 100 MHz): δ (PPM) = 163,02 (C=O); 150,18; 150,16; 150,07 (C=N); 144,96; 122,03; 120,68; 14,30 (H₃C-C).

Molécula CHC01 (2E)-1,3-bis(2H-1,3-benzodioxol-5-il)prop-2-en-1-ona: Pó amarelo; Rendimento: 78,48% (0,1171 g); IV (ATR): ν (cm^{-1}) = 3071 (C-H_{alc}); 1648 (C=O); 1608 (C=C_{est}); 1573 e 1489 (C-C_{aro}); 1249 e 1032 (C-O); 795 (C=C_{def}).

Molécula CHC02 (2E)-1-(2H-1,3-benzodioxol-5-il)-3-(piridin-4-il)prop-2-en-1-ona: Pó laranja; Rendimento: 52,21% (0,1263 g); IV (ATR): ν (cm^{-1}) = 1661 (C=O); 1602 (C=C_{est}); 1488 (C-C_{aro}); 1255 e 1034 (C-O); 815 (C=C_{def}).

Molécula CHC03 (2E)-3-(2H-1,3-benzodioxol-5-il)-1-(piridin-4-il)prop-2-en-1-ona: Pó marrom; Rendimento: 51,19% (0,0345 g); IV (ATR): ν (cm^{-1}) = 3074 (C-H_{alc}); 1662 (C=O); 1601 (C=C_{est}); 1487 (C-C_{aro}); 1246 e 1036 (C-O); 813 (C=C_{def}).

Molécula CHC04 (2E)-1,3-bis(piridin-4-il)prop-2-en-1-ona: Pó vermelho; Rendimento: 86,13% (0,2168 g); IV (ATR): ν (cm^{-1}) = 3051 (C-H_{alc}); 1690 (C=O); 1604 (C=C_{est}); 1560 e 1416 (C-C_{aro}); 815 (C=C_{def}).

Na caracterização da molécula ACH02, é possível confirmar a presença do produto desejado a partir dos sinais que comprovam a formação da imina. No IV (ATR): ν (cm^{-1}): 1646 (C=N), no RMN de ¹H: δ_{H} = 2,32 (s, H₃C-C=N, 3H) e no RMN de ¹³C: δ_{C} = 14,66 (H₃C-C=N) ppm. O mesmo é observado nas demais moléculas desse grupo.



Na caracterização da molécula CHC02, é possível confirmar a presença do produto desejado a partir do sinal de IV (ATR): ν (cm^{-1}) = 1602 (C=C) e 815 (C=C_{def}), que comprova a formação da ligação conjugada. O mesmo é observado nas demais chalconas.

In silico

Os resultados das predições das propriedades físico-químicas, atividade biológica, biodisponibilidade e riscos toxicológicos para os híbridos propostos são apresentados abaixo nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1 – Propriedades físico-químicas e biodisponibilidade e usando os softwares OSIRIS Property Explorer e Swiss ADME

Composto	MM (g/mol)	clog P	H - Aceptor	H - Doador	Log S	Absorção GI	Permear BBB
Piperina	285,34	3,60	4	0	-3,61	Alta	Sim
ACH01	269,26	2,31	6	1	-3,64	Alta	Não
ACH02	283,29	2,25	6	1	-4,00	Alta	Sim
ACH03	226,24	1,20	5	1	-2,13	Alta	Sim
ACH04	240,27	1,14	5	1	-2,49	Alta	Sim
CHC01	296,28	3,53	5	0	-5,26	Alta	Sim
CHC02	253,26	2,41	4	0	-3,76	Alta	Sim
CHC03	253,26	2,41	4	0	-3,76	Alta	Sim
CHC04	210,24	1,30	3	0	-2,25	Alta	Sim
Isoniazida	137,14	-1,02	4	2	-1,19	Alta	Não

Fonte: Autoria própria (2023)

Tabela 2 – Predição de atividade biológica e efeitos toxicológicos usando o software Pass Online e OSIRIS Property Explorer

Composto	Irritante	Mutagênico	Tumorigênico	Reprodução Efetiva	Anti tuberculose
Piperina	Não	Não	Não	Sim	-
ACH01	Não	Sim	Não	Sim	0,667
ACH02	Não	Sim	Não	Sim	0,639
ACH03	Não	Sim	Não	Sim	0,861
ACH04	Não	Sim	Não	Sim	0,776
CHC01	Sim	Não	Não	Sim	0,349
CHC02	Sim	Não	Não	Não	0,448
CHC03	Não	Não	Não	Sim	0,448
CHC04	Não	Não	Não	Não	0,609
Isoniazida	Sim	Sim	Sim	Sim	0,810

Fonte: Autoria própria (2023)

Na tabela 1, é possível observar os parâmetros de Lipinski, que relaciona os valores das propriedades físico-químicas com a disponibilidade oral de uma molécula. Para que a mesma tenha uma boa disponibilidade oral, os parâmetros adequados são log (P) menor que 5, número de hidrogênios aceptores (nH_A) menor ou igual que 10, número de hidrogênios doadores (nH_B) menor ou igual que 5 e massa molar (MM) menor que 500 (PICCIRILLO; AMARAL, 2018), logo, nenhuma das moléculas sintetizadas violaram esses parâmetros. Em relação a absorção gastrointestinal (GI), todas as moléculas apresentaram alta absorção, indicando viabilidade para compor um futuro fármaco de administração oral.

Com os dados da tabela 2, é observado que as ACHs, possuem boas probabilidades de atividade contra tuberculose, com a ACH03 superior até mesmo a isoniazida. No



entanto, as CHCs não mostraram o mesmo resultado, sendo inferiores a 60%. Exceto a CHC04, todas as moléculas apresentaram efeitos toxicológicos em pelo menos uma categoria, porém, ao todo são menores que a isoniazida, a qual é um fármaco com característica agressiva ao organismo humano.

O híbrido ACH02, foi encaminhado para um ensaio preliminar utilizando o método REMA (SAMPIRON et al, 2023) contra o bacilo da tuberculose, onde apresentou MIC=0,9 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para cepa padrão H₃₇Rv, um dado promissor tendo em vista que o resultado para a isoniazida é igual a 0,06 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

CONCLUSÃO

Todas as moléculas propostas foram sintetizadas e devidamente caracterizadas com espectros de IV, RMN de ¹H e ¹³C ou ambos. As metodologias abordadas se mostraram eficientes para obtenção dos híbridos. Os híbridos ACH apresentaram boa disponibilidade oral, potencial de atividade contra tuberculose e baixos efeitos toxicológicos, com destaque para a ACH03 e ACH02. Os híbridos CHC, apresentaram baixa probabilidade de atividade contra tuberculose, o que não os descarta de estudos para possíveis fármacos, afinal, seu precursor, a piperina, apresenta inibição da BE da micobactéria, sendo o objetivo principal da pesquisa mesclar a atividade contra a tuberculose com o efeito de inibição da BE. Dessa forma, todos os híbridos podem ser encaminhados para testes *in vitro* utilizando a *Mycobacterium tuberculosis* e cepas mais resistentes, a fim de comprovar os resultados obtidos nos estudos *in sílico*.

Agradecimentos

PIVICT/UTFPR, DAQUI-LD/UTFPR, UEL – Universidade Estadual de Londrina, UEM – Universidade Estadual de Maringá.

Conflito de interesse

Não há conflito de interesse.

REFERÊNCIAS

CAMPOS, HS. Etiopatogenia da tuberculose e formas clínicas. **Revista Pulmão RJ**. v.15, n.1, 2006. p. 29-35. Disponível em: [Etiopatogenia da tuberculose e formas clínicas](#). Acesso em 15 mai. 2023.

MONTAHLI, Débora et al. Estudo da combinação de fármacos antituberculose com a piperina em *Mycobacterium tuberculosis*. In: **Anais do 27º Encontro Anual de Iniciação Científica e 7º Encontro Anual de Iniciação Científica Júnior**. Maringá, 2 e 3 out. 2018.

PICCIRILLO, Erika; AMARAL, Antonia Tavares do. Busca virtual de compostos bioativos: conceitos e aplicações. **Revista Química Nova**, v.41, n.6, 2018.

SAMPIRON, Eloísa Gibin et al. Isoniazid-*N*-acyhydrazones as promising compounds for the anti-tuberculosis treatment. **Revista Tuberculosis**. v. 141, 2023.

VIDAL, Luiza. Ficamos mais de 40 anos sem novos medicamentos para tratar tuberculose. **Conselho Federal de Farmácia**. 2022. Disponível em: [Conselho Federal de Farmácia - Brasil - Notícia: 05/01/2022 - Ficamos mais de 40 anos sem novos medicamentos para tratar tuberculose](#). Acesso em: 29 mai. 2023.