

## PERFIL ANTIBACTERIANO DE NOVOS DERIVADOS N-ACILIDRAZÔNICOS SUBSTITUÍDOS

Willian Charles da Silva Moura<sup>1</sup>, Denise Nascimento Pereira<sup>2</sup>, Zilka Nanes Lima<sup>3</sup>, Ricardo Olímpio de Moura<sup>4</sup>

### RESUMO

As subunidades estruturais acilidrazona estão presentes em diversas substâncias com atividades biológicas bem relatadas. O presente estudo objetivou a avaliação *in vitro* do perfil antibacteriano de novos derivados N-acilidrazônicos substituídos, visando obter potenciais agentes terapêuticos mais eficazes, seguros e potentes. Os testes antibacterianos foram realizados através da técnica de microdiluição em caldo de acordo com o protocolo M7-A9 (NCCLS, 2012). As cepas testadas foram *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATC 25922. Constatou-se que o composto AMAC01 foi o que apresentou melhor atividade frente às duas cepas testadas, o que pode ser explicado pela presença do núcleo acridínico sem substituintes. Para a série JR os compostos nitrados substituídos nas posições *orto-para* foram os que apresentaram melhor atividade para ambas as cepas. Baseado nos resultados se constatou que os compostos acridínicos e o grupamento nitro podem ser trabalhados posteriormente aplicando-se técnicas de modificação molecular a fim de obter um *Hit* promissor.

**Palavras-chave:** Microdiluição. Acilidrazônicos. Atividade Antibacteriana.

## ANTIBACTERIAL PROFILE OF NEW DERIVATIVES N-ACYLHYDRAZONES REPLACED

### ABSTRACT

The structural subunits acylhydrazone are present in various substances with well reported biological activities. This study aimed to evaluate *in vitro* antibacterial profile of new substituted N-acylhydrazones derivatives, to obtain potential therapeutic agents more effective, safe and potent. The antibacterial tests were performed using the broth microdilution technique according to the protocol M7-A6 (NCCLS, 2006). The strains were *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Escherichia coli* ATC 25922. It was found that the AMAC01 compound showed the best activity against the two strains tested, which can be explained by the acridinic core presence without substituents. For the series JR the nitro compounds substituted in the *ortho-para* showed the best activity for both strains. Based on the results, it was found that acridinic compounds and the nitro grouping can be worked subsequently through applying techniques of molecular modification to obtain a promising hit.

**Keywords:** Microdilution. Acylhydrazones. Antibacterial activity.

<sup>1</sup> Universidade Estadual da Paraíba. [williancsmoura@gmail.com](mailto:williancsmoura@gmail.com)

<sup>2</sup> Universidade Estadual da Paraíba. [dennysepereira@hotmail.com](mailto:dennysepereira@hotmail.com)

<sup>3</sup> Departamento de Farmácia. Universidade Estadual da Paraíba. [zilkananeslima@gmail.com](mailto:zilkananeslima@gmail.com)

<sup>4</sup> Departamento de Farmácia. Universidade Estadual da Paraíba. [ricardo.olimpiodemoura@gmail.com](mailto:ricardo.olimpiodemoura@gmail.com)

## 1. INTRODUÇÃO

No tocante à busca de novos candidatos a fármacos, a estratégias de modificação molecular de agentes antimicrobianos tem sido, há muitos anos, uma das principais técnicas abordadas, consistindo na realização de pequenas modificações químicas em um composto protótipo matriz, possuidor de estrutura química e atividades biológicas bem conhecidas (mantendo constante seu grupo farmacofórico) obtendo-se novos compostos análogos ou homólogos, sem perda das principais propriedades do composto matriz (MONTANARI, 1995). Além disso, como a resistência consiste no reconhecimento da estrutura do fármaco pelos microrganismo, realizar substituições em fármacos já existentes pode garantir um maior potencial, superando os mecanismos de resistência, como também, diminuindo seus efeitos tóxicos (MADIGAN et al., 2010).

As subunidades estruturais hidrazona e acilidrazona estão presentes em diversas substâncias com atividades biológicas bem relatadas e que podem ser utilizadas como modelos para o planejamento de candidatos a novos fármacos. Já foram descritas, para os compostos desta natureza, diversas atividades farmacológicas como ação antiviral, antiparasitária, antimicrobiana, anticonvulsivante, analgésica e anti-inflamatória, e antiproliferativa (CACHIBA, 2012).

Dentre esses compostos, destacam-se os heterocíclicos, os quais correspondem a aproximadamente 65% dos fármacos atualmente empregados na terapêutica, de onde 95% desses apresentam-se nitrogenados, e outros 25% apresentam átomos de enxofre em sua composição química (BARREIRO; FRAGA, 2015). Além disso, estes compostos são possuidores de ampla atividade biológica e possuem vantagem de não terem sido extensivamente estudados.

Para a avaliação da atividade microbiológica dos compostos, existe uma série de testes que podem ser realizados *in vitro* ou *in vivo*. Para os testes *in vitro* destaca-se o de Concentração Inibitória Mínima (CIM), que permite investigar o crescimento microbiano em resposta à submissão dos microrganismos a essas drogas. De acordo com Alves et. al. (2008), métodos de diluição são comumente utilizados para determinar a concentração mínima de um agente necessário para inibir ou matar um microrganismo.

Dentre as inúmeras bactérias patogênicas, podemos ressaltar o *Staphylococcus aureus* considerado um patógeno humano oportunista e frequentemente está associado a infecções adquiridas na comunidade e no ambiente hospitalar, e a *Escherichia coli*, bactéria que habita o intestino humano e de alguns animais podendo ser benéfica ou prejudicial à saúde dependendo da espécie e quantidade no organismo (ANVISA, 2016).

Apesar do grande arsenal terapêutico de fármacos com atividade antibacteriana, vem-se crescendo gradualmente a resistência microbiana a estes fármacos ocorrendo normalmente, através de mutações que proporcionam a síntese de enzimas capazes de conferir a inativação de tais substâncias.

Baseado nos relatos acima expostos, este estudo objetivou o desenvolvimento de novos derivados N-acilidrazônicos substituídos, através da síntese e elucidação estrutural, e na avaliação suas atividades antibacterianas *in vitro* visando obter potenciais agentes terapêuticos mais eficazes, seguros e potentes.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

Os derivados N-acilidrazônicos foram sintetizados pelo Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas (LSVM) ligado a UEPB, João Pessoa – PB.

Foram utilizados as seguintes cepas padrão: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATC 25922 através do teste de microdiluição em caldo de acordo com o protocolo M7-A9 pelo NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS, 2012).

A suspensão bacteriana foi padronizada a partir de uma cultura de 24 horas em solução salina à 0,9% estéril. Em seguida foi verificada a leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 625nm, que resulta em uma concentração de 1 a 2 x 10<sup>8</sup> UFC/mL (corresponde a 0,5 na escala de McFarland). Por fim o inóculo foi diluído em Caldo Mueller Hinton (MH) até uma concentração final de 10<sup>4</sup> UFC/mL, a qual foi utilizada nos ensaios.

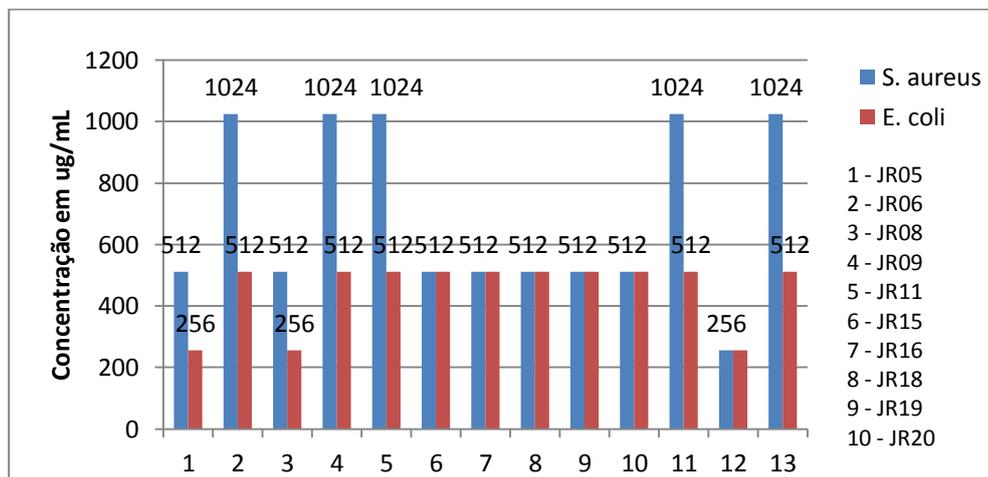
As concentrações finais dos derivados acilidrazônicos variaram entre 1024 a 1 µg/mL. Os testes foram realizados em triplicatas. O meio de cultura utilizado nos testes foi o Caldo MH. A droga controle utilizada foi a gentamicina e alguns poços foram reservados para os testes de esterilidade do meio e controle do crescimento bacteriano.

As leituras foram realizadas com o revelador resazurina a 0,025% do qual foi adicionado em cada orifício 20 µL e incubados por 4 horas. Depois de decorrido esse tempo, verificou-se a presença cor azul ou rosa, no qual a cor azul representa ausência de crescimento e a cor rosa indica o crescimento bacteriano (PALOMINO et al., 2002).

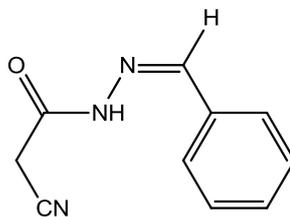
### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No gráfico 1 se encontram as atividades antibacterianas dos derivados *N*-acilidrazônicos sintetizados e suas respectivas Concentrações Inibitórias Mínimas.

**Gráfico 1** – Concentração Inibitória Mínima (CIM) em µg/mL de derivados *N*-acilidrazônicos frente às cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATC 25922



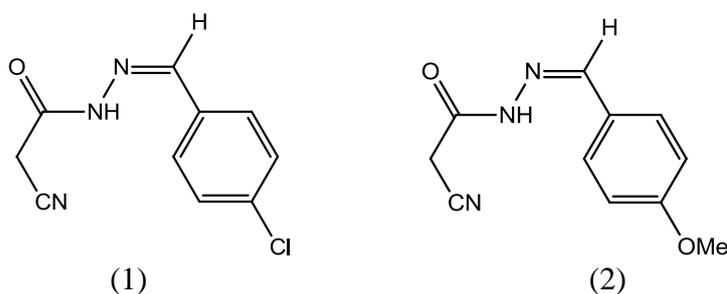
Para a série JR, o composto JR09 (Figura 2), por não apresentar substituinte ao anel aromático, foi utilizado com referencia na análise de atividade para os demais compostos da série testados. Observou-se que o mesmo apresentou um CIM de 1024 µg/mL para a cepa de *S. aureus* e de 512 µg/mL para a cepa de *E. coli*, o que indica uma atividade aumentada para a cepa Gram-negativa.

**Figura 2.** Estrutura molecular do JR09


Fonte: dados da pesquisa

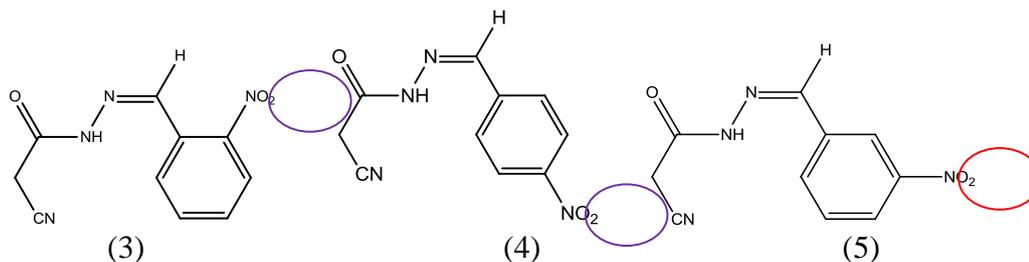
Cachiba et al. (2012) não encontraram resultado antibacteriano muito significativo quando avaliaram a eficácia de derivados acilidrazônicos frente à três espécies de bactérias *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*, sendo uma cepa de cada espécie.

Os compostos JR6 e JR11 apresentaram atividade semelhante ao composto JR09. Contudo, estes apresentam grupos substituintes na posição 4 (*para*) (Figura 3) do anel benzênico, o qual a presença de grupos retiradores e doadores de elétrons na posição *para* do aromático não influencia na atividade dos mesmos, quando comparado ao composto JR09 sem substituinte.

**Figura 3.** Diferenças estruturais entre (1) JR06 e (2) JR11


Fonte: dados da pesquisa

Entretanto, grupos fortemente retiradores, como o nitro (NO<sub>2</sub>), parece modular a atividade. Analisando os compostos JR05, JR08 e JR16, todos apresentam a mesma fórmula molecular, LogP e Peso molecular, variando somente na posição do grupamento NO<sub>2</sub> em que está ligado ao anel aromático, conforme Figura 4.

**Figura 4.** Diferenças estruturais entre (3) JR05, (4) JR08 e (5) JR16 quanto à posição do grupo NO<sub>2</sub>.


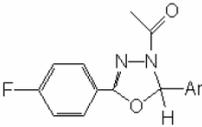
Fonte: dados da pesquisa

Baseado nas suas estruturas, os compostos JR05 e JR08 apresentaram atividades semelhantes para as duas cepas testadas (512  $\mu\text{g/mL}$  para *S. aureus* e 256  $\mu\text{g/mL}$  para *E. coli*) respectivamente, sendo mais ativos para a cepa Gram-negativa. Já o composto JR08 apresentou atividade de 512  $\mu\text{g/mL}$  para ambas as cepas, obtendo uma atividade inferior em relação a cepa Gram-negativa, quando comparado aos compostos anteriormente citados.

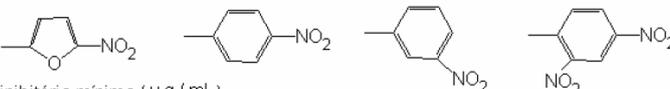
Essa diferença na atividade pode está relacionada à posição dos grupos substituintes, pois se constatou que, para o grupamento  $\text{NO}_2$ , a posição *orto-para* é mais favorecida para a atividade antibacteriana em cepa Gram-negativa.

Almeida (2009) constatou que em estudos envolvendo nitro-aromáticos, a presença do grupo nitro na posição 5 do anel aromático substituído na posição 2 é crucial para a atividade antibacteriana.

**Figura 5.** Estrutura química e atividade antimicrobiana de compostos 2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolínicos (ROLLAS, 2002).



2,3,5-trisubstituída-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolina

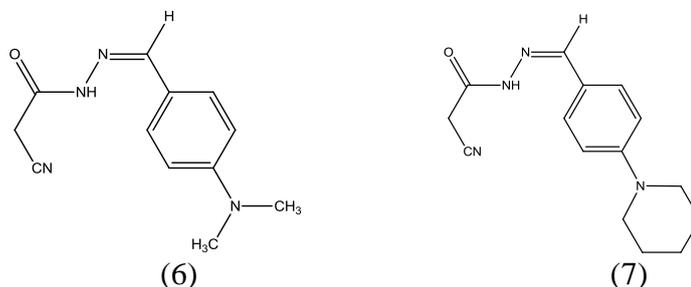
Ar = 

	Concentração inibitória mínima ( $\mu\text{g/mL}$ )			
<i>S. aureus</i>	8	62,5	16	125
<i>E. coli</i>	250	500	250	125
<i>P. aeruginosa</i>	250	250	250	125
<i>C. albicans</i>	8	250	250	125

Fonte: dados da pesquisa

Diante dos resultados obtidos com os compostos nitrados, pensou-se em testar derivados acilidrazônicos com aldeídos substituídos por grupamentos nitrogenados (N-R), sendo esses com perfil doador (Figura 6) e de acordo com o gráfico 1 os compostos apresentaram a mesma atividade perante as cepas testadas em relação aos compostos nitrados, sendo o 2- $\text{NO}_2$  ainda o mais promissor, obtendo assim o mesmo comportamento químico e biológico.

**Figura 6.** Diferenças estruturais entre (6) JR15 e (7) JR20 quanto ao grupo N livre e ciclizado.

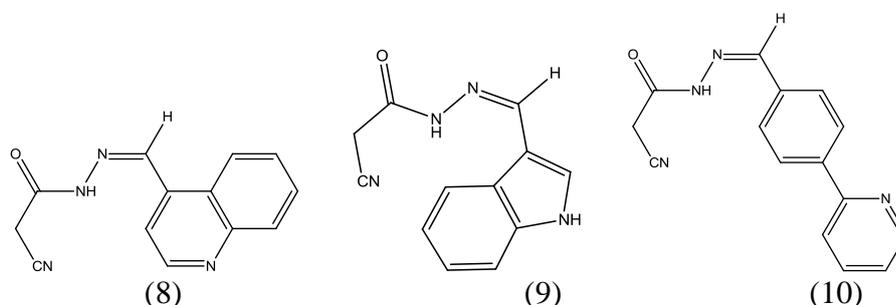


Fonte: dados da pesquisa

Os dois compostos com grupamentos nitrogenados apresentaram CIM de 512  $\mu\text{g/mL}$  para as duas cepas testadas, o qual comprova que a ciclização do nitrogênio e o aumento do tamanho da molécula, não interfere na atividade biológica, mas comprovam a importância do inserção de nitrogênio na molécula é favorável para atividade.

Partindo desse pressuposto, se pensou em testar compostos aromáticos nitrogenados (Figura 7) a fim de verificar a influencia da planaridade e aromaticidade na atividade bacteriana.

**Figura 7.** Diferenças estruturais entre (8) JR-18, (9) JR-19 e (10) JR-21 quanto à ausência e presença de anel benzênico fusionado a um anel aromático nitrogenado.



Fonte: dados da pesquisa

Ao analisar as estruturas e correlaciona-las com o resultado microbiológico descrito no gráfico 1, verificou-se que os compostos aromáticos nitrogenados fusionados a um anel benzênico (JR-18 e JR-19) apresentaram a mesma atividade para as duas bactérias testadas (CIM de 512  $\mu\text{g/mL}$ ), mesmo um tendo anel de 6 e outro de 5 membros; Contudo o composto JR-21 apresentou atividade diminuída para a cepa Gram-positiva (CIM de 1014  $\mu\text{g/mL}$ ).

De fato, os anéis aromáticos nitrogenados fusionados ao anel benzênico contribuem, consideravelmente, para um aumento da atividade antibacteriana desses compostos, confirmando a estratégia de que a planaridade e aromaticidade são promissoras para atividade proposta.

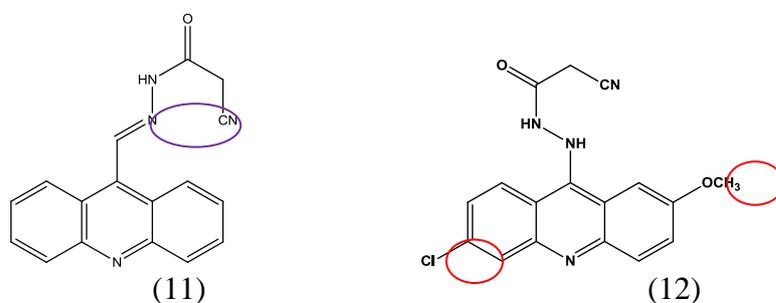
Desta forma, pensou-se em verificar a influencia de mais um anel benzênico fusionado ao composto JR-18, o que nos levou a verificar a atividade antimicrobiana do

composto AMAC01, que apresenta um núcleo acridínico.

Baseado em estudos da literatura envolvendo o núcleo acridínico, verificou-se que o mesmo apresenta considerável atividade antibacteriana, sendo assim dois derivados *N*-acilidrazônicos acoplados com núcleos de acridína (Figura 8) foram testadas para ambas as cepas.

De acordo com o gráfico 1, o composto AMAC01 (2-ciano-acridin-9-il-metileno-hidrazida) apresentou um CIM de 256 µg/mL, tanto para a cepa de *Escherichia coli*, quanto para a cepa de *Staphylococcus aureus*, o que indica uma atividade moderada para ambas as cepas. Quando comparado com o composto ACSAZ, que possui CIM de 1024 µg/mL para *Staphylococcus aureus* e 512 µg/mL para *Escherichia coli*, observa-se que mesmo ambos apresentando um núcleo acridínico, o composto ACSAZ apresentou uma atividade diminuída para as duas cepas sendo um pouco mais ativo para a cepa Gram-negativa.

**Figura 8.** Diferenças estruturais entre (11) AMAC01 e (12) ACSAZ



Fonte: dados da pesquisa

Essa diminuição da atividade do ACSAZ pode estar relacionada aos grupos substituintes no anel acridínico, como demonstrado na Figura 7, uma vez que o composto AMAC01 não apresentou substituições nos anéis aromáticos e sua atividade foi melhor do que o composto ACSAZ em ambas as cepas, como também a ausência da função imina (N=CH) entre o núcleo acridínico e o esqueleto carbônico pode influenciar na interação do composto com o alvo biológico.

Os resultados obtidos corroboram com Araujo et al. (2013), o qual avaliou a ação antimicrobiana de dois compostos acridínicos frente as cepas *Escherichia coli* (ATCC) e *Helicobacter pylori* (ATCC), onde constatou ação bactericida na concentração de 1000 µg/mL para cepa de *E. coli*.

#### 4. CONCLUSÕES

A avaliação microbiológica constatou-se que compostos com grupamentos retiradores de elétrons na posição *orto-para* do anel aromático são mais favoráveis para a atividade antibacteriana. Observamos também que os heterociclos aromáticos nitrogenados são favoráveis para atividade, principalmente os compostos contendo núcleo acridínico em sua estrutura, confirmando a ideia de que a planaridade e aromaticidade associada a um nitrogênio são importantes para atividade. Além disso, observamos que a função imina diretamente ligada a um anel aromático deficiente de elétrons, principalmente na posição 1 do benzeno (JR-05 e 08) ou 9 do núcleo acridínico (AMAC01) são favoráveis para atividade antibacteriana.

## REFERÊNCIAS

ALVES, E. G.; VINHOLIS, A. H. C.; CASEMIRO, L. A. *et al.* Estudo comparativo de técnicas de *screening* para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1224-1229, 2008.

ANVISA. “**Resistência Microbiana – Mecanismos e Impacto**”. 2016. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede\\_rm/cursos/rm\\_controlere/opas\\_web/modulo3/gramp\\_staphylo.htm](http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede_rm/cursos/rm_controlere/opas_web/modulo3/gramp_staphylo.htm)>. Acesso em: 27/08/2016.

ARAUJO, G. M.; MACEDO, E. M.; CARVALHO, M. S.; FERNADESJ, V.; ANDRADE, V. S. Compostos acridínicos frente às bactérias gram negativas *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Helicobacter pylori* ATCC 43504. In: **27º Congresso Brasileiro de Microbiologia**. 2165-1., 2013, Natal. Anais... Rio Grande do Norte: Sociedade Brasileira de Microbiologia. 2013.

BARREIRO, E. J. A. Química Medicinal e o paradigma do composto-protótipo. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 1, p. 26-34, 2009.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal: As bases moleculares da ação dos fármacos**. São Paulo: Artmed, 243 p. 2015.

CACHIBA, T. H.; CARVALHO B. D.; CARVALHO, D. T. *et al.* Síntese e avaliação preliminar da atividade antibacteriana e antifúngica de derivados *N*-acilhidrazônicos. **Química Nova**, v. 35, n. 8, p. 1566-1669, 2012.

LOPES, A. B.; MIGUEZ, E.; KÜMMEERLE, A. E.; RUMJANEK, V. M.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. *Characterization of Amide Bond Conformers for a Novel Heterocyclic Template of N-acylhydrazone Derivatives*. **Molecules**, v. 18, p. 11683-11704, 2013.

MADIGAN, M. T. *et al.* **Microbiologia de Brock**. 12. Ed. Porto Alegre: Artmed, 1160 p. 2010.

MONTANARI, C. A. Química Medicinal: Contribuição e Perspectiva no Desenvolvimento da Farmacoterapia. **Química Nova**, v. 18, p.56-64, 1995.

NCCLS. 2012. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)**, ed. 9, v. M7-A9. 2012

PALOMINO, J.C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. *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.

ROLLAS, S. GULERMAN, N. HABIBE, E. *Synthesis and antimicrobial activity of some new hydrazones 4-fluorobenzoic acid hydrazide and 3-acetyl-2,5-disubstituted-1,3,4-oxadiazolines*. **II Farmaco**, v. 57, p. 171-174, 2002.