

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MATO GROSSO DO SUL
CURSO DE QUIMICA INDUSTRIAL**

UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE DOURADOS

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

RAQUEL OLIVEIRA NASCIMENTO DE FREITAS

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E
ANTI-*Mycobacterium tuberculosis* DO 3-(3,4,5-
TRIHIDROXIFENIL)-4-N-AMINO-5-METILTIO-1,2,4-
TRIAZOL**

DOURADOS

2015

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MATO GROSSO DO SUL
CURSO DE QUÍMICA INDUSTRIAL**

UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE DOURADOS

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

RAQUEL OLIVEIRA NASCIMENTO DE FREITAS

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E
ANTI-*Mycobacterium tuberculosis* DO 3-(3,4,5-
TRIHIDROXIFENIL)-4-N-AMINO-5-METILTIO-1,2,4-
TRIAZOL**

*Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de
Química Industrial da Universidade Estadual de Mato
Grosso do Sul, como requisito para a obtenção do título de
graduado em Química Industrial, sob orientação da
Professora Dr^a. Anelise Samara Nazari Formagio.*

DOURADOS

2015

BANCA EXAMINADORA

Professor Dr. Alex Haroldo Jeller

Química (UEMS)

Professora Dr^a Claudia Andréa Lima Cardoso

Química (UEMS)

ORIENTADORA

Professora Dr^a Anelise Samara Nazari Formagio

Dourados, 30 de novembro de 2015

DEDICATÓRIA

Dedico meu trabalho primeiramente a Deus, meu principal orientador e protetor; a meus pais, que sempre apoiaram e incentivaram a minha decisão de me tornar uma profissional da química; a meus amigos, em especial Jéssika e Janyne, que mesmo estando longe, nunca deixaram de aplaudir minhas conquistas e desejar meu sucesso. Por fim, mas não menos importante, dedico a meu querido marido, que esteve e sempre estará ao meu lado, na alegria e na tristeza, me ajudando a passar por todas as dificuldades com carinho, sorrisos, compreensão e, acima de tudo, sempre com muito amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal da Grande Dourados pela oportunidade da realização da iniciação científica em suas dependências e à CNPq pela concessão de bolsa de estudo, o que tornou possível a realização deste estudo.

Agradeço aos meus companheiros de laboratório Carla, Diego, Yara, Camila, Isabela, Kamila, Lucas, Karol e a todos os outros que direta ou indiretamente me ajudaram a concluir esta etapa de forma satisfatória.

Agradeço a todos os meus professores que, de uma forma ou de outra, me ajudaram a chegar até aqui, através do conhecimento e sabedoria que me foram repassados.

Por fim, agradeço à minha orientadora Professora Dr^a. Anelise Samara Nazari Formagio, por estar sempre à disposição para auxiliar a execução dos trabalhos com atenção e pelos ensinamentos passados a cada dia que me serão úteis daqui para frente, tanto no mercado de trabalho, quanto na vida pessoal.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1:	Estrutura química do AG	9
FIGURA 2:	Estrutura química do núcleo 1,2,4-triazol	10
FIGURA 3:	Reação de redução do DPPH	11
FIGURA 4:	Rota sintética para a preparação da substância tio-metil (5)	13
FIGURA 5:	Espectro de RMN de ^1H (300,06 MHz, DMSO- d_6) do galato de metila....	18
FIGURA 6:	Espectro de RMN de ^{13}C (75,45 MHz, DMSO- d_6) do galato de metila....	18
FIGURA 7:	Mecanismo proposto para a reação de esterificação do AG (1)	18
FIGURA 8:	Espectro de RMN de ^1H (300,06 MHz, DMSO) do derivado galoil hidrazida	19
FIGURA 9:	Espectro de RMN de ^{13}C (75,45 MHz, DMSO- d_6) do derivado galoil hidrazida	19
FIGURA 10:	Mecanismo proposto para a síntese do derivado galoil hidrazida	19
FIGURA 11:	Espectro de RMN de ^{13}C (75,45 MHz, DMSO- d_6) do intermediário 1,2,4-triazol	20
FIGURA 12:	Mecanismo proposto para a síntese do intermediário 1,2,4-triazol	20
FIGURA 13:	Espectro de RMN de ^1H (300,06 MHz, DMSO) da substância (5)	21
FIGURA 14:	Espectro de RMN de ^{13}C (75,45 MHz, DMSO- d_6) da substância (5)	21
FIGURA 15:	Mecanismo proposto para a formação da substância (5)	21
FIGURA 16:	Porcentagem de inibição em relação à concentração da substância	22

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AG	–	Ácido Gálico
BHT	–	Hidroxitolueno Butilado
BD	–	Becton, Dickinson and Company
BK	–	Bacilo de Koch
CCD	–	Cromatografia em Camada Delgada
CIM	–	Concentração Inibitória Mínima
DMSO	–	Dimetilsulfóxido
DPPH	–	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
HPR	–	Horseradish Peroxidase
MPO	–	Mielo Peroxidase
MTB	–	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
OADC	–	Ácido oleico, Albumina, Dextrose e Catalase
RMN	–	Ressonância Magnética Nuclear
TB-MDR	–	Multidroga Resistentes
TB-XDR	–	Cepas de Resistência Estendida
δ	–	Deslocamento químico em ppm

RESUMO

O ácido gálico é um polifenol a que se atribui uma gama de propriedades biológicas e farmacológicas. Tais propriedades podem ser alteradas devido a modificações químicas na molécula. Com a expectativa de que a incorporação de substituintes melhore as atividades farmacológicas da molécula, no presente estudo foi realizada a síntese de uma nova substância, o 3-(3,4,5-trihidroxifenil-4-*N*-amino-5-metiltio)-1,2,4-triazol, obtido a partir da modificação estrutural do ácido gálico adquirido comercialmente. A síntese foi realizada em quatro etapas: obtenção do galato de metila através da reação de esterificação ácido gálico; síntese do galoil hidrazida através da reação de substituição nucleofílica do galato de metila com hidrazina; reação do galoil hidrazida com dissulfeto de carbono para a obtenção do intermediário tiosemicarbazida e reação do intermediário formado com hidróxido de potássio/iodeto de metila para a obtenção da substância de interesse; com rendimentos de 97, 40, 75 e 20% respectivamente. As reações foram monitoradas pela cromatografia em camada delgada (CCD) e a caracterização estrutural das substâncias por foi realizada espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ¹H e ¹³C. Foram testadas as atividades antioxidante e anti-*Mycobacterium tuberculosis*. A substância apresentou potente atividade antioxidante atuando no “sequestro” do radical livre (DPPH•), com valor de IC₅₀ de 37,0 µg/mL. A substância foi inativa contra *M. tuberculosis* (CIM < 250 µg/mL).

Palavras-Chave: Ácido gálico; 1,2,4-triazol; antioxidante; anti-*Mycobacterium tuberculosis*.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	9
1. Introdução	9
1.1. Ácido gálico	9
1.2. 1,2,4-triazol	10
1.3. Atividade antioxidante	10
1.4. Tuberculose	11
2. Objetivos	12
3. Justificativa	12
CAPÍTULO II	13
4. Metodologia	13
5. Procedimento	13
5.1. Síntese do galato de metila (2)	13
5.2. Síntese do galoil hidrazida (3)	14
5.3. Síntese do intermediário 1,2,4-triazol (4)	14
5.4. Síntese do derivado 1,2,4-triazol-substituído-tio-metil (5)	14
5.5. Atividade anti- <i>M. tuberculosis</i>	14
5.6. Atividade Antioxidante	16
6. Resultados e Discussão	17
6.1. Síntese da substância 3-(3,4,5-trihidroxifenil)-4- <i>N</i> -amino-5-metiltio-1,2,4-triazol	17
6.2. Avaliação da atividade anti- <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	21
6.3. Avaliação da atividade antioxidante	22
CAPÍTULO 3	24
7. Considerações Finais	24
8. Referências	25

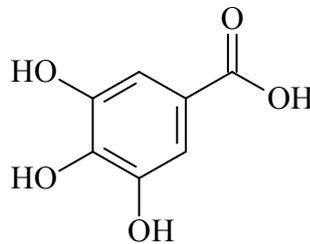
CAPÍTULO I

1. Introdução

1.1. Ácido gálico

O ácido gálico (AG) (ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico) (**Figura 1**), é uma substância fenólica abundante em plantas, e muito encontrado em frutas como a uva e em alguns tipos de chás (preto e verde) (OW e STUPANS, 2003).

Figura 1 – Estrutura química do AG



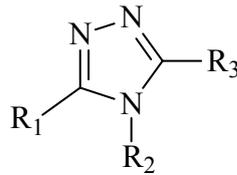
Fonte: próprio autor.

Destaca-se por apresentar várias propriedades farmacológicas, como: anticancerígena (HSU, LO e YEN, 2007; KAUR et al., 2009; JI et al, 2009; LIU, 2012; PAOLINI et al., 2015); ação sobre processos oxidativos, o que demonstrou potente atividade antioxidante e inibidora das peroxidases HPR (Horseradish peroxidase) e MPO (mieloperoxidase), com alta toxicidade frente a alguns sistemas celulares (BARBOSA, 2010 (B)); também no tratamento de fibrose hepática, pois é capaz de reduzir a proliferação celular e induzir o fenótipo quiescente (inativado) nas células hepáticas pelo aumento de gotículas lipídicas (SCHUSTER, 2013). Em modelos animais, reduz o estresse oxidativo e melhoram os níveis de glutathiona em tecido hepático, bem como os de catalase no soro (BRUN et al, 2005) e demonstra atividade anti-inflamatória, interferindo no funcionamento dos leucócitos polimorfo-nucleares. A correlação estrutura-atividade demonstrou que os grupamentos hidroxila presentes na molécula do AG é importante para a atividade inibidora *in vitro* (KROES et al., 1993). PATEL e GOYAL, 2011 sugeriram com seus estudos que o AG também pode ser benéfico para o tratamento de danos do miocárdio associados com diabetes tipo-1.

1.2. 1,2,4-triazol

Propriedades antioxidantes de novos derivados 1,2,4-triazol (**Figura 2**) foram estudadas utilizando um sistema modelo de estresse oxidativo de eritrócitos, mostrando que essas substâncias são capazes de exibir as propriedades de estabilização da membrana em condições de stress oxidativo em eritrócitos (KOCHIKYAN et al., 2011). Em 2013, MADILLA et al. sintetizaram uma nova classe de 1,2,4-triazol ligado ao grupo tieno-[2,3-d]-pirimidina, os quais demonstraram potente atividade antioxidante. No mesmo ano, GUMRUKCUOGLU et al. evidenciaram que novos derivados bis-1,2,4-triazol podem ser considerados inibidores de elastase, urease e captadores de radicais livres, podendo ser utilizados como fonte de antioxidante, antielastase, antibacteriana e antiurease em indústrias agrícolas, farmacêuticas e cosméticas.

Figura 2 – Estrutura química do núcleo 1,2,4-triazol



Fonte: próprio autor.

Novos derivados 1,2,4-triazol mostraram potente atividade antifúngica e antioxidante (SANCAK et al., 2012; AOUALI et al., 2015). Outros estudos relataram atividades antimicrobiana e antitumoral para diferentes derivados 1,2,4-triazóis (DEMIRBAS et al., 2004; PARDESHI e BOBADE, 2011; HAMDY et al., 2013). Derivados triazólicos incorporados com piridazinonas demonstraram atividade anti-hipertensiva (SIDDIQUI et al., 2011).

1.3. Atividade antioxidante

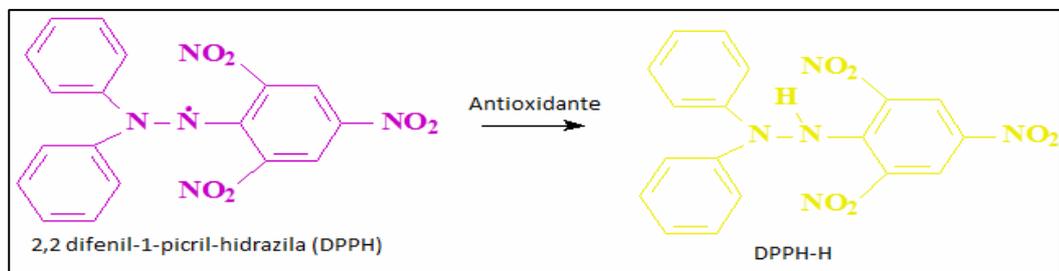
O estresse oxidativo decorre de um desequilíbrio entre substâncias oxidantes e a atuação dos sistemas de defesa antioxidante. A geração de radicais livres e/ou espécies reativas não radicalares resulta do metabolismo de oxigênio. A mitocôndria, por meio da cadeia transportadora de elétrons, é a principal fonte geradora. O sistema de defesa antioxidante tem a função de inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação dos radicais livres e/ou espécies reativas não radicalares (BARBOSA, 2010 (A)).

As evidências científicas sugerem que o estresse oxidativo desempenha um papel chave no aparecimento de doenças crônicas, tais como as doenças cardiovasculares, obesidade, diabetes, distúrbios da coagulação, aterosclerose, hipertensão, entre outras (GOTTLIEB et al, 2010).

Antioxidantes são substâncias naturais ou sintéticas que diminuem a velocidade da oxidação, através de um ou mais mecanismos, tais como inibição de radicais livres ou complexação de metais (PIETTA, 2000).

Entre os métodos existentes de avaliação da atividade antioxidante, destaca-se o método de sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH•) como um dos mais utilizados. A molécula de DPPH é um radical livre estável em virtude da deslocalização do elétron desemparelhado por toda a molécula, o que confere uma coloração violeta à molécula. Este método é baseado na medida da capacidade de uma determinada substância em sequestrar o radical (doando átomo de hidrogênio), reduzindo-o a hidrazina, havendo mudança na coloração de violeta a amarelo pálido, como demonstrado na **Figura 3** (ALVES et al., 2010).

Figura 3 – Reação de redução do DPPH



Fonte: próprio autor.

1.4. Tuberculose

A tuberculose é uma doença infecto contagiosa, causada pelo micro-organismo *Mycobacterium tuberculosis*, também chamado de bacilo de Koch (BK), o qual se propaga através do ar, por meio de gotículas contendo os bacilos, expelidos por uma pessoa doente ao tossir, espirrar ou falar em voz alta. Quando estas gotículas são inaladas por pessoas saudáveis, provocam a infecção tuberculosa e o risco de desenvolver a doença (Secretaria de Políticas de Saúde, 2002).

A infecção tuberculosa significa que os bacilos estão presentes no corpo da pessoa, mas o sistema imunológico os mantém sob controle, produzindo células chamadas macrófagos que fagocitam os bacilos e formam uma “barreira”, o granuloma, que mantém os

bacilos sob controle. Uma vez infectada, a pessoa pode desenvolver a doença tuberculose em qualquer fase da vida. Isto acontece quando o sistema imunológico não pode mais manter os bacilos “sob controle” e eles se multiplicam rapidamente (Secretaria de Políticas de Saúde, 2002).

O tratamento usual contra a tuberculose utiliza a associação das drogas rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol por dois meses de duração, seguida pela associação rifampicina e isoniazida na fase de manutenção. A combinação da dose fixa etambutol, isoniazida, rifampicina e pirazinamida também é recomendada pela Organização Mundial da Saúde. A utilização de um único medicamento é contraindicada pelo risco de resistência bacteriana (Ministério da Saúde, 2010).

O recente surgimento de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), multidroga resistentes (TB-MDR) e o surgimento de cepas de resistência estendida (TB-XDR) têm dificultado o controle da tuberculose. Assim sendo, há uma exigência no desenvolvimento de novas substâncias ativas contra essa doença (MOREIRA, CRODA e FORMAGIO, 2015).

Novos derivados sintetizados contendo o núcleo 1,2,3-triazol apresentaram atividade anti-*Mycobacterium tuberculosis* (THOMAS et al., 2011; YEMPALA et al., 2014; SURINENI et al., 2015). Em 2011, KAKWANI et al. sintetizaram substâncias contendo o núcleo 1,2,4-triazol que apresentaram atividade anti-micobacteriana.

2. Objetivos

O objetivo deste estudo foi a síntese e a avaliação das atividades anti-*Mycobacterium tuberculosis* e antioxidante da nova substância 3-(3,4,5-trihidroxifenil-4-*N*-amino-5-metiltilio)-1,2,4-triazol, a partir do AG comercial.

3. Justificativa

O AG possui várias propriedades farmacológicas e biológicas importantes, entre elas, ressalta-se a atividade antioxidante. Substâncias com o grupo triazol apresentaram várias atividades farmacológicas, entre elas, a atividade anti-micobacteriana. Além disso, o isolamento do metil galato a partir do extrato metanólico de *Schinus terebinthifolius* feito anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa e o potencial biológico do grupo galoil nos conduziu a desenvolver novos derivados do AG.

Desta forma, com a expectativa de que a modificação estrutural melhore as atividades farmacológicas da molécula, neste estudo foi proposto a incorporação do grupo 1,2,4-triazol-tio-metil ao núcleo galoil.

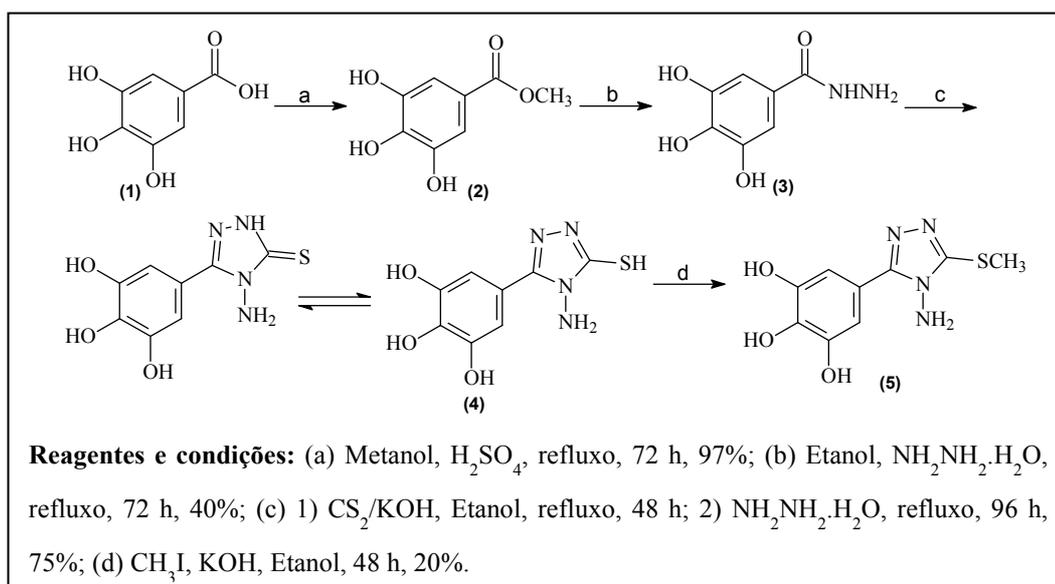
CAPÍTULO II

4. Metodologia

O estudo foi realizado no Laboratório de Plantas Medicinais da Faculdade de Ciências Agrárias (FCA) da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD).

A obtenção da substância 3-(3,4,5-trihidroxifenil)-4-*N*-amino-5-metiltio-1,2,4-triazol (5) foi desenvolvida pela seguinte rota sintética (**Figura 4**). As quatro etapas reacionais foram desenvolvidas utilizando-se uma aparelhagem de refluxo, tendo o AG comercial como reagente de partida.

Figura 4 – Rota sintética para a preparação da substância tio-metil (5).



Fonte: próprio autor.

5. Procedimento

5.1. Síntese do galato de metila (2)

A esterificação do AG (1) foi feita a partir de uma solução de AG obtido comercialmente (2,0 g ou 11,76 mmol) em metanol (100 mL), misturada com 20 gotas de ácido sulfúrico concentrado e mantida sob refluxo e agitação por 72 h. Após esse período a substância foi neutralizada com uma solução de bicarbonato de sódio 5% e posteriormente

extraído com acetato de etila, seco com sulfato de sódio e a fração orgânica foi submetida a rota-evaporação para remoção do solvente (VOGEL, 1957).

5.2. Síntese do galoil hidrazida (3)

Aproximadamente 5,40 mL de hidrazina hidratada foi adicionada a uma solução do galato de metila (2) (1,27 g ou 6,90 mmol) em etanol (93 mL), mantida sob refluxo por aproximadamente 72 h e o precipitado obtido foi lavado com etanol (SAVARIZ, 2010).

5.3. Síntese do intermediário 1,2,4-triazol (4)

À uma solução fria de hidróxido de potássio 0-5°C (0,085 g ou 1,49 mmol) e galoil hidrazida (3) (0,180 g ou 0,98 mmol) em etanol (25 mL) foi adicionado, gota-a-gota, dissulfeto de carbono (90 µL ou 1,49 mmol) sob agitação. A mistura reacional foi submetida a refluxo por 48 h, e depois de resfriada, diluída com 30 mL de éter etílico. O precipitado formado foi coletado por filtração a vácuo, lavado com éter etílico. Ao precipitado formado adicionou-se hidrazina hidratada (20 mL) e a solução foi submetida a refluxo por 96 h. Após esse período, a mistura reacional foi diluída com 20 mL de água gelada e acidificada com ácido clorídrico concentrado para a precipitação do produto. O produto (4) foi extraído com acetato de etila e evaporado em evaporador rotativo. (FORMAGIO, 2008).

5.4. Síntese do derivado 1,2,4-triazol-substituído-tio-metil (5)

A uma suspensão do intermediário 1,2,4-triazol (4) (0,085 g ou 0,5 mmol) em etanol (10 mL) foi adicionado, gota a gota a 0 °C, uma solução aquosa de hidróxido de potássio (2 mol/L; 0,50 mL ou 1,0 mmol). A essa mistura, adicionou-se iodeto de metila (0,063 mL ou 1,0 mmol) gota-a-gota, e a solução foi mantida à temperatura ambiente sob agitação por 48 h. Após, 10 mL de água destilada foi adicionada. O solvente foi retirado por evaporador rotativo. A purificação do derivado foi realizada por cromatografia em camada delgada preparativa clorofórmio/metanol 30%. (FORMAGIO, 2008).

5.5. Atividade anti-*M. tuberculosis*

A avaliação da atividade anti-*Mycobacterium tuberculosis* foi realizada em parceria com o Professor Dr. Julio Henrique Rosa Croda e a aluna de mestrado Flora Martinez Figueira Moreira (UFGD-FCS).

- **Preparo das soluções**

A substância foi solubilizada em dimetilsulfóxido (DMSO), obtendo-se uma solução estoque na concentração de 10000 µg/mL.

Foi utilizada a rifampicina (Sigma®) como fármaco de referência na concentração de 10000 µg/mL em DMSO.

A resazurina foi utilizada como solução reveladora em uma concentração de 0,01% em água estéril.

- **Preparo das suspensões bacilares**

Em 200 mL do meio Middlebrook 7H9 (BD®) enriquecido com OADC, um suplemento de crescimento recomendado para isolamento de *Mycobacteria*, (ácido oleico, albumina, dextrose e catalase) (BD®) na proporção de 10:1, respectivamente, foi feita uma suspensão bacilar, utilizando-se uma alíquota de 800 µL da cepa de *M. tuberculosis* congelada a -80° C, obtendo-se uma grande quantidade de massa bacilar. Após aproximadamente 10 dias de incubação a 37° C, a suspensão de micobactéria obtida foi centrifugada a 3000 rpm por 10 min e lavada com água destilada estéril. Ao sedimento obtido foram adicionados 10 mL de água destilada estéril. Alíquotas de 800 µL desta foram adicionadas em tubos que foram congelados a -20° C por duas horas e após este período, armazenados a -80° C até o momento de uso.

A avaliação da população bacilar viável para a cepa *M. tuberculosis* H37Rv – ATCC 27294 foi feita pelo plaqueamento de uma alíquota da suspensão em meio de Middlebrook 7H11 (BD®) enriquecido com OADC, nas seguintes diluições: 10⁻³, 10⁻⁴ e 10⁻⁵. As placas foram incubadas em estufa a 37° C por 28 dias para se realizar a contagem das unidades formadoras de colônias por microlitros (UFC/mL).

- **Determinação da atividade anti-*M. tuberculosis***

Foi utilizada a metodologia padronizada por Palomino (PALOMINO et al. 2002) para a determinação da CIM (Concentração Inibitória Mínima). Em uma microplaca estéril de 96 poços foram depositados diferentes volumes de meio Middlebrook 7H9 enriquecido com OADC (150 µL no controle de esterilidade da substância analisada; 200 µL nos controles negativos (8 réplicas); 100 µL nos controles positivos (8 réplicas) e 100 µL demais orifícios da placa. Em seguida foram realizadas diluições seriadas na própria placa, de forma a se obter concentrações variáveis de rifampicina (de 0,01 a 1,00 µg/mL) e da substância a ser analisada (de 0,98 a 250,00 µg/mL). Para controle de esterilidade, foram depositados 50 µL da

substância teste e do fármaco de referência. A cepa de *M. tuberculosis* H37RV – ATCC 27294 congelada foi diluída até atingir a concentração de 10^5 UFC/mL. Em seguida, foram adicionados 100 μ L da suspensão bacteriana em todos os poços da microplaca, exceto nos controles de esterilidade e negativos. A microplaca foi selada com parafilme e papel alumínio; sendo incubada a 37°C.

Após sete dias de incubação foram adicionados 30 μ L da resazurina diluída em água estéril (0,01%) por toda placa, e depois reincubada a 37°C por 24 h.

Após este período, foi realizada a leitura visual e a interpretação da colorimetria no leitor de microplaca TP-reader (Thermo Plate[®]), no comprimento de onda de 492 nm. A CIM foi determinada com o auxílio de uma planilha do Excel específica (YAPSmappure3).

5.6. Atividade Antioxidante

Foi preparada uma solução estoque de difenil-picril-hidrazil (DPPH) em metanol (0,062 mg/mL). Adicionou-se diferentes concentrações (0,00249; 0,0123; 0,0244; 0,0338; 0,0476; 0,0698; 0,0783 e 0,091 μ g/mL) da substância (5) solubilizada em metanol (0,1 mg/mL) a 2 mL da solução estoque de DPPH e deixou reagir por 30 min no abrigo de luz. A leitura da absorbância foi realizada a 517 nm. A porcentagem de inibição (%I) foi calculada pela equação:

$$\%I = [(A_0 - A_1)/A_0] \times 100$$

Onde: A_0 é a absorbância da solução de DPPH sem adição da substância e A_1 é a média das absorbâncias da solução de DPPH na presença da substância.

A concentração que inibe 50% da oxidação (IC_{50}) foi obtida pela equação da reta do gráfico: %I versus concentração. O antioxidante comercial hidroxitolueno butilado (BHT) foi utilizado como controle positivo. O teste foi realizado em triplicata (BLOIS, 1958).

6. Resultados e Discussão

6.1. Síntese da substância 3-(3,4,5-trihidroxifenil)-4-N-amino-5-metiltio-1,2,4-triazol

A formação da substância tio-metil (5) a partir do AG (1) obteve como intermediários galato de metila (2), galoil hidrazida (3) e 1,2,4-triazol (4) com rendimentos de 97%, 40% e 75% respectivamente, sendo que a obtenção do produto tio-metil (5) mostrou rendimento de 20%. O baixo rendimento obtido na última etapa pode ter sido devido à volatilidade do iodeto de metila, em que seria necessário a utilização de um sistema inerte para a realização da reação, desta forma, os 80% restante permaneceu na forma de substrato.

O acompanhamento de todas as etapas reacionais foi realizado por cromatografia em camada delgada (CCD) eluída com clorofórmio/metanol 30%, utilizando sílica gel como fase estacionária e revelada com vapor de iodo.

As substâncias foram caracterizadas por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e de ^{13}C . Os dados obtidos pelos espectros estão apresentados na **Tabela 1**.

Tabela 1: Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C (300,06 MHz/75,5 MHz, DMSO) para as substâncias 2-5

	Galato de metila (2)		Galoil hidrazida (3)		1,2,4-triazol (4)		1,2,4-triazol-SCH ₃ (5)	
C/H	δ_{H} (mult.; J= Hz)	δ_{C}						
1	-	120,0	-	123,6	-	112,2	-	119,8
2/6	6,98 (s, 2H)	107,5	6,86 (s, 2H)	106,3	6,84 (s, 2H)	105,6	6,88 (s, 2H)	108,4
3/5	-	146,4	-	146,8	-	146,3	-	146,8
4	-	138,7	-	136,6	-	138,4	-	138,0
C=O	-	166,4	-	162,0	-	-	-	-
OCH ₃	3,74 (s, 3H)	52,7	-	-	-	-	-	-
OH	9,39 (sl)	-	9,32 (sl)	-	-	-	9,22 (sl)	-
NH ₂	-	-	4,40 (sl)	-	-	-	4,30 (sl)	-
3'	-	-	-	-	-	162,5	-	161,6
5'	-	-	-	-	-	177,8	-	166,5
SCH ₃	-	-	-	-	-	-	2,53 (s, 3H)	15,7

O espectro de RMN de ^1H apresentou sinais que confirmaram a obtenção do galato de metila (2), pela presença de um singlete em δ_{H} 3,74 ppm com integral para três hidrogênios, atribuído aos hidrogênios metilênicos. Os sinais em δ_{H} 6,98 ppm com integral para dois

hidrogênios, corresponde aos hidrogênios aromáticos H-2/H-6 (**Figura 5**). O espectro de RMN de ^{13}C apresentou sinais na região de δ_{C} 166,4 ppm característico de carbonila de éster e um carbono oximetílico em δ_{C} 52,7 ppm, confirmando a esterificação (**Figura 6**). O mecanismo proposto para essa reação está disposto na **Figura 7**.

Figura 5 – Espectro de RMN de ^1H (300,06 MHz, DMSO-d_6) do galato de metila.

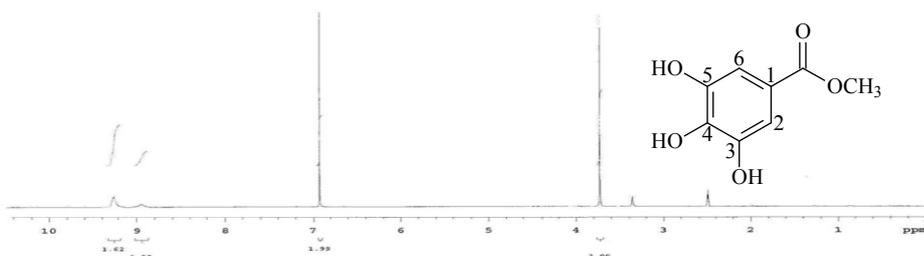


Figura 6 – Espectro de RMN de ^{13}C (75,45 MHz, DMSO-d_6) do galato de metila.

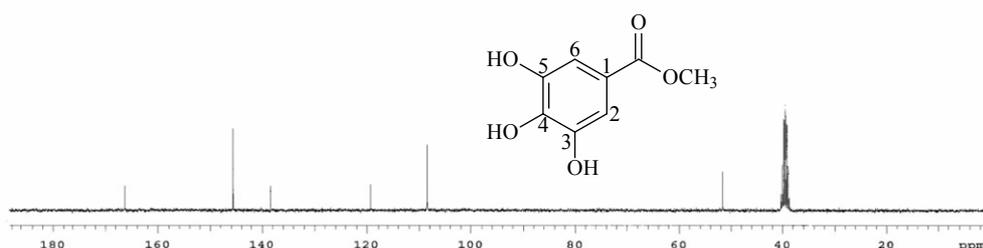
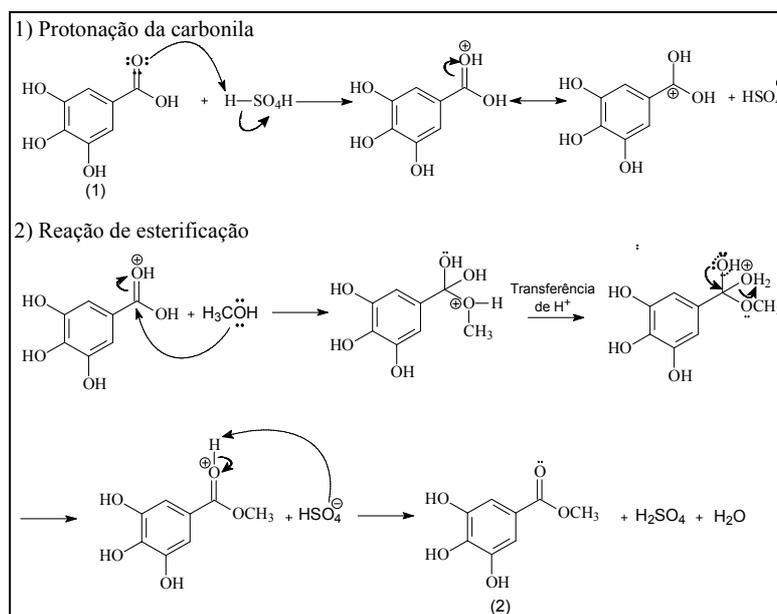


Figura 7 – Mecanismo para a reação de esterificação do AG (1)



Fonte: próprio autor.

A formação do derivado galoil hidrazida (3) foi evidenciada pelos espectros de RMN de $^1\text{H}/^{13}\text{C}$, em que se verificou a ausência dos sinais na região de δ_{H} 3,74 (s, 3H) / δ_{C} 52,7 (OCH₃), referente ao grupo oximetílico (**Figura 8 e 9**). O sinal em δ_{C} 166,4 ppm referente à carbonila e em δ_{H} 4,40 (sl, NH₂) confirmaram a presença do grupo amida no espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 9**). O mecanismo proposto está disposto na Figura 10.

Figura 8 – Espectro de RMN de ^1H (300,06 MHz, DMSO) do derivado galoil hidrazida.

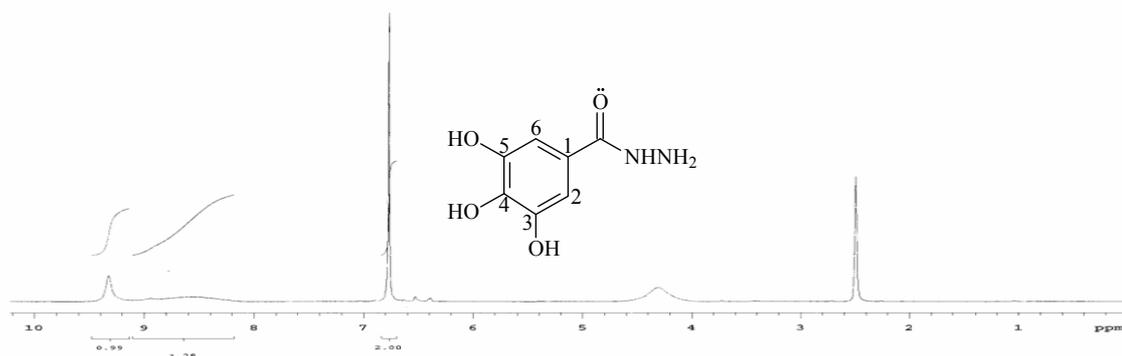


Figura 9 – Espectro de RMN de ^{13}C (75,45 MHz, DMSO-d₆) do derivado galoil hidrazida.

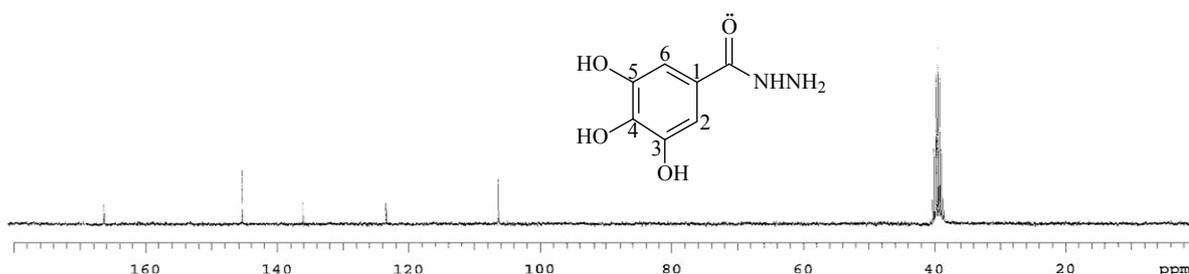
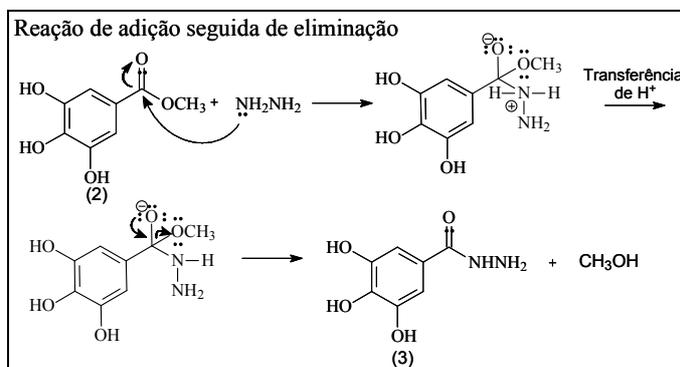


Figura 10 – Mecanismo proposto para a síntese do derivado galoil hidrazida.



Fonte: próprio autor.

A confirmação da formação do intermediário (4) foi feita através do espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 11**) pela presença dos sinais em δ_{C} 162,5 e 177,8 referente aos carbonos C-3' e C-5', confirmando a presença do anel triazol como estrutura tautomérica. O mecanismo proposto para esta síntese está disposto na **Figura 12**.

Figura 11 - Espectro de RMN de ^{13}C (75,45 MHz, DMSO- d_6) do intermediário 1,2,4-triazol

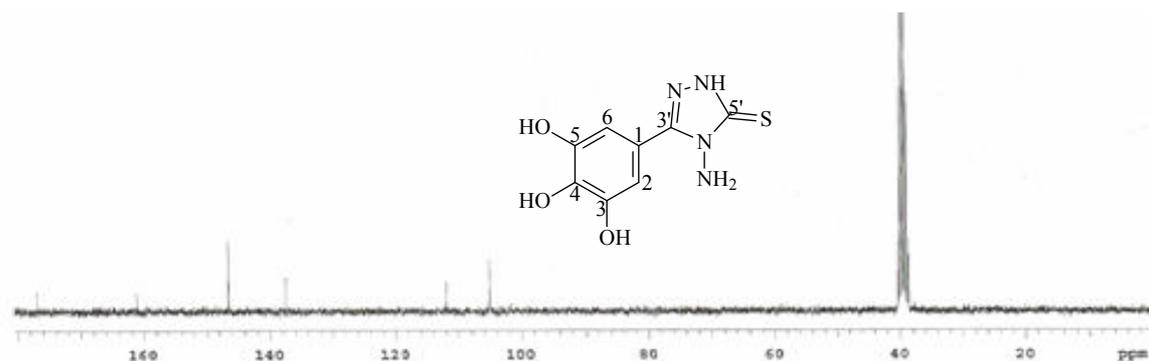
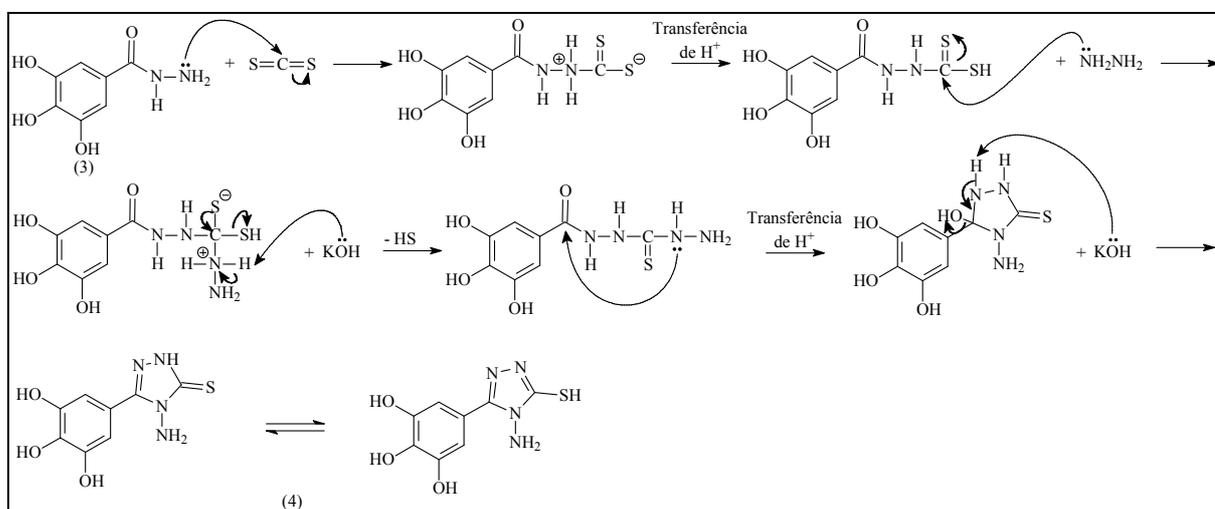


Figura 12– Mecanismo proposto para a síntese do intermediário 1,2,4-triazol.



Fonte: próprio autor.

A formação do 1,2,4-triazol-tio-metil (5) foi confirmada pelos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (**Figura 13 e 14**) pela presença de um singlete em δ_{H} 2,53 (3H) / δ_{C} 15,7 (CH_3), referente ao grupo tio-metil. O mecanismo proposto para esta síntese está disposto na **Figura 15**.

Figura 13 - Espectro de RMN de ^1H (300,06 MHz, DMSO) da substância (5)

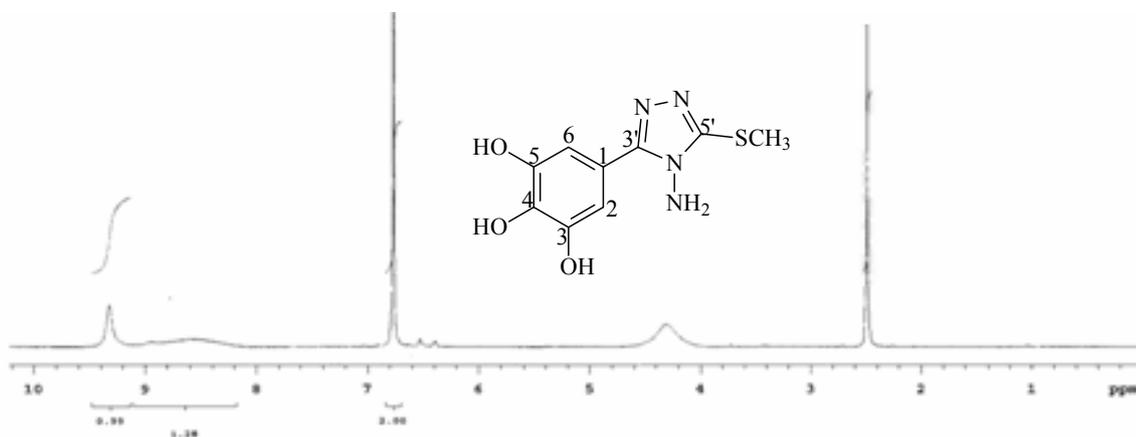


Figura 14 - Espectro de RMN de ^{13}C (75,45 MHz, DMSO- d_6) da substância (5)

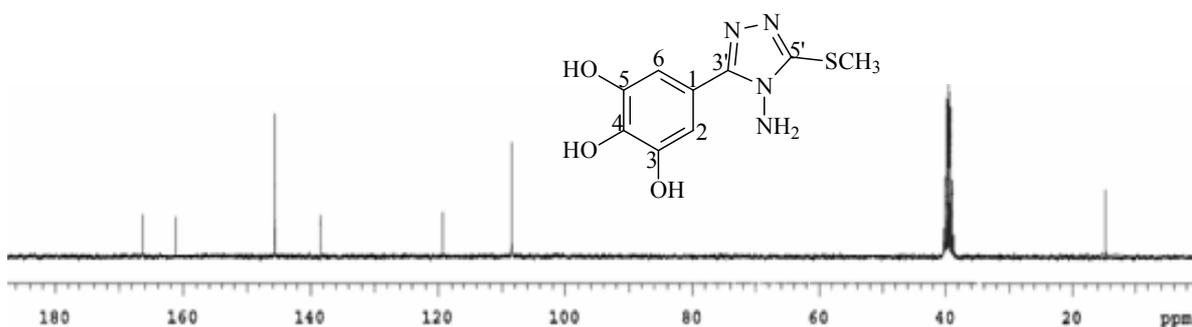
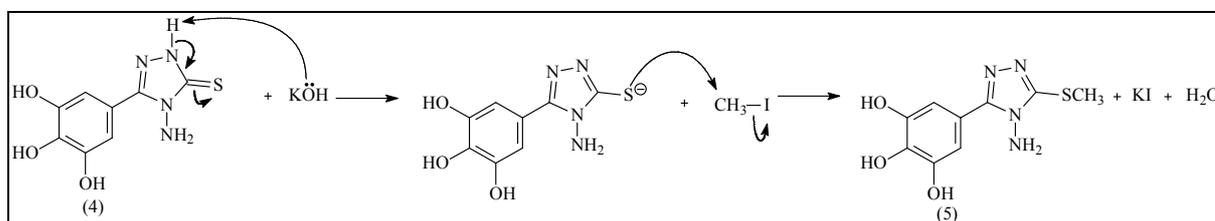


Figura 15 – Mecanismo proposto para a formação da substância (5)



Fonte: próprio autor.

6.2. Avaliação da atividade anti-*Mycobacterium tuberculosis*

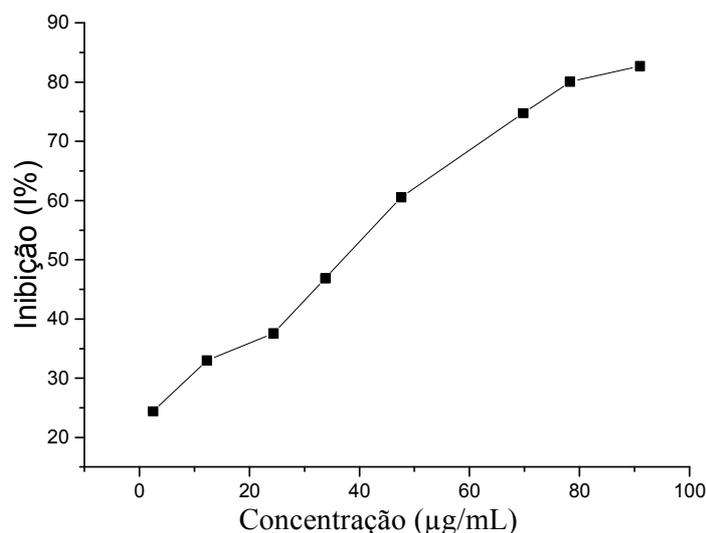
A solução reveladora de rezazurina é um indicador de oxidação-redução que age com resposta colorimétrica para a multiplicação/viabilidade celular. A cor azul representa a

ausência e a rosa representa a presença de multiplicação ou viabilidade celular. Define-se a CIM como a menor concentração da substância que inibe a multiplicação de 90% da cepa de *M. tuberculosis*, ou seja, o quanto da substância é necessário para que a mudança da coloração azul para rosa seja impedida. Substâncias que apresentam CIM < 125 µg/mL são consideradas promissoras contra o *M. tuberculosis*. Através da correlação dos dados de absorvância com a concentração da substância, foi obtida a CIM > 250 µg/mL, portanto a substância foi considerada inativa contra *M. tuberculosis*.

6.3. Avaliação da atividade antioxidante

O método de “sequestro” de radicais livres baseia-se na transferência de elétrons de uma substância antioxidante para um radical livre, o DPPH•, que ao se reduzir, perde sua coloração roxa. A **Figura 16** representa o gráfico (% de Inibição *versus* Concentração) obtido para o 1,2,4-triazol-substituído-tio-metil. A substância apresentou potente atividade antioxidante, atuando no sequestro do radical livre (DPPH•), com valor de IC₅₀ de 37,0 µg/mL, quando comparado ao BHT (IC₅₀ = 16,9 µg/mL).

Figura 16 – Porcentagem de inibição em relação à concentração da substância.



Fonte: próprio autor.

A potente atividade antioxidante, que atua no sequestro do radical livre DPPH•, encontrada para a substância (5), pode ser relacionada aos grupos doadores de próton (OH e NH₂) presentes na estrutura do galoil e do triazol.

Dados ainda não publicados de estudos feitos anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa mostraram que o metil galato (2) e o galoil hidrazida (3) foram mais ativos do que o ácido gálico (IC₅₀ = 6,12 µg/mL), com valores de IC₅₀ = 4,49 e 5,02 µg/mL respectivamente, apresentando assim maior capacidade “sequestradora” de radicais livres.

Porém a substância (5) sintetizada no presente estudo não demonstrou aumento da atividade antioxidante.

CAPÍTULO III

7. Considerações Finais

Conclui-se que o objetivo deste estudo foi alcançado, com a síntese do composto 3-(3,4,5-trihidroxifenil)-4-*N*-amino-5-metiltio-1,2,4-triazol a partir do AG comercial, em quatro etapas, com rendimentos 20-97%. O produto obtido foi inativo (CIM > 250 µg/mL) frente a *Mycobacterium tuberculosis*, porém apresentou potente atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical livre DPPH• (IC₅₀ de 37,0 µg/mL).

O presente estudo possibilitou a participação nos seguintes eventos:

- Apresentação oral no evento X Encontro de Iniciação Científica, VII Salão de Pesquisa Docente, V Mostra de Pós-Graduação (UNIGRAN);
- Apresentação oral, como um dos 5 melhores trabalhos da área de química orgânica no evento I Reunião da Sociedade Brasileira de Química de Mato Grosso do Sul e VIII Semana Integrada da Química (UFGD/UEMS);
- Apresentação em pôster no evento I Reunião da Sociedade Brasileira de Química de Mato Grosso do Sul e VIII Semana Integrada da Química (UFGD/UEMS);
- Apresentação em pôster no II ENEPEX – Encontro de Ensino, Pesquisa e Extensão (UFGD/UEMS).

8. Referências Bibliográficas

ALVES, C. Q.; et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substrates orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.

AOUALI, M.; et al. Synthesis, antimicrobial and antioxidant activities of imidazotriazoles and new multicomponent reaction toward 5-amino-1-phenyl[1,2,4]triazole derivatives. **Med. Chem. Res.**, v. 24, p. 2732-2741, 2015.

BARBOSA, K. B. F. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Ver. Nutr.**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010. (A)

BARBOSA, V. F. Caracterização do perfil da ação do ácido gálico e seus derivados sobre processos oxidativos *in vitro* e *ex vivo*. Araraquara: **UNESP**, 2010. (Dissertação de mestrado). (B)

BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, n. 4617, v. 181, p. 1199-1200, 1958.

BRUN, P.; CASTAGLIUOLO I.; PINZANI, M.; PALÙ G.; MARTINES, D. Exposure to bacterial cell wall products triggers an inflammatory phenotype in hepatic stellate cells. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 289, n. 3, p. 571-578, 2005.

DEMIRBAS, N.; et al. Synthesis and antimicrobial activities of some new 1-(5-phenylamino-[1,3,4]thiadiazol-2-yl)methyl-5-oxo-[1,2,4]triazole and 1-(4-phenyl-5-thioxo-[1,2,4]triazol-3-yl)methyl-5-oxo-[1,2,4]triazole derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 39, p. 793-804, 2004.

FORMAGIO, A. S. N.; et al. Synthesis and antitumoral activity of novel 3-(2-substituted-1,3,4-oxadiazol-5-yl) and 3-(5-substituted-1,2,4-triazol-3-yl) β -carboline derivatives. **Bioorg. Med. Chem.**, n. 22, v. 16, p. 9660-9667, 2008.

GOTTLIEB, M. G. V.; et al. Estresse oxidativo como fator de risco cardiometabólico emergente. **Scientia Medica**, v. 20, n. 3, p. 243-249, 2010.

GUMRUKCUOGLU, N.; et al. Synthesis, antibacterial, antielastase, antiurease and antioxidant activities of new 1,4-butylene bridged bis-1,2,4-triazole derivatives. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 28, n. 1, p. 89-94, 2013.

HAMDY, R.; et al. Synthesis and evaluation of 3-(benzylthio)-5-(1H-indol-3-yl)-1,2,4-triazol-4-amines as Bcl-2 inhibitory anticancer agentes. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, p. 2391–2394, 2013.

HSU, C.; LO, W.; YEN, G. Gallic acid induces apoptosis in 3T3-L1 pre-adipocytes via a Fas- and mitochondrial-mediated pathway. **J. Agric. Food Chem.**, v. 55, p. 7359-7365, 2007.

JI, B.; et al. Gallic acid induces apoptosis via caspase-3 and mitochondrion-dependent pathways *in vitro* and suppresses lung xenograft tumor growth *in vivo*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 16, p. 7596-7604, 2009.

KAKWANI, M. D.; et al. Synthesis and preliminary biological evaluation of novel N-(3-aryl-1,2,4-triazol-5-yl) cinnamamide derivatives as potential antimycobacterial agents: An operational Topliss Tree approach. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, p. 6523–6526, 2011.

KAUR, M.; VELMURUGAN, B.; RAJAMANICKAM, S.; AGARWAL, R.; AGARWAL, C. Gallic acid, an active constituent of grape seed extract, exhibits antiproliferative, pro apoptotic and anti-tumorigenic effects against prostate carcinoma xenograft growth in nude mice. **Pharm. Res.**, v. 26, p. 2133–2140, 2009.

KOCHIKYAN, T. V. et al. Synthesis and antioxidant activity of new 1,2,4-triazole derivatives. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 44, n. 10, 2011.

KROES, B. H.; VAN DEN BERG, A. J. J.; QUARLES VAN UFFORD, H. C.; VAN DIJK, H.; LABADIE, R. P. Anti-inflammatory activity of gallic acid. **Planta Med.**, v. 58, p. 499-504, 1993.

LIU, Z. Gallic acid as a cancer-selective agent induces apoptosis in pancreatic cancer cells. **Chemotherapy**, v. 58, p. 185-194, 2012.

MADDILA, S. et al. Synthesis and antioxidant activity of 1-2-4-triazole linked thieno[2,3-d]pyrimidine derivatives. **Letters in Drug Design & Discovery**, v. 10, p. 186-193, 2013.

MOREIRA, F. M. F.; CRODA, J.; FORMAGIO, A. S. N. Síntese e atividade anti-*Mycobacterium tuberculosis* de novos derivados β -carbólicos. **51 MedTrop**, 2015.

Ministério da Saúde. **Formulário Terapêutico Nacional**. 2 ed. Brasília-DF, 2010.

OW, Y.Y.; STUPANS, I. Gallic acid and gallic acid derivatives: effects on drug metabolizing enzymes. **Curr. Drug. Metab.**, v.4, n.3, p. 241-248, 2003.

PARDESHI, S.; BOBADE, V. D. Synthesis and biological evaluation of some novel triazol-3-ones as antimicrobial agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, p. 6559–6562, 2011.

PALOMINO, J. C.; MARTIN, A.; CAMACHO, C.; 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.

PATEL, S. S.; GOYAL, R. K. Cardioprotective effects of gallic acid in diabetes-induced myocardial dysfunction in rats. **Pharmacognosy Research**, v. 3, n. 4, p. 239-245, 2011.

PAOLINI, A.; et al. Gallic acid exerts a protective or an anti-proliferative effect on glioma T98G cells via dose-dependent epigenetic regulation mediated by miRNAs. **International Journal of Oncology**, p. 1491-1497, 2015.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **J. Nat. Prod.**, v. 63, n. 7, p. 1035-1042, 2000.

SANCAK, K.; et al. Synthesis, characterization, and antioxidant activities of new trisubstituted triazoles. **Turk. J. Chem.**, v. 35, p. 457-466, 2012.

SAVARIZ, F. C.; et al. Synthesis, antitumor and antimicrobial activity of novel 1-substituted phenyl-3-[3-alkylamino(methyl)-2-thioxo-1,3,4-oxadiazol-5-yl] β -carboline derivatives. **J. Braz. Chem. Soc.**, n.2, v.21, p. 288-298, 2010.

SCHUSTER, A. D. Efeitos antifibróticos de ácido gálico em células estreladas hepáticas ativadas. Porto Alegre: **PUCRS**, 2013. (Dissertação de mestrado)

Secretaria de Políticas de Saúde. **Departamento de Atenção Básica. Manual técnico para o controle da tuberculose: cadernos de atenção básica**. 6. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2002.

SIDDIQUI, A. A.; et al. Triazole incorporated pyridazinones as a new class of antihypertensive agents: Design, synthesis and *in vivo* screening. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, p. 1023–1026, 2011.

SURINENI, G.; et al. Rational design, synthesis and evaluation of novel-substituted 1,2,3-triazolylmethyl carbazoles as potent inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis*. **Med. Chem. Res.**, v. 24, p. 1298–1309, 2015.

THOMAS, K. D.; et al. New quinolin-4-yl-1,2,3-triazoles carrying amides, sulphonamides and amidopiperazines as potential antitubercular agentes. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 2503-2512, 2011.

VOGEL, A. I. **A Textbook of Practical Organic Chemistry**, 3 ed.; Wiley: New York, USA; p. 538–539, 1957.

YEMPALA, T.; et al. Rational design and synthesis of novel dibenzo[b,d]furan-1,2,3-triazole conjugates as potent inhibitors of Mycobacterium tuberculosis. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 71, p. 160-167, 2014.