

**SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y ESTUDIO *IN VITRO*  
DE N'-[(1E)-(2-HIDROXI-3-  
METOXIBENCILIDENO)PIRAZINA-2-  
CARBOHIDRAZIDA FRENTE A *MYCOBACTERIUM*  
*TUBERCULOSIS* H37R<sub>v</sub> y DM97**

Christian M. Aliaga Paucar<sup>a</sup>, Rocio I. Ramirez Panti<sup>a</sup>, Maihuiri Vargas Hugo G.<sup>a</sup>,  
Patricia Sheen Cortovaria<sup>b</sup>, Mirko Zimic Peralta<sup>b</sup>, Ana C. Valderrama Negron<sup>\*a</sup>

**RESUMEN**

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa causada por *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), donde la pirazinamida (PZA) es un fármaco de primera línea utilizado en su tratamiento. Nuevas propuestas de fármacos son urgentes, dada la mayor resistencia a antimicrobianos como la PZA. En este trabajo, hemos sintetizado y caracterizado la N'-[(1E)-(2-Hidroxi-3-metoxibencilideno) pirazina-2-carbohidrazida (C3), para evaluar su actividad antituberculosa *in vitro* en MTB H37R<sub>v</sub> (cepa sensible) y DM97 (cepa resistente a PZA). El compuesto C3 fue sintetizado y caracterizado por Análisis elemental, UV-Vis, FT-IR y RMN <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C. El compuesto C3 es una hidrazona derivada de PZA. En el ensayo de microplaca de tetrazolio (TEMA) realizado en MTB H<sub>37</sub>R<sub>v</sub> a pH 6,0 y 6,8, se encontró que PZA tiene mayor actividad antituberculosa que C3 en H37R<sub>v</sub>, sin embargo, en DM97, C3 (MIC = 64 µg/mL a pH 6,0; MIC = 256 µg/mL a pH 6,8) presentó mayor actividad antituberculosa que PZA (MIC > 800 µg/mL a pH 6,0; MIC > 800 µg/mL a pH 6,8), lo que demuestra el potencial antituberculoso de C3 frente a esta cepa resistente a PZA.

**Palabras clave:** *Mycobacterium tuberculosis*, antituberculosos, hidrazona, TEMA.

**SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND *IN VITRO*  
STUDY OF N'-[(1E)-(2-HYDROXY-3-  
METHOXYBENZYLIDENE)PYRAZINE-2-  
CARBOHYDRAZIDE AGAINST *MYCOBACTERIUM*  
*TUBERCULOSIS* H37R<sub>v</sub> AND DM97**

**ABSTRACT**

Tuberculosis is an infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), where pyrazinamide (PZA) is a first-line drug used in its treatment. New drug proposals are urgently needed, given the increased resistance to antimicrobials such as PZA. In this

---

<sup>a\*</sup> Laboratorio de Investigación en Biopolímeros y Metalofármacos (LIBIPMET), Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Ingeniería, Av. Túpac Amaru 210, Rímac, Lima, Perú, \*anitacvn29@yahoo.com.mx

<sup>b</sup> Unidad de Bioinformática y Biología Molecular, Laboratorios de Investigación y Desarrollo, Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Av. Honorio Delgado 430, SMP, Lima, Perú

work, we have synthesized and characterized *N'*-[(1*E*)-(2-Hydroxy-3-methoxybenzylidene)pyrazine-2-carbohydrazide (C3), to evaluate its *in vitro* antituberculosis activity in MTB H37Rv (sensitive strain) and DM97 (PZA-resistant strain). C3 was synthesized and characterized by elemental analysis, UV-Vis, FT-IR and <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C NMR. The compound C3 is a hydrazone derivative of PZA.

In the tetrazolium microplate assay (TEMA) performed on MTB H37Rv at pH 6.0 and 6.8, PZA was found to have greater antituberculosis activity than C3 in H37Rv, however, in DM97, C3 (MIC = 64 µg/mL at pH 6.0; MIC = 256 µg/mL at pH 6.8) presented greater antituberculosis activity than PZA (MIC > 800 µg/mL at pH 6.0; MIC > 800 µg/mL at pH 6.8), which demonstrates the antituberculosis potential of C3 against this PZA-resistant strain.

**Keywords:** *Mycobacterium tuberculosis*, antituberculosis, hydrazone, TEMA.

## INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una infección causada por *Mycobacterium tuberculosis* (MTB). Según el informe del año 2023 dado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) sobre la tuberculosis, el número de personas tratadas contra la tuberculosis ha aumentado de 10,3 millones en el 2021 a 10,6 millones en el 2022. Aproximadamente 1,3 millones de personas que padecían tuberculosis en todo el mundo murieron en el 2022. La tuberculosis es considerada la enfermedad infecciosa más peligrosa del mundo <sup>1</sup>. Una de las causas del aumento de los casos de tuberculosis ha sido la aparición de la tuberculosis multirresistente (MDR-TB) y la tuberculosis extremadamente resistente a los fármacos (XDR-TB), lo que ha dejado a muchos pacientes sin otras opciones de tratamiento<sup>2</sup>. Según el Ministerio de Salud de Perú (MINSa), en el 2019 se reportaron 23282 casos de morbilidad de TB, 20546 nuevos casos de TB, 1147 nuevos casos de MDR-TB y 76 nuevos casos de XDR-TB<sup>3</sup>. La pirazinamida (PZA) es un profármaco y un análogo estructural de la nicotinamida, utilizado como fármaco de primera línea en el tratamiento de la tuberculosis, debido a su excelente efecto esterilizante sobre los bacilos tuberculosos en estado semilátente o latente<sup>4</sup>. Se sabe que la PZA se convierte en su forma activa, el ácido pirazinoico (POA), por la acción de la enzima pirazinamidasa (PZasa). Sin embargo, el mecanismo de acción y la resistencia a la PZA no están completamente dilucidados. Se han documentado muchas mutaciones en el *gen pncA*, responsable de la síntesis de PZasa, que es probablemente la principal razón de la resistencia frente a PZA<sup>4</sup>. Las hidrazonas son bases de Schiff (-CH-N-NH-C=O-) que han atraído especial atención de los investigadores en los últimos años debido a su conocida capacidad de quelación y flexibilidad estructural<sup>5</sup>, así como a sus actividades biológicas y farmacológicas en algunas enfermedades, incluida la tuberculosis. Teniendo en cuenta la alta resistencia a la PZA que existe en el tratamiento de la TB, existe la necesidad de evaluar nuevos fármacos frente al estado latente de la MTB. En el presente trabajo, se realizó la síntesis y caracterización del *N'*-[(1*E*)-(2-Hidroxi-3-metoxibencilideno)pirazina-2-carbohidrazida (C3), un derivado de PZA unido covalentemente a un grupo hidrazona. Además, se realizaron pruebas biológicas *in vitro* frente a cepa sensible (MTB H37Rv) y cepa resistente (MD97) para evaluar su actividad en MTB. Es importante mencionar que Wang en el 2019 sintetizó y cristalizó el compuesto C3 monohidratado por otra metodología de síntesis, realizó estudios de DR-X de monocristal mostrando la estructura tridimensional,

pero no realizó la caracterización espectroscópica, ni evaluó su actividad antituberculosa para cepas sensibles H37Rv (ATCC 27294) o cepas resistentes (DM97)<sup>6</sup>.

## PARTE EXPERIMENTAL

Todos los productos químicos fueron comprados a Sigma-Aldrich. Los solventes eran de grado espectroscópico. Los puntos de fusión se determinaron con el kit Thermo Fisher Scientific IA9100. El análisis elemental se determinó utilizando un analizador elemental EAI Exeter Analytical CE-440. Los espectros electrónicos se registraron en un espectrofotómetro UV-Vis Shimadzu UV1800 utilizando una celda de cuarzo de 1 cm a temperatura ambiente en un rango de 200-400 nm. Los espectros infrarrojos se registraron con gránulos KBr en el rango de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$  en un espectrofotómetro Shimadzu FT-IR Prestige 21. El espectro de RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C se obtuvo utilizando un espectrómetro Bruker Ascend de 500 MHz con *d*<sub>6</sub>-dimetilsulfóxido (DMSO-*d*<sub>6</sub>) como disolvente y tetrametilsilano (TMS) como patrón interno ( $\delta\text{H}=0,0$  ppm) a temperatura ambiente.

### Síntesis de pirazin-2-carbohidrazida (2)

Se añadió hidracina monohidratada (1,77 mL, 1,81 g, 36,2 mmol) a una solución etanólica de 5 mL de metilpirazina-2-carboxilato (1) (0,5 g, 3,62 mmol). La mezcla se agitó durante 2 h a temperatura ambiente. El disolvente se retiró a presión reducida y el residuo se purificó mediante lavado con Et<sub>2</sub>O frío (20 mL) para obtener el producto (2) sólido<sup>7</sup>.

### Síntesis de *N'*-[(1*E*)-(2-Hidroxi-3-metoxibencilideno)pirazin-2-carbohidrazida (C3)

La pirazina-2-carbohidrazida (2) (0,138 g, 1 mmol) se disolvió en 10 mL de etanol, luego se añadieron lentamente 5 mL de solución etanólica de 2-Hidroxi-3-metoxibenzaldehído (0,152 g, 1 mmol) y 4 gotas de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 6 M y la mezcla se calentó a 40 °C durante 2 horas. Posteriormente, se dejó enfriar hasta la precipitación de un sólido insoluble (C3), luego se filtró, lavó con etanol y se recristalizó con DMF, este procedimiento de síntesis es diferente al reportado por Zhaodong (2019)<sup>4</sup>.

### Evaluación antimicrobiana

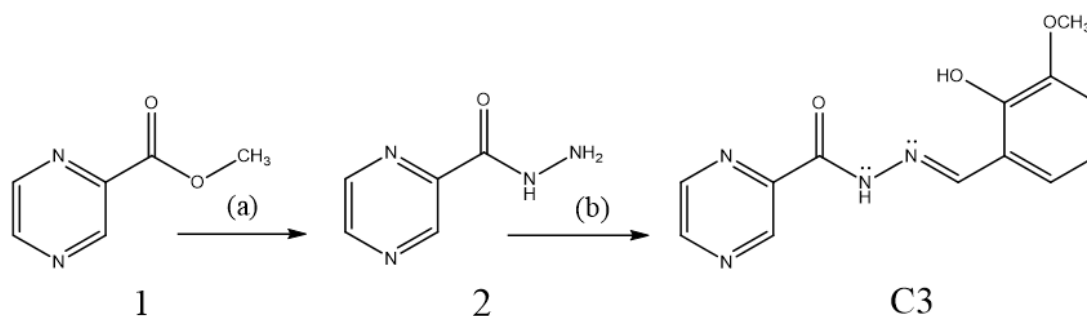
La prueba de susceptibilidad a la pirazinamida (PZA) de las cepas de MTB H37Rv y DM97 se realizó en un laboratorio de bioseguridad de nivel III utilizando el ensayo de microplaca de tetrazolio (TEMA) para la viabilidad celular (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5difeníl-tetrazolio) (Aldrich Chemical Co., Milwaukee, Wis.), que se basa en el cambio de color de amarillo a azul mediante la reducción de bromuro de tetrazolio en células viables<sup>8</sup>. Mediante esta técnica, se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los fármacos por triplicado a pH 6,0 y 6,8. Las soluciones de PZA y C3 se esterilizaron por filtración (22  $\mu\text{m}$ ) y se mezclaron con el medio 7H9. Los controles fueron cultivos de MTB no tratados. Para el inóculo se preparó la suspensión de MTB a partir de un cultivo primario en medio agar 7H10 previamente incubado durante 3-4 semanas. La masa bacteriana se cosechó en un tubo de vidrio con 100  $\mu\text{L}$  de Tween 80 al 10% y perlas de vidrio de 3 mm de diámetro. Después de la homogeneización con vortex, la turbidez se ajustó a la escala McFarland #1 ( $3 \times 10^8$  UFC/mL) con medio 7H9. Finalmente, la cepa McFarland #1 se diluyó 1:25 en medio

7H9. Por cada pozo se transfirieron 100  $\mu\text{L}$  de suspensión MTB 1:25. Las microplacas se colocaron en bolsas Ziploc y se incubaron a 37 °C durante 6 días para el cultivo a pH 6.8 y 10 días para el cultivo a pH 6. Se añadieron cincuenta microlitros de un tetrazolio a un pocillo de control. Las placas se reincubaron a 37 °C durante 24 h. Si el pocillo de control se volvía azul, la mezcla de reactivos se añadía a todos los pocillos de la microplaca. Las microplacas las incubamos durante 24 h adicionales a 37 °C, y se registraron los colores de todos los pocillos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Síntesis del compuesto C3

El compuesto C3 se obtuvo por la condensación de pirazina-2-carbohidrazida con 2-hidroxi-3-metoxibenzaldehído (Figura1).



**Figura 1.** Condiciones de síntesis; a) Hidracina monohidrato (98%), EtOH y b) 2-Hidroxi-3-metoxibenzaldehído, EtOH,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (6 M).

**Fuente:** Elaboración propia

### Pirazin-2-carbohidrazida (2)

Sólido blanco. 85% de rendimiento. Punto de fusión 158-159°C. IR (KBr): 3382, 3087, 3060, 1718, 1638, 1262  $\text{cm}^{-1}$ . RMN- $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ (ppm): 4,56 (s, 2H,  $\text{NH}_2$ ); 8,69 (dd, 1H,  $J = 1,5$  y 2,6 Hz, H-5); 8,82 (d, 1H,  $J = 2,6$  Hz, H-6); 9,12 (d, 1H,  $J = 1,5$  Hz, H-3); 10,11 (s, 1H, CONH). RMN- $^{13}\text{C}$  (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ (ppm): 143,7 (C-5); 144,0 (C-3); 145,4 (C-2); 147,8 (C-6); 162,0 (CONH).

### N'-[(1E)-(2-Hidroxi-3-metoxibencilideno)pirazin-2-carbohidrazida (C3)

Sólido amarillo. 89% de rendimiento. Punto de fusión 186-187 °C. IR (KBr): 3476, 3424, 3264, 3066, 3013, 1671, 1608, 1574, 1530, 1361, 1410, 1250, 1149  $\text{cm}^{-1}$ . RMN- $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  (ppm): 3,82 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 6,87 (t, 1H,  $J = 7,9$  Hz); 7,05 (dd, 1H,  $J = 1,4$  Hz); 7,12 (dd, 1H,  $J = 7,9$  Hz); 8,80 (dd, 1H,  $J = 2,45$  Hz); 8,85 (s, 1H); 8,93 (d, 1H,  $J = 2,45$  Hz); 9,28 (d, 1H,  $J = 1,5$ Hz); 10,98 (s, 1H, OH); 12,60 (s, 1H, CONH). RMN- $^{13}\text{C}$  (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ (ppm): 159,93; 150,71; 148,44; 148,41; 147,84; 144,78; 144,67; 143,85; 121,49; 119,55; 119,26; 114,52; 56,00.

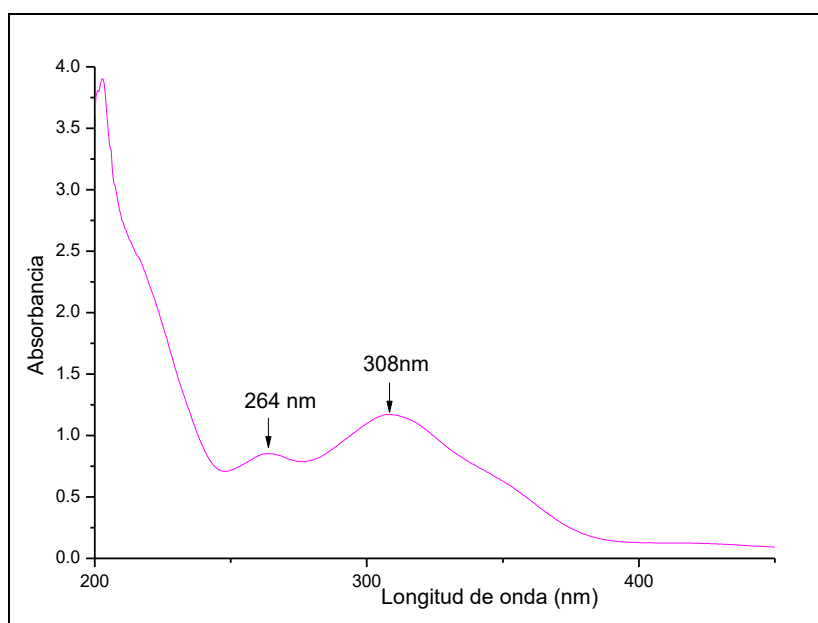
El compuesto C3 es soluble en dimetilsulfóxido (DMSO) y dimetilformamida (DMF), pero insoluble en disolventes polares como el agua, el metanol y el etanol. Las propiedades físicas y analíticas se observan en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Propiedades físicas y analíticas del C3.

Fórmula empírica	Rendimiento (%)	Color	Punto de fusión (°C)	Análisis elemental encontrado (calculado)		
				%C	%H	%N
C <sub>19</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	89	Amarillo	186-187	54,27	4,46	19,15
		claro		(55,35)	(4,44)	(20,08)

### Espectroscopía UV-Visible

El espectro de absorción UV-Vis del compuesto C3 (Figura 2) presenta dos bandas de absorción. La primera, alrededor de 264 nm ( $\pi \rightarrow \pi^*$ ), corresponde a la excitación de los electrones del grupo carbonilo (C=O) y al anillo aromático de la pirazina (C=N). El segundo pico alrededor de 308 nm (transición  $n \rightarrow \pi^*$ ) corresponde a la excitación de los electrones no enlazantes del átomo de O (grupo carbonilo) y del átomo de N (pirazina en anillo). La señal de esta última transición se extiende hasta alrededor de 400 nm, debido a la presencia de la transición  $n \rightarrow \pi^*$  del grupo hidrazona (NN=C)<sup>9,10</sup>.

**Figura 2.** Espectro UV-Vis del compuesto C3

### Espectroscopía infrarroja

El espectro FT-IR (Figura 3) muestra un pico ancho en el rango de 3300 a 3600  $\text{cm}^{-1}$  que corresponde a la tensión O-H del fenol, otro grupo importante es la presencia de un pico estrecho de intensidad media a 3264  $\text{cm}^{-1}$  que corresponde a la tensión del enlace N-H, así mismo se observa que el carbonilo de la amida (N-C=O) se observa como un pico agudo y estrecho a 1671  $\text{cm}^{-1}$ . También se observa otras señales importantes a menor número de onda, a 1608  $\text{cm}^{-1}$  se observa una señal de intensidad media propio de la tensión C=N del grupo hidrazona, a 1530  $\text{cm}^{-1}$  se observa una señal intensa producto de

la tensión C=C del grupo fenol y a  $1250\text{ cm}^{-1}$  otra señal intensa que corresponde a la tensión C-O del grupo fenol. Estos resultados concuerdan con lo reportado previamente en la literatura para moléculas de similar estructura<sup>7</sup>.

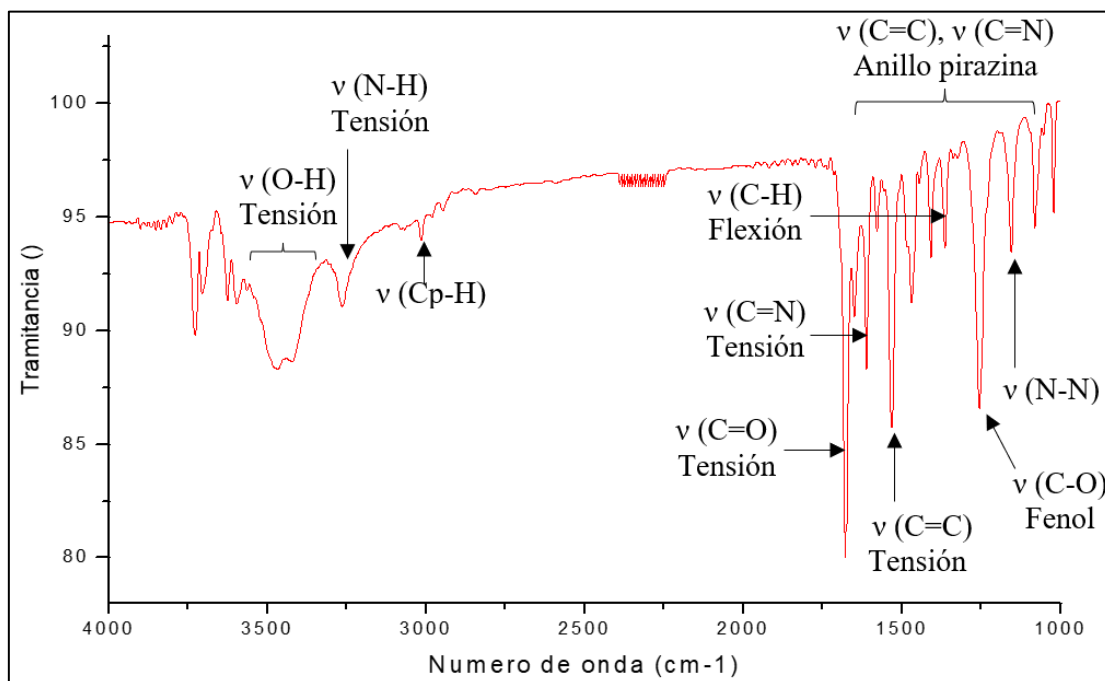
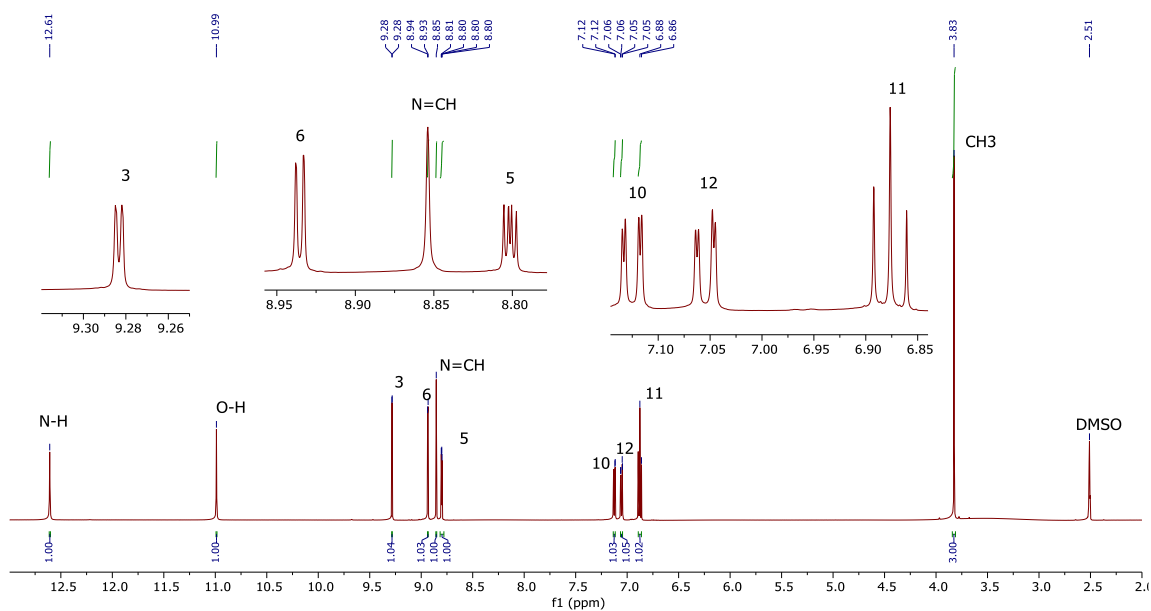


Figura 3. Espectro FT-IR del compuesto C3

### Resonancia Magnética de Nuclear del compuesto C3

El espectro RMN-<sup>1</sup>H del compuesto C3 (Figura 4) muestra a campo bajo las señales del protón del grupo hidrazona ( $\delta = 12,60\text{ ppm}$ , <sup>1</sup>H) y del protón del grupo OH del fenol ( $\delta = 10,98\text{ ppm}$ , <sup>1</sup>H), en ambos casos se observó un singlete porque no tiene átomos de hidrógeno cercanos con los que pueda acoplarse. El anillo pirazina muestra tres señales características a 9,28 ppm (H-3), 8,80 ppm (H-5) y 8,93 ppm (H-6), el cual guarda relación con las *N*-acilhidrazona ya reportadas<sup>11</sup>.

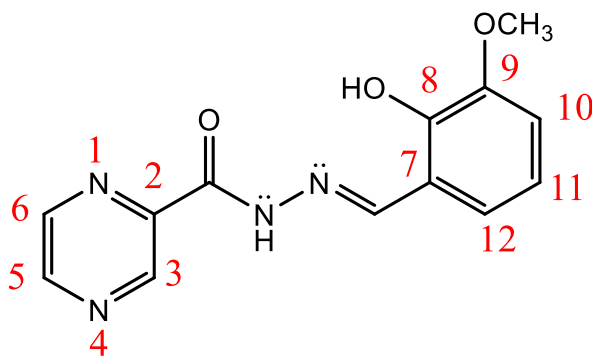
El análisis cuidadoso de los espectros de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto C3 indicó la diastereoselectividad de la etapa de condensación, el cual se evidencia por la presencia de una sola señal de iminohidrógeno (N = CH) para el derivado de *N*-acilhidrazona ( $\delta = 8,85\text{ ppm}$ , 1H), que se atribuyó al diastereoisómero (E) debido a que esta señal característica sale en el rango de 8,32 a 8,82 ppm<sup>12</sup>. Además, es importante mencionar que este tipo de derivado de la *N*-acilhidrazona tiene mayor estabilidad al formar el diastereómero tipo (E)<sup>4,13</sup>. La tabla 2 muestra los desplazamientos químicos ( $\delta$ ), multiplicidad, integral y constante de acoplamiento (*J*) que le corresponden a las diez señales mostradas del espectro de RMN-<sup>1</sup>H.



**Figura 4.** Espectro de RMN- $^1\text{H}$  del compuesto C3 (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).

**Fuente:** Elaboración propia

**Tabla 2.** Señales obtenidas en RMN- $^1\text{H}$  para el compuesto C3 (500 MHz, ppm, DMSO- $d_6$ , J Hz)



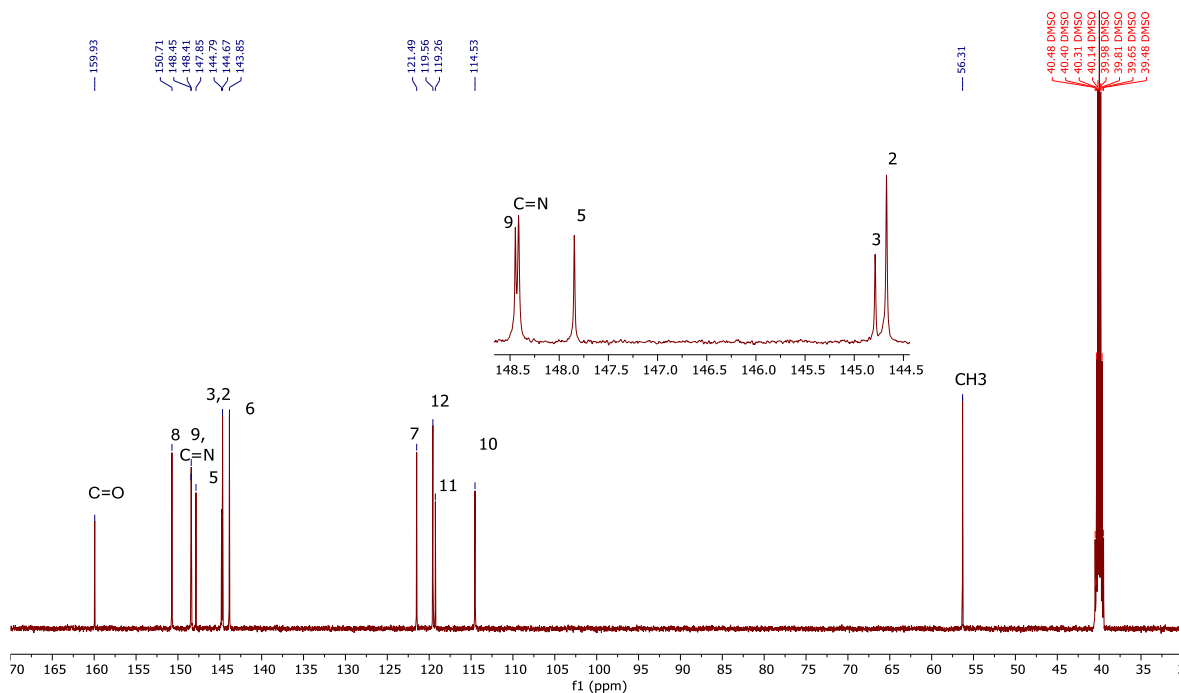
*Numeración de los hidrógenos presentes en el compuesto C3*

N° Hidrógeno	$\delta$ (ppm) Experimental	Multiplicidad	J (Hz)	Integral
N-H	12,603	Singlete	-	1H
O-H	10,989	Singlete	-	1H
3	9,284 9,281	Doblete	$4J_{H3,H5} = 1,50$	1H
6	8,937 8,933	Doblete	$3J_{H6,H5} = 2,45$	1H
N = CH	8,853	Singlete	-	1H
5	8,805	Doble	$3J_{H5,H6} = 2,45$	1H
	8,802			
	8,800	Doblete	$4J_{H5,H3} = 1,50$	
	8,797			
10	7,134	Doble	$3J_{H10,H11} = 7,90$	1H
	7,131			
	7,118	Doblete	$4J_{H10,H12} = 1,40$	
	7,115			
12	7,064	Doble	$3J_{H12,H11} = 7,90$	1H
	7,061			
	7,047	Doblete	$4J_{H12,H10} = 1,40$	
	7,045			
11	6,892	Triplete	$3J_{H11,H10} = 7,90$	1H
	6,876		$3J_{H11,H12} = 7,90$	
	6,860			
-CH <sub>3</sub>	3,825	Singlete	-	3H

En el espectro RMN-<sup>13</sup>C (Figura 5) se observan 13 señales correspondientes a los carbonos del compuesto C3. El carbono que aparece en el campo inferior ( $\delta = 159,93$  ppm) es del grupo carbonilo (C = O)<sup>7,13</sup>.

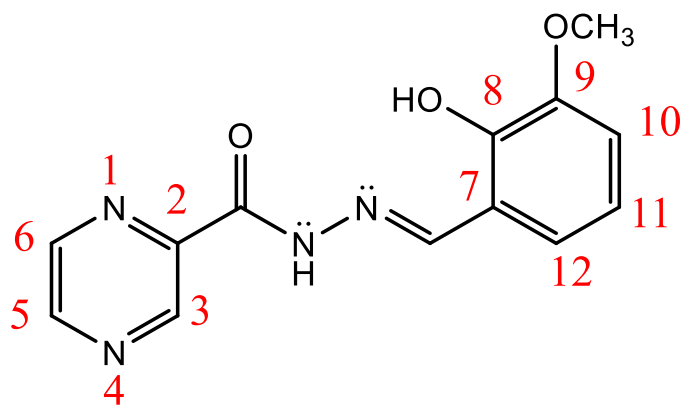
Las señales de C-9 y CH=N, así como C-3 y C-2, aparentemente tienen el mismo desplazamiento químico, sin embargo, al expandirse podemos diferenciar claramente ambas señales, donde el carbono de CH=N ( $\delta = 148,41$  ppm) está ligeramente más protegido que el carbono C-9 ( $\delta = 148,44$  ppm), y el carbono C-3 ( $\delta = 144,78$  ppm) está menos protegido que el C-9 ( $\delta = 144,67$  ppm). Las señales obtenidas del espectro RMN-<sup>13</sup>C se resumen en la Tabla 3 y son datos característicos para compuestos tipos *N*-acilhidrazona<sup>11,14</sup>.





**Figura 5.** Espectro RMN-<sup>13</sup>C del compuesto C3 (DMSO-d<sub>6</sub>, 500 MHz)  
**Fuente:** Elaboración propia

**Tabla 3.** Señales obtenidas en el RMN-<sup>13</sup>C para el compuesto C3 (500 MHz, ppm, DMSO-d<sub>6</sub>)

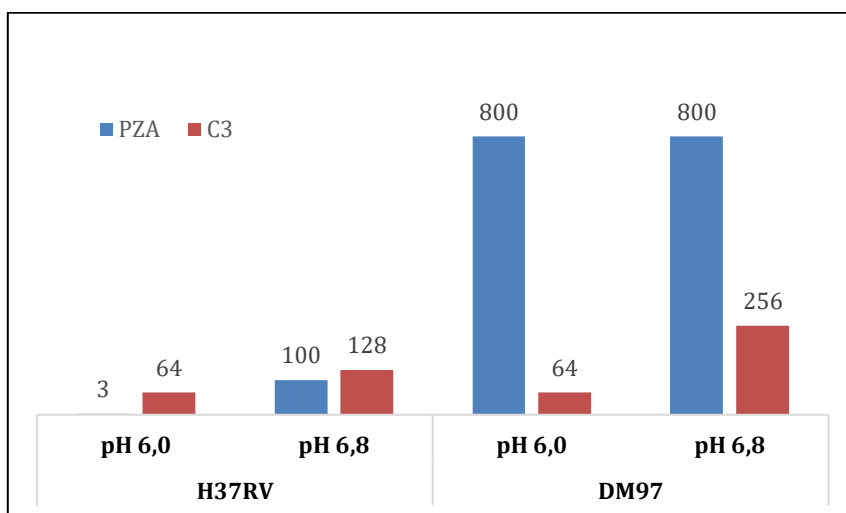


*Numeración de los carbonos presentes en el compuesto C3*

N° carbono	Desplazamiento químico (ppm)
<b>C=O</b>	159,93
<b>8</b>	150,71
<b>9</b>	148,44
<b>C=N</b>	148,41
<b>5</b>	147,84
<b>3</b>	144,78
<b>2</b>	144,67
<b>6</b>	143,85
<b>7</b>	121,49
<b>12</b>	119,55
<b>11</b>	119,26
<b>10</b>	114,52
<b>-CH<sub>3</sub></b>	56,30

### Evaluación antimicrobiana

De acuerdo con los resultados de prueba TEMA (Figura 6), la CMI para PZA disminuye de 100 a 3,125  $\mu\text{g/mL}$  cuando el pH disminuye de 6,8 a 6,0 para H37Rv. Mientras que para DM97 tienen una CMI de 64  $\mu\text{g/mL}$  y 128  $\mu\text{g/mL}$  para H37Rv a pH 6,0 y 6,8, respectivamente. La CMI de C3 en DM97, tanto a pH 6,0 (MIC = 64  $\mu\text{g/mL}$ ) como a pH 6,8 (MIC = 256  $\mu\text{g/mL}$ ) muestran concentraciones más bajas en comparación con la PZA (MIC > 800  $\mu\text{g/mL}$ ).<sup>15,16</sup>



**Figura 6.** Concentración inhibitoria mínima (CMI) de PZA y C3 a pH 6,0 y 6,8 para MTB H37Rv y DM97. **Fuente:** Elaboración propia

## CONCLUSIONES

*N*'-[(1*E*)-(2-Hidroxi-3-metoxibencilideno)pirazina-2-carbohidrazida (C3) se preparó por condensación entre pirazina-2-carbohidrazida con 2-Hidroxi-3-metoxibenzaldehído con un rendimiento del 89%. La caracterización química (UV-Vis, FT-IR, RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C) permitió corroborar la estructura propuesta por Zhaodong (2019). Por otro lado, los estudios *in vitro* permitieron encontrar una CMI más bajo en la DM97 de MTB para C3 a pH 6,0 (CMI = 64 µg/mL) y pH 6,8 (CMI = 256 µg/mL) en comparación con la PZA (MIC > 800 µg/mL a pH 6,0 y 6,8). Al ser MTB DM97 resistente a PZA, esta hidrazona derivada de PZA arroja nueva luz sobre el uso de hidrazonas para el desarrollo de fármacos asociados con la resistencia a los antimicrobianos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WHO. Global tuberculosis report 2020. Geneva: World Health Organization; 2020.
2. Kardan-Yamchi J, Kazemian H, Battaglia S, Abtahi H, Foroushani AR, Hamzelou G, et al. Whole Genome Sequencing Results Associated with Minimum Inhibitory Concentrations of 14 Anti-Tuberculosis Drugs among Rifampicin-Resistant Isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Iran. *J Clin Med*. 2020 Feb 7;9(2):465. doi: 10.3390/jcm9020465.
3. Ministerio de Salud. Perfil de la tuberculosis en el Perú. [Internet. ]2019 [Consultado 12 dic 2024]. Disponible en: <http://www.tuberculosis.minsa.gob.pe/DashboardDPCTB/PerfilTB.aspx>.
4. Zhang Y, Shi W, Zhang W, Mitchison D. Mechanisms of Pyrazinamide Action and Resistance. *Microbiol Spectr*. 2014 Aug;2(4):MGM2-0023-2013. doi: 10.1128/microbiolspec.MGM2-0023-2013.
5. Shebl M, Saleh AA, Khalil SM, Dawy M, Ali AA. Synthesis, spectral, magnetic, DFT calculations, antimicrobial studies and phenoxazinone synthase biomimetic catalytic activity of new binary and ternary Cu(II), Ni(II) and Co(II) complexes of a tridentate ONO hydrazone ligand. *Inorg Nano-Met Chem*. 2020; 51(2):195–209.
6. Wang Z. *N*'-(2-Hydroxy-3-methoxy-benzyl-idene)pyrazine-2-carbohydrazide monohydrate. *IUCrdata*. 2020 Jan 10;5(Pt 1):x191731. doi: 10.1107/S2414314619017310.
7. Vergara FM, Lima CH, Henriques Md, Candéa AL, Lourenço MC, Ferreira Mde L, et al. Synthesis and antimycobacterial activity of *N*'-[(*E*)-(monosubstituted-benzylidene)]-2-pyrazinecarbohydrazide derivatives. *Eur J Med Chem*. 2009 Dec;44(12):4954-9.
8. Liu Y, Peterson DA, Kimura H, Schubert D. Mechanism of Cellular 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reduction. *J Neurochem*. 1987; 69(2): 581-593.
9. Bhaskar RS, Ladole CA, Salunkhe NG, Barabde JM, Aswar AS. Synthesis, characterization and antimicrobial studies of novel ONO donor hydrazone Schiff base complexes with some divalent metal (II) ions. *Arab J Chem*. 2020;13(8):6559-67.

10. Ramírez RI, Aliaga CM, Grandez F, Brillo P, Zimic MJ, Cauna Y, et al. Pyrazinamide–isoniazid hy-brid: synthesis optimisation, characterisation, and antitu-berculous activity. *Rev Colomb Quim.* 2022; 50(3): 16-23.
11. Da Silva YK, Augusto CV, de Castro Barbosa ML, de Albuquerque Melo GM, de Queiroz AC, de Lima Matos Freire Dias T, et al. Synthesis and pharmacological evaluation of pyrazine N-acylhydrazone derivatives designed as novel analgesic and anti-inflammatory drug candidates. *Bioorg Med Chem.* 2010 Jul 15;18(14):5007-15.
12. Karabatsos GJ, Taller RA. Structural studies by nuclear magnetic resonance. V. Phenylhydrazones. *J Am Chem Soc.* 1963; 85(22):3624–3629.
13. Lima CH, Henriques MG, Candéa AL, Lourenço MC, Bezerra FA, Ferreira ML, Kaiser CR, de Souza MV. Synthesis and antimycobacterial evaluation of N'-(E)-heteroaromaticpyrazine-2-carbohydrazide derivatives. *Med Chem.* 2011 May;7(3):245-9.
14. Ferreira M, Candea AL, de O Henriques GM, Kaiser CR, da S Lima CH, de Souza MV. Synthesis and Cytotoxic Evaluation of Disubstituted N-Acylhydrazones Pyrazinecarbohydrazide Derivatives. *Lett Drug Des Discov.* 2010;7(4):275-80.
15. Peterson ND, Rosen BC, Dillon NA, Baughn AD. Uncoupling Environmental pH and Intrabacterial Acidification from Pyrazinamide Susceptibility in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015 Dec;59(12):7320-6.
16. Piddington DL, Kashkouli A, Buchmeier NA. Growth of *Mycobacterium tuberculosis* in a defined medium is very restricted by acid pH and Mg(2+) levels. *Infect Immun.* 2000 Aug;68(8):4518-22.