

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Síntese de Derivados Aril-Semicarbazônicos como
Protótipos Moleculares Contra o *Trypanosoma cruzi*
(Antichagas)**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Lucas Oliveira da Silva

Recife - PE, Brasil
2010

**Síntese de Derivados Aril-Semicarbazônicos como Protótipos Moleculares
Contra o *Trypanosoma cruzi*
(Antichagas)**

por

Lucas Oliveira da Silva

Dissertação submetida ao Programa
de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas do Centro de Ciências
da Saúde da UFPE, como requisito
parcial para obtenção do grau em
MESTRE EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS.

Orientador: Prof. Dr. Dalci José Brondani

Recife - PE, Brasil
2010

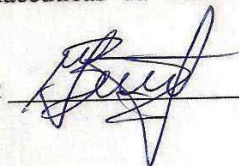
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
LABSINFA – LABORATÓRIO DE PLANEJAMENTO, SÍNTESE E AVALIAÇÃO DE
FÁRMACOS

Recife, 26 de fevereiro de 2010.

Defesa de Dissertação de Mestrado defendida e **APROVADA**, por decisão unânime, em 26 de fevereiro de 2010 e cuja Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

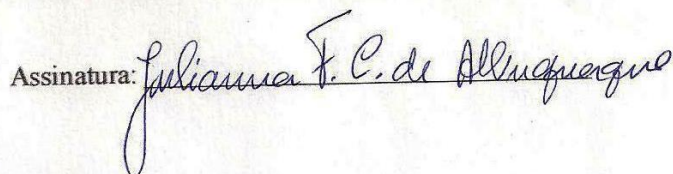
PRESIDENTE ORIENTADOR E PRIMEIRO EXAMINADOR INTERNO: Prof. Dr. Dalci José Brondani (Deptº de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE).

Assinatura: _____



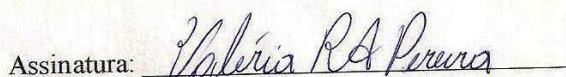
SEGUNDO EXAMINADOR INTERNO: Profª. Drª. Julianna Ferreira Cavalcanti de Albuquerque (Deptº de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE).

Assinatura: _____



EXAMINADOR EXTERNO: Profª. Drª. Valéria Rêgo Alves Pereira (Deptº de Imunologia, Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz)

Assinatura: _____



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Dr. Amaro Henrique Pessoa Lins

VICE-REITOR

Prof. Dr. Gilson Edmar Gonçalves e Silva

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. José Tadeu Pinheiro

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Dalci José Brondani

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto

**VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Profa. Dra. Beate Saegesser Santos

Aos meus pais, Gislaine Oliveira e Paulo Francisco,
por todo apoio ao longo de minha vida

“É necessário abrir os olhos e perceber que as coisas boas estão dentro de nós,
onde os sentimentos não precisam de motivos nem os desejos de razão.
O importante é aproveitar o momento e aprender sua duração, pois a vida está nos olhos de
quem sabe ver”.

Gabriel Garcia Marquez

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que sempre se fez presente em minha vida, sem o qual sei, nunca estaria concluindo mais esta etapa. A Santo Expedito que sempre recorro nas horas de aflição.

Aos meus pais, Gislaine Oliveira e Paulo Francisco, pelo constante apoio, amor, incentivo e confiança.

Aos meus irmãos, Gabriela Oliveira e Matheus Oliveira.

À minha avó Maria de Lourdes pelo constante carinho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Dalci José Brondani, pelos ensinamentos passados desde a disciplina de Orgânica 6, continuados na época de IC e reforçados agora na etapa do mestrado. Pela paciência e incentivo prestados.

À toda equipe do LABSINFA, desde a época em que integrávamos apenas um laboratório e contávamos com as presenças de Fábio Fernandes, Flávio Ricardo, Ana Célia, Cristiane Marques, Marcos Cardoso, Suellen Mello e Lucas Coelho. Sem esquecer da Prof^a. Dra. Ana Cristina, e do doutorando Diogo Rodrigo, o qual nunca mediu esforços em nos ajudar.

A atual equipe do LABSINFA e que pretendo levar como amigos por toda vida. Victor Hugo, amigo não só de laboratório, mas também de graduação, Dyego Revorêdo, José Wanderlan, Ana Daura, Andréa Vasconcelos e Marcia Isabel, cada um com seu jeito único de ser, e com os quais recordo grandes momentos.

À Leilane Santana, pela amizade e carinho, e embora não faça parte da equipe LABSINFA, não seria um erro, incluí-la nos agradecimentos acima.

Aos novos IC's: Janessa Domingos, Jannieres D'Arc, Lecílio Soares, Elany Barbosa e a Gevanio Filho.

Aos amigos de graduação, em especial à Thiago Muniz, Cinthya Santos, Marcos Quidute, Kirlla Coimbra, Cynthia Albuquerque, sei que também os levarei por toda vida. À Keylla Ramos, que tive a sorte de conhecer.

À Iguacy Duque, secretária de farmácia, pela alegria e paciência em nos atender. Às secretárias do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Margarete Valdevino e Maria da Conceição.

Aos coordenadores do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas Pedro Rolim e Beate Saegesser, a qual muito me ensinou quando fui monitor da disciplina Análise Quantitativa II.

Aos alunos da turma de Química Orgânica 6 de 2009.2, os quais tive a felicidade de ensinar, e com eles também muito aprendi.

Aos professores que muito me ensinaram nas disciplinas do mestrado.

Aos companheiros de mestrado Tiago Bento, Gleybson Correia e Charles Cristophe.

Aos professores que muito ajudaram e sem os quais este trabalho não estaria se realizando. À Prof^a. Dra. Janete Magali e sua equipe pela realização dos testes de atividade antimicrobiana. À Prof^a. Dra. Teresinha Gonçalves e equipe pela realização dos testes de toxicidade aguda. À Prof^a. Dra. Ivone Souza e equipe pela realização dos testes de atividade antitumoral. À Prof^a. Dra. Valéria Pereira e equipe pela realização dos testes anti-*T. cruzi* e citotoxicidade. Meu muito obrigado.

Aos professores que aceitaram compor a banca de avaliação, Prof^a. Dra. Julianna Ferreira, Prof^a. Dra. Valéria Pereira, Prof^a. Dra. Ivani Malvestiti e Prof^a. Dra. Janete Magali.

A equipe da Central Analítica do Departamento de Química Fundamental da UFPE, pela realização análises de RMN e IV.

A todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho, e durante minha vida acadêmica.

A FACEPE pela concessão da bolsa, dando suporte e incentivo a este trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	XII
LISTA DE ESQUEMAS	XIV
LISTA DE TABELAS	XV
LISTA DE QUADROS	XVI
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	XVII
RESUMO	XIX
ABSTRACT	XX
CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO, OBJETIVOS E REVISÃO DA LITERATURA	21
1. INTRODUÇÃO	22
2. OBJETIVOS	25
2.1. OBJETIVO GERAL	25
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3. REVISÃO DA LITERATURA	26
3.1. DOENÇA DE CHAGAS	26
3.1.1. Aspectos gerais da doença de Chagas	26
3.1.2. Epidemiologia	28
3.1.3. Ciclo biológico	29
3.1.4. Sintomatologia	31
3.1.5. Tratamento	33
3.1.6. Alvos específicos na busca de fármacos tripanomicidas	35
3.2. QUÍMICA DE SEMICARBAZIDA E SEMICARBAZONAS	37
3.2.1. Síntese de semicarbazidas	37
3.2.2. Oxidação de semicarbazida	38
3.2.3. Síntese de semicarbazonas	39
3.2.4. Ciclização de semicarbazonas	41
3.2.5. Semicarbazonas a tiosemicarbazonas	43
3.2.6. N-alquilação de semicarbazonas	44
3.2.7. Semicarbazonas e complexos metálicos	45
3.3. SEMICARBAZONAS E SEU AMPLO PERFIL FARMACOLÓGICO	47

3.3.1. Semicarbazonas e suas atividades anticonvulsivantes	48
3.3.2. Semicarbazonas e suas atividades antimicrobianas	50
3.3.3. Semicarbazonas e suas atividades antichagásicas	51
CAPÍTULO II: SÍNTESE, ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL E ATIVIDADES BIOLÓGICAS	54
4. METODOLOGIAS	55
4.1. SÍNTESE	55
4.2. DETERMINAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS	55
4.2.1. Análise cromatográfica em camada delgada	55
4.2.2. Faixas de fusão	56
4.3. ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL	56
4.3.1. Análise de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H)	56
4.3.2. Análise de espectrofotometria de absorção no infravermelho (IV)	56
4.4. AVALIAÇÕES BIOLÓGICAS	56
4.4.1. Atividade antimicrobiana	56
Método da difusão em discos de papel	56
Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI), Concentração Mínima Bacteriostática (CMB) e Concentração Mínima Fungistática (CMF)	57
4.4.2. Toxicidade aguda	58
4.4.3. Atividade antitumoral	58
4.4.4. Atividade antichagásica e citotoxicidade	59
Obtenção de células esplênicas de camundongos isogênicos	59
Ensaio de citotoxicidade dos compostos em células esplênicas	59
Avaliação da atividade dos compostos frente ao <i>T. cruzi</i>	59
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
5.1. SÍNTESE	61
5.2. CARACTERIZAÇÃO DOS DERIVADOS OBTIDOS	65
5.3. ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL	65
5.3.1. Espectroscopia no Infravermelho (IV) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN ^1H)	65
5.4. AVALIAÇÕES BIOLÓGICAS	69

5.4.1. Atividade antimicrobiana	69
5.4.2. Toxicidade aguda	71
5.4.3. Atividade antitumoral	72
5.4.4. Atividade antichagásica e citotoxicidade	74
CAPÍTULO III: CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	76
6. CONCLUSÕES	77
7. PERSPECTIVAS	78
CAPITULO IV: PARTE EXPERIMENTAL	79
8. METODOLOGIAS	80
8.1. SÍNTESE	80
8.2. DETERMINAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS	80
8.2.1. Análise cromatográfica em camada delgada	80
8.2.2. Faixas de fusão	81
8.3. ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL	81
8.4. ENSAIOS BIOLÓGICOS	81
8.4.1. Atividade antimicrobiana	81
8.4.1.1. Método da difusão em discos de papel	81
8.4.1.2. Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI), Concentração Mínima Bacteriostática (CMB) e Concentração Mínima Fungistática (CMF)	82
8.4.2. Toxicidade Aguda	83
8.4.3. Atividade Antitumoral	83
8.4.4. Atividade antichagásica e citotoxicidade	84
8.4.4.1. Avaliação da atividade anti- <i>T. cruzi</i>	84
8.4.4.2. Obtenção de células esplênicas de camundongos isogênicos e ensaio de citotoxicidade	84
9. DADOS FÍSICO-QUÍMICOS E ESPECTROSCÓPICOS	85
9.1. COMPOSTO 01: 4-dimetil-aminobenzaldeído semicarbazona	85
9.2. COMPOSTO 02: 4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído semicarbazona	85
9.3. COMPOSTO 03: 4-metoxibenzaldeído semicarbazona	86

9.4. COMPOSTO 04: Cinamaldeído semicarbazona	86
9.5. COMPOSTO 05: 2,6-piridina-dicarboxaldeído semicarbazona	86
9.6. COMPOSTO 06: Isoftaldeído semicarbazona	87
9.7. COMPOSTO 07: 4-bromobenzaldeído semicarbazona	87
9.8. COMPOSTO 08: 4-fluorbenzaldeído semicarbazona	87
9.9. COMPOSTO 09: 4-clorobenzaldeído semicarbazona	88
9.10. COMPOSTO 10: 3,4-diclorobenzaldeído semicarbazona	88
9.11. COMPOSTO 11: 2-piridinacarboxaldeído semicarbazona	88
9.12. COMPOSTO 12: 3-piridinacarboxaldeído semicarbazona	89
9.13. COMPOSTO 13: 4-piridinacarboxaldeído semicarbazona	89
9.14. COMPOSTO 14: 4-terc-butilbenzaldeído semicarbazona	89
9.15. COMPOSTO 15: 4-metilbenzaldeído semicarbazona	90
9.16. COMPOSTO 16: 2-tiofenocarboxaldeído semicarbazona	90
9.17. COMPOSTO 17: 2-hidroxi-naftaldeído semicarbazona	90
9.18. COMPOSTO 18: 3-metil-1-fenil-1H-pirazol-4-carboxaldeído semicarbazona	91
9.19. COMPOSTO 19: Tereftaldeído semicarbazona	91
9.20. COMPOSTO 20: 4-tiometilbenzaldeído semicarbazona	91
10. REFERÊNCIAS	92
ANEXOS	100
ANEXOS: ESPECTROS DE INFRAVERMELHO DOS COMPOSTOS OBTIDOS	101

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Número de novos medicamentos desenvolvidos entre os anos de 1975 e 2004.	22
Figura 02: Estruturas do Nifurtimox e Benznidazol	23
Figura 03: <i>Triatoma infestans</i> (barbeiro), inseto vetor do <i>T. cruzi</i>	26
Figura 04: Fatores preponderantes para o aparecimento da doença de Chagas	27
Figura 05: Estimativa da população global afetada pelo <i>Trypanosoma cruzi</i> , 2009.	28
Figura 06: Formas evolutivas do <i>T. cruzi</i> – A: formas amastigotas intracelulares, B: formas tripomastigotas sangüíneas e C: formas epimastigotas.	30
Figura 07: Ciclo biológico da doença de Chagas	31
Figura 08: Sinal de Romaña e chagoma de inoculação	32
Figura 09: Coração de pacientes que desenvolveram doença de Chagas e morreram por: (A) morte súbita, (B) megacólon ou mega-esôfago e (C) insuficiência cardíaca congestiva	33
Figura 10: Primeiro fármaco utilizado no tratamento da doença de Chagas	34
Figura 11: Fármacos utilizados clinicamente e experimentalmente como agentes anti- <i>T. cruzi</i> .	35
Figura 12: Produtos propostos na oxidação da semicarbazida	38
Figura 13: Estrutura geral de semicarbazonas e numeração dos átomos.	39
Figura 14: Analogia de Aril-semicarbazonas e 1,2,4-triazóis	43
Figura 15: Estrutura de complexos metálicos de semicarbazona com vanádio (V)	47
Figura 16: Estruturas gerais de derivados semicarbazônicos avaliados como agentes anticonvulsivantes	49
Figura 17: Estrutura do derivado 17, avaliado por R. Thirumurugan e equipe, 2006	50
Figura 18: Estrutura do derivado 20, avaliado por Shaline et al., 2007.	50
Figura 19: Estrutura geral dos derivados semicarbazônicos cíclicos avaliados por Shalini e equipe, 2009	51
Figura 20: Estrutura geral de derivados N-nitroso-2,6-diarilpiperidin-4-ona semicarbazonas avaliados por T. Hemalatha, 2008.	51

Figura 21: Estrutura geral de derivados nitrofurazônicos avaliados por D. J. Brondani, 2008	52
Figura 22: Estrutura geral de derivados nitrofurânicos e nitrotiofênicos avaliados por M. Paulino, 2002	52
Figura 23: Estrutura da hidroximetilnitrofurazona	53
Figura 24: Estrutura geral de derivados 5-nitro-2-furil avaliados por G. Aguirre, 2006	53
Figura 25: Estrutura geral de derivados 5-nitro-2-furil avaliados por E. Cabrera, 2009	54
Figura 26: Estrutura do derivado semicarbazônico 4, avaliado por A. Gerpe, 2009	54
Figura 27: Espectro de infravermelho do composto 02.	67
Figura 28: Espectro de RMN ¹ H do composto 02.	69
Figura 29: Estrutura química dos compostos 05 e 06.	71
Figura 30: Estrutura química do derivado 16 e da Nitrofurazona	76

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 01: Rota de síntese da semicarbazida a partir de hidrazina e uréia.	37
Esquema 02: Rota de síntese da semicarbazida a partir de cianato de potássio e hidrazina	37
Esquema 03: Oxidação de semicarbazida	39
Esquema 04: Rota de síntese de 4-bromo-3-metilfenil semicarbazona	40
Esquema 05: Rota de síntese de semicarbazonas a partir de 1-vinilpirrol-2-carboxaldeído	40
Esquema 06: Rota de síntese de derivados semicarbazônicos N-nitroso-2,6-diarilpiperidin-4-ona	40
Esquema 07: Rota de síntese de 4-(2-fenoxifenil)semicarbazonas	41
Esquema 08: Mecanismo de ciclização de salicilaldeído semicarbazona	42
Esquema 09: Rota sintética de ciclização de metilaril semicarbazonas	42
Esquema 10: Etapas da ciclização de metilaril semicarbazonas	43
Esquema 11: Rota de síntese para obtenção de 1,2,4-triazóis	44
Esquema 12: Rotas sintéticas para obtenção de tiossemicarbazonas a partir de semicarbazonas	45
Esquema 13: Mecanismo envolvido na reação de Lawesson	45
Esquema 14: Rotas de síntese para N-alkilação de semicarbazonas	46
Esquema 15: Rota de síntese do complexo catalisador Paládio/semicarbazona	47
Esquema 16: Rota de síntese da reação de homoacoplamento de Suzuki utilizando o complexo catalítico Pd/Semicarbazona	48
Esquema 17: Rota geral de síntese para obtenção dos derivados arilsemicarbazônicos	62
Esquema 18: Mecanismo de síntese das arilsemicarbazonas.	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Dados físico-químicos e analíticos dos compostos 01-20	66
Tabela 02: Atividade antimicrobiana expressa em diâmetro da zona de inibição (mm)	70
Tabela 03: Valores da Concentração Mínima Inibitória, Concentração Mínima Bacteriostática e Fungistática para os compostos 05 e 06 frente às cepas avaliadas em µg/mL	71
Tabela 04: Média dos pesos dos animais e órgãos submetidos à administração dos derivados 02, 05 e 10	72
Tabela 05: Atividade antitumoral do derivado 06 nas doses de 10 e 5mg/kg	73
Tabela 06: Atividade anti- <i>T. cruzi</i> e citotoxicidade dos derivados aril-semicarbazônicos	75

LISTA DE QUADROS

Quadro 01: Estrutura dos compostos 01-10	64
Quadro 02: Estrutura dos compostos 11-20	65

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

% = Porcentagem

°C = Graus Celsius

µg/mL = Micrograma por mililitro

µL = Microlitro

µm = Micrometro

µM = Micromolar

3D = Três dimensões

AcOEt = Acetato de Etila

BZD = Benznidazol

CHCl₃/MeOH = Clorofórmio/Metanol

cm⁻¹ = Centímetro a menos 1

CMB = Concentração Mínima Bacteriostática

CMF = Concentração Mínima Fungistática

CMI = Concentração Mínima Inibitória

CO₂ = Dióxido de Carbono

CoMFA = Análise comparativa de campo molecular

DCA = Doença de Chagas Aguda

DMF = Dimetilformamida

DMSO = Dimetil Sulfóxido

DNA = Ácido desoxirribonucléico

GABA = Ácido gama-aminobutírico

GR = Glutathione redutase

Hex/AcOEt = Hexano/Acetato de Etila

IC₅₀ = Concentração inibitória em 50%

IV = Infravermelho

K₂CO₃ = Carbonato de Potássio

KBr = Brometo de Potássio

MES = Ensaio do Eletrochoque-Máximo

mg/kg = Miligrama por quilograma

mg/kg/dia = Miligrama por quilograma por dia

mg/mL = Miligrama por mililitro

mL = Mililitro

mm = Milímetro

mmol = Milimol

MRSAs = *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina

MTT = Metil tiazol tetrazólio

NADPH = Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato-H

NF = Nitrofurazona

NFX = Nifurtimox

nm = Nanômetro

Pd = Paládio

Rf = Referencial de fase

RMN ^1H = Ressonância Magnética Nuclear de ^1H

rpm = Rotações por minuto

RPMI = Meio de cultura

scPIC = Picrotoxina em administração subcutânea

scPTZ = Pentilenotetrazol em administração subcutânea

scSTY = Estriquinina em administração subcutânea

SDS = Duodecil sulfato de sódio

TCC = Cruzipaína do *Trypanosoma cruzi*

TR = Tripanotiona redutase

UFC/mL = Unidade formadora de colônia/mililitro

v/v = Volume/volume

RESUMO

Passado mais de cem anos a partir da descoberta da doença de Chagas em 1909, esse mal que afeta cerca de 18.000 milhões de pessoas ainda se encontra sem uma quimioterapia adequada. As duas únicas drogas utilizadas no tratamento atual da doença de Chagas, Nifurtimox e o Benznidazol, mostram-se totalmente inadequadas, tendo em vista seus altos índices de efeitos colaterais e ineficácia na fase crônica da doença. Atrelado a isto, ainda existe o fato de existir resistência por parte de cepas do parasita. Afetando principalmente classes mais baixas da população, a Doença de Chagas tem sido negligenciada no que diz respeito aos campos de pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos, havendo, desta forma, uma grande necessidade na busca por novas drogas antichagásicas. Semicarbazonas representam uma classe de compostos com grande potencial antichagásico, tendo sido relatado por diversos pesquisadores sua grande diversidade de ações biológicas, como antimicrobiana, antitumoral, anticonvulsivante e principalmente anti *T. cruzi*. Neste trabalho, derivados aril-semicarbazônicos foram sintetizados por meio da reação de condensação entre diversos aril-aldeídos substituídos e a semicarbazida hidrocloreada, os quais tiveram suas estruturas confirmadas por meio de espectroscopia de infravermelho e de ressonância magnética nuclear de próton. Foi desenvolvida uma série de 20 aril-semicarbazonas, das quais foram avaliadas suas atividades biológicas, como ação anti-*T. cruzi* e citotoxicidade, além da ação antimicrobiana. A toxicidade aguda de alguns derivados da série foi determinada. Em relação ao poder antimicrobiano, esses compostos apresentaram de baixa a moderada ação. Tratando-se da atividade frente ao parasita causador da doença de Chagas, merecem atenção os compostos 04, 08 e 10 que demonstraram uma moderada ação anti *T. cruzi*, e o composto 16 que se mostrou o mais promissor da série, chegando a possuir atividade superior aos fármacos padrões, Nifurtimox e Benznidazol. Analisando os dados de citotoxicidade, podemos observar que se trata de moléculas com baixas propriedades citotóxicas, as quais chegam a ser cerca de 100 vezes menor que a apresentada pelo Nifurtimox, por exemplo. No teste de toxicidade aguda, foi observado que por meio da dose oral de 2000 mg/kg os derivados semicarbazônicos avaliados mostraram-se pouco tóxicos, não provocando morte dos animais por um período de 14 dias, e após sacrifício destes, não foram encontradas modificações anatômicas consideráveis nos órgãos observados, fígado, rins e baço. O derivado 06 apresentou excelente ação antitumoral, com inibição de 74,74% do tumor Sarcoma 180. Frente aos resultados obtidos fica-se evidenciada a importância biológica dos derivados aril-semicarbazônicos sintetizados, comprovada principalmente pelas notáveis atividades anti *T. cruzi* e antitumoral desempenhadas pelos compostos 16 e 06, respectivamente.

Palavras chave: Doença de Chagas, aril-semicarbazonas, atividade anti *T. cruzi*, atividade antimicrobiana, atividade antitumoral, citotoxicidade.

ABSTRACT

After more than a hundred years after the discovery of Chagas disease in 1909, this condition that affects about 18.000 million people, is still without an adequate pharmacotherapy. The only two drugs used in the current treatment of Chagas disease, Nifurtimox and Benznidazole, appear to be totally inadequate in view of their high rates of side effects and inefficiency in the chronic phase of disease. Coupled to these, there is the fact that there are resistances from strains of the parasite. Affecting mainly the lower classes of the population, Chagas disease has been neglected with regard to basic research and drug development, then, there is great need in the search for new drugs antichagasic. Semicarbazones represent a class of compounds with great antichagasic potential, having been reported great diversity of biological actions by several researchers, such as antimicrobial, antitumor, anticonvulsant and especially anti-*T. cruzi* activities. In this study, aryl semicarbazones derivatives were synthesized by the condensation reaction of various aryl-substituted aldehydes and semicarbazide hydrochloride, which had their structures confirmed by infrared spectroscopy and proton nuclear magnetic resonance. Was developed a series of 20 aryl semicarbazones, which were evaluated their biological activities, such as anti-*T. cruzi* and cytotoxicity, besides their antimicrobial activities. The acute toxicity of some derivatives of the series was determinate. Regarding the antimicrobial power these compounds showed low to moderate action. As regards the activity against the parasite that causes Chagas disease, deserve attention compounds 04, 08 and 10 which showed a moderate action anti-*T. cruzi*, and the compound 16 which showed the most promising of the series, and had superior activity than the standard drugs, Nifurtimox and Benznidazole. Analyzing the data of cytotoxicity, we can see that these are molecules with low cytotoxic properties, which are up to about 100 times smaller than that presented by Nifurtimox, for example. In acute toxicity test, it was observed that through the oral dose of 2000 mg/kg the semicarbazones derivatives evaluated proved to be low toxic, causing no death of animals for a period of 14 days, and after sacrifice of these, there weren't considerable anatomical changes of observed organs, liver, kidneys and spleen. The derivative 06 showed extraordinary antitumor action, with 74.74% inhibition of tumor Sarcoma 180. Given our results it is evident the biological importance of the synthesized aryl-semicarbazones derivatives, proven by the remarkable anti-*T. cruzi* and antitumor activities developed by the compounds 16 and 06, respectively.

Keywords: Chagas disease, aryl-semicarbazones, anti-*T. cruzi* activity, antimicrobial activity, antitumor activity, cytotoxicity.

CAPÍTULO I



INTRODUÇÃO, OBJETIVOS E REVISÃO DA LITERATURA

1. INTRODUÇÃO

A cada dia, cerca de três mil pessoas morrem no mundo vítimas de doenças negligenciadas como malária, leishmaniose visceral, doença de Chagas e doença do sono. São mais de 1 milhão de mortes por ano. Um dos motivos para esse número elevado de óbitos é a falta de ferramentas adequadas para o diagnóstico e tratamento destas doenças. Elas afetam as populações mais empobrecidas nos países menos desenvolvidos do mundo, e, portanto, não constituem um mercado lucrativo para as indústrias farmacêuticas (www.dndi.org.br/Portugues/doencas_negligenciadas.aspx).

Como podemos observar na **Figura 01**, entre 1975 e 2004, apenas 21 medicamentos foram registrados para doenças tropicais e tuberculose, ainda que estas doenças constituam mais de 11% da carga global de doença. Durante o mesmo período, 1.535 medicamentos foram registrados para outras doenças (www.dndi.org.br/Portugues/doencas_negligenciadas.aspx).

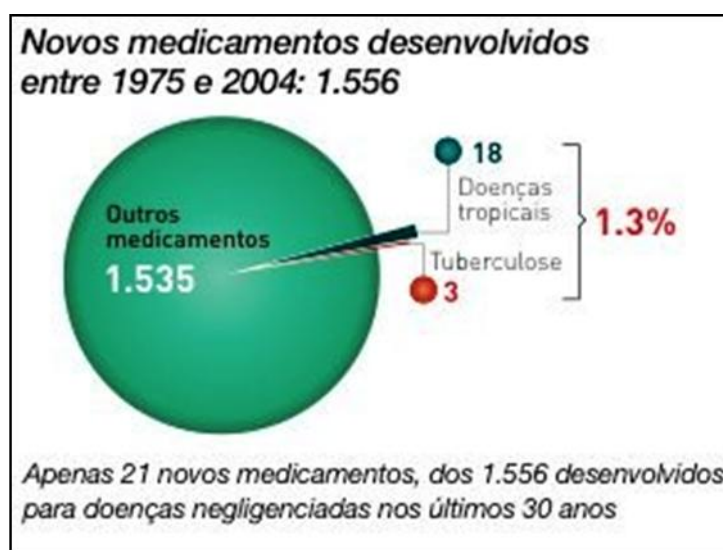


Figura 01: Número de novos medicamentos desenvolvidos entre os anos de 1975 e 2004.

Fonte: http://www.dndi.org.br/Portugues/doencas_negligenciadas.aspx

Desde a descoberta da Doença de Chagas, em 1909, pesquisadores têm se empenhado na busca por fármacos que possam ser realmente eficazes contra esta doença, promovendo a cura parasitológica tanto na fase aguda quanto na fase crônica. Todavia, passados mais de

cem anos, este é um problema que ainda permanece sem uma solução adequada, visto que as duas principais drogas aplicadas na terapêutica, o Nifurtimox e o Benznidazol (**Figura 02**), tratam-se de fármacos considerados de ação supressiva, não curativa, apresentando atividade antiparasitária, porém sem capacidade de cura radical da infecção, além disso, são compostos que apresentam alto índice de efeitos colaterais.

O Nifurtimox, um nitrofurano com estrutura geral 3-metil-4-(5'-nitrofurfurilidenoamino)tetrahydro-4H-1, 4-tiazina-1,1-dióxido, comercializado como nome de *Lampit*[®], vem tendo sua produção descontinuada a partir da década de 1980, inicialmente no Brasil e depois na Argentina, Chile e Uruguai. O Benznidazol, (N-benzyl-2-nitroimidazol acetamida, comercializado no Brasil com o nome de Rochagan[®], está sendo passado pela Roche para o Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (Lafepe) (www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=37).

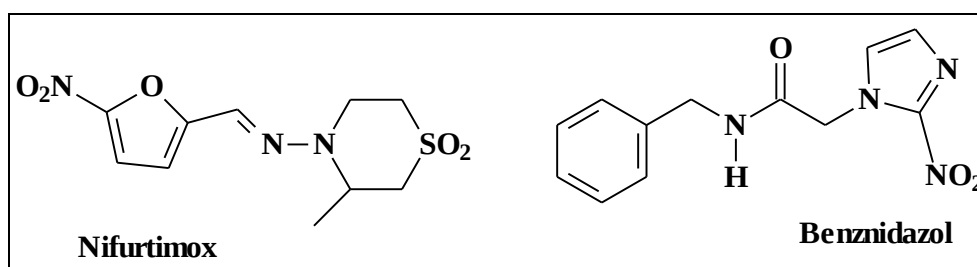


Figura 02: Estruturas do Nifurtimox e Benznidazol

A droga ideal para o tratamento da doença de Chagas deveria apresentar os seguintes requisitos:

- Produzir a cura parasitológica de casos agudos e crônicos e evitar a evolução da doença, sendo eficaz com poucas doses em curto prazo (10 a 15 dias);
- Não produzir efeitos colaterais importantes nem teratogênicos e não induzir resistência parasitária;
- Ser barata, de fácil aplicação e acessível aos pacientes.

Semicarbazonas e semicarbazidas são importantes grupamentos farmacofóricos na busca por novas drogas. Suas atividades biológicas e diversidade de aplicações médicas são exemplificadas por uma gama de propriedades terapêuticas, atuando contra *Trypanosoma cruzi*, tumor e bactérias (BRONDANI, D. J. et al., 2007).

A Nitrofurazona, 5-nitro-2-furaldeído semicarbazona, é um exemplo de fármaco com comprovada atividade anti-*T. cruzi*, porém provido de alta toxicidade, impossibilitando-o de ser utilizado na terapêutica antichagásica.

Simplificadamente a Nitrofurazona exerce sua atividade através de um mecanismo citotóxico o qual inicialmente envolve uma ou mais reações de redução do grupo nitro, seguindo da inibição de várias enzimas necessárias para a célula do parasita requerer energia. O grupo nitro presente na molécula é o responsável pela atividade, sendo considerado como parasitóforo (BOSQUESI, P. L., 2009). O grupo Nitro apresenta metabolização tanto *in vitro* como *in vivo*, resultando em sinais de toxicidade a nível celular e tecidual do hospedeiro humano (ABREU, F. C. et al., 2002).

Baseando-se no princípio da similaridade estrutural, nosso trabalho está direcionado no planejamento e síntese de novos derivados aril-semicarbazônicos desprovidos do grupamento nitro, os quais possam apresentar real atividade contra o *T. cruzi* e que possuam menor toxicidade se comparado a farmacoterapia atual; em paralelo, serão realizados testes a fim de se determinar o poder antimicrobiano e antitumoral dessa classe de compostos.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Sintetizar e avaliar a atividade biológica de derivados semicarbazônicos, visando obtenção de compostos ativos contra o *T. cruzi* e de menor toxicidade que os fármacos utilizados atualmente na farmacoterapia da doença de Chagas.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter aril-semicarbazonas substituídas através da condensação entre a semicarbazida hidrociorada e uma série de aril-aldeídos.
- Determinar as principais propriedades físico-químicas e realizar elucidação estrutural por meio de Ressonância Magnética Nuclear de Prótons (RMN-¹H) e Infravermelho (IV).
- Avaliar a atividade antimicrobiana das aril-semicarbazonas
- Avaliar a toxicidade aguda de compostos aril-semicarbazônicos através da administração da dose máxima permitida
- Avaliar a ação antitumoral.
- Avaliar em cultura de células esplênicas a citotoxicidade dos compostos obtidos
- Verificar a ação das aril-semicarbazonas em formas epimastigotas da cepa y de *T. cruzi*.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. DOENÇA DE CHAGAS

3.1.1. Aspectos gerais da doença de Chagas

Em abril de 1909 o cientista brasileiro Carlos Chagas comunicou ao mundo científico a descoberta de uma nova doença, a qual no final de 1908 ele já havia também identificado seu agente etiológico – o protozoário *Trypanosoma cruzi*, por ele assim nomeado em homenagem a Oswaldo Cruz – e o inseto vetor – um triatomíneo conhecido popularmente como barbeiro, pelo hábito de picar o rosto de suas vítimas enquanto essas dormiam (www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=171).

O parasita possui um complexo ciclo biológico passando por hospedeiros vertebrados e invertebrados, e apresenta diferentes formas evolutivas flageladas (epimastigota e tripomastigota) ou aflagelada (amastigota).

A principal forma de transmissão da doença se dá por meio do inseto vetor (**Figura 03**), porém, também é comum a transmissão através de transfusões sanguíneas e transplante de órgãos, através de aleitamento materno e via congênita, acidentes laboratoriais, e mais recentemente, houve surtos de transmissão por meio da via oral, devido ingestão de alimentos contaminados.



Figura 03: *Triatoma infestans* (barbeiro), inseto vetor do *T. cruzi*

Fonte: <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=21>

Esta doença, denominada então de Tripanossomíase americana ou doença de Chagas, trata-se de um dos principais problemas socioeconômicos enfrentados na América Latina, afetando cerca de 18 milhões de pessoas desde o sul dos Estados Unidos até a Patagônia, causando aproximadamente 50.000 mortes por ano, sendo que outros 100 milhões de indivíduos vivem em áreas de risco de contaminação (DIAS, L. C. et al., 2009). As pessoas mais afetadas pela doença de Chagas são as muito pobres, que vivem em casas de pau-a-pique, um habitat perfeito para os insetos, com podemos ver na **Figura 04**.



Figura 04: Fatores preponderantes para o aparecimento da doença de Chagas

Fonte: <http://www.mombacaonline.com.br/saude/tramissao.gif>

Doenças tropicais – como por exemplo a doença de Chagas, leishmaniose, doença do sono e malária – juntamente com a tuberculose e hanseníase fazem parte do grupo das chamadas doenças negligenciadas e têm um impacto devastador nos países mais empobrecidos do mundo. Tendo em vista que as pessoas afetadas por essas doenças não representam um mercado lucrativo para atrair investimentos necessários para a pesquisa e o desenvolvimento de novos medicamentos, essas doenças vêm sendo progressivamente

marginalizadas pelas decisões dos responsáveis pelos programas de pesquisa, tanto no setor privado, quanto no setor público (www.dndi.org.br/Portugues/doencas_negligenciadas.aspx).

Nos países ricos, o progresso científico dos últimos 30 anos gerou avanços médicos sem precedentes e um ganho substancial na expectativa de vida. No entanto, doenças tropicais fatais, que muitas vezes podem ser prevenidas, tratáveis e curáveis continuam a assolar comunidades pobres nos países em desenvolvimento, devido, em grande parte, a falhas de mercado e de políticas públicas adequadas (www.dndi.org.br/Portugues/doencas_negligenciadas.aspx).

3.1.2. Epidemiologia

Endêmica em 21 países da América Latina, a doença de Chagas mata, todos os anos, mais pessoas na região do que qualquer outra doença parasitária, incluindo a malária. É crescente o número de pacientes em países desenvolvidos não endêmicos (tais como, Austrália, Canadá, Japão, Espanha e Estados Unidos), devido ao aumento dos fluxos migratórios (www.treatchagas.org/cp_chagas_globalview.aspx). Na **Figura 05** podemos ver uma estimativa global dos países afetados pela doença de Chagas.

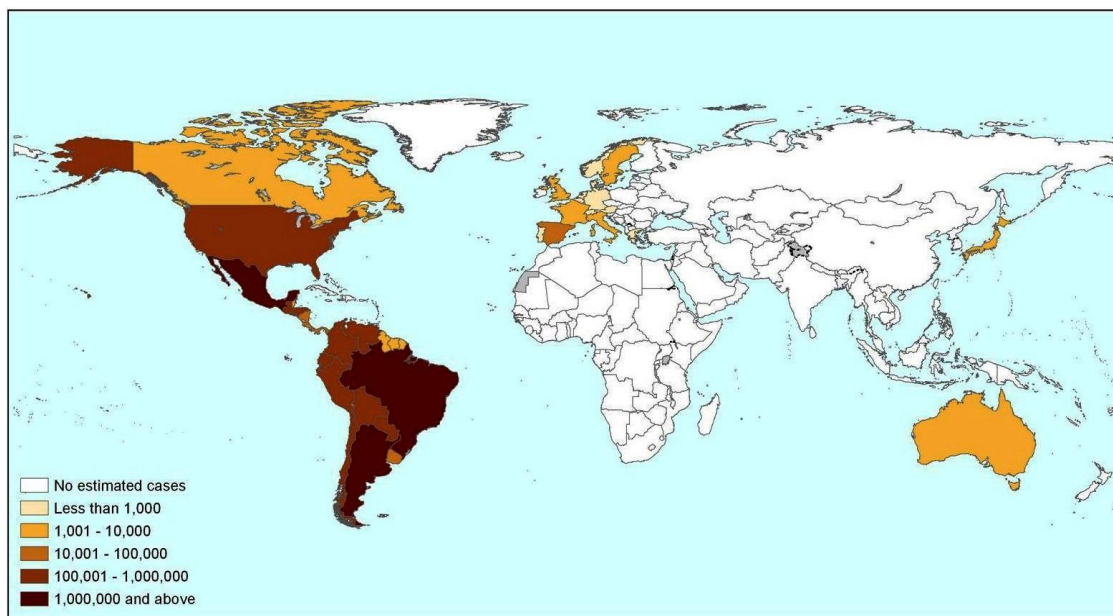


Figura 05: Estimativa da população global afetada pelo *Trypanosoma cruzi*, 2009.

Fonte: http://www.treatchagas.org/imagens/MapChagasJun09_large.jpg

No Brasil a ocorrência de doença de Chagas aguda (DCA) tem sido observada em diferentes Estados, como: Bahia, Ceará, Piauí, Santa Catarina e São Paulo, com maior frequência de casos e surtos registrados na região da Amazônia Legal (Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Amapá, Pará, Tocantins), onde a transmissão oral tem sido registrada com maior frequência (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

Nos anos de 2000, 2001 e 2004, ocorreram 57 casos de doença de Chagas aguda, por transmissão oral; no período de 2005 a 2007, esses números somaram 301 casos. Em 2008, foram diagnosticados 94 casos de DCA no estado do Pará, dos quais 57 (65%) estavam envolvidos em transmissão oral; 20, no estado do Amapá, todos por provável transmissão oral e 7 no estado do Tocantins, 4 por transmissão oral (80%) e 1 vetorial (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

3.1.3. Ciclo biológico

O ciclo biológico do *T. cruzi* é do tipo heteroxênico, passando o parasito por uma fase de multiplicação intracelular no hospedeiro vertebrado (homem e mamíferos pertencentes a sete ordens diferentes) e extracelular no inseto vetor (triatomíneos) (NEVES, D. P., 2005). As formas evolutivas envolvidas nesse ciclo são a amastigota, tripomastigota e epimastigota (**Figura 06**).

Nos hospedeiros vertebrados e em culturas de tecidos são encontradas intracelularmente as formas amastigotas, e extracelularmente as formas tripomastigotas presentes no sangue circulante. Durante a fase no hospedeiro invertebrado, o *T. cruzi* se transforma em epimastigotas e então, no intestino posterior, diferenciam em tripomastigotas metacíclicos os quais, eliminados pelas fezes e urina do inseto vetor, são capazes de infectar o hospedeiro vertebrado (www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=11).

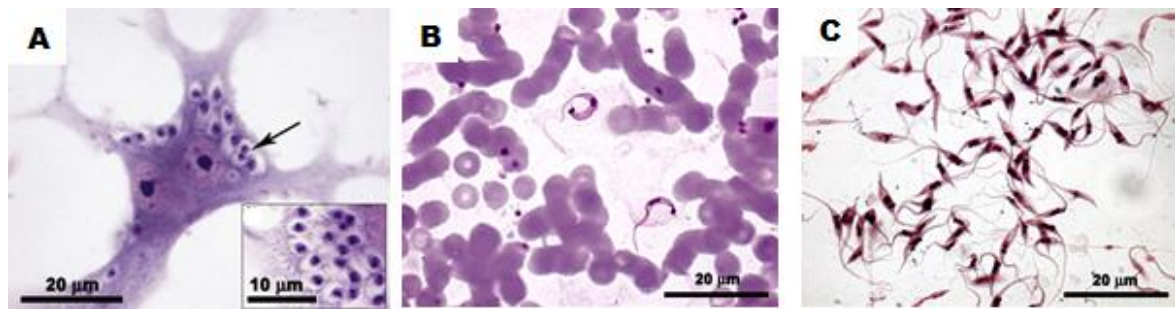


Figura 06: Formas evolutivas do *T. cruzi* – **A:** formas amastigotas intracelulares, **B:** formas tripomastigotas sangüíneas e **C:** formas epimastigotas.

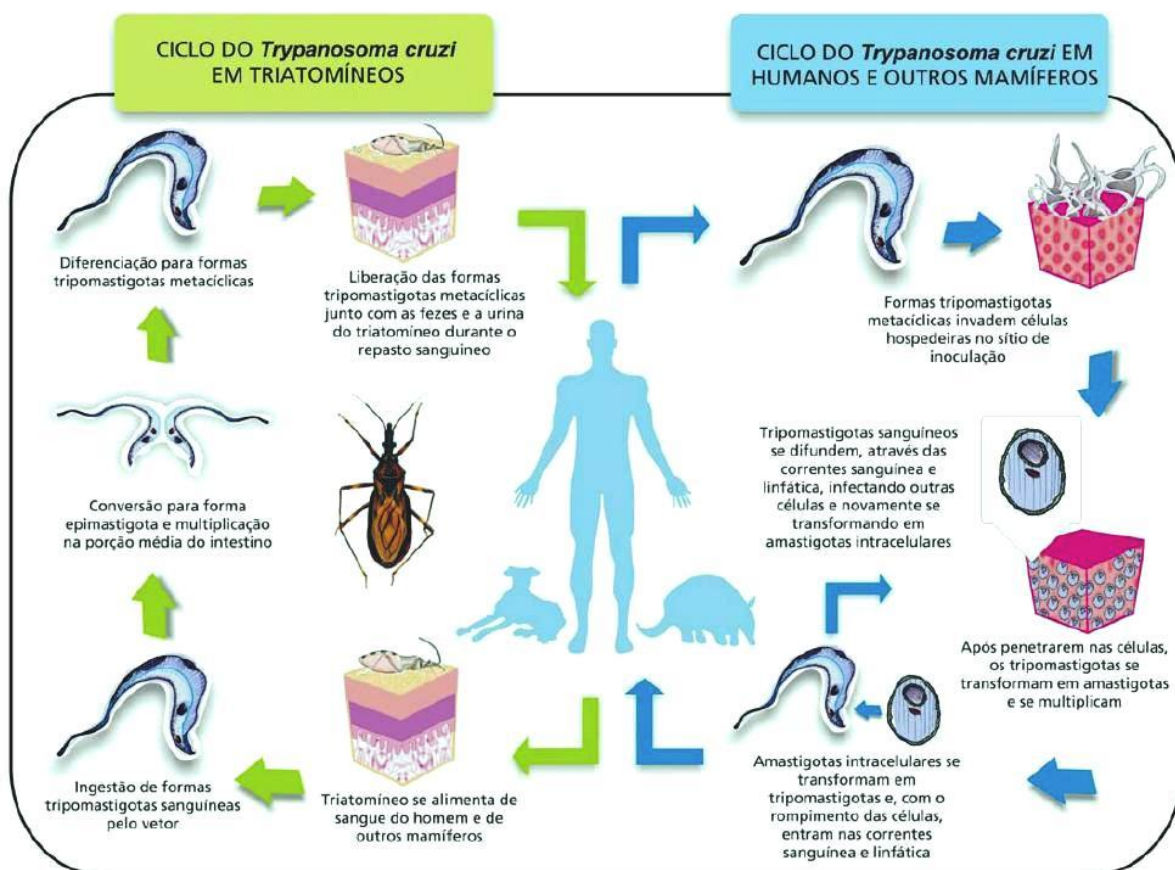
Fonte: <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=13>

Os amastigotas, formas arredondadas ou ovóides, imóveis, desprovidas de flagelo livre, agrupam-se em "ninhos" na intimidade de tecidos diversos do hospedeiro vertebrado. Trata-se da forma de multiplicação do parasita no hospedeiro vertebrado e medem de 1,5 a 4µm de diâmetro (LEÃO, R. N. Q., 1997).

Os tripomastigotas apresentam corpo alongado, com cerca de 20µm de comprimento. São formas encontradas no sangue circulante dos hospedeiros vertebrados e nas porções terminais do intestino dos vetores (LEÃO, R. N. Q., 1997).

A forma epimastigota, apresenta cerca de 20µm de comprimento e trata-se da forma multiplicativa do parasita no intestino do triatomídeo, é também a forma predominante em cultivo axênico, sendo por isso, mais comumente utilizada em estudos bioquímicos (PRATA, A., 2001).

O ciclo biológico do *T. cruzi* encontra-se esquematizado na **Figura 07**.



Ciclo de transmissão do *Trypanosoma cruzi* (simplificado). Infográfico: Venício Ribeiro, ICICT/Fiocruz.

Figura 07: Ciclo biológico da doença de Chagas

Fonte: <http://miriamsalles.info/wp/wp-content/uploads/ciclotrypanosomacruz.jpg>

3.1.4. Sintomatologia

A infecção chagásica humana é caracterizada por uma fase aguda que dura em média dois meses, sendo sucedida por uma fase crônica que tipicamente se prolonga por toda a vida do hospedeiro. Na maioria dos casos, a fase aguda da doença é oligossintomática, principalmente em adultos, não sendo valorizada pelo paciente ou pelo agente de saúde. Pode ainda não haver instalação de uma fase aguda clássica, uma vez que está relacionada diretamente com o número de parasitas inoculados (DIAS, L. C. et al., 2009). Esta fase tem as características clínicas de uma infecção generalizada, de gravidade variável, sendo o diagnóstico sugerido pela presença dos sinais de porta de entrada, sinal de Romaña e chagoma cutâneo de inoculação (**Figura 08**) quando evidentes, e comprovado pelo encontro dos

parasitos no sangue periférico (exame a fresco ou gota espessa) (www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=93).

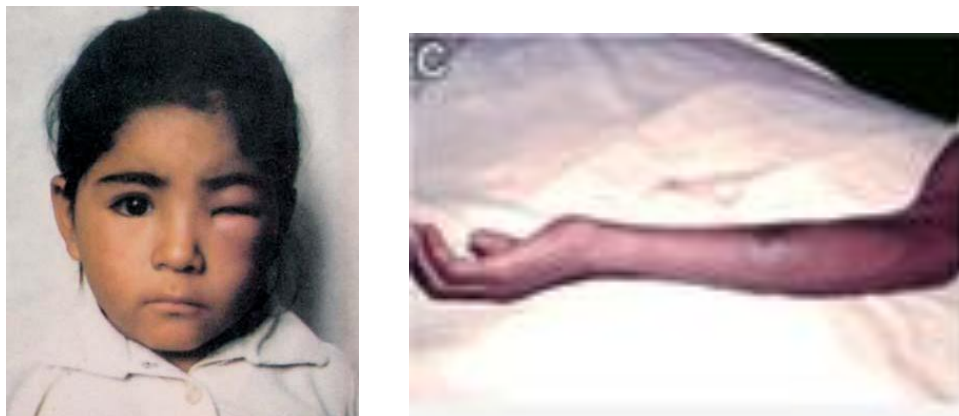


Figura 08: Sinal de Romaña e chagoma de inoculação

Fonte: <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=35>

A fase aguda sintomática ocorre principalmente em crianças, na primeira década de vida, podendo levar à morte devido a complicações decorrentes de insuficiência cardíaca e processos inflamatórios que envolvem o cérebro (*e.g.*, meningoencefalite). À medida que os níveis de parasitemia e as lesões inflamatórias da fase aguda diminuem em intensidade, uma miocardite focal se instala durante a fase indeterminada da doença, podendo em muitos casos evoluir em magnitude e abrangência, com a destruição de fibras cardíacas e aumento da fibrose. Cerca de 60% dos pacientes chagásicos crônicos permanecem assintomáticos por longo período, sendo que 30% destes desenvolvem complicações cardíacas que podem levar à cardiopatia chagásica crônica, lesão mais grave da doença, e/ou afetar o sistema gastrointestinal, resultando em severos problemas digestivos (DIAS, L. C. et al., 2009). Na **Figura 09** podemos observar a morfologia de corações de pacientes chagásicos que morreram vítimas de diferentes complicações.

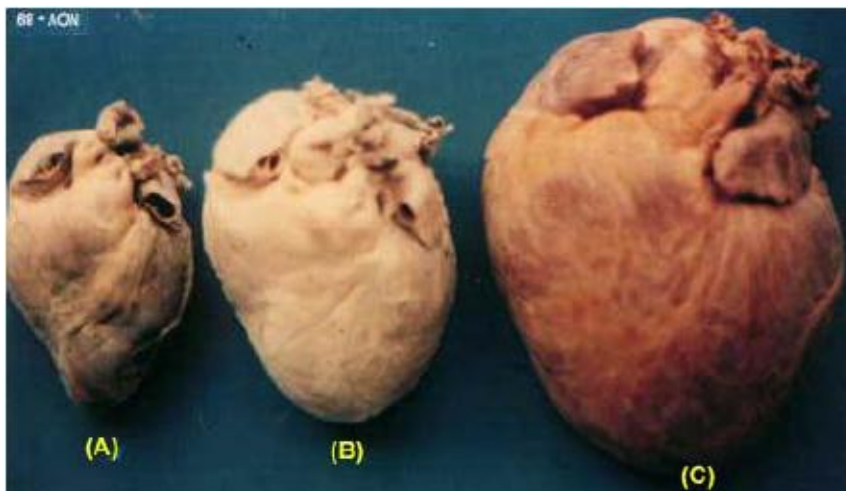


Figura 09: Coração de pacientes que desenvolveram doença de Chagas e morreram por: (A) morte súbita, (B) megacólon ou mega-esôfago e (C) insuficiência cardíaca congestiva

Fonte: www.uftm.edu.br/instpub/fmtm/patge/mac0220.htm

3.1.5. Tratamento

A partir de 1911, Chagas e seus companheiros do Instituto Oswaldo Cruz se puseram em campo para melhorar o diagnóstico e tentar estabelecer um tratamento específico da doença, que vitimava geralmente crianças em sua etapa aguda e desencadeava uma terrível e mortal cardiopatia em muitos casos da fase crônica. Muitos medicamentos foram experimentados contra o *T. cruzi*, ao longo de décadas, tais como, arsenicais, antimoniais, derivados do quinino, amins, sulfas e antibióticos, que se mostravam ativos em outras infecções e doenças tropicais, porém, mostraram-se inócuos contra o parasita causador da doença de Chagas (www.datasus.gov.br/cns/temas/tribuna/tratamento.htm).

A partir da década de 1960 estudos demonstraram que a Nitrofurazona (**Figura 10**) em esquema de duração prolongada (53 dias em média) na dose de 100mg/kg/dia curava mais de 95% dos camundongos cronicamente infectados. Entretanto, a conclusão final foi de que a Nitrofurazona poderia ser curativa, mas os pacientes não toleravam os efeitos colaterais nas doses e no tempo necessários para a cura (www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=124).

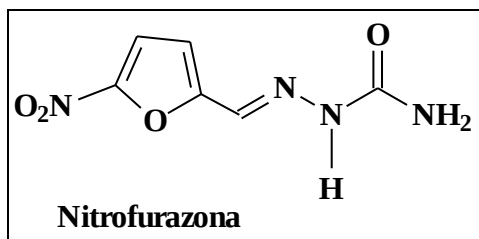


Figura 10: Primeiro fármaco utilizado no tratamento da doença de Chagas

No final de 1960 duas novas drogas surgiram então com melhores perspectivas para o tratamento da doença, Nifurtimox e Benznidazol, estas possuíam melhor potencial de cura, principalmente na fase aguda da doença, e apresentavam melhor tolerância, se comparando com a Nitrofurazona. A ação destes fármacos é afetada diretamente por algumas condições, como a duração do tratamento, a idade e a distribuição geográfica dos pacientes, entre outros (DIAS, L. C. et al., 2009).

Embora tenham sido consideradas um avanço para o tratamento da doença de Chagas, o Nifurtimox (Lampit[®]) e Benznidazol (Rochagan[®]) não são exemplos de drogas ideais, visto que não são ativos durante a fase crônica da doença e apresentam sérios efeitos colaterais, requerem administração por longos períodos de tempo sob supervisão médica, há grande variação na susceptibilidade de isolados do parasito a ação destas drogas, apresentam alto custo e não há formulações pediátricas, apesar do fato de que crianças até 12 anos possuem maiores chances de se beneficiarem com o tratamento por não apresentarem ainda a sintomatologia crônica da doença (www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=125).

Atualmente outros compostos vêm sendo estudados como agentes anti-*T. cruzi*, é o caso dos antifúngicos Cetoconazol[®] e Terbinafina[®] (**Figura 11**), inibidores da biossíntese de esteróis de membrana. Estes agentes antifúngicos têm mostrado possuírem ação contra culturas do parasita (PORCAL, W. et al., 2008).

Evidências indicam que o Nifurtimox e Benznidazol atuam através da formação de radicais livres e/ou metabólitos eletrofílicos, esses metabólitos (eletrofílicos) formados através do mecanismo de ação destas drogas podem atuar também em outros sistemas, especialmente do hospedeiro (humano), devido a sua alta reatividade. Esta baixa especificidade de ação por vias bioquímicas específicas e exclusivas do parasita, contribui para os efeitos citotóxicos observados no tratamento de pacientes chagásicos (DIAS, L. C. et al., 2009).

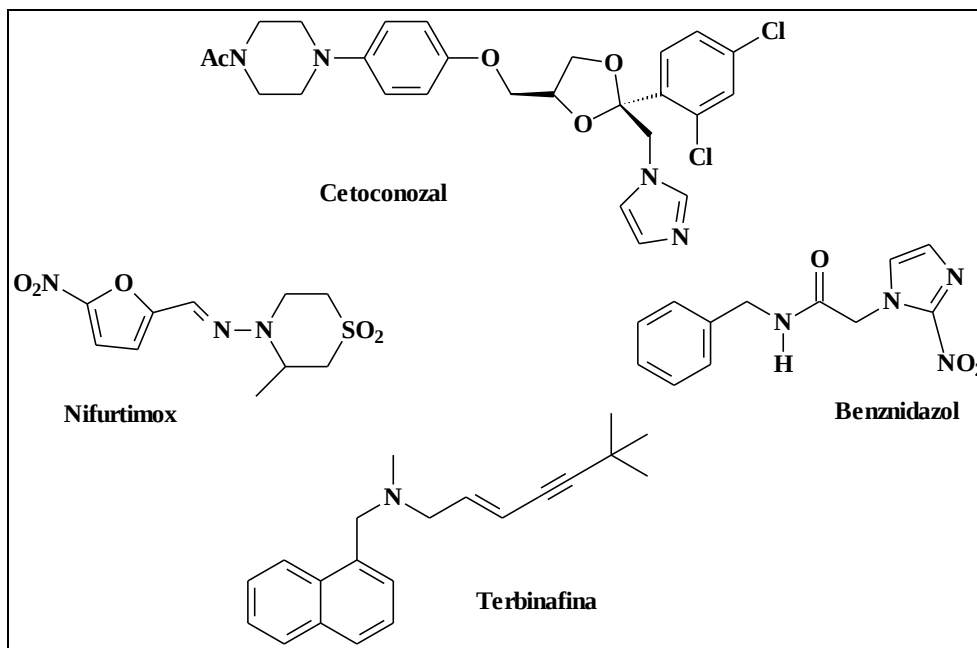


Figura 11: Fármacos utilizados clinicamente e experimentalmente como agentes anti-*T. cruzi*.

3.1.6. Alvos específicos na busca de fármacos tripanomicidas

O desenvolvimento de fármacos mais efetivos e menos tóxicos requer um melhor conhecimento do ciclo de vida e do metabolismo do *T. cruzi*. Uma extensa distribuição da forma intracelular amastigota dos parasitos nos tecidos e células, durante as fases aguda e crônica da doença de Chagas, é o fator que causa maior dificuldade para a ação de um fármaco específico, especialmente quando se compara com a leishmaniose, na qual as formas amastigotas estão restritas aos macrófagos (CROFT, S. L., 1999).

Para o sucesso do desenvolvimento deste tipo de fármaco, realmente efetivo e menos tóxico, é necessário a determinação de alvo(s) específico(s) identificado(s) em vias metabólicas chave para o parasito. Estudos recentes têm permitido a identificação de alvos potenciais em *T. cruzi* e que incluem o metabolismo de esteróis, o DNA e diferentes enzimas, como por exemplo, a tripanotiona redutase (TR), cruzaína, dentre outras (www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=125).

T. cruzi, assim como a maioria dos fungos e leveduras patogênicos, requerem 24-alquil esteróides específicos para a viabilidade e proliferação celular, em todos os estágios de seu ciclo de vida, e não são capazes de utilizar as reservas de colesterol presentes em seus hospedeiros mamíferos. A biossíntese de ergosterol do *T. cruzi* tem sido quimicamente

validada como um alvo quimioterápico em várias etapas, incluindo a escaleno epoxidase, uma enzima que catalisa a conversão de escaleno em 2,3-oxidoescaleno, utilizando oxigênio molecular (GERPE, A. et al., 2009).

Escaleno epoxidase é essencial na síntese de colesterol em mamíferos e ergosterol em fungos, e é potencialmente inibida por alilaminas, utilizadas com sucesso como agentes antifúngicos. Derivados de alilaminas têm também demonstrado serem potentes inibidores do crescimento do *T. cruzi* *in vitro* e *in vivo*, atuando por meio de uma redução seletiva nos níveis endógenos de esterol de membrana do parasito, o fármaco Terbinafina é um exemplo disto (GERPE, A. et al., 2009).

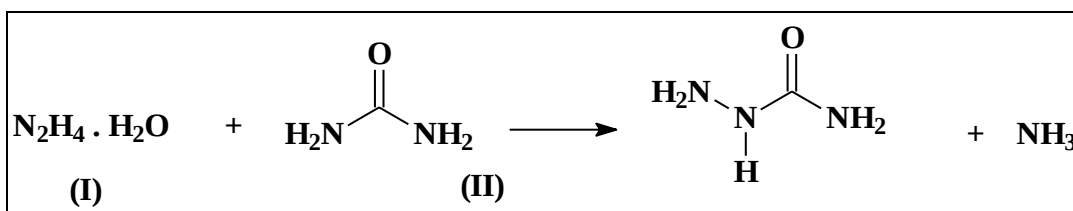
Tripanotiona redutase (TR), trata-se de uma flavoenzima NADPH-dependente responsável pela proteção do parasita contra radicais livres. Ocorre exclusivamente em tripanosomatídeos, sendo indicada por vários autores como um dos mais promissores alvos na busca por drogas tripanomicidas (AGUIRRE, G. et al., 2004). Derivados nitrofurânicos têm demonstrado produzirem inativação irreversível desta enzima em condições anaeróbicas. Em uma etapa inicial estes compostos são reduzidos pela enzima, os produtos finais desta reação são oxidados pelo oxigênio molecular e atuam como inibidores enzimáticos, bloqueando a redução do substrato fisiológico, “tripanotiona dissulfide” (CHUNG, M.-C. et al., 2003).

Cruzaína (TCC) é a principal cisteína protease do *T. cruzi* sendo liberada em todos os estágios do ciclo de vida do parasita, porém entregue em diferentes compartimentos celulares em cada estágio. Esta enzima é essencial para a replicação intracelular do parasita, sendo um alvo potencial para o desenvolvimento de novas drogas tripanomicidas (LEITE, A. C. L. et al., 2007). Recentemente tem sido demonstrado que a infecção pelo *T. cruzi* pode ser curada em células de ratos e modelos de cães pelo tratamento com inibição irreversível da cruzaína (BRAK, K. et al., 2009). Diversos trabalhos têm descrito a atividade inibitória provocada por diversos grupos de compostos, como por exemplo, N-acilhidrazidas, uréias, tiouréias e tiosemicarbazonas (LEITE, A. C. L. et al., 2007).

3.2. QUÍMICA DE SEMICARBAZIDA E SEMICARBAZONAS

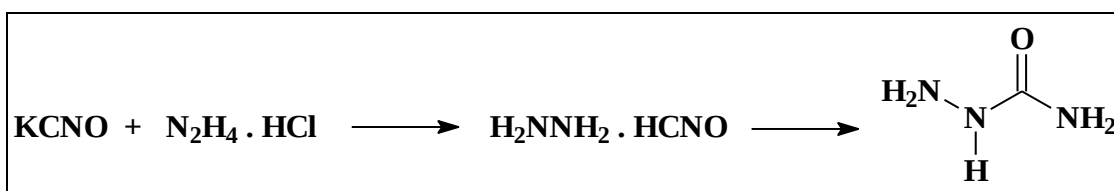
3.2.1. Síntese de semicarbazidas

Semicarbazida é originada da reação da hidrazina (I) em uréia (II) (**Esquema 01**) ou em cianatos. Hidrazinas substituídas, uréias e isocianatos orgânicos formam semicarbazidas substituídas. A reação da hidrazina com uréia acontece sob aquecimento a 100°C, ou melhor, sob refluxo em álcool amílico (BYRKIT, G. D.; MICHALEK, G. A., 1950).



Esquema 01: Rota de síntese da semicarbazida a partir de hidrazina e uréia.

Cianato de potássio e sais de hidrazina formam cianato de hidrazina, o qual sofre rearranjo originando semicarbazida, conforme **Esquema 02** a seguir.



Esquema 02: Rota de síntese da semicarbazida a partir de cianato de potássio e hidrazina

Segundo Byrkit e Michalek, Baker e Gilbert em 1942 afirmaram que esta reação pode proceder-se naturalmente em temperatura ambiente, o aquecimento prolongado normalmente utilizado seria desnecessário. Um excesso de uréia, cianato ou tiocianato (utilizado na síntese de tiosemicarbazida) pode formar hidrazodicarbonamida (biurea), um derivado semicarbazida secundário, ou o correspondente hidrazoditiocarbamida (BYRKIT, G. D.; MICHALEK, G. A., 1950).

Semicarbazida pode também ser formada pela redução de nitroureia (BYRKIT, G. D.; MICHALEK, G. A., 1950).

3.2.2. Oxidação de semicarbazida

Linch em 1912 citou que a oxidação de semicarbazida com hipobromito de sódio formaria tetrahydro-3,4-sim-tetrazinediona (I), porém Stolle, em 1913, em um artigo sem resultados experimentais declarou que a oxidação de semicarbazida resultaria em biurea (II) como principal produto ao invés do tetrahydro-3,4-sim-tetraziodiona (**Figura 12**) (WILEY, P. F., 1954).

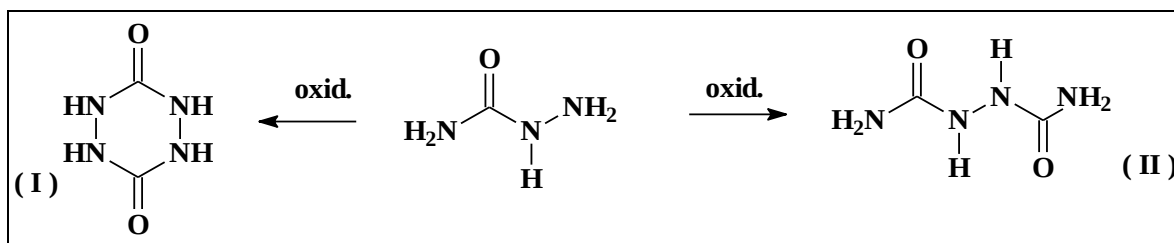
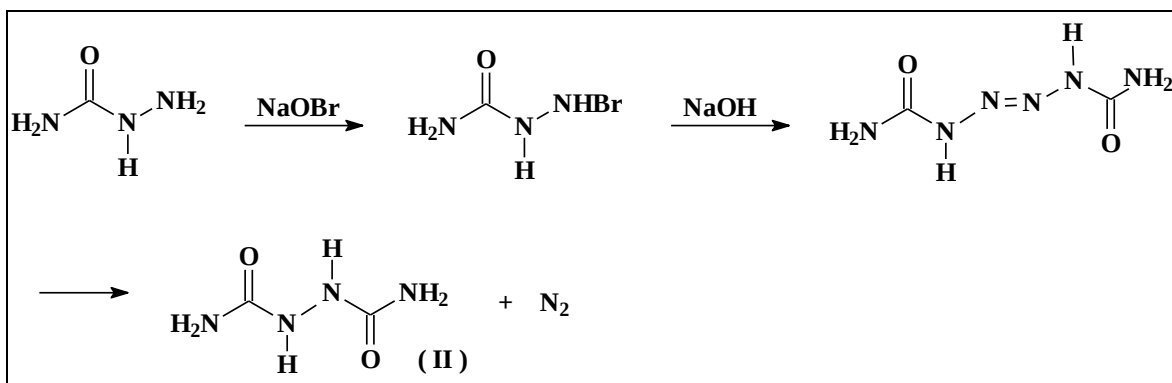


Figura 12: Produtos propostos na oxidação da semicarbazida

Segundo Wiley, 1954, a segunda afirmativa parece mais provável, tendo em vista que a já comprovada oxidação de semicarbazida à biurea realizada por D'Arcangelo utilizava iodo e iodeto de cianogenio. Estas oxidações são semelhantes àquela utilizando hipobromito, onde o agente oxidante é também um halogênio positivo. Assim, a oxidação de hidrocloreto de semicarbazida com quantidade equimolar de bromo gera 91% de biurea (II), conforme sequencia de reações mostradas a seguir (**Esquema 03**).



Esquema 03: Oxidação de semicarbazida

3.2.3. Síntese de semicarbazonas

Semicarbazonas constituem uma importante classe de compostos que vêm sendo largamente estudada na Química Orgânica Medicinal devido sua ampla gama de atividades biológicas. Apresentam-se com a estrutura geral da **Figura 13** e são obtidas diretamente por meio da condensação entre aldeídos ou cetonas com a semicarbazida, podendo ser empregados diferentes meios reacionais.

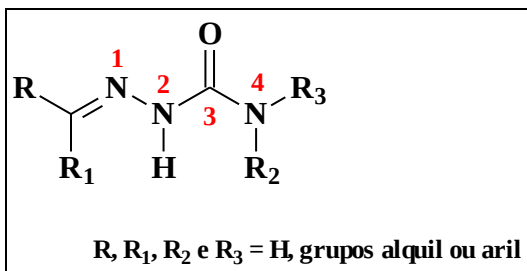
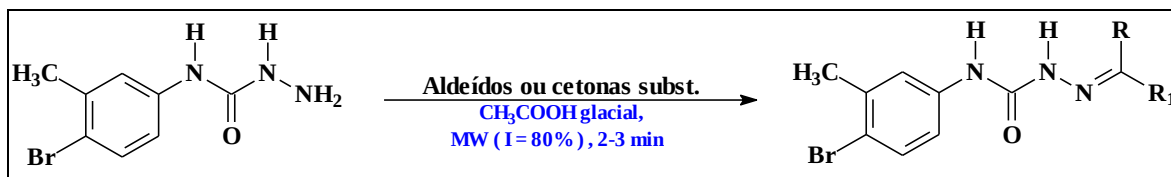


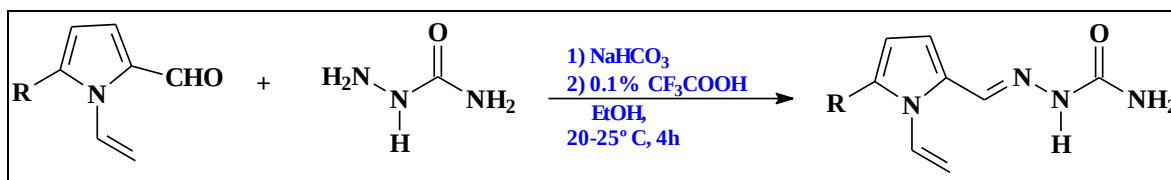
Figura 13: Estrutura geral de semicarbazonas e numeração dos átomos.

Utilizando irradiação em microondas, Shalini e equipe em 2007, obteve uma série de 4-bromo-3-metilfenil semicarbazonas fazendo-se reagir 4-bromo-3-metilfenil semicarbazida e diferentes aldeídos ou cetonas substituídos em etanol e ácido acético glacial, como catalisador, por um período de 2-3 minutos (**Esquema 04**) (SHALINI, M. et al., 2007).



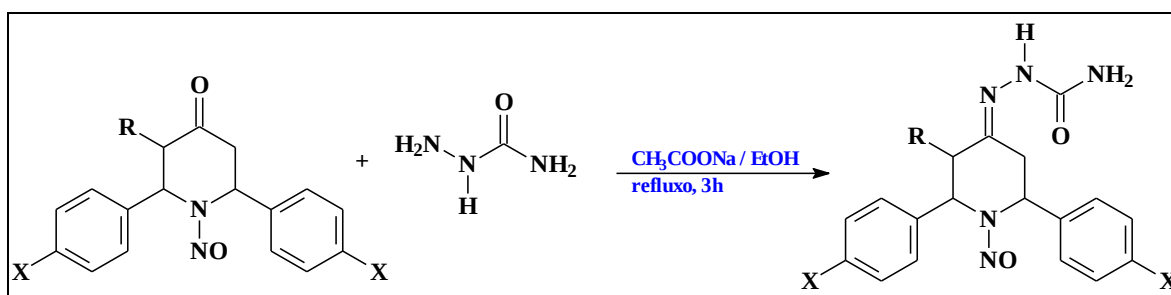
Esquema 04: Rota de Síntese de 4-bromo-3-metilfenil semicarbazona

Mikhaleva e equipe, 2008, sintetizou semicarbazonas através da condensação entre uma série de 1-vinilpirrol-2-carboxaldeído e a semicarbazida sob agitação em etanol e com adição de 0,1% de ácido trifluoracético, como catalisador, porém antes disso, a semicarbazida foi primeiro convertida em base pela agitação por 1 hora em temperatura ambiente com quantidade equimolar de NaHCO_3 (**Esquema 05**) (MIKHALEVA, A. I. et al., 2008).



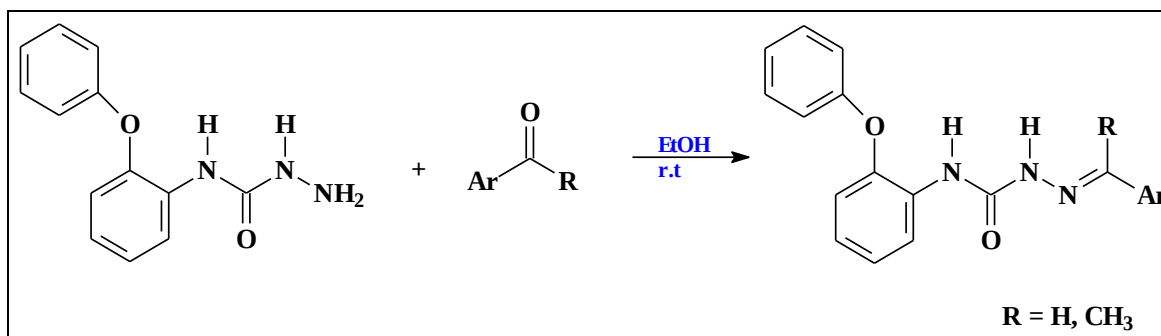
Esquema 05: Rota de síntese de semicarbazonas a partir de 1-vinilpirrol-2-carboxaldeído

T. Hemalatha e equipe, 2008, obteve uma série de semicarbazonas N-nitroso-2,6-diarilpiperidin-4-ona, fazendo-se reagir semicarbazida com a série de piperidonas e acetato de sódio em etanol sob refluxo por um período de 3 horas em banho de vapor (**Esquema 06**) (HEMALATHA, T. et al., 2008).



Esquema 06: Rota de síntese de derivados semicarbazônicos N-nitroso-2,6-diarilpiperidin-4-ona

Shafiee et al., 2009, preparou uma série de 4-(2-fenoxifenil)semicarbazonas a partir da reação entre 4-(2-fenoxifenil)semicarbazida e diversos benzaldeídos e acetofenonas sob agitação em etanol e temperatura ambiente (**Esquema 07**) (SHAFIEE, A. et al., 2009).

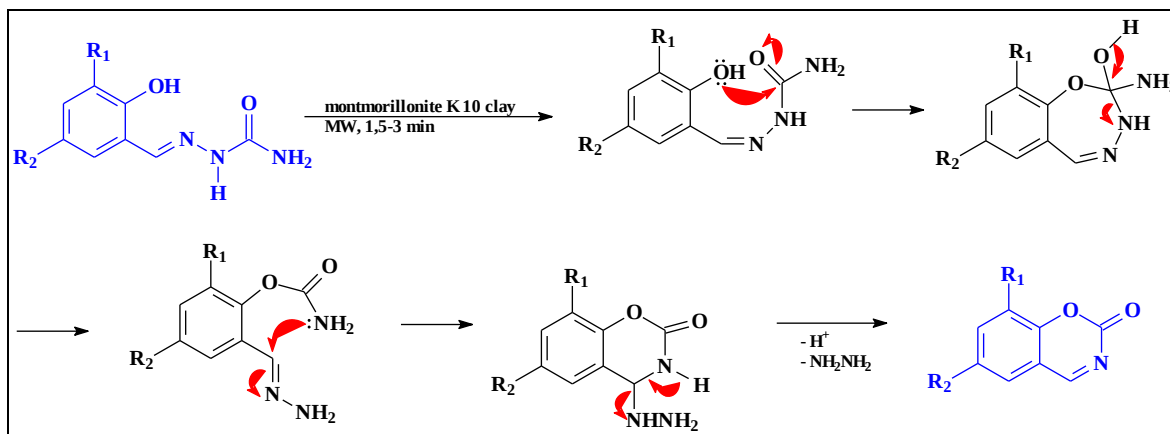


Esquema 07: Rota de síntese de 4-(2-fenoxifenil)semicarbazonas

3.2.4. Ciclização de semicarbazonas

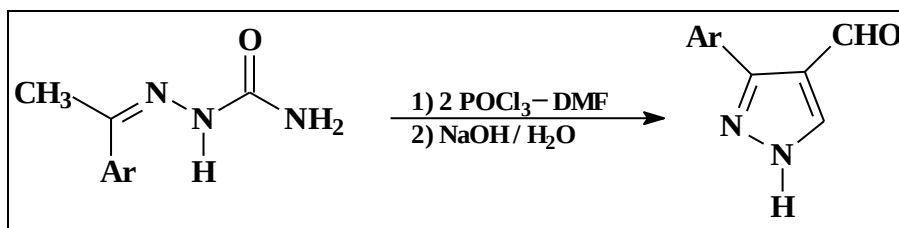
Semicarbazonas podem ser utilizadas como importantes intermediários na síntese orgânica, principalmente para obtenção de anéis heterocíclicos, como tiazolidonas, oxadiazóis, pirazolidonas e tiadiazóis (BRONDANI, D. J. et al., 2007).

L. D. S. Yada e equipe, em 2002, desenvolveu um método rápido para síntese de 2H-benz[e]-1,3-oxazin-2-ones por meio da ciclodehidrazinação de salicilaldeído semicarbazona, a reação se processou em um meio de argila sobre irradiação no microondas na ausência de solvente (**Esquema 08**) (YADAV, L. D. S. et al., 2002).



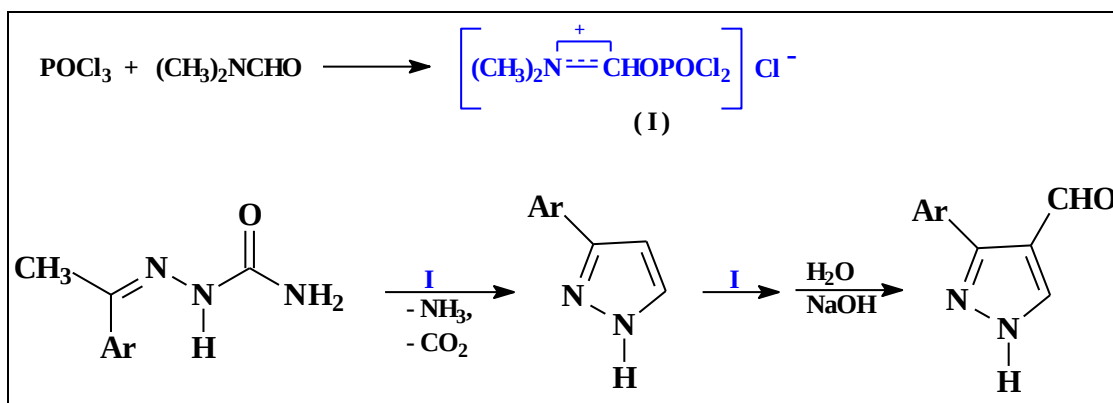
Esquema 08: Mecanismo de ciclização de salicilaldeído semicarbazona

Lebedev et al., 2005, descreveu a formação de 3-arilpirazol-4-carboxaldeídos a partir de metilaril semicarbazonas, via formilação de Vilsmeier por meio de 2 mols do complexo POCl_3 -DMF (**Esquema 09**).



Esquema 09: Rota sintética de ciclização de metilaril semicarbazonas

Metilaril semicarbazonas entram na reação de Vilsmeier com o complexo POCl_3 -DMF (I) dando origem a 3-arilpirazol-4-carboxaldeídos através da sequência de dois ataques por I: primeiro no grupamento $-\text{CH}_3$ da semicarbazona, com subsequente ciclização à 3-arilpirazol, e após, no átomo de carbono 4, resultando no aldeído heterocíclico (**Esquema 10**) (LEBEDEV, A. V. et al., 2005).



Esquema 10: Etapas da ciclização de metilaril semicarbazonas

M. Shalini et al., 2009, objetivando desenvolver derivados 1,2,4-triazóis, análogos cíclicos de aril-semicarbazonas (**Figura 14**), promoveu a ciclodesidratação de N^1 -(4-substituído benzoil)- N^4 -(substituído fenil) hidrazina-carboxamidas.

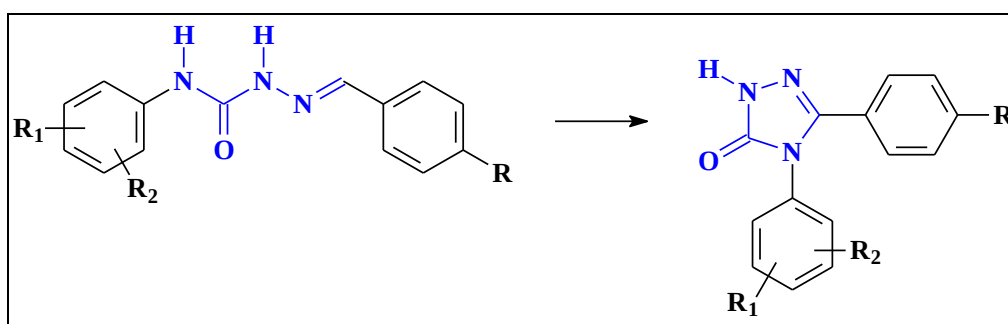
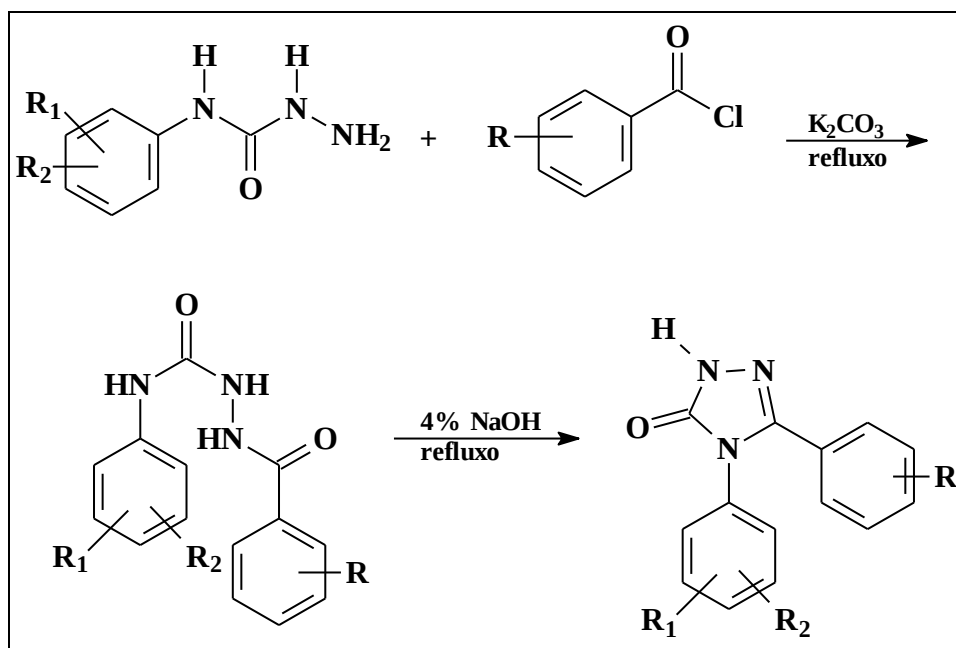


Figura 14: Analogia de Aril-semicarbazonas e 1,2,4-triazóis

Os derivados substituídos difenil-1,2,4-triazol-3-ona (1-18) foram obtidos através da condensação de cloretos benzoil substituídos e fenil semicarbazidas substituídas na presença de solução de K_2CO_3 a 4% em refluxo por 2-3 horas. Os derivados N^1 -(4-substituído benzoil)- N^4 -(substituído fenil) hidrazina-carboxamidas formados, foram então, ciclizados à 4,5-difenil-2H-1,2,4-triazol-3-(4H)-ona em meio ligeiramente alcalino (4% de NaOH) em aquecimento por mais ou menos 3 horas (**Esquema 11**) (SHALINI, M. et al., 2009).

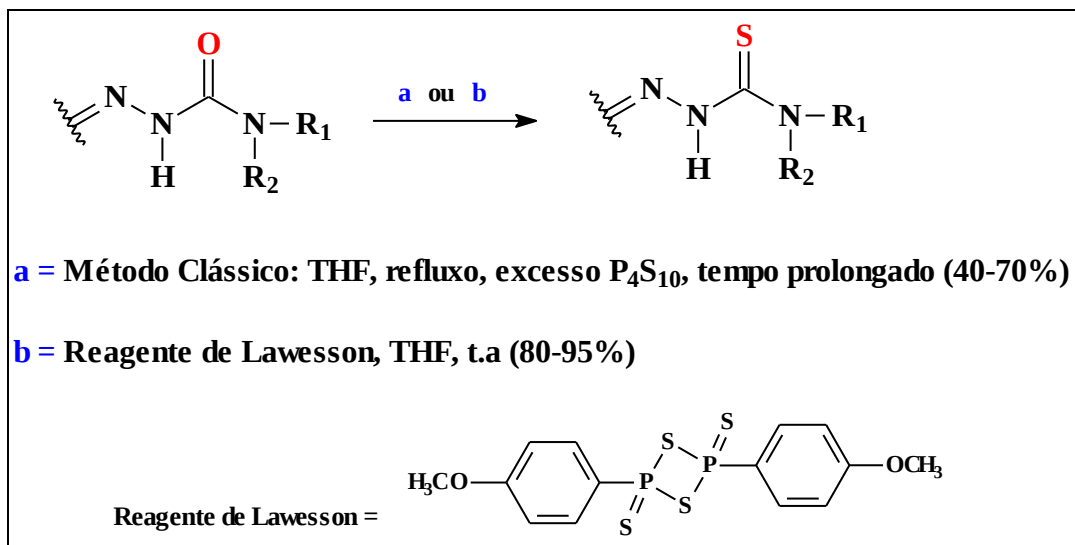


Esquema 11: Rota de síntese para obtenção de 1,2,4-triazóis

3.2.5. Semicarbazonas a tiosemicarbazonas

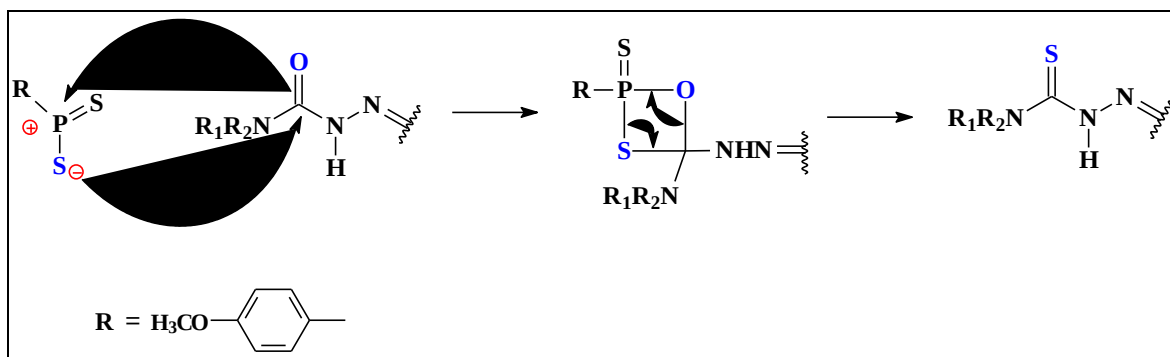
O grupamento carbonila presente na estrutura das semicarbazonas pode ser convertido a um grupamento tiocarbonilado, obtendo-se desta forma, uma tiosemicarbazona, composto que, assim como as semicarbazonas, possui uma vasta utilização na Química Medicinal.

As reações de tiocarboxilação podem ser realizadas através de dois reagentes: o pentasulfeto de fósforo (P_4S_{10}) ou o 1,3-ditio-2,4-difosfatano-2,4-disulfeto-2,4-bis(4-metóxfenil), comumente conhecido como reagente de Lawesson (**Esquema 12**). A primeira reação apresenta desvantagens como necessidade de um excesso de P_4S_{10} , ambiente inerte, solvente anidro (dioxano ou tetrahidrofurano), um tempo prolongado de reação e baixos rendimentos (DE SOUZA, M. V. N. et al., 2005).



Esquema 12: Rotas sintéticas para obtenção de tiossemicarbazonas a partir de semicarbazonas

A reação utilizando o reagente de Lawesson é mais eficaz, limpa, de fácil purificação, realizada em condições brandas e com excelentes rendimentos. O mecanismo proposto para esta reação encontra-se no **Esquema 13** (DE SOUZA, M. V. N. et al., 2005).

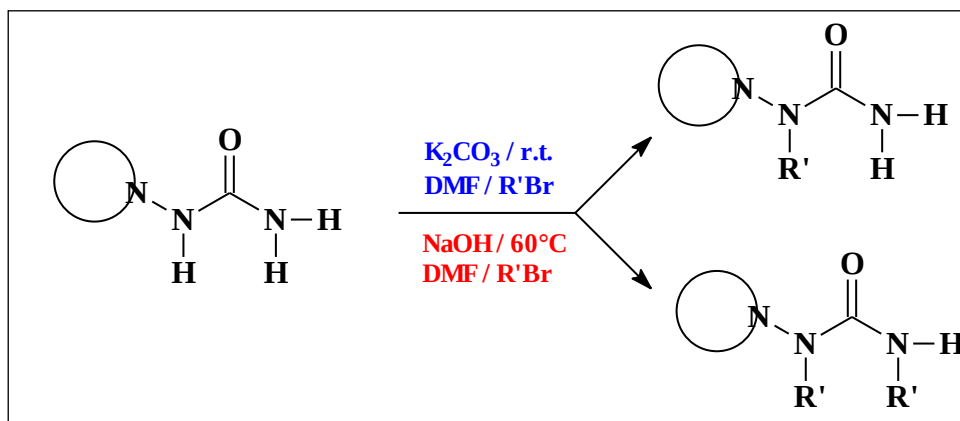


Esquema 13: Mecanismo envolvido na reação de Lawesson

3.2.6. N-alquilação de semicarbazonas

A N-Alquilação de semicarbazonas apresenta-se como uma das soluções em se melhorar a lipofilia de derivados semicarbazônicos, tendo em vista que, a alta polaridade de fármacos pode dificultar suas atividades em organismos biológicos.

D. J. Brondani, 2007, descreveu um método seletivo para N²-alquilação em derivados semicarbazônicos, utilizando meio aprótico e controle cinético. Até então, os métodos de N-alquilação em derivados semicarbazônicos só eram regioseletivos para a porção -NH₂ (N⁴-alquilação) do grupamento amida, sendo comum a ocorrência de overalquilações (N²,N⁴-alquilação) (BRONDANI, D. J. et al., 2007). O esquema geral da síntese encontra-se descrito no **Esquema 14**:



Esquema 14: Rotas de síntese para N-alquilação de semicarbazonas

3.2.7. Semicarbazonas e complexos metálicos

Semicarbazonas e seus complexos metálicos exibem uma vasta gama de atividades biológicas, sendo extensamente estudadas suas diversas propriedades com diferentes complexos metálicos (BASTOS, A. M. B. et al., 2008). A atividade biológica dos complexos metálicos diferem tanto em relação ao ligante como em relação ao íon metálico em si (KASUGA, N.C. et al., 2006).

P. Noblía e colaboradores, 2004, estudaram a atividade antitumoral *in vitro* de cinco ligantes semicarbazônicos com vanádio(V), **Figura 15**, onde foi observado que estes complexos apresentaram seletiva citotoxicidade para linhagens de células tumorais TK-10 (NOBLÍA, P. et al., 2005).

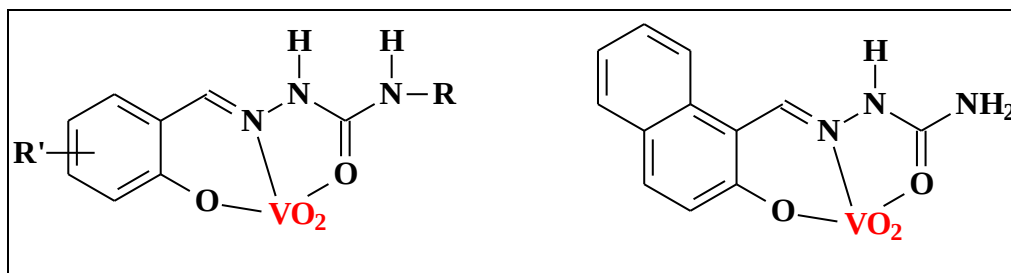
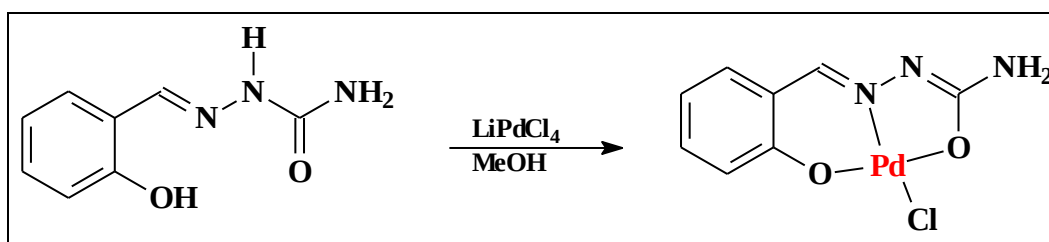


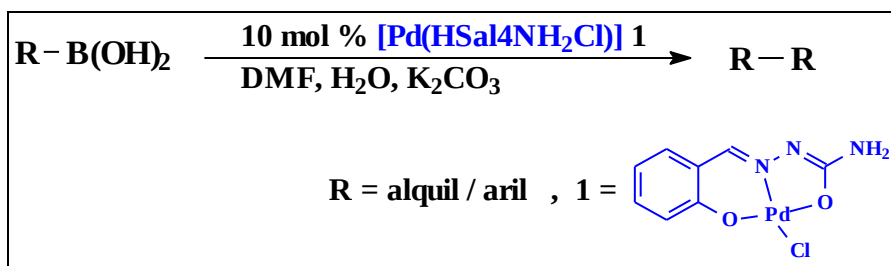
Figura 15: Estrutura de complexos metálicos de semicarbazona com vanádio (V)

J. S. Yadav e equipe, 2007, descreveu o uso do complexo Paládio/semicarbazona como catalizador nas reações de homoacoplamento de ácidos alquil e aril borônico via reação de Suzuki, dando origem a compostos dialquil ou diaril, através da formação de ligação C-C. O complexo catalítico é formado por meio do salicilaldeído semicarbazona com Li_2PdCl_4 em metanol, onde o ligante (semicarbazona) está ligado ao Pd em um modelo tridentado por meio do nitrogênio azometínico, oxigênio semicarbazônico e o oxigênio fenólico, **Esquema 15** (YADAV, J. S. et al., 2007).



Esquema 15: Rota de síntese do complexo catalisador Paládio/semicarbazona

Este complexo catalítico tem a vantagem de ser ativo em condições aeróbicas, diferentemente de ligantes fosfina comumente utilizados nestas reações. O complexo catalítico derivado do Pd e semicarbazona [$\text{Pd}(\text{HSal}_4\text{NH}_2)\text{Cl}$] catalisou eficientemente as reações de homoacoplamento apresentando altos rendimentos (**Esquema 16**) (YADAV, J. S. et al., 2007).



Esquema 16: Rota de síntese da reação de homoacoplamento de Suzuki utilizando o complexo catalítico Pd/Semicarbazona

Em 2008, Ana Mena B. Bastos et al., sintetizou e avaliou a atividade glicemiante de complexos metálicos de oxavanádio(IV) e (V) tendo como ligantes 2, 3 ou 4-acetilpiridina. Foi observado que os complexos metálicos de oxavanádio(IV) foram capazes de aumentar a captação de glicose e inibir a liberação de glicerol dos adipócitos, indicando seus potenciais de agirem como insulino-miméticos (BASTOS, A. M. B. et al., 2008).

3.3. SEMICARBAZONAS E SEU AMPLO PERFIL FARMACOLÓGICO

Semicarbazonas apresentam um amplo perfil farmacológico e constituem uma importante classe de compostos cujas propriedades têm sido extensivamente estudadas na Química Medicinal e, particularmente, na Química Medicinal Inorgânica, em razão de sua capacidade quelante e do papel da coordenação no seu mecanismo bioquímico de ação (BERALDO, H., 2004).

De modo geral pode-se dizer que semicarbazonas e tiosemicarbazonas agem, seja como inibidores de enzimas – através da complexação de metais endógenos ou através de reações de redox – seja através de interações com o DNA e da inibição da síntese deste. Além disso, alguns complexos metálicos desses ligantes apresentam a habilidade de mimetizar a ação de certas enzimas (BERALDO, H., 2004).

Podemos encontrar semicarbazonas apresentando uma diversa gama de atividades biológicas, dentre as quais podemos citar: atividades antichagásica, anticonvulsivante, antimicrobiana, herbicida, dentre outras.

3.3.1. Semicarbazonas e suas atividades anticonvulsivantes

Recentemente semicarbazonas adquiriram um importante papel como drogas anticonvulsivantes, podendo ser consideradas como uma nova classe de anticonvulsivantes orais (AGGARWAL, N. et al, 2008) e que são desprovidas do grupo dicarboximida – encontrado em drogas convencionais como barbitúricos, hidantoinas, oxazolidinadionas, dentre outros – que parece estar associado a toxicidade e efeitos colaterais (SHALINI, M. et al., 2009).

Tem sido demonstrado que a maioria das aril-semicarbazonas agem bloqueando os canais de sódio voltagem-dependente (THIRUMURUGAN, R. et al, 2006). P. Yogeeswari e colaboradores demonstrou que semicarbazonas N⁴-fenil substituídas poderiam atuar por mediação do GABA e inibir a enzima GABA-T (YOGEE SWARI, P. et al., 2005).

Dimmock e colaboradores, em 1986, sintetizou uma série inicial de dezoito semicarbazonas e tiosemicarbazonas (I), das quais 10 apresentaram atividade no testes MES e de scPTZ, quando administrados por via intraperitoneal. Eliminando a dupla ligação na função arilideno (II) (Dimmock et al., 1991), foi observada diminuição da atividade anticonvulsivante. Finalmente estudos adicionais permitiram a conclusão de que semicarbazonas com a estrutura geral III têm excelente atividade oral no teste de MES e elevados índices de proteção (Figura 16) (DIMMOCK, J. R., BAKER, G. B., 1994).

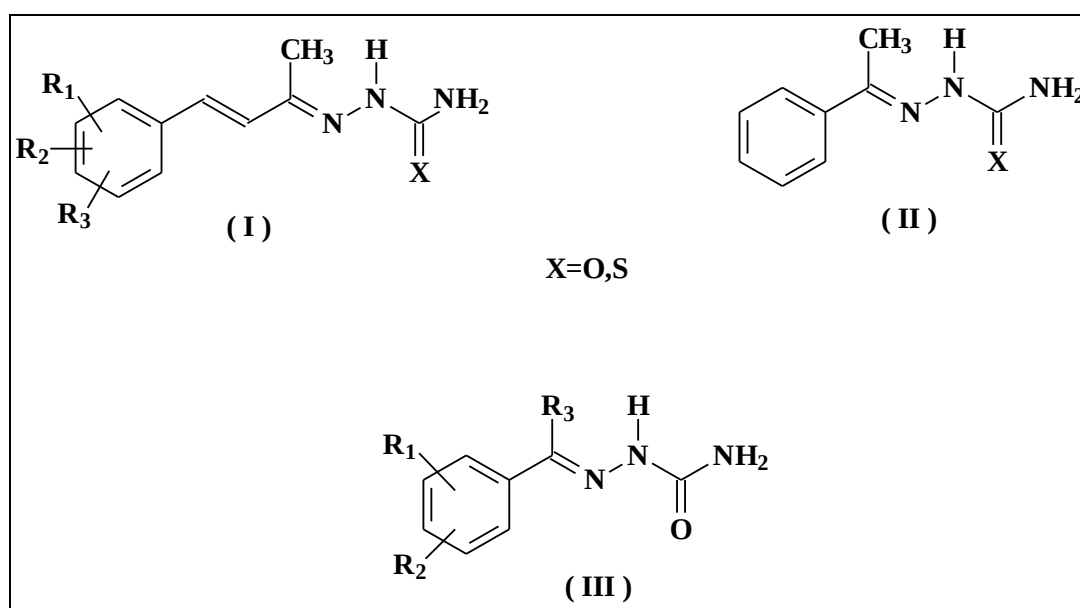


Figura 16: Estruturas gerais de derivados semicarbazônicos avaliados como agentes anticonvulsivantes

R. Thirumurugan e equipe, em 2006, sintetizou e avaliou a atividade anticonvulsivante de uma série de 2,4-dimetoxi-fenilsemicarbazonas, estas apresentaram um amplo espectro de atividade anticonvulsivante com baixa ou nenhuma neurotoxicidade, dentre esse compostos merece atenção o derivado 17 (**Figura 17**), sendo o mais ativo nos três modelos de testes avaliados (MES, scPTZ, e scSTY) e desprovido de neurotoxicidade (THIRUMURUGAN, R. et al., 2006).

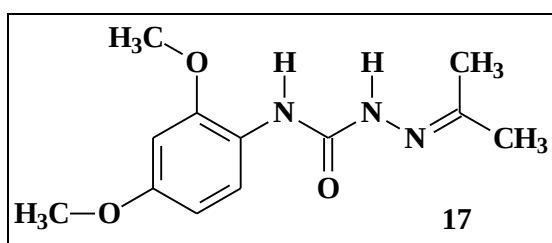


Figura 17: Estrutura do derivado 17, avaliado por R. Thirumurugan e equipe, 2006

Shalini et al., em 2007, relatou que derivados N-(4-bromo-3-metilfenil) semicarbazônicos possuem largo espectro de atividade anticonvulsivante devido seus variados mecanismos de ações, dentre os derivados sintetizados por Shalini e equipe, podemos citar o composto 20 (**Figura 18**), ativo em todos os testes (MES, scPTZ, scSTY e scPIC) (SHALINI, M. et al., 2007).

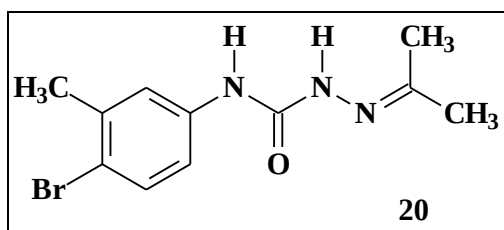


Figura 18: Estrutura do derivado 20, avaliado por Shaline et al., 2007.

Em 2009, Shalini observou o efeito da ciclização, de dezoito derivados semicarbazônicos (**Figura 19**), sobre a atividade anticonvulsivante, sendo notado que, para os derivados 6-8 houve uma maior atividade em relação aos compostos da série 6a-8a (cadeia aberta), o mesmo não ocorre em relação aos compostos 10-13, onde foi visto que a ciclização não se mostrou favorável, diminuindo a atividade anticonvulsivante àquela observada nos derivados 10a-13a. Em relação aos derivados 4-fluorofenil (14-18), estes se mostraram mais

ativos ou equípotentes aos seus análogos não cíclicos, porém tóxicos nas doses ativas (SHALINI, M. et al., 2009).

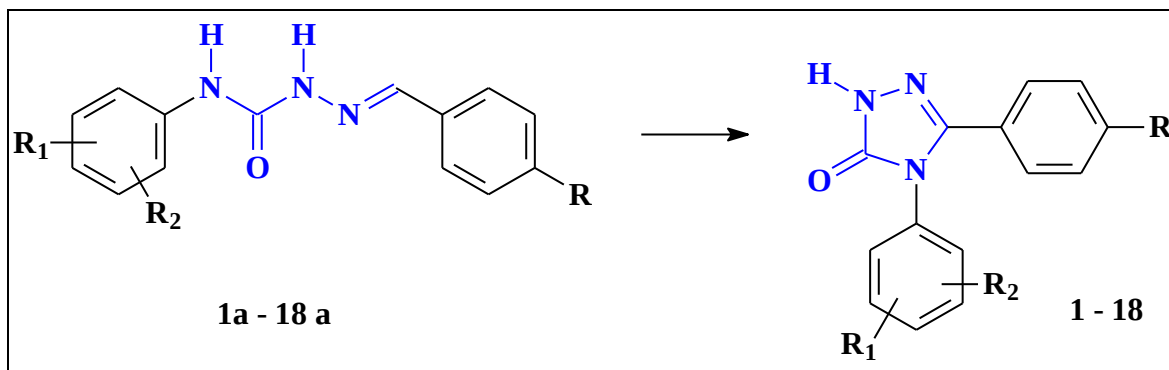


Figura 19: Estrutura geral dos derivados semicarbazônicos cíclicos avaliados por Shalini e equipe, 2009

3.3.2. Semicarbazonas e suas atividades antimicrobianas

T. Hemalatha *et al.*, 2008, avaliou a atividade antimicrobiana e antifúngica de derivados N-nitroso-2,6-diarilpiperidin-4-ona semicarbazonas, observando que dentre os derivados semicarbazônicos, os compostos 3d e 3h apresentaram muito boa atividade antibacteriana contra *E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus* e antifúngica contra *C. albicans* (HEMALATHA, T. *et al.*, 2008).

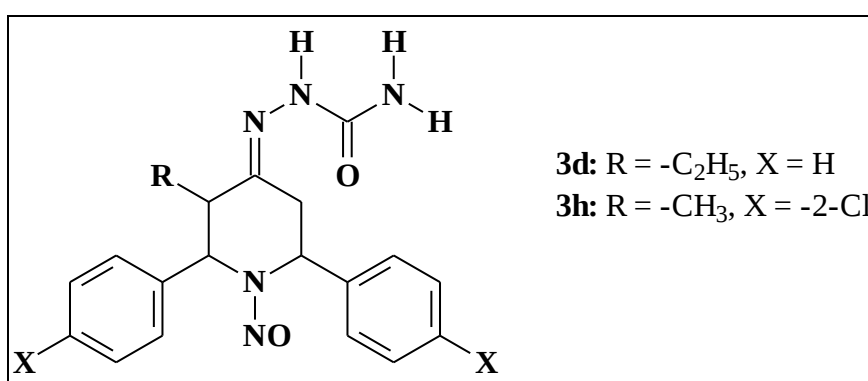


Figura 20: Estrutura geral de derivados N-nitroso-2,6-diarilpiperidin-4-ona semicarbazonas avaliados por T. Hemalatha, 2008.

D. J. Brondani e colaboradores, 2008, sintetizaram e avaliaram a atividade antimicrobiana de novos derivados da nitrofurazona (5-nitro-2-furaldeído semicarbazona), potente antibiótico usado como agente antibacteriano tópico, devido suas propriedades mutagênicas. Dentre os derivados nitrofurazônicos sintetizados, o composto 2a (**Figura 21**) apresentou melhor atividade, sendo efetivo contra *B. subtilis*, *S. Aureus*, *S. faecalis*, *Candida sp* e *Aspergillus niger*. Em relação a ação frente a microorganismos multirresistentes (MRSA), 2a também apresentou melhor potência (BRONDANI, D. J. et al, 2008).

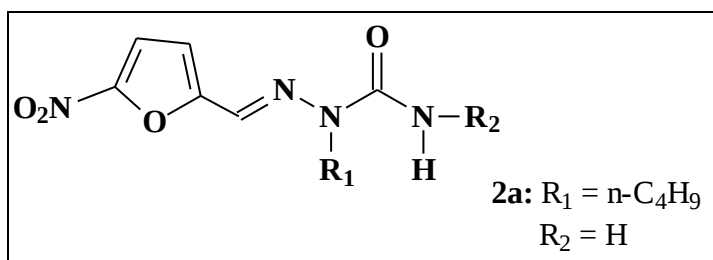


Figura 21: Estrutura geral de derivados nitrofurazônicos avaliados por D. J. Brondani, 2008

3.3.3. Semicarbazonas e suas atividades antichagásicas

M. Paulino et al., 2002, estudou em derivados 5-nitrofuranos e análogos 5-nitrotiofeno a taxa de inibição enzimática promovida por esses compostos em relação a tripanotiona redutase (TR) e a glutationa redutase (GR), enzimas responsáveis pela defesa contra radicais livres, no parasita e em mamíferos, respectivamente. Foi observado que, estes compostos são melhores inibidores da GR do que da TR, fato este, que pode estar ligado a efeitos tóxicos no hospedeiro mamífero. Em relação à inibição *in vitro* do crescimento do *T. cruzi* foi observado que os derivados 5-nitrofuranos foram mais potentes que seus análogos 5-nitrotiofeno. Os compostos RD06 e GI01 (**Figura 22**) foram os que apresentaram maior potência inibitória frente ao parasita (PAULINO, M. et al., 2002).

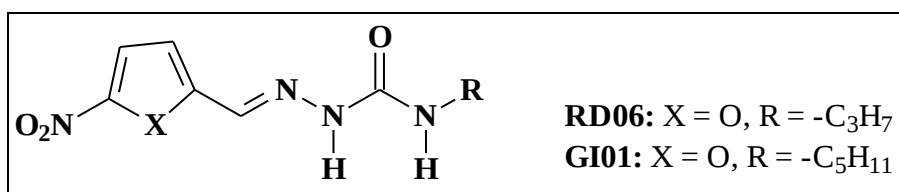


Figura 22: Estrutura geral de derivados nitrofurânicos e nitrotiofênicos avaliados por M. Paulino, 2002

M.-C. Chung et al., 2003, sintetizou e avaliou a atividade antichagásica da hidroximetilnitrofurazona (**Figura 23**) como pró-fármaco. Este composto apresentou maior atividade tripanomicida em relação à nitrofurazona e benznidazol, em todos os estágios evolutivos do parasita, e mostrou-se menos tóxico que seu protótipo (nitrofurazona) (CHUNG, M.-C. et al., 2003).

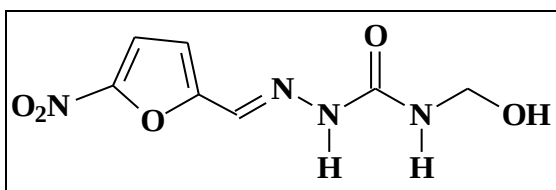


Figura 23: Estrutura da hidroximetilnitrofurazona

Analisando a atividade *in vitro* de derivados 5-nitro-2-furil como agentes anti-*T. cruzi*, G. Aguirre et al. em 2006, observou que dentre as semicarbazonas obtidas, o derivado 27 (**Figura 24**) foi o que se mostrou mais efetivo. Por meio dos estudos de estrutura atividade em 3D (CoMFA) foi observado que em relação à efeitos de campo eletrostático, duas regiões eram importantes na atividade: a cadeia lateral e a porção carbonil ou tiocarbonil, onde a presença de cadeias apolares resultaram em compostos mais ativos (AGUIRRE, G. et al., 2006).

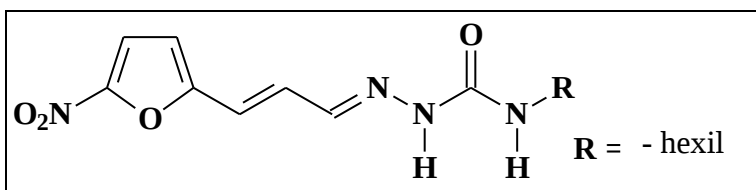


Figura 24: Estrutura geral de derivados 5-nitro-2-furil avaliados por G. Aguirre, 2006

E. Cabrera et al., 2009, analisou o potencial anti-*T. cruzi* e toxicidade *in vivo* de derivados do tipo 5-nitro-2-furil, onde foi observado que, dentre os análogos semicarbazônicos, os derivados 5-nitrofurfurilideno (n = 0, compostos 1 e 2) apresentaram maior toxicidade nos estudos realizados em relação a derivados do tipo (5-nitro-2-furil) propeno (n = 1, composto 3). Por meio dos estudos realizados, o derivado 3 (**Figura 25**)

mostrou possuir melhor comportamento como a gente anti-*T. cruzi* em músculos lisos, assim como comportamento antitripanomicida adequado em músculo cardíaco (CABRERA, E. et al., 2009).

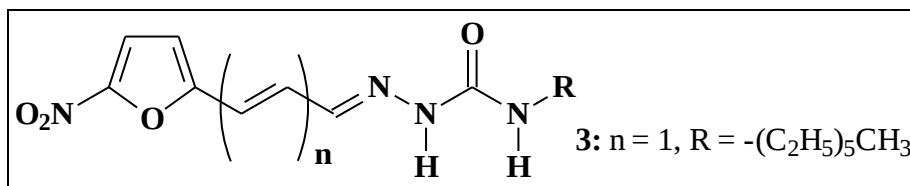


Figura 25: Estrutura geral de derivados 5-nitro-2-furil avaliados por E. Cabrera, 2009

A. Gerpe et al. e equipe, 2009, avaliou a capacidade de 5-nitrofuranos e 5-nitrotiofenos em promover acúmulo de escaleno no *T. cruzi*, determinando assim a atividade antitripanomicidade, por meio da inibição da enzima escaleno epoxidase, importante na via de biossíntese de esteróis. O derivado semicarbazônico 4 (**Figura 26**), foi classificado como um bom agente acumulador de escaleno, além de possuir um mecanismo de ação adicional, sendo capaz de produzir estresse oxidativo (GERPE, A. et al., 2009)

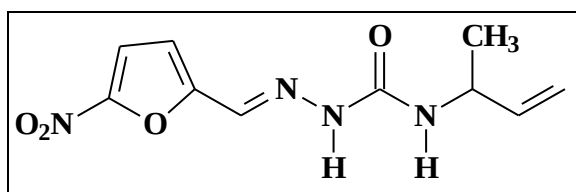
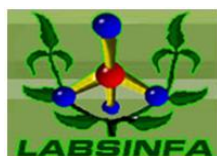


Figura 26: Estrutura do derivado semicarbazônico 4, avaliado por A. Gerpe, 2009

CAPÍTULO II



SÍNTESE, ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL E ATIVIDADES BIOLÓGICAS

4. METODOLOGIAS

4.1. SÍNTESE

Os derivados arilsemicarbazônicos desejados foram obtidos por meio da reação de condensação entre a semicarbazida hidrocloreada e uma série de aril-aldeídos substituídos, obtendo-se os compostos **01-20**.

Em um balão de fundo redondo contendo aproximadamente 15 mL de álcool etílico absoluto (EtOH) foram adicionados 2,5 mmol de semicarbazida hidrocloreada e quantidade equimolar do aril-aldeído ao qual desejava-se promover a condensação, adicionou-se então, 3 gotas de ácido clorídrico (HCl), como catalisador. A reação foi mantida em temperatura ambiente e constante agitação magnética, por um período de 3-5 horas. Para obtenção dos derivados **05**, **06** e **19** foram adicionados 5 mmol de semicarbazida hidrocloreada para 2,5 mmol dos respectivos aldeídos.

O acompanhamento das reações foi realizado por meio de análise cromatográfica em camada delgada (conforme metodologia a seguir) e após o término, os derivados arilsemicarbazônicos obtidos, precipitados no meio reacional, foram filtrados em funil sinterizado e lavados com água, seguida de lavagem em solvente orgânico (hexano).

A purificação dos compostos sintetizados foi por meio de recristalizações em água destilada. A pureza dos cristais foi visualizada em lâmpada ultravioleta após cromatografia em camada delgada utilizando sistema solvente adequado, assim como pela análise do ponto de fusão.

4.2. DETERMINAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

4.2.1. Análise cromatográfica em camada delgada: As análises foram realizadas em cromatofolhas de alumínio de sílica-gel 60 para o acompanhamento das reações, avaliação e purificação, e determinação dos valores de referência de fase dos produtos sintetizados. As fases móveis empregadas foram: Hex/AcOEt (7:3 v/v), sistema solvente 1; AcOEt, sistema

solvente 2; $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (7:3 v/v), sistema solvente 3. A visualização das substâncias foi realizada em lâmpada ultravioleta (254-365 nm).

4.2.2. Faixas de fusão: As faixas de fusão (ou decomposição) foram determinadas em aparelho fusiômetro, disponível no Laboratório de Planejamento, Síntese e Avaliação de Fármacos - LABSINFA, Departamento de Farmácia - UFPE, Recife - PE

4.3. ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL

4.3.1. Análise de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H): Os espectros de RMN ^1H e das substâncias sintetizadas foram obtidos no espectrômetro da Central Analítica do Departamento de Química Fundamental da UFPE, Recife - PE, utilizando como solvente DMSO-d_6 e como padrão interno DMSO.

4.3.2. Análise de espectrofotometria de absorção no infravermelho (IV): Os espectros de absorção no infravermelho na região de 4.000 a 400 cm^{-1} , foram obtidos em pastilhas de KBr no espectrofotômetro de infravermelho, disponível na Central Analítica do Departamento de Química Fundamental da UFPE, Recife - PE.

4.4. AVALIAÇÕES BIOLÓGICAS

Os ensaios biológicos foram conduzidos como sugeridos pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e são testes de elevada exatidão. Os laboratórios envolvidos apresentam condições de Biossegurança (contenções para NB2) adequadas para execução do trabalho proposto e para trabalho com animais experimentais.

4.4.1. Atividade antimicrobiana

Método da difusão em discos de papel: A atividade antimicrobiana foi verificada *in vitro*, pelo método de difusão em disco de papel, frente a bactérias Gram-positivas e Gram-

negativas (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Streptococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycobacterium smegmatis*) e fungos (*Candida albicans* e *Malassezia furfur*) da coleção de microrganismos do Departamento de Antibióticos da UFPE. Neste método, os discos contendo quantidades conhecidas dos compostos sintetizados ou dos fármacos utilizados como padrão foram colocados na superfície de uma placa de ágar que foram inoculados com uma suspensão padronizada de microrganismos testados. Discos de papel com apenas DMSO foram utilizados como controles negativos. As placas foram incubadas durante 24h e 48h à temperatura de 30°C e 37°C e após o período de incubação mediram-se os halos de inibição. A zona média de inibição para amoxicilina (antibiótico) e nistatina (antifúngico) foram utilizadas como valor de referência (mm). Os experimentos foram realizados em triplicata ou em duplicata, e repetidos se os resultados fossem diferentes.

Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI), Concentração Mínima Bacteriostática (CMB) e Concentração Mínima Fungistática (CMF): Para os ensaios de CMI, CMB e CMF, uma solução-mãe (1mg/mL) de compostos do teste foi preparado em dimetilsulfóxido (DMSO). Além disso, a diluição em série de compostos teste foi realizado em percentuais decrescentes de 1 para 2. Compostos teste em várias concentrações foram adicionados ao meio de cultura em um tubo de ensaio e diferentes cepas foram inoculadas em concentração 10^8 bacteria/mL. Trípticos Soy Agar (TSA) (para antibacteriano) e meio líquido Sabouraud (para antifúngico) foram utilizados como meio de cultura. Os tubos foram incubados a 37°C (antibiótico) ou 30°C (antifúngico) por 24-48 h, e, em seguida, examinados para a presença ou ausência de organismos de cultivo. Amoxicilina e Fluconazol foram utilizados como substâncias antibacterianas e antifúngicas. Os valores de CMI foram obtidos a partir da menor concentração dos compostos dos tubos de ensaios, onde permaneceu claro, indicando que o crescimento de bactérias ou fungos foi completamente inibido na concentração. Os valores da CMB e CMF foram medidos através da inoculação dos caldos utilizados para determinação da CMI para meio sem drogas. Os valores da CMI e da CMB e CMF, foram expressos em µg/mL.

4.4.2. Toxicidade aguda

Para este procedimento foi utilizado o método descrito por Carlini, E. A. et al., 1991. As observações comportamentais foram registradas em fichas apropriadas de triagem farmacológica adaptadas por Malone, R. A., 1977. Foram utilizados camundongos albinos swiss fêmeas pesando em média 20-30g com aproximadamente 60 dias. Os animais foram privados de alimentação 20 h antes do experimento. As substâncias após solubilização com propilenoglicol foram administradas por via oral na mais alta dose recomendada, de 2000mg/kg, calculando-se o volume a ser administrado em relação ao peso de cada animal. Os efeitos gerais foram observados com os animais em livre movimentação, em superfície plana, por um período de 60 min. Seguida por período constante de observação por um total de 14 dias.

4.4.3. Atividade antitumoral

Para determinação da atividade antitumoral do derivado 06 foram realizados ensaios pré-clínicos em roedores portadores de tumores malignos. Foram selecionados camundongos albinos swiss machos (*Mus musculus*) com sessenta dias de nascidos e pesos entre 25 e 35 gramas, divididos em grupos de seis animais por gaiolas, mantidos em condições controladas de iluminação (ciclo de 12 horas claro/escuro) e temperatura (22°C) e água *ad libitum*. A implantação dos tumores sólidos de Sarcoma 180 e Carcinoma de Ehrlich foi realizada segundo método de Stock (STOCK, C. C., et al., 1955) e modificada por Komiyama (KOMIYAMA, K., 1992).

O tratamento teve início 48 horas após os implantes e a administração foi por via intraperitoneal com doses de 10mg/kg e 5mg/kg do composto teste, 2,5mg/kg para o grupo padrão (utilizando Metotrexato) e solução salina para os grupos controles.

4.4.4. Atividade antichagásica e citotoxicidade

Obtenção de células esplênicas de camundongos isogênicos: Células esplênicas foram obtidas de acordo com PEREIRA, V. R. A. et al., 2005. Após sacrifício do animal por asfixia em CO₂, o baço de cada camundongo foi removido em condições assépticas e, em fluxo vertical, macerado em placa de Petri contendo meio de cultura RPMI. As suspensões celulares obtidas foram centrifugadas a 4°C, durante 5 minutos. Após descarte do sobrenadante, adicionou-se água destilada ao sedimento promovendo lise das hemácias. Após cinco minutos, foi coletado o sobrenadante, centrifugou-se novamente a 4°C, 200 x g por cinco minutos. O sedimento (contendo as células esplênicas) foi ressuspensionado em meio RPMI 1640 e uma alíquota de cada suspensão celular removida, diluída 1:10 em azul de trypan e quantificada em câmara de Neubauer para verificação das células viáveis.

Ensaio de citotoxicidade dos compostos em células esplênicas: Células esplênicas (6×10^5 células/poço), obtidas de acordo com item anterior, foram cultivadas em placas de 96 poços de fundo plano, contendo meio de cultura RPMI com 10% de soro bovino fetal. Para o ensaio de citotoxicidade, as células foram incubadas com os compostos em sete diferentes concentrações (faixa de 200 a 0,1 µg/mL) e com 1 µM de timidina tritiada/poço durante 24 h em estufa de CO₂ a 37°C. Em paralelo, foram feitos controles com células tratadas com saponina (0,05%), com células tratadas com DMSO (0,05%), substâncias com reconhecida atividade tóxica e um controle sem tratamento. Após 24 h de incubação, as células foram coletadas em papel de fibra de vidro e, posteriormente, a captação de timidina tritiada foi determinada através do contador beta de cintilação. O percentual de citotoxicidade foi determinado comparando-se a percentagem de incorporação de timidina tritiada nos poços com as drogas em relação aos poços não tratados.

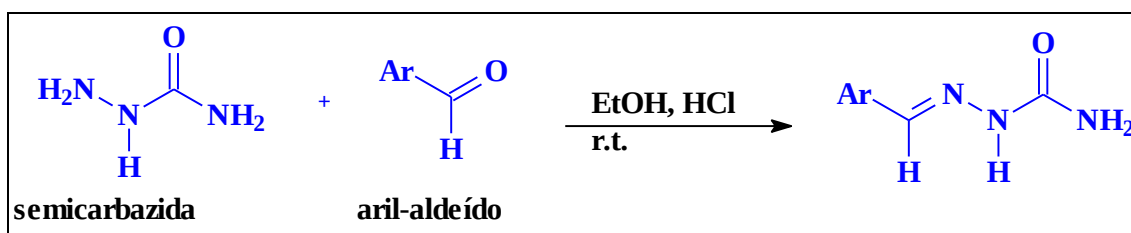
Avaliação da atividade dos compostos frente ao *T. cruzi*: Formas epimastigotas (5×10^6 /mL) crescidas em culturas axênicas, na fase log de crescimento, foram colocadas em placas de 96 poços no volume de 100 µL, a 26°C. O crescimento das formas epimastigotas foi realizado na ausência e na presença de diferentes concentrações dos compostos. Após 24 horas, 10 µL de MTT (10mg/mL) foi adicionado a cada poço e as placas incubadas por 4h. A

reação enzimática foi bloqueada com a adição de 100 μL de isopropanol 50% e duodecil sulfato de sódio (SDS) 10% e a leitura realizada no espectrofotômetro (BIORAD 3550) a 595 nm. Os testes foram conduzidos tendo como controles benznidazol (50 $\mu\text{g/mL}$) e Nifurtimox (25 $\mu\text{g/mL}$), drogas com atividade anti-*T. cruzi* conhecida e culturas de parasitos sem tratamento. O percentual de atividade contra o parasita foi determinado comparando-se os valores das absorbâncias dos poços incubados com as drogas e os valores do controle sem tratamento. A partir desses resultados, a IC_{50} foi determinada através da análise de próbites por meio de uma regressão linear simples utilizando o software SPSS 8.0 para Windows

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. SÍNTESE

Por meio da reação de condensação entre a semicarbazida hidrocloreada e uma série de aril aldeídos substituídos foi possível obter os derivados arilsemicarbazônicos desejados (**01-20**), empregando-se um metodologia simples e barata. Obteve-se arilsemicarbazonas com rendimentos, em geral acima de 80%, e grau pureza satisfatórios. O esquema geral da síntese encontra-se representado no **Esquema 17**.



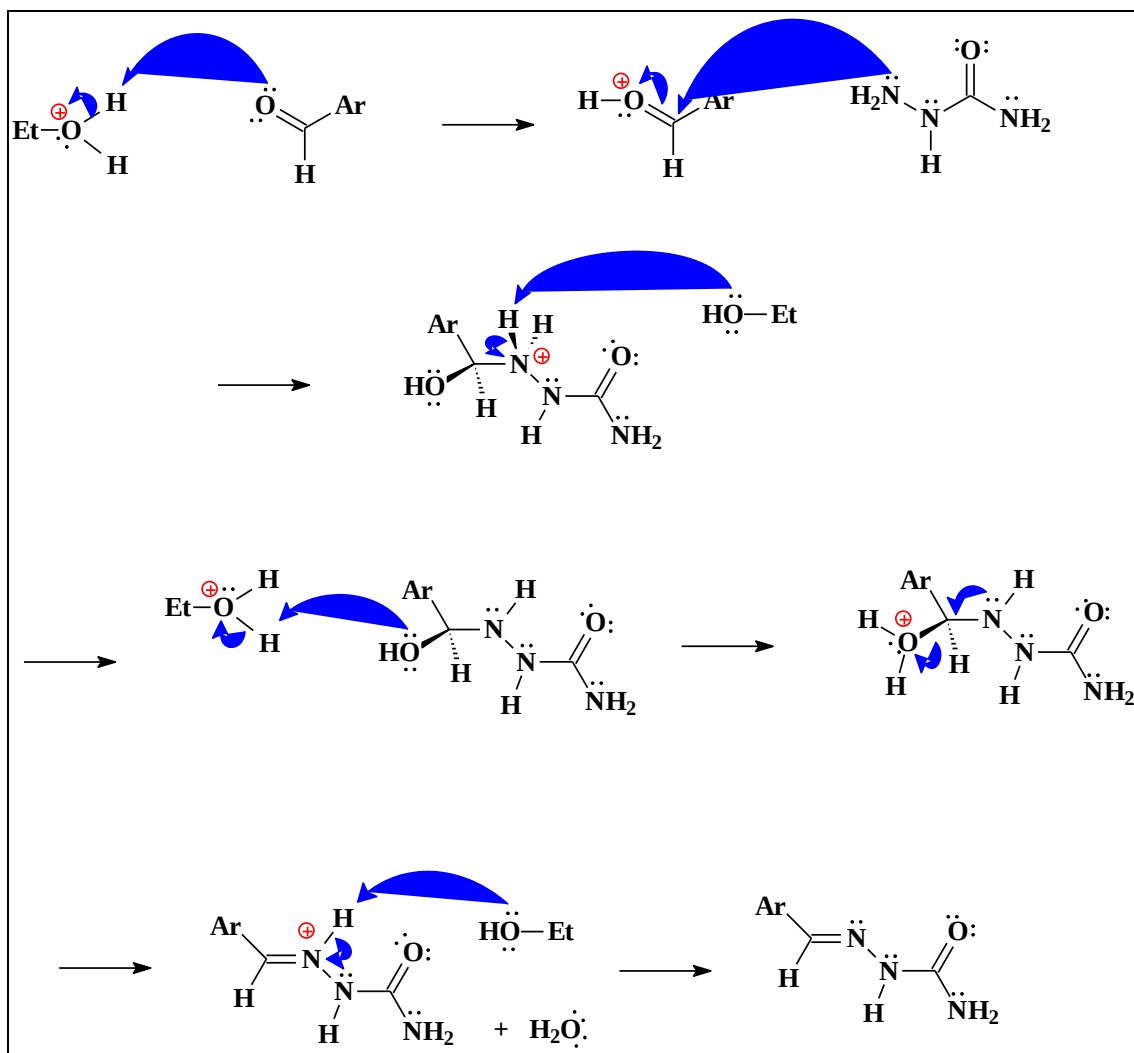
Esquema 17: Rota geral de síntese para obtenção dos derivados arilsemicarbazônicos

A adição de ácido clorídrico ao meio reacional (agente catalisador), provocou a protonação do solvente, EtOH, o qual, então cedeu próton (H^+) para o oxigênio carbonílico do aril-aldeído presente em reação. Após a protonação do aldeído, ocorreu ativação da carbonila aldeídica, favorecendo o ataque nucleofílico pelo par de elétrons livres presente no N1 da molécula de semicarbazida.

Ao formar quatro ligações, o nitrogênio (N1) da semicarbazida torna-se instável, voltando a ser um átomo neutro após transferência do próton de H^+ ao oxigênio que antes integrava o grupamento carbonila no aldeído. Ocorrida esta transferência do H^+ para o oxigênio, a instabilidade gerada neste átomo, favorece a formação de uma ligação imínica entre o N1 da semicarbazida e o “C carbonílico” do aldeído inicial, com liberação de água. O

N1 é então estabilizado pela perda de mais um átomo de hidrogênio para a formação do composto final arilsemicarbazônico.

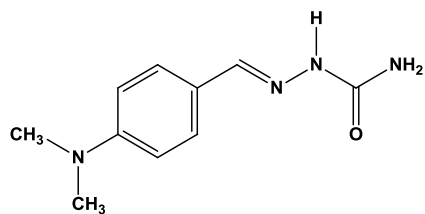
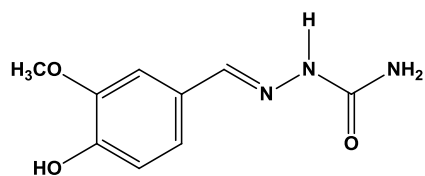
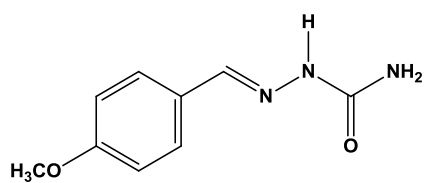
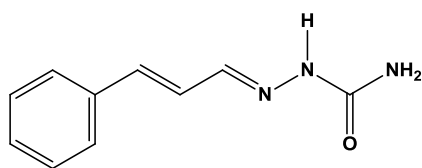
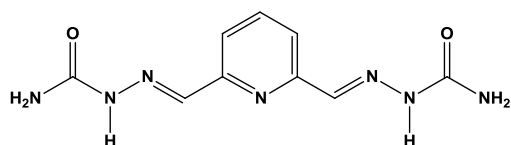
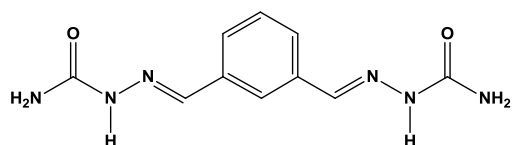
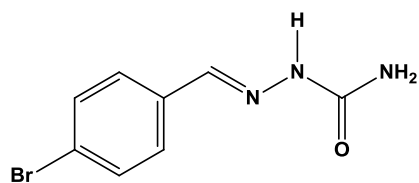
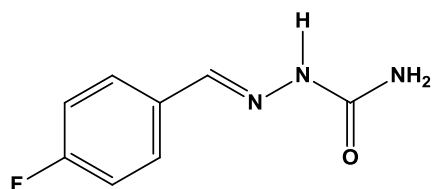
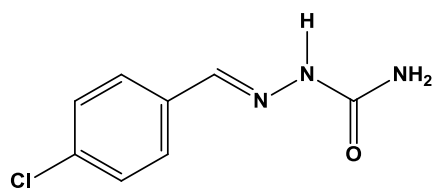
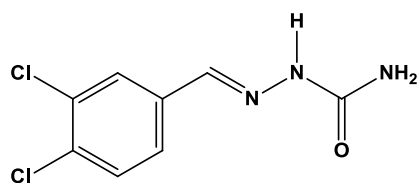
Estas etapas são mostradas no **Esquema 18**.

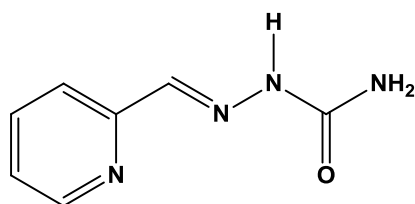
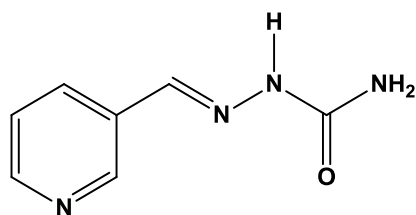
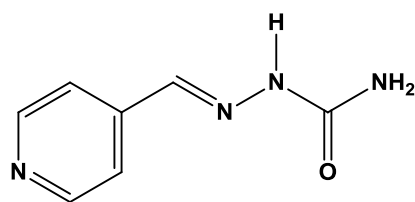
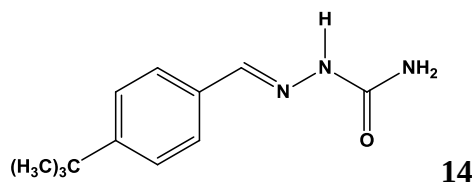
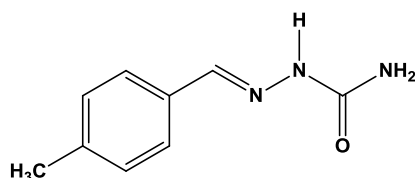
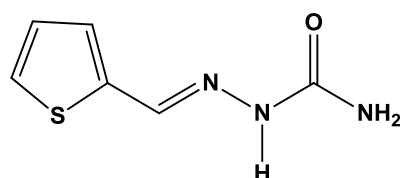
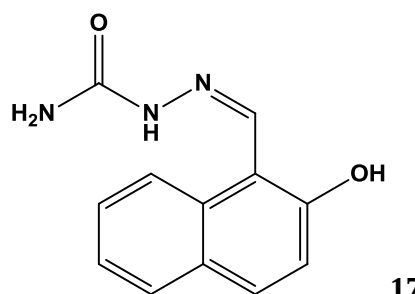
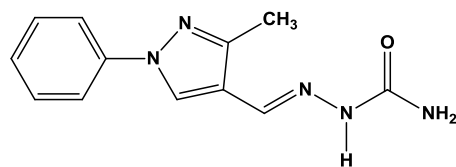
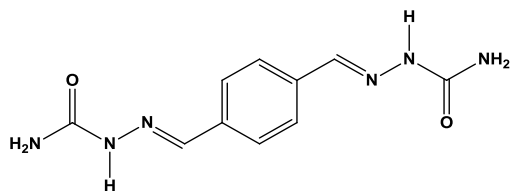
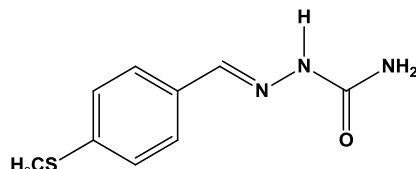


Esquema 18: Mecanismo de síntese das arilsemicarbazonas

Os compostos aril-semicarbazônicos sintetizados tiveram suas propriedades físico-químicas determinadas: faixa de fusão e referência de fase (*R_f*), presentes na **Tabela 01**. As estruturas foram confirmadas através de técnicas de espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Prótons (RMN¹H) e espectroscopia de absorção no Infravermelho (IV), confirmando a estrutura dos novos compostos.

Nos **Quadros 01** e **02** são apresentadas as estruturas dos compostos obtidos.

Quadro 01: Estrutura dos compostos 01-10**01****02****03****04****05****06****07****08****09****10**

Quadro 02: Estrutura dos compostos 11-20**11****12****13****14****15****16****17****18****19****20**

5.2. CARACTERIZAÇÃO DOS DERIVADOS OBTIDOS

Na **Tabela 01** é apresentada a fórmula e o peso molecular dos derivados aril-semicarbazônicos sintetizados, assim como, os dados referentes aos rendimentos obtidos na síntese, os valores de referência de fase (Rf), seguido do meio de eluição utilizado, e as faixas de fusão de cada composto.

Tabela 01: Dados físico-químicos e analíticos dos compostos 01-20

Composto	Fórmula molecular	Peso molecular	Rendimento (%)	Rf	Meio de eluição	Faixa de fusão (°C)
01	C ₁₀ H ₁₄ N ₄ O	206.24	42	0,35	Acetato de etila	225-227
02	C ₉ H ₁₁ N ₃ O ₃	209.20	81	0,43	Acetato de etila	237-239
03	C ₉ H ₁₁ N ₃ O ₂	193.20	82	0,53	Acetato de etila	210-212
04	C ₁₀ H ₁₁ N ₃ O	189.21	89	0,64	Acetato de etila	215-217
05	C ₉ H ₁₁ N ₇ O ₂	249.23	55	0,66	CHCl ₃ /MeOH (1:1)	270-272
06	C ₁₀ H ₁₂ N ₆ O ₂	248.24	89	0,76	CHCl ₃ /MeOH (1:1)	245-246
07	C ₈ H ₈ BrN ₃ O	242.07	83	0,64	Acetato de etila	237-239
08	C ₈ H ₈ FN ₃ O	181.16	84	0,55	Acetato de etila	230-232
09	C ₈ H ₈ ClN ₃ O	197.62	81	0,65	Acetato de etila	235-236
10	C ₈ H ₇ Cl ₂ N ₃ O	232.06	88	0,60	Acetato de etila	246-247
11	C ₇ H ₈ N ₄ O	164.16	86	0,87	CHCl ₃ /MeOH (7:3)	206-207
12	C ₇ H ₈ N ₄ O	164.16	67	0,80	CHCl ₃ /MeOH (7:3)	218-220
13	C ₇ H ₈ N ₄ O	164.16	66	0,84	CHCl ₃ /MeOH (7:3)	225-226
14	C ₁₂ H ₁₇ N ₃ O	219.28	92	0,57	Acetato de Etila	216-218
15	C ₉ H ₁₁ N ₃ O	177.20	82	0,51	Acetato de Etila	215-217
16	C ₆ H ₇ N ₃ OS	169.20	84	0,54	Acetato de Etila	228-230
17	C ₁₂ H ₁₁ N ₃ O ₂	229.23	82	0,59	Acetato de Etila	220-222
18	C ₁₂ H ₁₃ N ₅ O	243.26	90	0,48	Acetato de Etila	218-220
19	C ₁₀ H ₁₂ N ₆ O ₂	248.24	87	-	-	Acima 300
20	C ₉ H ₁₁ N ₃ OS	209.26	67	0,62	Acetato de Etila	222-224

5.3. ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL

5.3.1. Espectroscopia no Infravermelho (IV) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN ¹H)

Através da interpretação dos espectros de IV pode-se confirmar que a metodologia de condensação empregada foi eficaz, pois em todas as biomoléculas sintetizadas (**1-20**) foram

observadas as bandas de absorção características dos grupamentos funcionais presentes, assim como, observou-se a ausência de bandas características de aldeídos.

Pode-se constatar a ausência de absorção entre 2830 cm^{-1} e 2695 cm^{-1} referente à deformação axial da ligação C-H de aldeído, que apareceria como duas bandas moderadas. A absorção referente à deformação axial da ligação C=O característica de aldeídos também não foi notada, o sinal de carbonila constatado nos espectros de IV corresponde ao grupamento carbonílico presente nas semicarbazonas, sinal este que aparece em campo mais baixo em relação ao campo de absorção referente ao sinal de carbonila aldeídica. Para vibrações referentes à deformação axial de C=O em aldeídos o sinal normalmente aparece entre $1740\text{--}1720\text{ cm}^{-1}$, nos espectros obtidos observamos essa absorção em torno de 1690 cm^{-1} , deslocamento característico conhecido como Banda de Amida I, e que se refere a deformação axial da ligação C=O em amidas.

Adotando como exemplo a **Figura 27**, referente ao espectro de IV do composto **02**, observamos a presença das bandas de absorção de grupamentos importantes e característicos presentes em todos os compostos obtidos, como por exemplo, as bandas de absorção referentes ao grupamento C=O e -NH_2 da semicarbazona, a ligação imina formada e o hidrogênio hidrazínico.

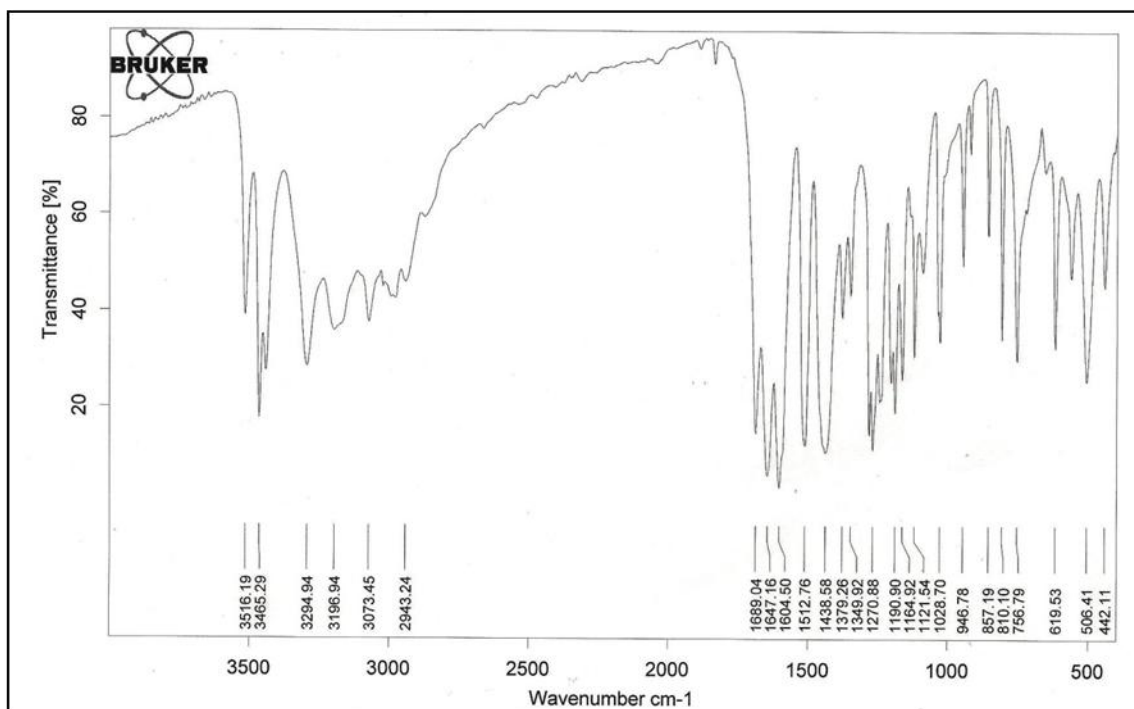


Figura 27: Espectro de infravermelho do composto 02.

Na região de 1689 cm^{-1} observa-se um pico de absorção intenso referente a deformação axial da ligação C=O, conhecido como Banda de Amida I, e em 1604 cm^{-1} observamos a Banda de Amida II referente a deformação angular de N-H. Na região de 1647 cm^{-1} temos o pico de absorção referente a deformação axial da ligação imínica (N=C), e na região de 3196 cm^{-1} é notada a absorção referente a deformação axial da ligação N-H hidrazínico. É observada também duas bandas de absorção moderadas em 3465 cm^{-1} , características das deformações axiais assimétrica e simétrica da ligação N-H da amida (-NH₂). Bandas de absorção com características e deslocamentos semelhantes foram encontradas nos espectros dos demais compostos.

Após a confirmação da presença de grupamentos funcionais desejados e do sucesso da condensação observado pela análise dos dados de infravermelho, a confirmação estrutural mais detalhada foi realizada por RMN ¹H. A configuração das moléculas sintetizadas não foi determinada neste estudo, porém, pela rápida observação e análise na cromatografia em camada delgada, pressupõe a presença de apenas um isômero, sugerindo que este esteja na configuração *E*, a qual é termodinamicamente mais estável.

Por meio da análise em espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN¹H) foi confirmada a estrutura química de cada derivado semicarbazônico obtido. Através dos deslocamentos químicos e acoplamentos de sinais pode-se determinar ao certo a posição de cada átomo de hidrogênio na molécula, elucidando assim cada estrutura.

Em uma rápida análise das estruturas químicas dos compostos desejados e de acordo com os conhecimentos de descolamento químico, teoria de blindagem e desblindagem dos átomos de hidrogênio, efeito anisotrópico, assim como acoplamento de sinais, e correlacionando com os espectros de RMN¹H obtidos, podemos concluir que os derivados almejados foram realmente obtidos. Analisando como exemplo o espectro de RMN¹H do composto **02**, presente na **Figura 28**, observa-se os deslocamentos químicos e acoplamentos de cada sinal de hidrogênio na molécula, confirmando assim a estrutura química em questão.

Pode-se notar que a maior parte dos sinais no espectro aparecem em regiões acima de 6 ppm, região característica para sinais de hidrogênio ligados a anéis aromáticos, assim como também, ligados a heteroátomos (SILVERSTEIN, R. M. et al., 2006). Temos apenas um sinal aparecendo em frequência mais baixa, próximo a 4 ppm, correspondente ao sinal de hidrogênios metílicos. Como pode ser visto na parte experimental deste trabalho,

comportamento semelhante de deslocamento químico é observado nos demais compostos obtidos.

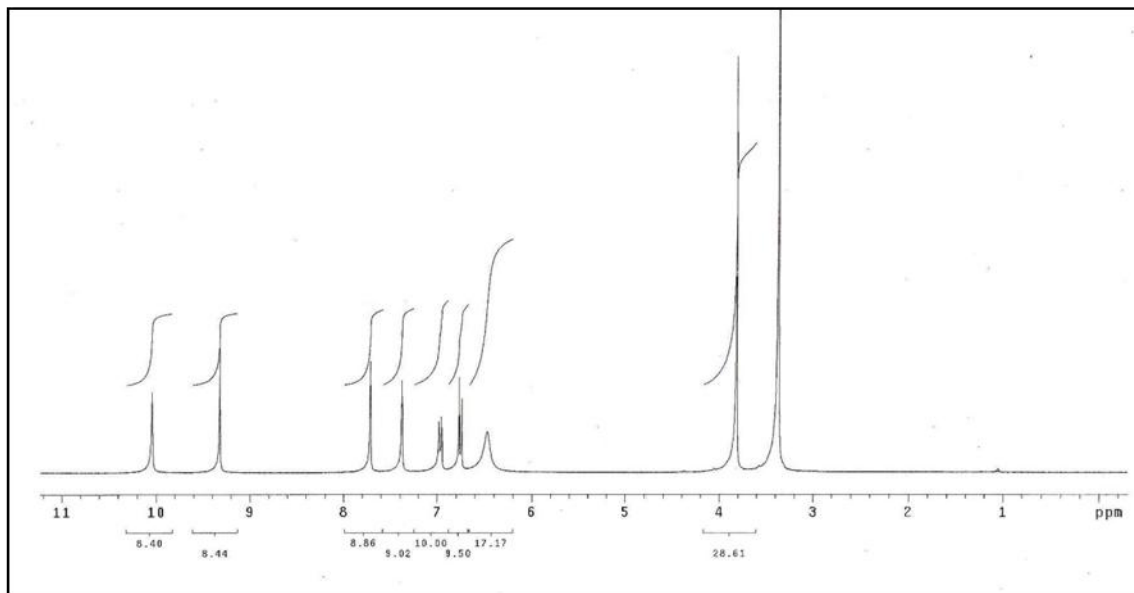


Figura 28: Espectro de RMN¹H do composto 02.

Analisando detalhadamente cada sinal representado no espectro presente na **Figura 28**, temos que o singlete aparecendo em 3.81 ppm, e com integração correspondente a 3 hidrogênios, refere-se aos 3 hidrogênios metílicos, em frequência mais alta, em 6.469 ppm observamos mais outro singlete, com integração pra 2 hidrogênios, e que corresponde ao NH₂. Em 6.75 e 6.96 ppm observamos dois dubletos com constante de acoplamento $J=7.79$ Hz, correspondentes aos hidrogênios presentes nas posições 5 e 6 do anel benzênico, respectivamente. Em 7.37 ppm observa-se mais um singlete, referente ao hidrogênio ligado a posição 2 do anel aromático. Na região de 7.71 ppm encontra-se o sinal referente ao CHN. Os picos mais desblindados deste composto encontra-se a 9.31 ppm, referente ao OH, e em 10.04 ppm, que é o sinal referente ao hidrogênio hidrazínico da molécula.

5.4. AVALIAÇÕES BIOLÓGICAS

5.4.1. Atividade antimicrobiana

Por meio da avaliação *in vitro* da atividade antibacteriana e antifúngica, através da difusão em discos de papel dos dez derivados arilsemicarbazônicos testados, foram determinados os dados de inibição antimicrobiana presentes na **Tabela 02**.

Tabela 02: Atividade antimicrobiana expressa em diâmetro da zona de inibição (mm)

Microorganismos	Compostos										Padrão	
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	Amox.	Nist.
<i>S. aureus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	18	
<i>B. subtilis</i>	8	0	0	0	8	8	0	0	0	0	18.5	
<i>M. luteus</i>	12.6	0	0	0	16	16.3	0	0	14	13.3	57	
<i>S. faecalis</i>	0	0	0	0	8	0	0	0	0	0	32.5	
<i>E. coli</i>	12.3	0	0	0	12.3	11.3	0	0	10.6	11	26	
<i>K. pneumoniae</i>	12	0	0	0	11.3	10	0	0	9.6	9.6	0	
<i>M. smegmatis</i>	0	0	0	0	7.6	7.6	0	0	7.6	0	35	
<i>Candida albicans</i>	17	0	0	0	16.3	15.6	0	0	13.6	11		10
<i>Mallaseia furfur</i>	7.3	-	-	-	7.5	7.3	-	-	0	0		

0 = ausência de inibição de crescimento microbiano; - = não testado

Amox. = Amoxicilina; Nist. = Nistatina

Com os resultados presentes na **Tabela 02** podemos observar que os derivados aril-semicarbazônicos **01**, **05**, **06**, **09** e **10** apresentaram de baixa a moderada ação frente aos patógenos avaliados, apresentando halos de inibição de crescimento microbiano em geral inferior a 15mm, sendo as drogas utilizadas como padrão (Amoxicilina e nistatina) bem mais potentes. Os derivados **02**, **03**, **04**, **07** e **08** não se mostraram ativos.

Nenhum dos compostos avaliados apresentou atividade frente a *Staphylococcus aureus*, e dentre os microorganismos submetidos ao teste, *Micrococcus luteus* e *Candida albicans* foram os mais sensíveis.

Os derivados **05** e **06** apresentaram uma melhor atividade em relação aos demais compostos da série. Estes derivados foram obtidos por meio da condensação entre 1 equivalente do aldeído e 2 equivalentes da semicarbazida, enquanto que, os outros são derivados monocondensados, 1:1 semicarbazida/aldeído. Entre **05** e **06** não houve grande diferença na potência inibitória do crescimento microbiano, sendo o derivado **05**

discretamente mais ativo que **06**. Na **Figura 29** está demonstrada a estrutura química dos derivados **05** e **06**.

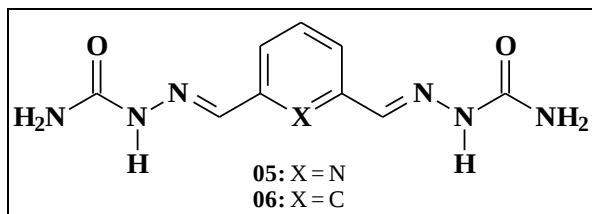


Figura 29: Estrutura química dos compostos 05 e 06.

Notou-se também que a substituição no anel benzênico por um átomo de halogênio não foi favorável, sendo **07** (4-Br) e **08** (4-F) inativos. O derivado **09** (4-Cl) apresentou moderada atividade, a qual em geral foi perdida com a adição de um segundo átomo de Cl na posição 3 do anel, derivado **10**.

Os compostos **05** e **06**, por apresentarem uma melhor ação em relação aos demais, foram selecionados para realização dos testes de determinação das concentrações mínima inibitória (CMI), mínima bacteriostática (CMB) e mínima fungistática (CMF), resultados mostrados na **Tabela 03**.

Tabela 03: Valores da Concentração Mínima Inibitória, Concentração Mínima Bacteriostática e Fungistática para os compostos 05 e 06 frente às cepas avaliadas em µg/mL

		05	06	Padrão	
				Amoxicilina	Fluconazol
<i>M. luteus</i>	CMI	250 µg/mL	500 µg/mL	0.06 µg/ml	
	CMB	125 µg/mL	250 µg/mL	-	
<i>C. albicans</i>	CMI	250 µg/mL	250 µg/mL		1,0 µg/ml
	CMF	125 µg/mL	125 µg/mL		-

Através destas análises observamos a baixa potência antibiótica desses compostos, comprovada pelas altas doses necessárias para se obter a concentração mínima inibitória, em relação aos fármacos utilizados como padrão.

5.4.2. Toxicidade aguda

A avaliação da toxicidade aguda dos compostos **02**, **05** e **10** na dose elevada de 2000 mg/kg forneceu os dados presentes na **Tabela 04**.

Tabela 04: Média dos pesos dos animais e órgãos submetidos à administração dos derivados 02, 05 e 10

Composto	Peso do animal		Rins	Órgãos		
	Inicial	Final		Baço	Fígado	
02		29,7	40,4	0,25	0,37	2,5
		21,7	25,8	0,24	0,13	1,5*
		26,4	35,7	0,23	0,44	2,2
	Média	28,05	38,05	0,24	0,41	2,35
	Desvio			0,01	0,16	0,51
05		30,0	39,7	0,19	0,21	2,5
		26,5	37,2	0,2	0,26	1,4
		27,3	38,4	0,25	0,19	2,4
	Média	28,7	39,05	0,21	0,22	2,10
	Desvio			0,03	0,04	0,61
10		29,4	32,3	0,18	0,18	1,71
		22,5	32	0,2	0,22	2,03
		27,3	31,7	0,2	0,17	2,1
	Média	28,35	32,00	0,19	0,19	1,95
	Desvio			0,01	0,03	0,21

* Animal fora das médias dos pesos.

Após administração por via oral dos compostos sintetizados, na dose de 2000mg/kg do animal, foi observado primeiramente, por 1 hora, os efeitos gerais provocados nos animais pelo uso de cada substância.

Foi visto que os animais que receberam o composto **02** mostraram-se agitados e apresentaram movimentos esteriotipados e piloereção evidentes. Os animais submetidos aos compostos **05** e **10** apresentaram comportamentos semelhantes entre si, apresentando discreta agitação inicial, com quadro de sonolência após 30-45 minutos de administração das drogas. Foi constatada, também, nestes grupos de animais, a ocorrência de movimentos

esteriotipados. A ausência de comportamentos anômalos como, por exemplo, convulsões e catatonia indicam baixa ou ausência de efeitos em nível do sistema nervoso central.

Passada a observação preliminar dos animais, no período de 1 hora, estes foram mantidos em observação por mais um período de 14 dias, onde nenhum dos animais foi a óbito. De acordo com os critérios estabelecidos para a toxicidade aguda pelo GHS (Globally Harmonized Classification System) o fato de não ter ocorrido óbito ou grave injúria em nenhum dos animais testados na dose mais alta recomendada (2000mg/kg), indica que os compostos **02**, **05** e **10** se enquadram na classe 5 (muito baixa ou ausência de toxicidade).

Os animais foram então eutanasiados e seus órgãos pesados e analisados macroscopicamente, sendo constatado que as substâncias **05** e **10** provocaram poucas mudanças nos órgãos avaliados (rins, pulmão e baço), estando estes, dentro das médias de pesos, e então pouco afetados pela administração desses compostos. Entretanto a administração do derivado **02** provocou um aumento significativo no baço, comparando-se com o valor apresentado pelo grupo dos outros animais que fizeram uso de **05** e **10**. Este resultado será novamente analisado em avaliações futuras.

5.4.3. Atividade antitumoral

A atividade antitumoral do derivado **06** foi avaliada *in vivo* frente a duas linhagens de células tumorais malignas, Carcinoma de Ehrlich e Sarcoma 180, utilizando as doses de 10 e 5mg/kg do composto **06**. Os resultados encontram expostos na **Tabela 05**.

Tabela 05: Atividade antitumoral do derivado 06 nas doses de 10 e 5mg/kg

Substância	Dose	Carcinoma Ehrlich	Sarcoma 180
06	10mg/kg	24,82%	74,74%
	5mg/kg	37,50%	35,01%
Metotrexato	2.5mg/kg	48,47%	89,81%
Salina 0.9%		Tumor invasivo	Tumor vascularizado

Através dos dados obtidos podemos observar que nos ensaios realizados com Carcinoma de Ehrlich a atividade de inibição tumoral, tanto do Metotrexato, utilizado como

padrão, como do derivado arilsemicarbazônico não foram satisfatórias, sendo estas atividades de inibição de crescimento tumoral inferiores a 50%.

Em relação à segunda linhagem de células tumorais avaliada, Sarcoma 180, os resultados obtidos foram bem satisfatórios, com o derivado **06** apresentando 74,74% de inibição tumoral na dose de 10mg/kg do animal. As reações tóxicas observadas após administração deste composto foram menos pronunciadas que as reações apresentadas pelo padrão.

Devido ao fato de existirem na literatura poucos trabalhos relacionando atividade antineoplásica para esta classe de compostos, os dados obtidos nestes testes preliminares mostram-se bastante atrativos. Embora ainda sejam resultados iniciais, novas investigações com doses intermediárias serão avaliadas, uma vez que em estudos de toxicidade aguda, na dose extrema de 2000mg/kg, derivados da mesma série mostraram-se pouco tóxicos. Buscando resultados mais detalhados, outra via de administração será estudada e a avaliação dos outros derivados da série **01-20** será realizada.

5.4.4. Atividade antichagásica e citotoxicidade

Tabela 06: Atividade anti-*T. cruzi* e citotoxicidade dos derivados aril-semicarbazônicos

Compostos	IC ₅₀ epimastigotas (µg/ml)	Citotoxicidade (µg/ml) ^a
02	8.85	>100
03	ND	>100
04	6.08	50
05	ND	>100
06	60.8	>100
07	ND	>100
08	6.9	>100
09	ND	>100
10	5.23	>100
11	ND	>100
12	28.66	>100
13	10.19	>100
14	12.77	>100
15	36.01	>100
16	0.5	>100
17	8.21	>100
18	14.94	>100
19	ND	>100
20	49.71	>100
BZD	1.73	25
NFX	0.54	1

^a = maior concentração atóxica em células esplênicas de camundongos BALB/c;

BZD = Benznidazol; NFX = Nifurtimox; ND = Não Determinado;

* Os valores ND ("Não Determinado") significam medidas que foram feitas, mas não foi possível fazer a regressão para determinar o IC₅₀. Isto significa que, apesar dos valores de IC₅₀ não terem sido determinados, os dados de atividade para a curva dose-resposta foram adquiridos.

Por meio dos resultados obtidos, presentes na **Tabela 06**, podemos observar que dentre os compostos avaliados o composto **06**, derivado semicarbazônico bicondensado com duas moléculas de semicarbazida, mostrou-se o menos ativo. Os resultados para **05** e **19**, que possuem semelhança estrutural com o **06** não foram determinados pelo programa.

Os compostos **08** e **10** apresentaram uma considerável ação frente às formas epimastigotas, com valores de IC₅₀ iguais a 6.9µg/ml e 5.23µg/ml, respectivamente, mostrando que substituições no anel aromático por átomos de halogênio podem ser favoráveis. **08** apresenta um átomo de Flúor na posição 4 do anel aromático e **10** possui átomos de Cloro nas posições 3 e 4 do anel, o que provocou um aumento da atividade

comparando-a com a exercida por **08**. Entretanto os dados de atividade para **07** e **09**, derivados que também possuem átomos de halogênio no anel aromático, não foram determinados pelo programa.

O derivado **04** também apresentou boa atividade anti-*T. cruzi*, na faixa de 6.08 µg/ml, com maior citotoxicidade em relação aos demais componentes da série, entretanto, esta citotoxicidade ainda é bem menor que a apresentada pelo Nifurtimox e Benznidazol. Os derivados **02**, **13**, **14**, **17** e **18** mostraram valores de IC₅₀ menores que 15 µg/ml, enquanto que os compostos **12**, **15** e **20** apresentaram menos potência, com valores de IC₅₀ acima de 28 µg/ml.

O composto **16** apresentou excelente ação tripanomicida, com IC₅₀ na faixa de 0.5 µg/ml, mostrando-se mais potente que os fármacos padrões, Nifurtimox e Benznidazol.

Analizando sua estrutura química, observamos a semelhança estrutural com a molécula da Nitrofurazona (NF) (**Figura 30**), droga com considerável ação anti-*T. cruzi*, que age via inibição da enzima TR do parasita, porém é altamente tóxica. Vale salientar a baixa citotoxicidade apresentada por **16**, cem vezes menor que a citotoxicidade apresentada pelo Nifurtimox, fármaco com semelhante IC₅₀ e utilizado na terapêutica da doença.

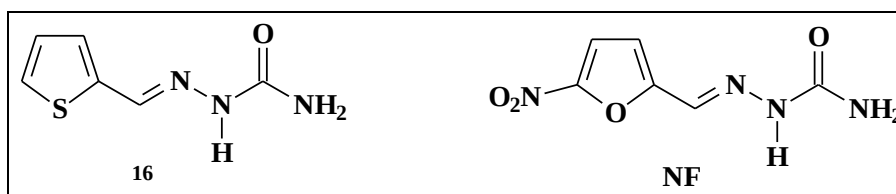
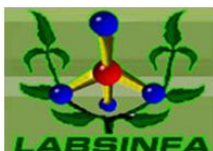


Figura 30: Estrutura química do derivado 16 e da Nitrofurazona

Através dos dados referentes à citotoxicidade podemos, mais uma vez evidenciar, assim como pelos dados obtidos na avaliação da toxicidade aguda discutida anteriormente, que a série de compostos obtida trata-se de substâncias com baixas características tóxicas. Observamos que, com excessão da arilsemicarbazona **04**, a qual apresentou toxicidade celular em concentrações acima 50 µg/ml, os demais componentes da série mostraram-se atóxicos em concentrações acima de 100 µg/ml.

Supõe-se que a baixa citotoxicidade apresentada pelos compostos da série **01-20** esteja relacionado à ausência do grupamento Nitro (-NO₂) nessas moléculas, o qual está presente no BZD, NFX e NF.

CAPÍTULO III



CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

6. CONCLUSÕES

Foi sintetizada uma série de 20 derivados arilsemicarbazônicos obtidos com bons rendimentos, em geral acima de 80%.

Em relação à atividade antibacteriana e antifúngica de dez compostos testados, obteve-se atividade baixa ou moderada. Observou-se que os produtos com melhor ação antimicrobiana foram os derivados semicarbazônicos bicondensados com a semicarbazida (compostos **05** e **06**). Os microorganismos mais sensíveis foram *Micrococcus luteus* e *Candida albicans*.

Por meio da avaliação toxicológica aguda de **02**, **05** e **10** na mais alta dose recomendada (2000mg/kg) observamos que estes compostos não apresentam efeitos a nível de sistema nervoso central. Por não terem ocorrido óbito dos animais, no período de 14 dias de observação, estes compostos se enquadram na classe 5 de toxicidade (muito baixa ou ausência de toxicidade). Análise dos órgãos dos animais, foi observado que apenas **02** provocou um aumento no baço, resultado este que será novamente analisado.

Na avaliação da atividade antitumoral o derivado **06**, na dose de 10mg/kg, mostrou-se bastante efetivo, com inibição tumoral próxima a 75% frente ao tumor Sarcoma 180. Este resultado é bastante expressivo, visto que, na literatura há poucos trabalhos relacionados a essa classe de compostos.

Através dos estudos de atividade anti-*T. cruzi*, o derivado **16** apresentou excelente ação tripanomicida, com valor de IC₅₀ na concentração de 0.5µg/ml, potência superior aos fármacos utilizados na terapêutica da doença, Nifurtimox e Benznidazol.

O composto **16** apresentou baixa citotoxicidade, cerca de 100 vezes menor que a apresentada pelo Nifurtimox. **16** se mostrou atóxico em concentrações até 100µg/ml, enquanto que NFX, já apresenta citotoxicidade em concentrações superiores a 1µg/ml.

7. PERSPECTIVAS

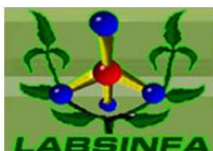
Realização dos ensaios de toxicidade aguda para todos os compostos da série.

A avaliação antitumoral dos outros derivados da série será realizada, a fim de se obter a ação antineoplásica desta classe de compostos, traçando um estudo de estrutura atividade. Bem como, será analisada a ação antitumoral do derivado **06** em outras doses, afim de, ser obtida uma maior inibição tumoral e calcular o índice terapêutico ou dose efetiva.

Por meio dos resultados da atividade anti-*T. cruzi* frente à forma evolutiva tripomastigota, que está em fase final de conclusão, poderemos ter uma visão mais ampla sobre a ação tripanomicida destes compostos.

Estudos de modelagem molecular “docking” serão realizados.

CAPÍTULO IV



PARTE EXPERIMENTAL

8. METODOLOGIAS

8. 1. SÍNTESE

Os derivados arilsemicarbazônicos desejados foram obtidos por meio da reação de condensação entre a semicarbazida hidrocloreada e uma série de aril-aldeídos substituídos, obtendo-se os compostos **01-20**.

Em um balão de fundo redondo contendo aproximadamente 15 mL de álcool etílico absoluto (EtOH) foram adicionados 2,5 mmol de semicarbazida hidrocloreada e quantidade equimolar do aril-aldeído ao qual desejava-se promover a condensação, adicionou-se então, 3 gotas de ácido clorídrico (HCl), como catalisador. A reação foi mantida em temperatura ambiente e constante agitação magnética, por um período de 3-5 horas. Para obtenção dos derivados **05**, **06** e **19** foram adicionados 5 mmol de semicarbazida hidrocloreada para 2,5 mmol dos respectivos aldeídos.

O acompanhamento das reações foi realizado por meio de análise cromatográfica em camada delgada e após o término, os derivados arilsemicarbazônicos obtidos, precipitados no meio reacional, foram filtrados em funil sinterizado e lavados com água, seguida de lavagem em solvente orgânico (hexano).

A purificação dos compostos sintetizados foi por meio de recristalizações em água destilada. A pureza dos cristais foi visualizada em lâmpada ultravioleta após cromatografia em camada delgada utilizando sistema solvente adequado.

8.2. DETERMINAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

8.2.1. Análise cromatográfica em camada delgada

As cromatografias em camada delgada (CCD) foram realizadas em placas de Sílica Gel 60 F254 da MERCK de 0,25 mm de espessura. A leitura das mesmas foi realizada através de radiação de ultravioleta (UV) no comprimento de onda (λ) de 254 nm.

8.2.2. Faixas de fusão

As faixas de fusão (ou decomposição) foram medidas no equipamento QUILMES Q.340.23, em tubos capilares imersos em banho de silicone.

8.3. ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL

Os espectros de IV foram obtidos em espectrofotômetro BRUKER IFS-66, em discos de KBr.

Os espectros de RMN ^1H foram obtidos em um equipamento UNITYplus-300 MHz-VARIAN, utilizando-se DMSO- d_6 como solvente. Os deslocamentos químicos (δ) foram reportados em ppm, utilizando tetrametilsilano como referência interna. As constantes de acoplamento foram indicadas em Hz, e as multiplicidades dos sinais foram designadas da seguinte forma: s – singlete, d – dubleto, dd – duplo dubleto, t – tripleto, m – multiplete.

8.4. ENSAIOS BIOLÓGICOS

8.4.1. Atividade antimicrobiana

8.4.1.1. Método da difusão em discos de papel

A atividade antimicrobiana das arilsemicarbazonas **01-10** foi verificada *in vitro*, pelo método de difusão em disco de papel, frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Streptococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycobacterium smegmatis*) e fungos (*Candida albicans* e *Malassezia furfur*) da coleção de microorganismos do Departamento de Antibióticos da UFPE.

Neste método, os discos contendo concentrações conhecidas dos compostos sintetizados foram colocados na superfície de uma placa de ágar, onde uma suspensão padronizada dos micro-organismos teste foi inoculada. As suspensões dos micro-organismos

testes foram padronizadas através da escala de McFarland com turbidez correspondente a 0,5, equivalente a $1 \text{ a } 2 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias por mililitros (UFC/mL). Discos de papel contendo apenas o solvente dimetil-formamida (DMF) foram utilizados como controles negativos. As placas foram levadas a estufa durante 24h e 48h à temperatura de 30°C e 37°C e após o período de incubação mediram-se os halos de inibição em milímetros (mm). O halo de inibição foi considerado como sendo a área sem crescimento detectável a olho nu. A zona média de inibição para amoxicilina (antibiótico) e nistatina (antifúngico) foram utilizadas como valor de referência. Os experimentos foram realizados em duplicata, e repetidos se os resultados apresentassem alguma divergência (BAUER, A. W. et al., 1966).

8.4.1.2. Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI), Concentração Mínima Bacteriostática (CMB) e Concentração Mínima Fungistática (CMF)

Para os ensaios de CMI, CMB e CMF, foi utilizada a técnica de macrodiluição em meio líquido, onde a partir de uma solução-mãe com concentração de 1mg/mL dos compostos em análise, solubilizados em dimetilformamida, foram realizadas diluições seriadas para obtenção das concentrações desejadas. Foram adicionados 100µL da suspensão bacteriana ou fúngica, previamente padronizadas através da escala de McFarland acima citada, aos tubos de Muller-Hinton contendo as concentrações desejadas dos compostos em análise. Os tubos foram incubados a 37°C por 24-48 h, e, em seguida, examinados para visualização da presença ou ausência de organismos de cultivo. Tubos contendo apenas DMF também foram avaliados. Os valores de CMI foram obtidos a partir da menor concentração dos compostos onde não foi observado qualquer crescimento de bactérias. Após plaqueamento, os valores da CMB e CMF foram medidos através da inoculação dos caldos utilizados para determinação do CMI. Os valores de CMB e CMF foram observados a partir do crescimento da diluição subsequente. Os valores da CMI, da CMB e da CMF, foram expressos em µg/mL (NCCLS, 2003).

8.4.2. Toxicidade Aguda

Para este procedimento foi utilizado o método descrito por Carlini, E. A. et al., 1991. As observações comportamentais foram registradas em fichas apropriadas de triagem farmacológica adaptadas por Malone, R. A., 1977. Foram utilizados camundongos albinos swiss fêmeas pesando em média 20-30 g com aproximadamente 60 dias. Os animais foram privados de alimentação 20 h antes do experimento. As substâncias após solubilização com propilenoglicol foram administradas por via oral na mais alta dose recomendada, de 2000 mg/kg, calculando-se o volume a ser administrado em relação ao peso de cada animal. Os efeitos gerais foram observados com os animais em livre movimentação, em superfície plana, por um período de 60 min. Seguida por período constante de observação por um total de 14 dias. Após os 14 dias de observação, os animais foram eutanasiados e seus órgãos (baço, rins e fígado) analisados macroscopicamente.

8.4.3. Atividade Antitumoral

Para determinação da atividade antitumoral do derivado 06 foram realizados ensaios pré-clínicos em roedores portadores de tumores malignos. Foram selecionados camundongos albinos swiss machos (*Mus musculus*) com sessenta dias de nascidos e pesos entre 25 e 35 gramas, divididos em grupos de seis animais por gaiolas, mantidos em condições controladas de iluminação (ciclo de 12 horas claro/escuro) e temperatura (22°C) e água *ad libitum*. A implantação dos tumores sólidos de Sarcoma 180 e Carcinoma de Ehrlich foi realizada segundo método de Stock (STOCK, C. C., et al., 1955) e modificada por Komiyama (KOMIYAMA, K., 1992).

O tratamento teve início 48 horas após os implantes e a administração foi por via intraperitoneal com doses de 10mg/kg e 5mg/kg do composto teste, 2,5mg/kg para o grupo padrão (utilizando Metotrexato) e solução salina para os grupos controles.

8.4.4. Atividade antichagásica e citotoxicidade

8.4.4.1. Avaliação da atividade anti-*T. cruzi*

Para determinar o efeito anti-proliferativo para *T. cruzi*, formas epimastigotas (10^6 /ml) crescidos em culturas axênicas, na fase log de crescimento, serão colocadas em placas de 96 poços no volume de 100 µl, sob condições de cultura adequadas (26°C). Os testes foram conduzidos tendo como controle o benznidazol (50 mg/ml) e culturas de parasitos sem tratamento. As substâncias foram avaliadas quanto à concentração inibidora de 50% do crescimento dos parasitas ($IC_{50\%}$) onde formas epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi* foram cultivadas durante 24 horas, respectivamente, na presença de diferentes concentrações dos compostos, procedendo-se em seguida a contagem de parasitas viáveis. O cálculo da $IC_{50\%}$ foi determinada por meio de uma regressão linear simples utilizando o software Prisma 4 Graphpad.

8.4.4.2. Obtenção de células esplênicas de camundongos isogênicos e ensaio de citotoxicidade

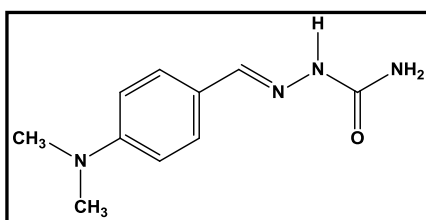
Células esplênicas foram obtidas de acordo com metodologia descrita na literatura (PEREIRA, V. R. A. et al., 2005). Após sacrifício do animal por asfixia em CO_2 , o baço de cada camundongo foi removido em condições assépticas e, em fluxo vertical, macerado em placa de Petri contendo meio de cultura RPMI. As suspensões celulares obtidas foram centrifugadas a 4°C, durante 5 minutos. Após descarte do sobrenadante, adicionou-se água destilada ao sedimento promovendo lise das hemácias. Marcou-se cinco minutos, coletou o sobrenadante e centrifugou novamente a 4°C, 200 rpm por cinco minutos. O sedimento (contendo as células esplênicas) foi ressuspenso em meio RPMI 1640 e uma alíquota de cada suspensão celular removida, diluída 1:10 em azul de trypan e quantificada em câmara de Neubauer para se verificar as células viáveis.

Células esplênicas (6×10^5 células/poço) foram cultivadas em placas de 96 poços de fundo plano, contendo meio de cultura RPMI com 10% de soro bovino fetal. Para o ensaio de citotoxicidade, as células foram incubadas com os compostos em sete diferentes

concentrações (faixa de 200 a 0,1 µg/mL) e com 1 µM de timidina tritiada/poço durante 24 h em estufa de CO₂ a 37°C. Em paralelo, foram feitos controles com células tratadas com saponina (0,05%), com células tratadas com DMSO (0,05%), substâncias com reconhecida atividade tóxica e um controle sem tratamento. Após 24 h de incubação, as células foram coletadas em papel de fibra de vidro e, posteriormente, a captação de timidina tritiada foi determinada através do contador beta de cintilação. O percentual de citotoxicidade foi determinado comparando-se a percentagem de incorporação de timidina tritiada nos poços com as drogas em relação aos poços não tratados.

9. DADOS FÍSICO-QUÍMICOS E ESPECTROSCÓPICOS

9.1. COMPOSTO 01: 4-dimetil-aminobenzaldeído semicarbazona



F.M.: C₁₀H₁₄N₄O

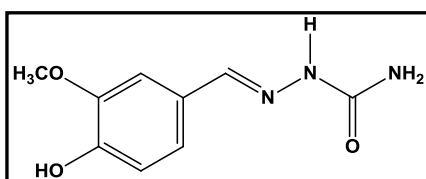
M.M: 206.24

Cristais amarelo; Rendimento: 42%; P.F: 225-227°C;

R_f: 0,35 (Meio de eluição: acetato de etila).

RMN ¹H (300 MHz, ppm, DMSO-d₆): δ 2.93 (s, 6H, CH₃); 6.33 (s, 2H, NH₂); 6.68 (d, 2H, J= 8.99 Hz, Ar-H); 7.49 (d, 2H, J= 8.99 Hz, Ar-H); 7.70 (s, 1H, CH=N); 9.94 (s, 1H, NH).

9.2. COMPOSTO 02: 4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído semicarbazona



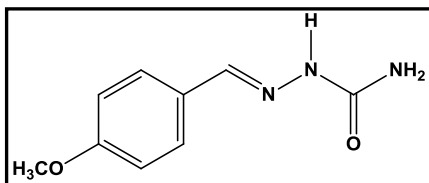
F.M.: C₉H₁₁N₃O₃

M.M: 209.20

Cristais amarelo; Rendimento: 81%; P.F: 237-239°C;

R_f: 0,43 (Meio de eluição: acetato de etila).

RMN ¹H (300 MHz, ppm, DMSO-d₆): δ 3.81 (s, 3H, CH₃); 6.46 (s, 2H, NH₂); 6.75 (d, 1H, J= 7.79 Hz, Ar-H); 6.96 (d, 1H, J= 7.79 Hz, Ar-H); 7.37 (s, 1H, Ar-H); 7.71 (s, 1H, CH=N); 9,31 (s, 1H, OH); 10.04 (s, 1H, NH).

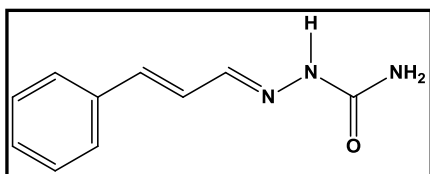
9.3. COMPOSTO 03: 4-metoxibenzaldeído semicarbazonaF.M.: C₉H₁₁N₃O₂

M.M: 193.20

Cristais branco; Rendimento: 82%; P.F: 210-212°C;

R_f: 0,53 (Meio de eluição: acetato de etila).

RMN ¹H (300 MHz, ppm, DMSO-d₆): δ 3.45 (s, 3H, CH₃); 6.40 (d, 2H, J= 7.00 Hz, Ar-H); 7.13 (s, 2H, NH₂); 7.36 (d, 2H, J= 7.00Hz, Ar-H); 7.50 (s, 1H, CH=N); 9.35 (s, 1H, NH).

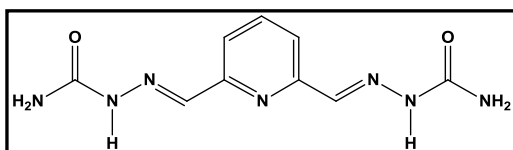
9.4. COMPOSTO 04: Cinamaldeído semicarbazonaF.M.: C₁₀H₁₁N₃O

M.M: 189.21

Cristais amarelo claro; Rendimento: 89%; P.F: 215-217°C;

R_f: 0,64 (Meio de eluição: acetato de etila).

RMN ¹H (300 MHz, ppm, DMSO-d₆): δ 6.30 (s, 2H, NH₂); 7.27-7.40 (m, 5H, Ar-H); 7.5-7.75 (m, 3H, CH); 10.21 (s, 1H, NH).

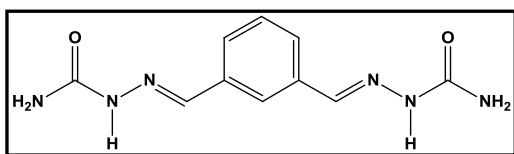
9.5. COMPOSTO 05: 2,6-piridina-dicarboxaldeído semicarbazonaF.M.: C₉H₁₁N₇O₂

M.M: 249.23

Cristais amarelo; Rendimento: 55%; P.F: 270-

272°C; R_f: 0,66 (Meio de eluição: clorofórmio/metanol 1:1).

RMN ¹H (300 MHz, ppm, DMSO-d₆): Dados não obtidos.

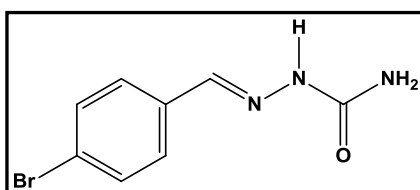
9.6. COMPOSTO 06: Isoftaldeído semicarbazonaF.M.: $C_{10}H_{12}N_6O_2$

M.M: 248.24

Cristais branco; Rendimento: 89%; P.F: 245-246°C;

 R_f : 0,76 (Meio de eluição: clorofórmio/metanol 1:1).

RMN 1H (300 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ 6.59 (s, 4H, NH_2); 7.38 (t, 1H, J = 7.49 Hz, Ar-H); 7,66 (d, 2H, J = 7.19 Hz, Ar-H); 7.86 (s, 2H, $CH=N$); 8.08 (s, 1H, Ar-H); 10.37 (s, 2H, NH).

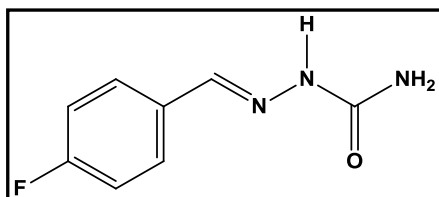
9.7. COMPOSTO 07: 4-bromobenzaldeído semicarbazonaF.M.: $C_8H_8BrN_3O$

M.M: 242.07

Cristais branco; Rendimento: 83%; P.F: 237-239°C;

 R_f : 0,64 (Meio de eluição: acetato de etila).

RMN 1H (300 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ 6.54 (s, 2H, NH_2); 7.56 (d, 2H, J = 6.59 Hz, Ar-H); 7.69 (d, 2H, J = 6.59 Hz, Ar-H); 7.79 (s, 1H, $CH=N$), 10.33 (s, 1H, NH).

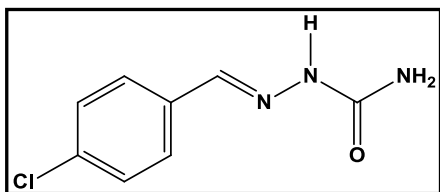
9.8. COMPOSTO 08: 4-fluorbenzalaldeído semicarbazonaF.M.: $C_8H_8FN_3O$

M.M: 181.16

Cristais branco; Rendimento: 84%; P.F: 230-232°C;

 R_f : 0,55 (Meio de eluição: acetato de etila).

RMN 1H (300 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ 6.51 (s, 2H, NH_2); 7.22 (d, 2H, J = 8.99 Hz, Ar-H); 7.77 (d, 2H, J = 5.39 Hz, Ar-H); 7.82 (s, 1H, $CH=N$); 10.24 (s, 1H, NH).

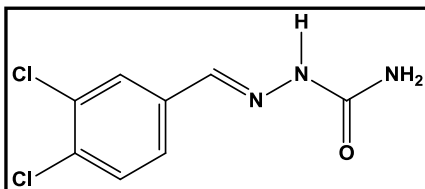
9.9. COMPOSTO 09: 4-clorobenzaldeído semicarbazonaF.M.: C₈H₈ClN₃O

M.M: 197.62

Cristais branco; Rendimento: 81%; P.F: 235-236°C;

R_f: 0,65 (Meio de eluição: acetato de etila).

RMN ¹H (300 MHz, ppm, DMSO-d₆): δ 6.55 (s, 2H, NH₂); 7.42 (d, 2H, J= 8.39 Hz, Ar-H); 7.75 (d, 2H, J= 8.39 Hz, Ar-H); 7.81 (s, 1H, CH=N); 10.32 (s, 1H, NH).

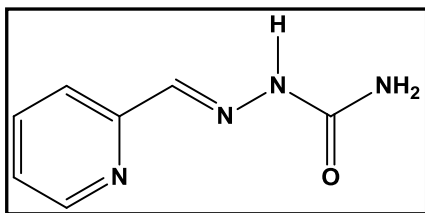
9.10. COMPOSTO 10: 3,4-diclorobenzaldeído semicarbazonaF.M.: C₈H₇Cl₂N₃O

M.M: 232.06

Cristais branco; Rendimento: 88%; P.F: 246-247°C;

R_f: 0,60 (Meio de eluição: acetato de etila).

RMN ¹H (300 MHz, ppm, DMSO-d₆): δ 6.60 (s, 2H, NH₂); 7.63 (d, 2H, J= 8.39 Hz, Ar-H); 7.78 (s, 1H, Ar-H) 8.12 (s, 1H, CH=N); 10.42 (s, 1H, NH).

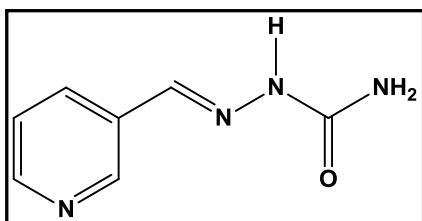
9.11. COMPOSTO 11: 2-piridinacarboxaldeído semicarbazonaF.M.: C₇H₈N₄O

M.M: 164.16

Cristais branco; Rendimento: 86%; P.F: 206-207°C;

R_f: 0,87 (Meio de eluição: clorofórmio/metanol 7:3).

RMN ¹H (300 MHz, ppm, DMSO-d₆): δ 6.93 (s, 2H, NH₂); 7.83 (t, 1H, J= 8.09 Hz, Ar-H); 7.99 (s, 1H, CH=N); 8.28 (d, 1H, J= 8.09 Hz, Ar-H); 8.44 (t, 1H, J= 8.09 Hz, Ar-H); 8.75 (d, 1H, J= 8.09 Hz, Ar-H); 11.23 (s, 1H, NH).

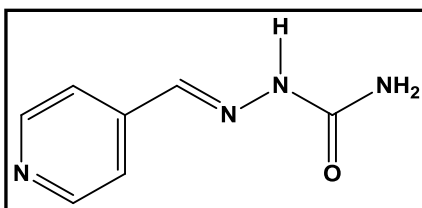
9.12. COMPOSTO 12: 3-piridinacarboxaldeído semicarbazonaF.M.: C₇H₈N₄O

M.M: 164.16

Cristais branco; Rendimento: 67%; P.F: 218-220°C;

R_f: 0,80 (Meio de eluição: clorofórmio/metanol 7:3).

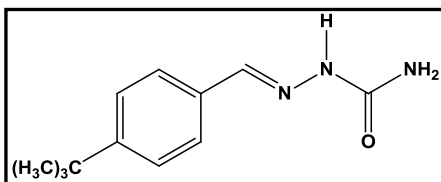
RMN ¹H (300 MHz, ppm, DMSO-d₆): δ 6.08 (s, 2H, NH₂); 7.95 (s, 1H, Ar-H). 7.95 (t, 1H, J= 7.19 Hz, Ar-H); 8.75 (d, 1H, J= 7.19 Hz, Ar-H); 8.80 (d, 1H, J= 7.19 Hz, Ar-H); 9.26 (s, 1H, CH=N); 10.79 (s, 1H, NH).

9.13. COMPOSTO 13: 4-piridinacarboxaldeído semicarbazonaF.M.: C₇H₈N₄O

M.M: 164.16

Cristais branco em agulha; Rendimento: 66%; P.F: 225-226°C; R_f: 0,84 (Meio de eluição: clorofórmio/metanol 7:3).

RMN ¹H (300 MHz, ppm, DMSO-d₆): δ 6.68 (s, 2H, NH₂); 7.69 (d, 2H, J= 4.49Hz, Ar-H); 7.79 (s, 1H, CH=N); 8.55 (d, 2H, J= 4.49Hz, Ar-H); 10.58 (s, 1H, NH).

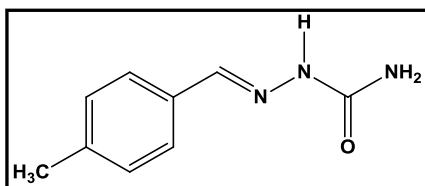
9.14. COMPOSTO 14: 4-terc-butilbenzaldeído semicarbazonaF.M.: C₁₂H₁₇N₃O

M.M: 219.28

Cristais branco; Rendimento: 92%; P.F: 216-218°C;

R_f: 0,57 (Meio de eluição: acetato de etila).

RMN ¹H (300 MHz, ppm, DMSO-d₆): δ 1.31 (s, 9H, (CH₃)₃); 6.52 (s, 2H, NH₂); 7.43 (d, 2H, J= 8.69 Hz, Ar-H); 7.66 (d, 2H, J= 8.69 Hz, Ar-H); 7.84 (s, 1H, CH=N); 10.24 (s, 1H, NH).

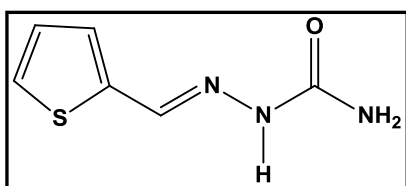
9.15. COMPOSTO 15: 4-metilbenzaldeído semicarbazonaF.M.: C₉H₁₁N₃O

M.M: 177.20

Cristais branco; Rendimento: 82%; P.F: 215-217°C;

R_f: 0,51 (Meio de eluição: acetato de etila).

RMN ¹H (300 MHz, ppm, DMSO-d₆): δ 2.34 (s, 3H, CH₃); 6.49 (s, 2H, NH₂); 7.22 (d, 2H, J= 8.39 Hz, Ar-H); 7.62 (d, 2H, J= 8.39 Hz, Ar-H); 7.83 (s, 1H, CH=N); 10.21 (s, 1H, NH).

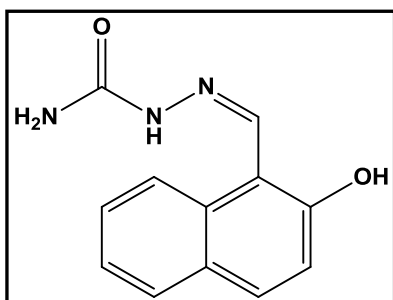
9.16. COMPOSTO 16: 2-tiofenocarboxaldeído semicarbazonaF.M.: C₆H₇N₃OS

M.M: 169.20

Cristais laranja claro; Rendimento: 84%; P.F: 227-230°C;

R_f: 0,54 (Meio de eluição: acetato de etila).

RMN ¹H (300 MHz, ppm, DMSO-d₆): δ 6.29 (s, 2H, NH₂); 7.07 (dd, 1H, J= 3.59 Hz, J= 5.09 Hz, Ar-H); 7.31 (d, 1H, J= 3.59 Hz, Ar-H); 7.55 (d, 1H, J= 5.09 Hz, Ar-H); 8.03 (s, 1H, CH=N); 10.26 (s, 1H, NH).

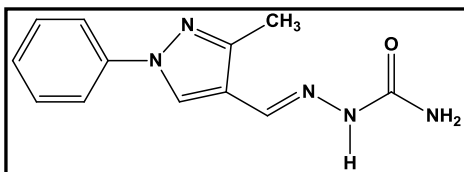
9.17. COMPOSTO 17: 2-hidroxi-naftaldeído semicarbazonaF.M.: C₁₂H₁₁N₃O₂

M.M: 229.23

Cristais amarelo; Rendimento: 82%; P.F: 220-223°C;

R_f: 0,59 (Meio de eluição: acetato de etila).

RMN ¹H (300 MHz, ppm, DMSO-d₆): δ 6.42 (s, 2H, NH₂); 7.19 (d, 1H, J= 8.99, Ar-H); 7.36 (t, 1H, J= 7.49, Ar-H); 7.54 (t, 1H, J= 7.49, Ar-H); 7.83 (d, 2H, J= 7.49, Ar-H); 8.38 (d, 1H, J= 8.99, Ar-H); 8.85 (s, 1H, CH=N); 10.28 (s, 1H, NH); 10.99 (s_{largo}, 1H, OH).

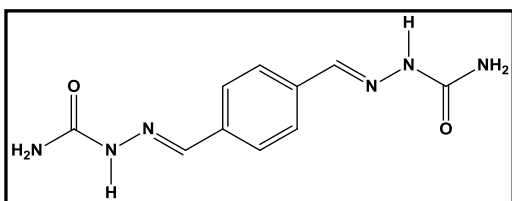
9.18. COMPOSTO 18: 3-metil-1-fenil-1H-pirazol-4-carboxaldeído semicarbazonaF.M.: C₁₂H₁₃N₅O

M.M: 243.26

Cristais branco; Rendimento: 90%; P.F: 218-221°C;

R_f: 0,48 (Meio de eluição: acetato de etila).

RMN ¹H (300 MHz, ppm, DMSO-d₆): δ 2.37 (s, 3H, CH₃); 6.32 (s, 2H, NH₂); 7.28 (t, 1H, J= 7.49 Hz, Ar-H); 7.48 (t, 2H, J= 7.49 Hz, Ar-H); 7.78 (d, 2H, J= 7.49 Hz, Ar-H); 7.84 (s, 1H, Ar-H); 8.76 (s, 1H, CH=N); 10.12 (s, 1H, NH).

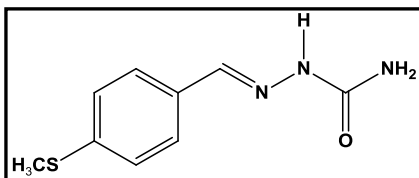
9.19. COMPOSTO 19: Tereftaldeído semicarbazonaF.M.: C₁₀H₁₂N₆O₂

M.M: 248.24

Cristais amarelo; Rendimento: 87%; P.F: acima 300°C; R_f: - (não foi possível).

RMN ¹H (300 MHz, ppm, DMSO-d₆): Dados não obtidos

O composto 19 apresentou alta polaridade, o que impossibilitou o cálculo de seu R_f, assim como também sua solubilização para realização da espectroscopia de RMN ¹H.

9.20. COMPOSTO 20: 4-tiometilbenzaldeído semicarbazonaF.M.: C₉H₁₁N₃OS

M.M: 209.26

Cristais branco; Rendimento: 67%; P.F: 222-224°C;

R_f: 0,62 (Meio de eluição: acetato de etila).

RMN ¹H (300 MHz, ppm, DMSO-d₆): δ 2.48 (s, 3H, CH₃); 6.48 (s, 2H, NH₂); 7.23 (d, 2H, J=8.09 Hz, Ar-H); 7.64 (d, 2H, J=8.09 Hz, Ar-H); 7.78 (s, 1H, CH=N); 10.20 (s, 1H, NH).

10. REFERÊNCIAS

ABREU, F. C., FERRAZ, P. A. L., GOULART, M. O. F. Some Applications of Electrochemistry in Biomedical Chemistry. Emphasis on the Correlation of Electrochemical and Bioactive Properties. *Journal of Brazilian Chemical Society*. v. 13, p. 19-35, 2002.

AGGARWAL, N., AGGARWAL, R., MISHRA, P., JAIN, J. S., BANSAL, S. K., JHA, K. K. Design and Evaluation of Semicarbazones and Thiosemicarbazones as Novel Anticonvulsants. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry*. v. 8, p. 26-28, 2008.

AGUIRRE, G., CABRERA, E., CERECETTO, H., DI MAIO, R., GONZÁLEZ, M., SEOANE, G., DUFFAUT, A., DENICOLA, A., GIL, M. J., MARTÍNEZ-MERINO, V. Design, synthesis and biological evaluation of new potent 5-nitrofuryl derivatives as anti-*Trypanosoma cruzi* agents. Studies of trypanothione binding site of trypanothione reductase as target for rational design. *European Journal of Medicinal Chemistry*. v. 39, p. 421–431, 2004.

AGUIRRE, G., BOIANI, M., CABRERA, E., CERECETTO, H., DI MAIO, R., GONZÁLEZ, M., DENICOLA, A., SANT'ANNA, C. M. R., BARREIRO, E. J. New potent 5-nitrofuryl derivatives as inhibitors of *Trypanosoma cruzi* growth. 3D-QSAR (CoMFA) studies. *European Journal of Medicinal Chemistry*. v. 41, p. 457–466, 2006.

BASTOS, A. M. B., SILVA, J. G., MAIA, P. I. S., DEFLON, V. M., BATISTA, A. A., FERREIRA, A. V. M., BOTION, L. M., NIQUET, E., BERALDO, H. Oxovanadium(IV) and (V) complexes of acetylpyridine-derived semicarbazones exhibit insulin-like activity. *Polyhedron*. v. 27, p. 1787–1794, 2008.

BAUER, A. W., KIRBY, W. M. M., SHERRIS, J. C., TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*. 45:493-496, 1966.

BERALDO, H. Semicarbazonas e Tiosemicarbazonas: O amplo perfil farmacológico e usos clínicos. *Química Nova*. v. 27, p. 461-471, 2004.

BOSQUESI, P. L. **Avaliação da Presença do Grupo Nitro na Atividade Antichagásica e Mutagênica do Candidato a Fármaco Hidroximetilnitrofurural (NFOH)**. Araraquara, 2009. [Dissertação de mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista].

BRAK, K., DOYLE, P. S., MCKERROW, J. H., ELLMAN, J. A. Identification of a New Class of Nonpeptidic Inhibitors of Cruzain. *Journal of the American Chemical Society*. v. 130, p. 6404–6410, 2009.

BRONDANI, D. J., MOREIRA, D. R. de M., DE FARIAS, M. P. A., SOUZA, F. R. da S., BARBOSA, F. F., LEITE, A. C. L. A new and efficient N-alkylation procedure for semicarbazides/semicarbazones derivatives. *Tetrahedron Letters*. v. 48, p. 3919–3923, 2007.

BRONDANI, D. J., CAETANO, N., MOREIRA, D. R. de M., SOARES, R. R., LIMA, V. T., DE ARAÚJO, J. M., DE ABREU, F. C., DE OLIVEIRA, B. G., HERNANDES, M. Z., LEITE, A. C. L. Novel Nitrofurazone Derivatives Endowed with Antimicrobial Activity. *Archiv der Pharmazie - Chemistry in Life Sciences*. v. 341, p. 655 – 660, 2008.

BYRKIT, G. D.; MICHALEK, G. A. Hydrazine in Organic Chemistry. *Industrial And Engineering Chemistry*. v.42, p. 1862-1875, 1950.

CABRERA, E., MURGUIONDO, M. G., ARIAS, M. G., ARREDONDO, C., PINTOS, C., AGUIRRE, G., FERNÁNDEZ, M., BASMADJIÁN, Y., ROSA, R., PACHECO, J. P., RAYMONDO, S., DI MAIO, R., GONZÁLEZ, M., CERECETTO, H. 5-Nitro-2-furyl derivative actives against *Trypanosoma cruzi*: Preliminary in vivo studies. *European Journal of Medicinal Chemistry*. v. 44, p. 3909–3914, 2009.

CARLINI, E. A., OLIVEIRA, M. G. M. ; MONTEIRO, M. G. ; MACAUBAS, C. I. P. ; BARBOSA, V. P. Pharmacological and toxicologic effects of two Maytenus species in laboratory animals. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 34, p. 29-41, 1991.

CHUNG, M.-C., GÜIDO, R. V. C., MARTINELLI, T. F., GONÇALVES, M. F., POLLI, M. C., BOTELHO, K. C. A, VARANDA, E. A., COLLI, W., MIRANDA, M. T. M., FERREIRA, E. I. Synthesis and in Vitro Evaluation of Potential Antichagasic Hydroxymethylnitrofurazone (NFOH-121): A New Nitrofurazone Prodrug. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. v. 11, p. 4779–4783, 2003.

Conferência Nacional de Saúde On-Line. *O tratamento específico da doença de chagas*. Disponível em: <<http://www.datasus.gov.br/cns/temas/tribuna/tratamento.htm>>. Acessado em janeiro de 2010.

CROFT, S. L. Pharmacological Approaches to Antitrypanosomal Chemotherapy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. v. 94 215-220, 1999.

DE SOUZA, M. V. N., FERREIRA, S. B., MENDONÇA, J. S., COSTA, M., REBELLO, F. R. Métodos de obtenção e aplicações sintéticas de tiazóis, uma importante classe de compostos heterocíclicos. *Química Nova*. v. 28, p. 77-84, 2005.

DIAS, L. C., DESSOY, M. A., SILVA, J. J. N., THIEMANN, O. H., OLIVA, G., ANDRICOPULO, A. D. Quimioterapia da doença de chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. *Química Nova*. v. 32, p. 2444-2457, 2009.

DIMMOCK, J. R., BAKER, G. B. Anticonvulsant Activities of 4-Bromobenzaldehyde Semicarbazone. *Epilepsia*. v. 35, p. 648-655, 1994.

Drugs for Neglected Diseases Initiative - DNDI. *Estimated global population infected by Trypanosoma cruzi*, 2009. Disponível em: <http://www.treatchagas.org/imagens/MapChagasJun09_large.jpg>. Acessado em janeiro de 2010.

Drugs for Neglected Diseases Initiative - DNDI. **Doença de Chagas**. Disponível em: <http://www.dndi.org.br/Portugues/doenca_chagas.aspx>. Acessado em janeiro de 2010.

Drugs for Neglected Diseases Initiative - DNDI. **Doenças Negligenciadas**. Disponível em: <http://www.dndi.org.br/Portugues/doencas_negligenciadas.aspx>. Acessado em janeiro de 2010.

Drugs for Neglected Diseases Initiative - DNDI. **Chagas Global View**. Disponível em: <http://www.treatchagas.org/cp_chagas_globalview.aspx>. Acessado em janeiro de 2010.

Fundação Oswaldo Filho – FIOCRUZ. **Doença de Chagas**. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/chagas>>. Acessado em janeiro de 2010.

GERPE, A., ÁLVAREZ, G., BENÍTEZ, D., BOIANI, L., QUIROGA, M., HERNÁNDEZ, P., SORTINO, M., ZACCHINO, S., GONZÁLEZ, M., CERECETTO, H. 5-Nitrofuranes and 5-nitrothiophenes with anti-*Trypanosoma cruzi* activity and ability to accumulate squalene. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 17, p. 7500–7509, 2009.

HEMALATHA, T., IMRAN, P. K. M., GNANAMANI, A., NAGARAJAN, S. Synthesis, antibacterial and antifungal activities of some N-nitroso-2,6-diarylpiperidin-4-one semicarbazones and QSAR analysis. **Nitric Oxide**. v. 19, p. 303–311, 2008.

KASUGA, N.C., SEKINO, K., ISHIKAWA, M., HONDA, A., YOKOYAMA, M., NAKANO, S., SHIMADA, N., KOUMO, C., NOMIYA, K. Synthesis, structural characterization and antimicrobial activities of 12 zinc(II) complexes with four thiosemicarbazone and two semicarbazone ligands. **Journal of Inorganic Biochemistry**. v. 96, p. 298–310, 2006.

KOMIYAMA, K. Antitumor antibiotics and their producing microorganisms. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 8 (1), p. 77-78, 1992.

LEÃO, R. N. Q. **Doenças Infecciosas e Parasitárias – Enfoque Amazônico**. 1ª ed. Belém: CEJUP – UEPA, 1997.

LEBEDEV, A. V., LEBEDEVA, A. B., SHEUDYAKOV, V. D., KOVALEVA, E. A., USTINOVA, O. L., KOZHEVNIKOV, I. B. Synthesis of 3-Substituted Arylpyrazole-4-carboxylic Acids. *Russian Journal of General Chemistry*. v. 75, n.5, p. 782-789, 2005.

LEBEDEV, A. V., LEBEDEVA, A. B., SHEUDYAKOV, V. D., KOVALEVA, E. A., USTINOVA, O. L., KOZHEVNIKOV, I. B. Vilsmeier Formylation of Hydrazones and Semicarbazones Derived from Alkyl, Benzyl, and Cycloalkyl Methyl Ketones. *Russian Journal of General Chemistry*. v. 75, n.3, p. 412-416, 2005.

LEITE, A. C. L., MOREIRA, D. R. DE M., CARDOSO, M. V. DE O., HERNANDES, M. Z., PEREIRA, V. R. A., SILVA, R. O., KIPERSTOK, A. C., LIMA, M. DA S., SOARES, M. B. P. Synthesis, Cruzain Docking, and in vitro Studies of Aryl-4-Oxothiazolylhydrazones Against *Trypanosoma cruzi*. *ChemMedChem*. v. 2, p. 1339 – 1345, 2007.

MALONE, R.A. Pharmacological approach to natural products screening and evaluation. In: *New natural products and plant drugs With Pharmacological, Biological or Therapeutical Activity*. p. 24 -53, 1977.

MIKHALEVA, A. I., IVANOV, A. V., VASIL'TSOV, A. M., USHAKOV, I. A., MA, J. S., YANG, G. Directed synthesis of semicarbazones, thiosemicarbazones, and guanidylhydrazones of 1-vinylpyrrole-2-carbaldehydes. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*. v. 44, p. 1117-1122, 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Guia de Vigilância Epidemiológica*. 7. ed, Brasília, Ministério da Saúde, Brasil, 2009.

MIRIAM SALLES: Informática Educacional, Ciências e Meio Ambiente. **Ciclo de transmissão do *Trypanosoma cruzi* (simplificado)**. Disponível em:

<<http://miriamsalles.info/wp/wp-content/uploads/ciclotrypanosomacruz.jpg>>. Acessado em janeiro de 2010

NCCLS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. **Approved Standard**. 6. ed. NCCLS document M7-A6. Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 11^a. ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

NOBLÍA, P., VIEITES, M., PARAJÓN-COSTA, B. S., BARAN, E. J., CERECETTO, H., DRAPER, P., GONZÁLEZ, M., PIRO, O. E., CASTELLANO, E. E., AZQUETA, A., DE CERÁIN, A. L., MONGE-VEJA, A., GAMBINO, D. Vanadium(V) complexes with salicylaldehyde semicarbazone derivatives bearing in vitro anti-tumor activity toward kidney tumor cells (TK-10): crystal structure of [VVO₂(5-bromosalicylaldehyde semicarbazone)]. **Journal of Inorganic Biochemistry**. v. 99, p. 443–451, 2005.

PAULINO, M., IRIBARNE, F., HANSZ, M., VEGA, M., SEOANE, G., CERECETTO, H., DI MAIO, R., CARACELLI, I., ZUKERMAN-SCHPECTOR, J., OLEA, C., STOPPANI, A. O. M., BERRIMAN, M., FAIRLAMB, A. H., TAPIA, O. Computer assisted design of potentially active anti-trypanosomal compounds. **Journal of Molecular Structure (Theochem)**. v. 584, p. 95-105, 2002.

PEREIRA, V. R. A., LORENA, V. M. B., NAKAZAWA, M., LUNA, C. F., SILVA, E. D., FERREIRA, A. G. P., KRIEGER, M. A., GOLDENBERG, S., SOARES, M. B. P., COUTINHO, E. M., CORREA-OLIVEIRA, R., GOMES, Y. M. Humoral and cellular immune responses in BALB/c and C57BL/6 mice immunized with cytoplasmic (CRA) and flagellar (FRA) recombinant repetitive antigens, in acute experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Parasitology Research**. v. 96, p. 154–161, 2005.

PORCAL, W., HERNÁNDEZ, P., BOIANI, L., BOIANI, M., FERREIRA, A., CHIDICHIMO, A., CAZZULO, J. J., OLEA-AZAR, C., GONZÁLEZ, M., CERECETTO, H.

New trypanocidal hybrid compounds from the association of hydrazone moieties and benzofuroxan heterocycle. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. v. 16, p. 6995–7004, 2008.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas Disease. *The Lancet Infectious Disease*. v. 1, p. 92-100, 2001.

SHAFIEE, A., RINEH, A., KEBRIAEZADEH, A., FOROUMADI, A., SHEIBANI, V., AFARINESH, M. R. Synthesis and anticonvulsant activity of 4-(2-phenoxyphenyl)semicarbazones. *Medicinal Chemistry Research*. v. 18, p. 758–769, 2009.

SHALINI, M., YOGESWARI, P., SRIRAM, D., STABLES, J. P. Cyclization of the semicarbazone template of aryl semicarbazones: synthesis and anticonvulsant activity of 4,5-diphenyl-2H-1,2,4-triazol-3(4H)-one. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. v. 63, p. 187-193, 2009.

SHALINI, M., YOGESWARI, P., SRIRAM, D., INDUJA, S. Microwave-assisted synthesis, anticonvulsant activity and quantum mechanical modelling of N-(4-bromo-3-methylphenyl) semicarbazones. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*. v. 8, p. 45-55, 2007.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. *Identificação espectrométrica de compostos orgânicos*. 7^a. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2006.

STOCK, C. C., CLARKE, D. A., PHILIPS, F. S., BARCLAY, R. K. Sarcoma 180 Inhibition Screeming Data. *Cancer Research Supplement*. n.2, p. 179-331. 1955.

THIRUMURUGAN, R., SRIRAM, D., SAXENA, A., STABLES, J., YOGESWARI, P. 2,4-Dimethoxyphenylsemicarbazones with anticonvulsant activity against three animal models of seizures: Synthesis and pharmacological evaluation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. v. 14, p. 3106–3112, 2006.

Universidade Federal do Triângulo Mineiro – UFTM. **Coração de pacientes que desenvolveram Doença de Chagas.** Disponível em: <<http://www.uftm.edu.br/instpub/fmtm/patge/mac0220.htm>>. Acessado em janeiro de 2010

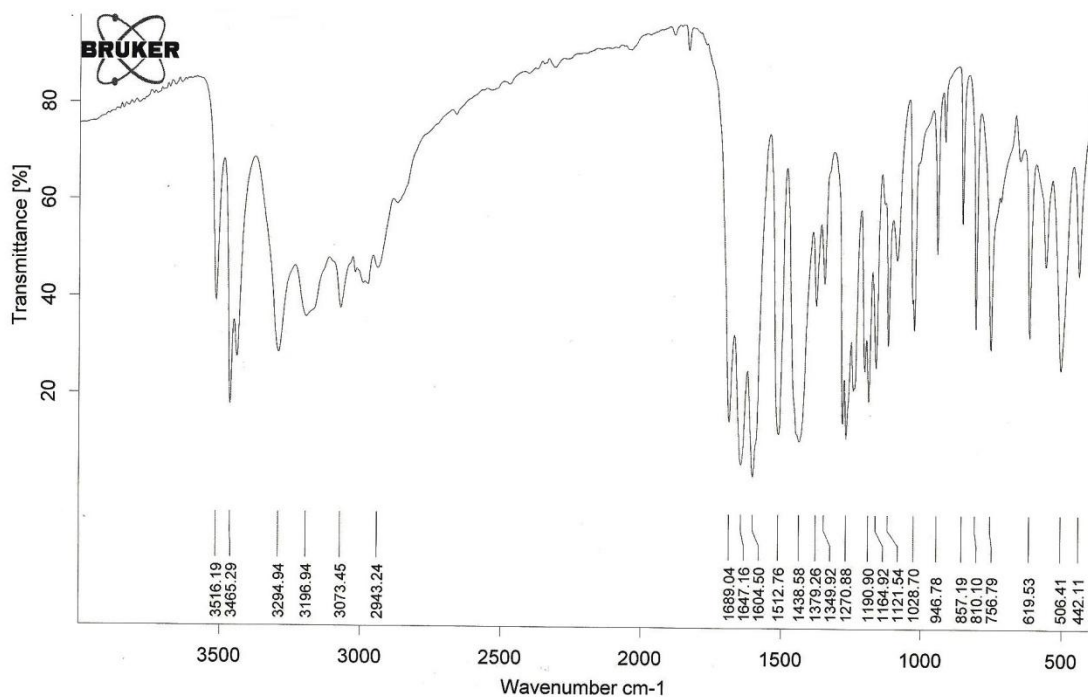
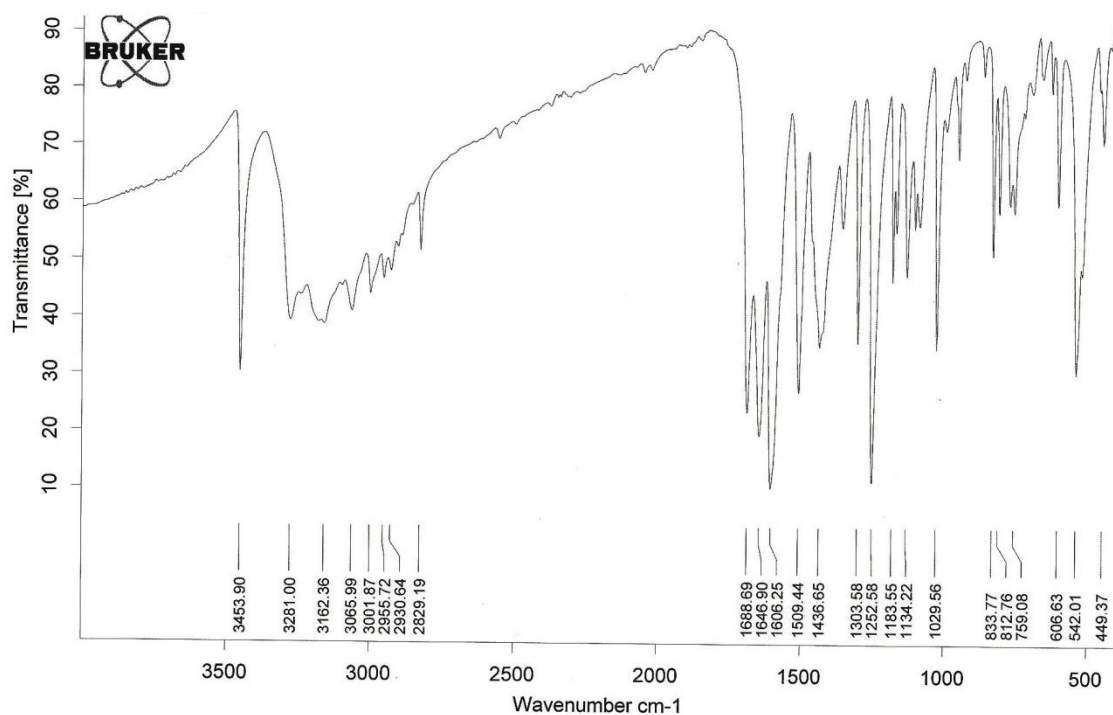
WILEY, P. F. Oxidation of Semicarbazide. *Notes*. v. 76, p. 5176-5177, 1954.

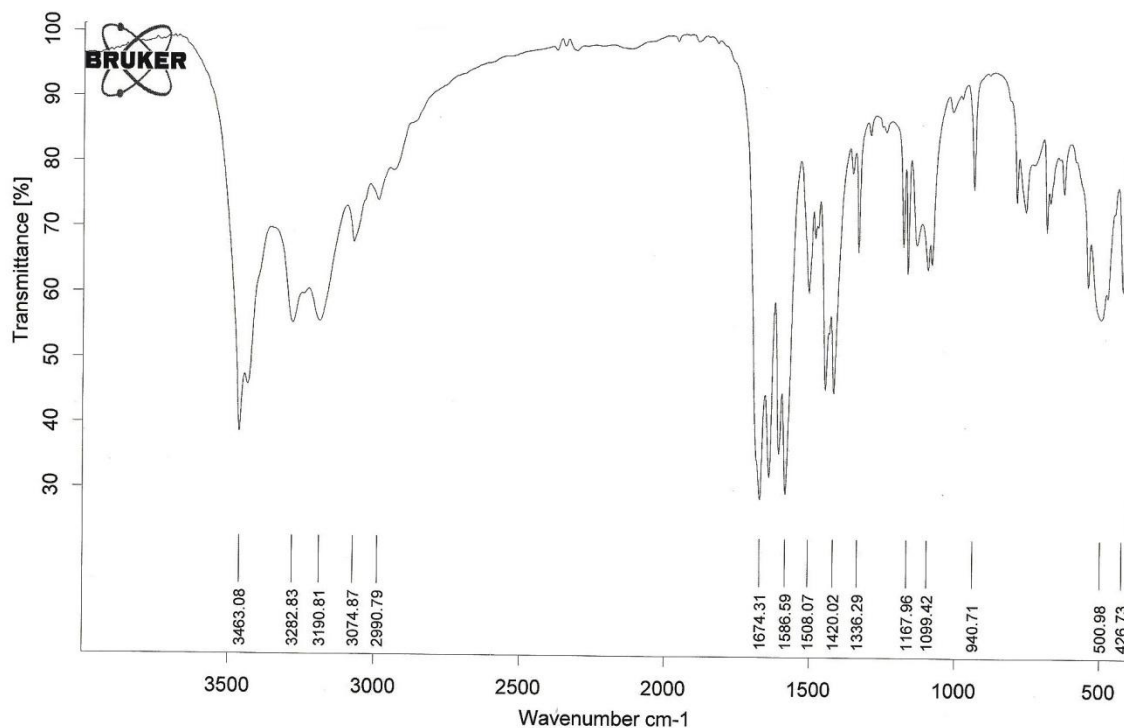
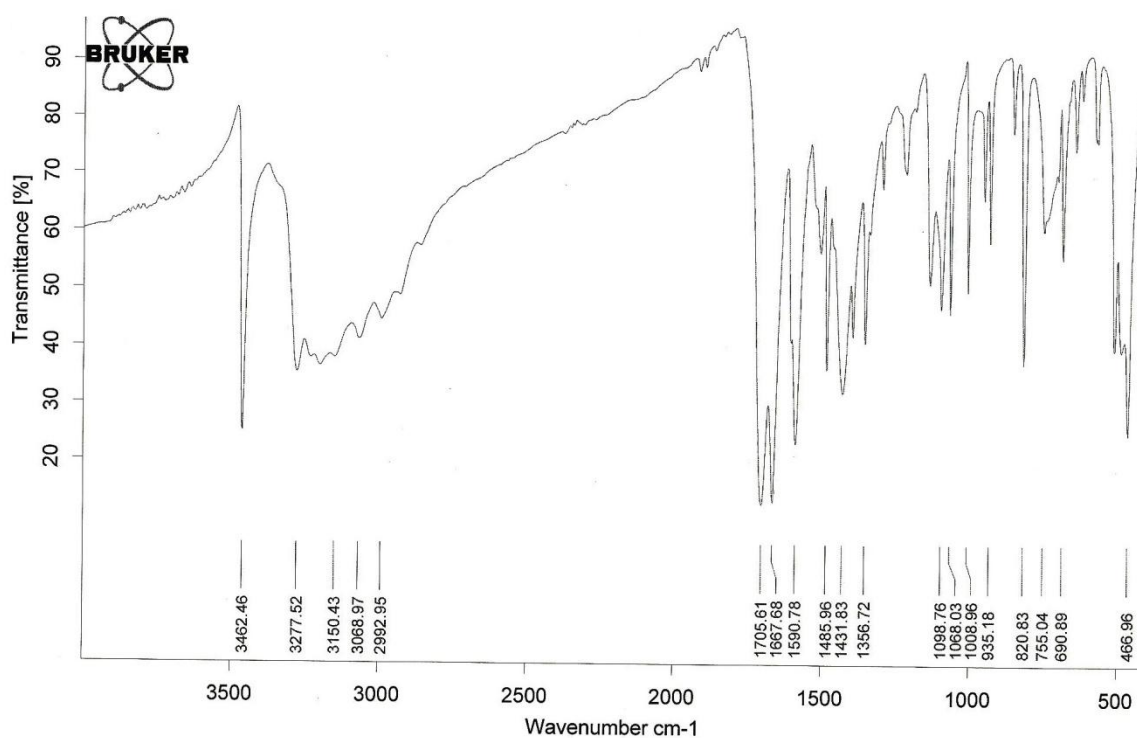
YADAV, L. D. S., SINGH, S., SINGH, A. Novel clay-catalysed cyclisation of salicylaldehyde semicarbazones to 2*H*-benz[*e*]-1,3-oxazin-2-ones under microwave irradiation. *Tetrahedron Letters*. v. 43, p. 8551–8553, 2002.

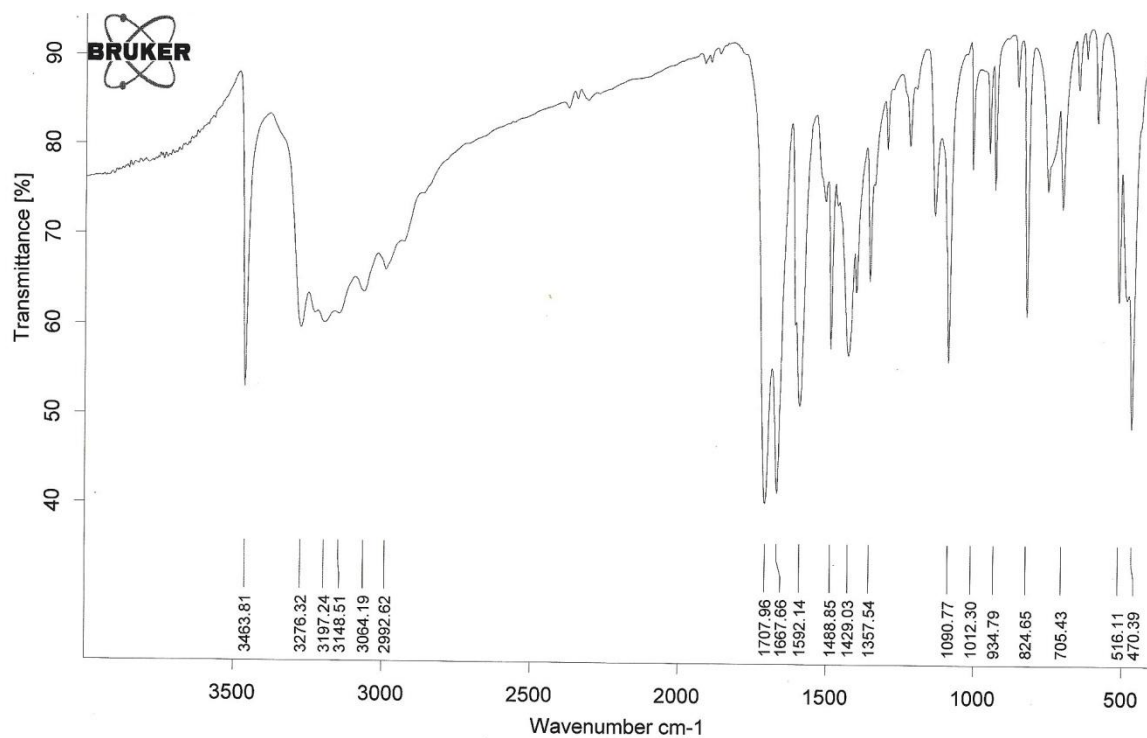
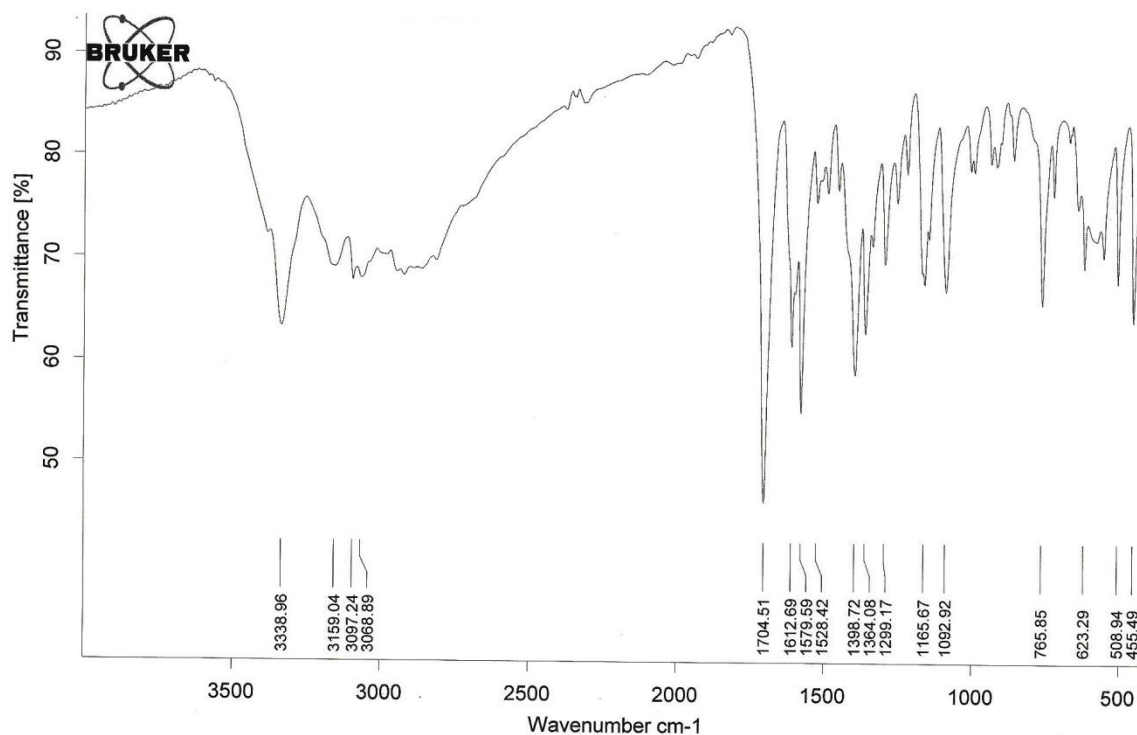
YADAV, J. S., GAYATHRI, K. U. ATHER, H., UR REHMAN, H., PRASAD, A. R. Utility of semicarbazones as ligands in newly made palladium complex for facile Suzuki homocoupling reaction of alkyl and aryl boronic acids. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*. v. 271, p. 25–27, 2007.

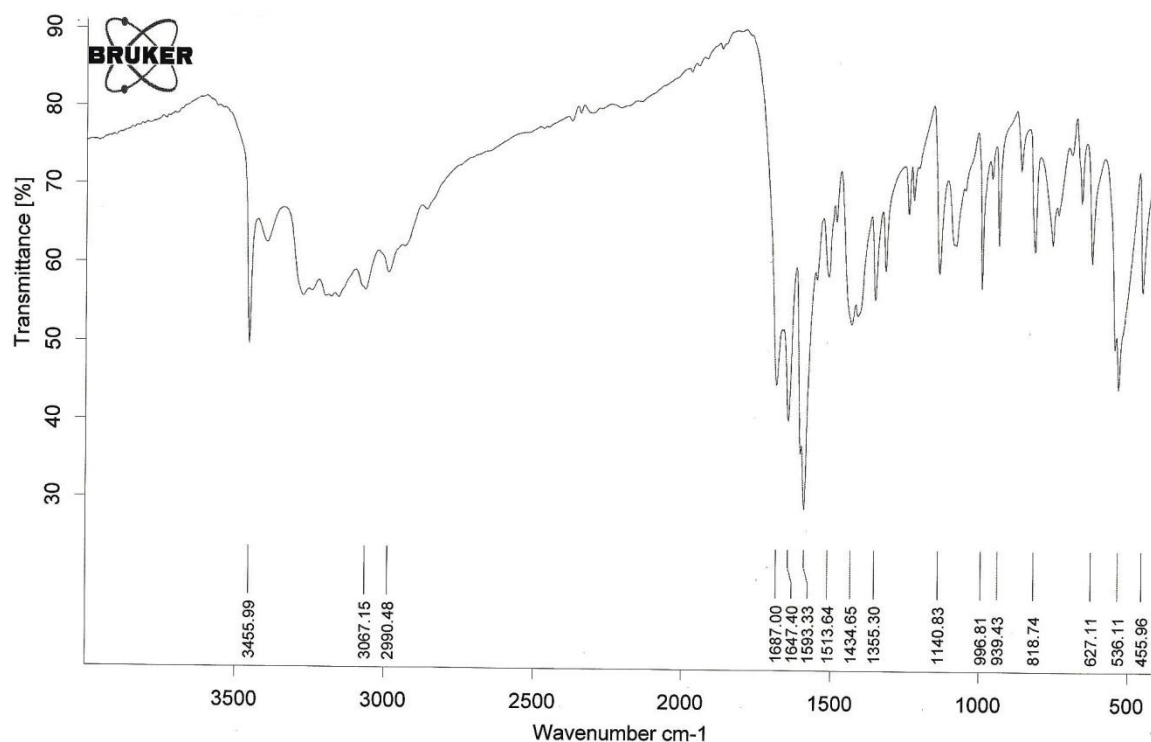
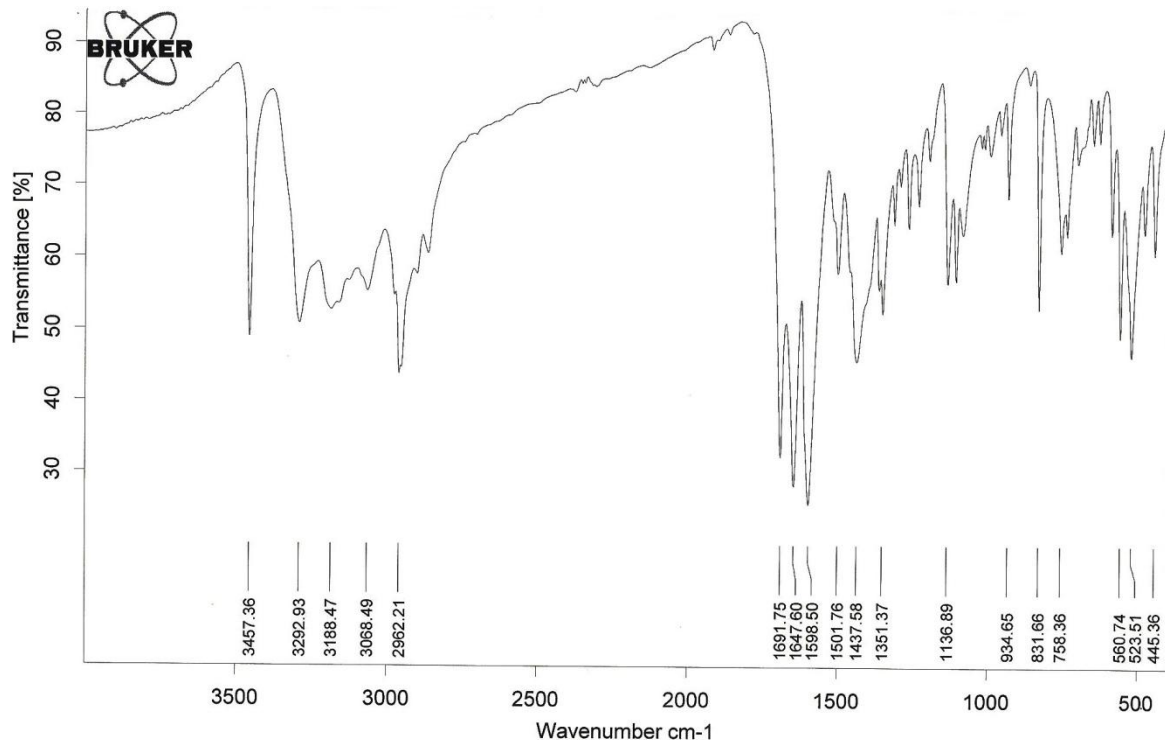
YOGESHWARI, P., SRIRAM, D., THIRUMURUGAN, R., RAGHAVENDRAN, J. V., SUDHAN, K., PAVANA, R. K., STABLES, J. Discovery of *N*-(2,6-Dimethylphenyl)-Substituted Semicarbazones as Anticonvulsants: Hybrid Pharmacophore-Based Design. *J. Med. Chem.* v. 48, p. 6202-6211, 2005.

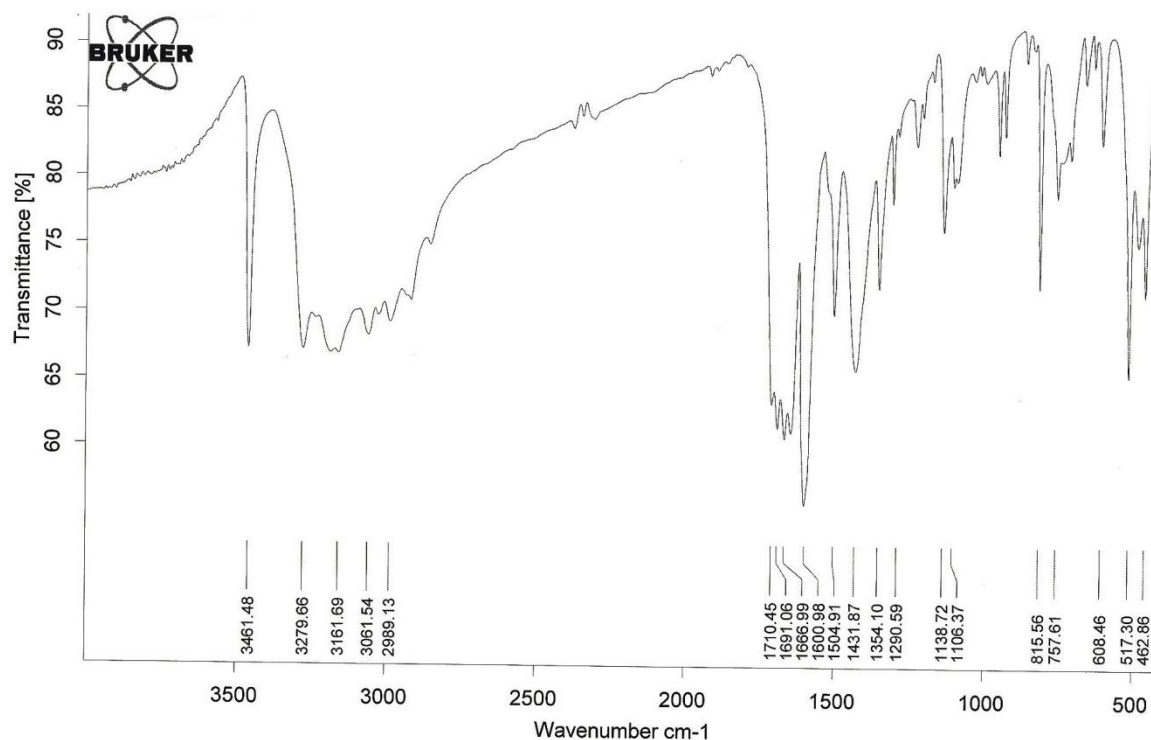
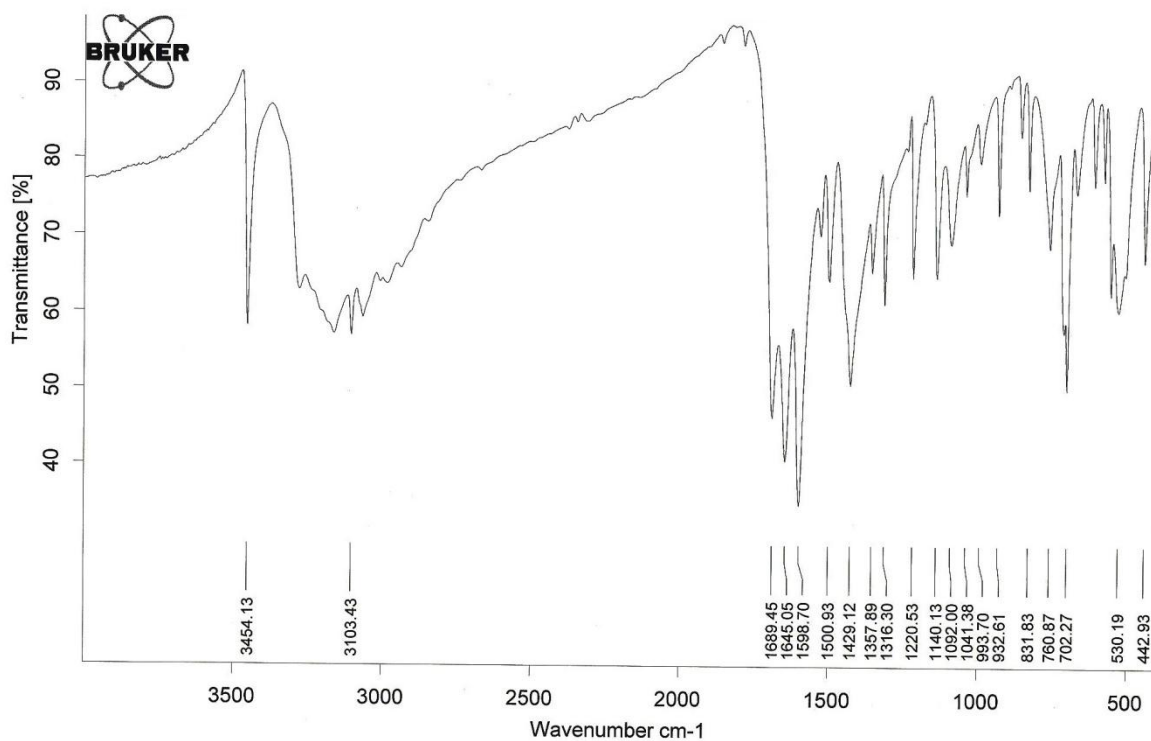
ANEXOS

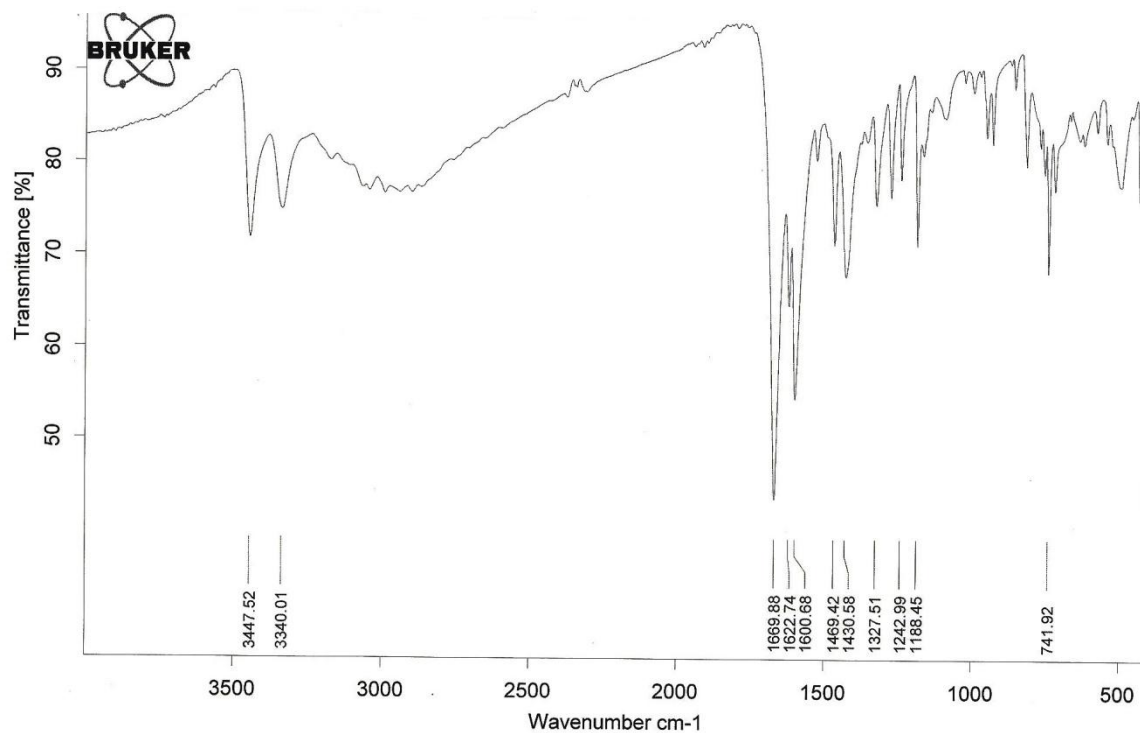
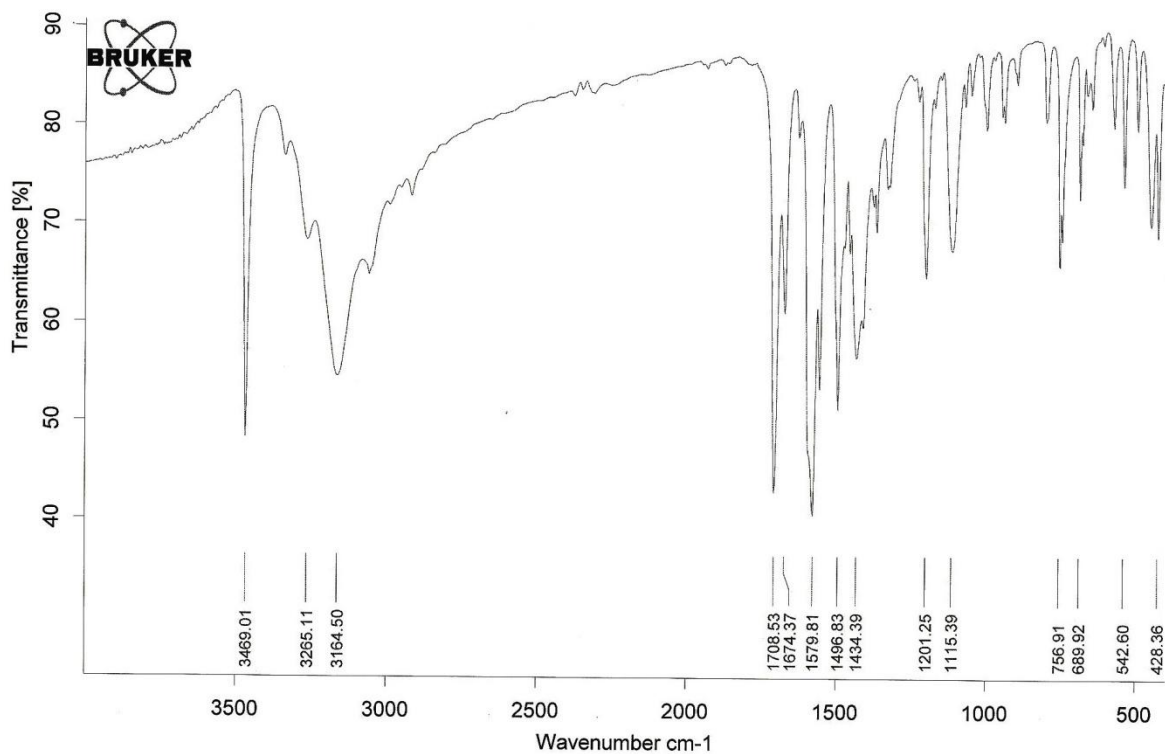
ANEXOS: ESPECTROS DE INFRAVERMELHO DOS COMPOSTOS OBTIDOS**Composto 02: 4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído semicarbazona****Composto 03: 4-metoxibenzaldeído semicarbazona**

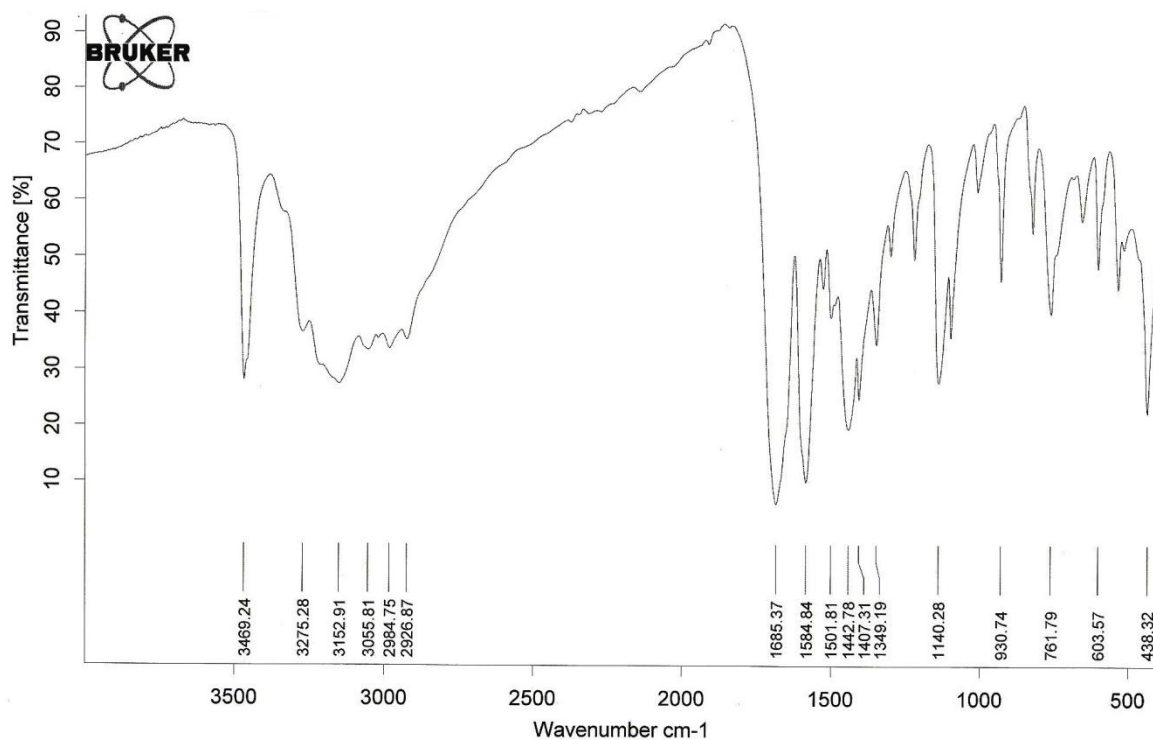
Composto 06: Isoftaldeído semicarbazona**Composto 07:** 4-bromobenzaldeído semicarbazona

Composto 09: 4-clorobenzaldeído semicarbazona**Composto 11: 2-piridinacarboxaldeído semicarbazona**

Composto 13: 4-piridinacarboxaldeído semicarbazona**Composto 14: 4-terc-butilbenzaldeído semicarbazona**

Composto 15: 4-metilbenzaldeído semicarbazona**Composto 16: 2-tiofenocarboxaldeído semicarbazona**

Composto 17: 2-hidroxi-naftaldeído semicarbazona**Composto 18: 3-metil-1-fenil-1H-pirazol-4-carboxaldeído semicarbazona**

Composto 19: Tereftaldeído semicarbazona**Composto 20:** 4-tiometilbenzaldeído semicarbazona