

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DA 4-HIDROXI-BENZOIL TIOSEMICARBAZONA: ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

Ana MENA BARRETO BASTOS (1); Sonia Maria DE MELO LIMA (2); Gabriel OLIVEIRA DE SOUZA (3)

(1) Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas, Av. 7 de Setembro CEP 69020 - 120, e-mail:

anamenabarreto@ifam.edu.br

(2) Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas, Av. 7 de Setembro CEP 69020 - 120, e-mail:

smmlima@ifam.edu.br

(3) Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas, Av. 7 de Setembro CEP 69020 - 120, e-mail:

biel_czar@hotmail.com

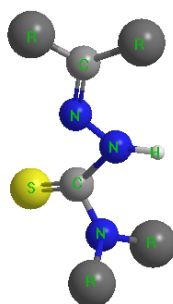
RESUMO

Esta pesquisa objetiva sintetizar, caracterizar e investigar a atividade antifúngica da 4-hidroxi-benzoil tiossemicarbazona (4-HOBzS). Na síntese realizada, obteve-se um pó branco com Ponto de Fusão (P.F.) = 205°C. A análise elementar sugere a síntese da 4-hidroxi-benzoil tiossemicarbazona pura. As bandas do espectro na região do infravermelho apresentam-se em 3313 –3055 cm^{-1} , que são atribuídas aos estiramentos $\nu(\text{N-H})$ simétrico e assimétrico. As bandas atribuídas às vibrações $\nu(\text{S=O})$, $\nu(\text{OH})$ e $\nu(\text{C=N})$ apresentam-se em 828, 1515 e 1596 cm^{-1} , respectivamente. Em solução de dimetilsulfoxido, bandas são observadas no espectro eletrônico da 4-HOBzS em 46948 cm^{-1} , atribuídas transições $\pi \rightarrow \pi^*$ do anel benzeno e em 36300 e 30303 cm^{-1} , atribuídas às transições $n \rightarrow \pi^*$ dos grupos azometínico e tioamida. Os testes de atividade antifúngica *in vitro* da 4-HOBzS frente aos fungos *Aspergillus niger* e *Aspergillus fumigatus* foram realizados e a toxicidade do composto frente aos fungos foi medida em termos da resposta de uma cultura em relação a outra cultura, tratada com um controle Micostatin (princípio ativo Nistatina), com comprovada ação antifúngica. Os resultados mostram que a 4-hidroxi-benzoil tiossemicarbazona não inibe o crescimento dos fungos testados nas concentrações de 800 $\mu\text{g/mL}$ a 1200 $\mu\text{g/mL}$.

Palavras-chave: 4-hidroxi-benzoil tiossemicarbazona, caracterização e atividade antifúngica.

1 INTRODUÇÃO

As tiossemicarbazonas (Figura 1) são substâncias de considerável interesse científico, devido as suas importantes propriedades químicas e biológicas, tais como antitumoral, antibacteriana, antiviral, antiprotozoária, citotóxica, dentre outras. Entre as razões estruturais que explicariam esse amplo perfil, está no fato de apresentarem na estrutura heteroátomos como o N, S, O. Tal característica permite a coordenação com metais existentes nas estruturas de enzimas, inativando-as, bem como a possibilidade de modular-se o caráter lipofílico dessas moléculas, assim como suas interações com receptores biológicos.



Substituinte = R₁, R₂, R₃, R₄ = H, alquil, aril.

Figura originária do Software CHEM 3D ULTRA 8.0

Figura 1- Estrutura Química das Tiossemicarbazonas

As Tiossemicarbazonas derivadas de benzaldeído não foram extensivamente estudadas, embora já se saiba que a atividade antitumoral da 2-benzoilpiridina tiossemicarbazona é superior às daquelas derivadas de formilpiridina. Até o momento, poucos estudos são encontrados na literatura a respeito de tiossemicarbazonas derivadas do 4- hidroxibenzaldeído . Diante deste fato, propomos sintetizar, caracterizar por meio de análises elementar, Ponto de Fusão, espectrometria na região do infravermelho (IV) ultravioleta (UV) a 4-hidroxi-benzoil tiossemicarbazona (4-HOBzS) e investigar atividade antifúngica. O teste da atividade antifúngica foi realizado em meio de Agar Batata Dextrose, semeados com os fungos *Aspergillus niger* e *Aspergillus fumigatus*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os estudos a respeito das carbazonas foram impulsionados a partir de 1946, pelo sucesso dos testes biológicos *in vivo* de tiossemicarbazonas com ação bactericida (SAWAF, 1999).

Com base nos estudos sobre relação estrutura e atividade biológica, uma nova tiossemicarbazona foi sintetizada, substituindo-se o agrupamento isatina da metizona pelo grupo fenoxiacetaldeído (Figura 2), a qual apresentou atividade quando testada em cepas virais da vaccínia, herpes humano, vírus de poliomelite, vírus da estomatite vesiculosa (WEST, 1998).

A atividade antileishmania foi verificada no promastigota da *Leishmania donovani* para tiossemicarbazonas derivadas de 3-formil e 3-acetil-B-carbolina. Esses compostos apresentaram maior resposta inibitória do que a 2-formilpiridina tiossemicarbazona (DEMERTZI,2000).

A 2-formilpiridina tiossemicarbazona apresenta também atividade antitumoral quando testada em tumores sólidos e leucemia de ratos, atividade esta manifestada por um aumento no tempo de vida do animal. Sua ação se dá através do bloqueio da enzima ribonucleosídeo difosfatase redutase (RDR), intermediário importante na biossíntese do (DNA), responsável pela transformação dos ribonucleotídeos nas formas desoxi correspondentes. A capacidade de inibição da RDR pela tiossemicarbazona é aumentada quando esta se coordena ao ferro. Atualmente sabe-se que a forma ativa da droga é o complexo de ferro (II)(MOHAN ,1985).

A 3-aminopiridina-2-carboxaldeído tiossemicarbazona e a 3-aminopiridina-4-metil-2-carboxaldeído tiossemicarbazona são conhecidas por apresentarem atividade inibitória sobre enzima ribonucleotídeo redutase (RR) 1000 vezes mais potentes que a hidroxiuréia em células da leucemia L1210 em ratos. Estudos indicam que a atividade inibitória destas substâncias sobre a RR é devida ao complexo formado entre elas e o átomo de ferro presente no sítio catalítico da RR. Atualmente, a triapina está sendo avaliada em testes clínicos de fase II, como possível fármaco antitumoral. Estas duas substâncias fazem parte da classe das tiossemicarbazonas (BERALDO, 2004).

A Atividade antifúngica foi observada para a 3- e 4- piridinoformamida tiossemicarbazonas, sendo que a maior ação antifúngica foi 4- piridinoformamida. A presença de substituinte metila ou etila no nitrogênio terminal da cadeia provoca diminuição da atividade, ao contrário do que a literatura relata para outras tiossemicarbazonas que não contêm o grupo amino (BASTOS, 2004).

A 5-hidroxi-2-formilpiridina tiossemicarbazona era o único membro da classe das tiossemicarbazonas $\alpha(N)$ -heterocíclicas a ser avaliado clinicamente em animais. No entanto, a importante atividade antineoplásica observada *in vitro* e em animais não se verificou em pacientes com câncer, principalmente em razão da formação do metabólito O-glucuronídeo inativo, que é rapidamente eliminado. Além disso, o composto mostrou menor afinidade pela enzima ribonucleosídeo difosfato redutase (RDR) do que outros agentes como a 1-formilisoquinolina tiossemicarbazona. A fraca atividade foi assim atribuída à pequena capacidade inibitória frente à enzima e a curta meia-vida biológica da droga, o que levou ao desenvolvimento de compostos de segunda geração que apresentassem maior afinidade pela RDR e que não fossem tão facilmente metabolizados (BERALDO, 2004).

A atividade antileishmania foi verificada no promastigota da *Leishmania donovani* para tiossemicarbazonas derivadas de 3-formil e 3-acetil- β -carbolina (MENDES, 2001).

Com base nos estudos sobre a relação da estrutura química e atividade biológica, uma nova tiossemicarbazona foi sintetizada, substituindo-se o agrupamento isatina da metizona pelo grupo fenoxiacetaldeído, a qual apresentou atividade quando testada em cepas virais da vaccínia, herpes humano, vírus de poliomelite, vírus da estomatite vesiculosa (DIMMOCK, 2000).

As tiossemicarbazonas derivadas da isatina apresentam ação como agentes antivirais (Thompson, 1953 e Bauer, 1955), bactericidas (Daisley e Sahah, 1984) e antifúngicos (Psicopo et al., 1987). A atividade antiviral foi verificada para a 4-tiossemicarbazona da N-metil isatina, quando testada em ratos com infecção intracerebral por vírus da vacina, por retrovírus e pelo HIV (DEMERTZI, 1997).

A 2-formilpiridina tiossemicarbazona apresenta também atividade antitumoral quando testada em tumores sólidos e leucemia de ratos, a atividade é aumentada quando esta se coordena a um metal (DEMERTZI, 1997).

Algumas modificações estruturais foram relatadas na literatura, com o objetivo de se estabelecer relações estrutura-atividade, tais como: (1) troca do átomo de enxofre do grupo tiocarbonil por oxigênio ou por selênio; (2) troca do ponto de ligação da porção tiossemicarbazona na cetona ou no aldeído de partida em particular quando existe um grupo coordenante adicional; (3) substituição no N terminal; (4) variação na estrutura do aldeído ou da cetona de partida (WEST, 1995).

A Atividade antifúngica foi observada para as 3- e 4- piridiniformamida tiossemicarbazonas, sendo que a maior ação antifúngica foi 4- piridinoformamida. A presença de substituintes metila ou etila no nitrogênio terminal da cadeia provoca diminuição da atividade, ao contrário do que a literatura relata para outras tiossemicarbazonas que não contêm o grupo amino (BASTOS, 2004).

Apesar de ainda preliminares, os resultados dos testes de atividade antifúngica para a 1,5 difenilcarbazona e dos seus complexos de níquel (II) e Zn (II) mostram que apenas o complexo de zinco(II) não apresentou atividade satisfatória contra *Candida albicans*. Na família do ligante a atividade aumenta pelo aumento do volume de substituintes, de acordo com resultados relatados na literatura para outras carbazonas. Tanto a 1,5 difenilcarbazona e o complexo de níquel (II) apresentaram atividade superior à do controle (nistatina), não observando o mesmo para o complexo de Zn (II), onde ocorre a formação de halo, mas com algumas colônias do fungo, o que podemos considerar uma inibição não satisfatória. Na concentração de 1200 µg.mL⁻¹ a inibição foi 8 mm menor que a do controle Nistatina (BASTOS, 2008).

3. METODOLOGIA, RESULTADOS, ANÁLISE E INTERPRETAÇÃO DOS DADOS

3.1 Síntese da 4-hidroxi-benzoil tiossemicarbazona (4-HOBzS)

Para a síntese da 4-HOBzS, utilizou-se 11 mmol de tiossemicarbazida e 11 mmol de 4-hidroxi-benzaldeído que foram dissolvidos em álcool etílico P.A. e mantidos em refluxo durante 8 horas. O precipitado formado foi purificado por solubilização e posterior extração usando Soxhlet. O extrato alcoólico contendo precipitado foi filtrado e, em seguida, secado ao ar.

3.2 Investigação de atividade antifúngica da 4- hidroxi-benzoil tiossemicarbazona

Os testes de atividade antifúngica *in vitro* da 4-hidroxi-benzoil tiossemicarbazona foram realizados contra os fungos *Aspergillus niger* e *A. fumigatus* e a toxicidade dos compostos frente esses fungos foram medidos em termos da resposta de uma cultura em relação a uma outra, tratada com um controle Micostatin (princípio ativo Nistatina), com comprovada ação antifúngica.

3.2.1 Teste da Atividade Antifúngica

Os Testes foram realizados utilizando soluções da 4-HOBzS com concentração entre 800 a 1200 µg/mL Os microorganismos foram cultivados em tubos de ensaio contendo o meio apropriado para o seu crescimento por um período de 24-72 horas a uma temperatura de 30°C. Em seguida, retirou-se 10 µL da suspensão de cada tubo, e semeados em placas de petri contendo Agar batata e discos de papel (Discos Plank) embebidos nas soluções do composto e do controle. As placas foram incubadas a 30°C em ambiente de microaerofilia por um período de 24-72 horas. A inibição do crescimento das colônias dos microorganismos foi avaliada pelo aparecimento de halos ao redor dos discos de papel. A inibição foi então medida através do diâmetro do halo formado e comparada ao controle Nistatina em torno de 14 mm.

3.3 Resultados

A obtenção de 4- HOBzS, a partir da síntese da tiossemicarbazida com o 4 Hidroxi-Benzaldeído forneceu um precipitado branco, de P.F. 205°C, característico das tiossemicarbazonas O produto foi caracterizado por análise elementar (Tabela 1) e espectroscopia na região do infravermelho, ultravioleta.

Tabela 1 - Análise elementar massa molar da 4-hidroxi-benzoil tiossemicarbazona

Composto	Ponto de Fusão (°C)	Experimental (Teórico %)					Massa Molar g/mol
		C	H	N	O	S	
4-OHBzS	138,9	49,25(49,21)	4,62(4,65)	21,10(21,52)	8,32(8,19)	15,98(16,42)	195,05

As bandas do espectro na região do infravermelho mais útil na determinação estrutural, apresentam-se na região 3313 –3055 cm⁻¹ atribuídas aos estiramentos ν (N-H) simétrico e assimétrico. As bandas atribuídas às vibrações ν (S=O), ν (OH) e ν (C=N) apresentam-se em 828, 1515 e 1596 cm⁻¹, respectivamente, equivalentes as encontradas por Mendes (2001) para compostos com estruturas semelhantes.

Em solução de dimetilsufoxido, bandas são observadas no espectro eletrônico da 4-HOBzS em 46948 cm⁻¹ o que sugere transições $\pi \rightarrow \pi^*$ do anel benzeno e em 36300 e 30303 cm⁻¹ as transições $n \rightarrow \pi^*$ dos grupos azometínico e tioamida, equivalentes as encontradas por Martinez (1995).

A Figura 2 mostra a não inibição do crescimento dos fungos *Aspergillus niger* e *Aspergillus fumigatus*, cultivados em meio de Agar em diferentes concentrações da 4-HOBzS.

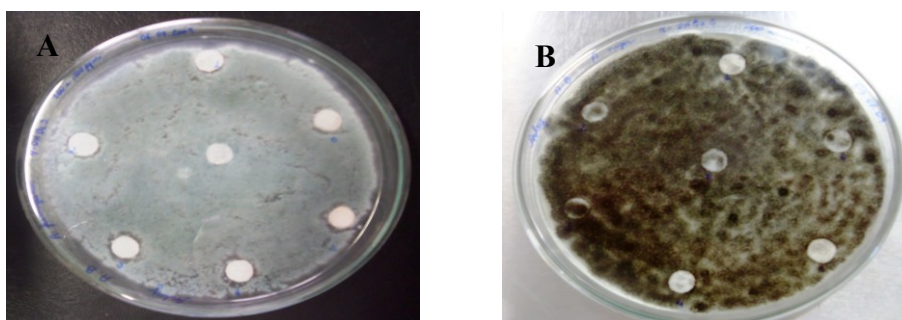


Figura 2 – Placas de Petri apresentando a não inibição do crescimento dos fungos e *A. fumigatus* (A) *Aspergillus Niger* (B) para diferentes concentrações (800 a 1200 µg/mL.) da 4-hidroxi-benzoil tiossemibcarbazona.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho foi sintetizado e caracterizado por análise elementar, ponto de fusão, espectroscopia na região do infravermelho e ultravioleta a 4-hidroxi-benzoil tiossemicarbazona. O composto sintetizado apresenta P.F. = 205°C, característico das tiossemicarbazonas. A análise elementar sugere a síntese de um composto com um bom grau de pureza, como mostra a Tabela 1.

Os resultados para os testes de atividade antifúngica mostram que a 4-HOBzS não apresenta atividade antifúngica frente ao *A. Niger* e *A. Fumigatus* nas concentrações de 800 a 1200 µg/mL, quando comparados com o controle Nistatina (HI = 12,0 - 14,0 mm).

Com os resultados obtidos no presente trabalho, novos aspectos da química e da atividade farmacológica até hoje inexplorados da 4- hidroxi-benzoil tiossemicarbazona foram investigados, e esperamos estar contribuindo com o perfil farmacológico do composto sintetizado.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Fundação de Apoio a Pesquisa no Estado do Amazonas FAPEAM pelo apoio financeiro, ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas IFAM pelo infra estrutura de laboratório disponibilizada para pesquisa e ao bolsista Gabriel Oliveira de Souza, pela dedicação e apoio a essa pesquisa.

REFERÊNCIAS

- BASTOS, A.M.; SILVA, J.L.O.; GUERRA, C. G. S., **Síntese ,caracterização e investigação da atividade antifúngica da difenilcarbazona e seus complexos de Ni (II) e Zn(II): atividade antifungica.** in: III Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte e Nordeste de Educação Tecnológica Fortaleza-CE, 2008.
- BASTOS, A. M. B. **Investigação de algumas semicarbazonas e tiossemicarbazonas: estudos por RMN e atividade insulino mimética, antimicrobiana e mimetizadora da superóxido dismutase de complexos metálicos.** 2004. 240 p. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Minas Gerais, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.
- BERALDO, H. **Semicarbazonas e tiossemicarbazonas: o amplo perfil farmacológico e usos clínicos** Quim. Nova, Vol. 27, No. 3, 461-471, 2004
- DEMERTZI K, D., DOMOPOULOU A., DEMERETZIS, Valle G., PAPAGEORGIOU A., *J. Inorg. Biochem.*, 68, 147, 1997.
- DEMERTZI, K. D., YADAV P. N., DEMERTZI M. A., COLUCCIA M., *J. Inorg. Biochem.*, 78, 347, 2000.
- DIMMOCK, J. R.; VASHISTHA S.C.; STABLES P. **Anticonvulsant properties of various acethydrazones and semicarbazones derived from aromatic and insaturated carbonyl compounds.** *Eur. J. Med. Chem.*, 35, 241, 2000.
- MARTINEZ, J. V.; ORTIZ S. H.; TOSCANO R. A. **Copper (II) Complexes Of 2-Benzoylpyridine 4n-Substituted Thiosemicarbazones.** *Polyhedron*. v.14, p.2189-2200,1995.
- MENDES I. C., TEIXEIRA L. R., LIMA R., BERALDO H., SPEZIALI N. L., WEST D. X., **Structural and spectral studies of thiosemicarbazones derived from 3- and 4- formylpyridine and 3- and 4- acetylpyridine.** *J. Molec. Structure*, 559, 355, 2001.
- MOHAN M., SHARMA P., JHA N. K., *Inorg. Chem. Acta*, 106, 117, 1985.
- SAWAF, A. K.; WEST, D. X.; El-Saied, F. A.; El-Bahnasawy, R. M.; *Inorg. . Me. Chem.*, 27, 1127, 1999.
- WEST, D. X.; IVES, J. S.; KRE JCI, J.; SALBER, M. M.; ZUMBAHLEN, T. L.; BAIN, G. A.; LIBERTA, A. E. **Copper (II) Complexes of 2-Benzoylpyridine N-Substituted thiosemicarabzones.** *Polyhedron*, 14, p. 2189, 1995.
- WEST, D.X.; BILLEH, I. S., JASINSKI, J. P.; JASINSKI, J. M.; BUTCHER R. J. **Complexes of N 4 cyclohexylsemicarbazones derived from 2-formyl-2-acetyl- and 2- benzoylpyridine.** *Transition Met. Chem.* v. 23, p. 209-214, 1998.