

SINTESE E CARACTERIZAÇÃO DE BENZOILSEMICARBAZONA E SEU COMPLEXO DE Ni (II): ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

A.M.B. Bastos, Gerência da área de Química-CEFET-AM
Av. 7 de setembro, 1975 CEP 69020-120 Manaus-A
E-mail: anamenabarreto@cefetam.edu.br

J. G. Farias, Gerencia do Ensino Superior- Tecnologia de Química Industrial-CEFET-AM
Av. 7 de setembro, 1975 CEP 69020-120 Manaus-A
E-Mail: JonhatanGuedesFarias@hotmail.com

RESUMO

A atividade biológica e as propriedades físico-químicas de semicarbazonas derivadas de acetonas e aldeídos foram estudadas por vários autores. A atividade biológica mais relatada na literatura recente para as semicarbazonas é a atividade anticonvulsivante, mas existem igualmente relatos a respeito de suas propriedades, antileucêmica, antineoplásica e antiviral. A atividade biológica bem como os efeitos colaterais das semicarbazonas depende da estrutura e, em muitos casos, devem-se à sua capacidade quelante. Algumas modificações estruturais foram relatadas na literatura, com o objetivo de se estabelecer relações estrutura-atividade. Neste trabalho, foram sintetizados a benzoilsemicarbazona (HBES), derivada do ácido benzóico e seu complexo de níquel $[Ni(BES)_2]$. Os compostos foram submetidos à análise elementar, espectroscopia na região do infravermelho e atividade antifúngica contra o fungo *Cândida albicans*. A benzoilsemicarbazona e seu complexo, apresentaram atividade inibitória do crescimento contra *Candida albicans*, apresentando ação superior ao padrão (droga Micostatin -princípio ativo Nistatina), com comprovada ação antifúngica.

Palavras-chave: benzoilsemicarbazona, complexo de níquel (II), atividade antifúngica.

1. INTRODUÇÃO

As Semicarbazonas são compostos que apresentam uma ampla faixa de aplicações farmacológicas. As propriedades destes compostos têm sido extensivamente estudadas na Química Medicinal e em particular na Química Medicinal Inorgânica em razão de sua grande afinidade pelos cátions metálicos. Essa substância também demonstra ter uma grande atividade biológica, assim como seus complexos metálicos. Esses compostos são sintetizados por reação de condensação de uma semicarbazida com aldeídos ou cetonas, como mostra (Hajipour et al 1999).

A 2-formilpiridina semicarbazona (Figura 1) apresenta 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, como relatado por (Pandeya et al 1999).

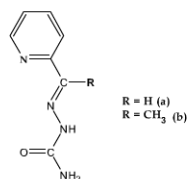


Figura 1. Estruturas de 2-formilpiridina semicarbazona (a) e 2-acetilpiridina semicarbazona (b).

As atividades hansenostática e tuberculostática foram comprovadas na clínica em pacientes contaminados por *Micobacterium leprae*, e *Micobacterium tuberculosis* decorrentes de infecção por HIV, quando a p-acetamidobenzaldeído semicarbazona (Figura 2) foi testada com bom resultado.

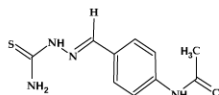


Figura 2. Estrutura de p-acetamidobenzaldeído semicarbazona

A literatura recente traz inúmeros trabalhos sobre a crescente importância das semicarbazonas que apresentam, entre outras, atividades antineoplásica, antimalária, antituberculose, antimicrobiana, antichagásica, pesticida, herbicida e principalmente como anticonvulsivantes. As β -semicarbazonas derivadas da isatina (Figura 3.) apresentam um amplo espectro de ação como agentes antivirais, bactericidas e antifúngicos. A atividade antiviral foi verificada para a β -semicarbazona da N-metil isatina, quando testada em ratos com infecção intracerebral por vírus da vaccinia, por retrovírus e pelo HIV. Em 1962, iniciou-se a comercialização da β -semicarbazona da N-metil isatina (metizona) sob o nome de Marboran (Casas et al 2000).

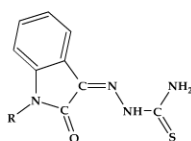


Figura 3. β -semicarbazonas derivadas da isatina

As atividades biológicas bem como os efeitos colaterais das semicarbazonas dependem da estrutura e, em muitos casos, devem-se à sua capacidade quelante. Algumas modificações estruturais foram relatadas na literatura, com o objetivo de se estabelecer relações estrutura-atividade; variação na estrutura do aldeído ou da cetona de partida. Observou-se que, de modo geral, a presença de substituintes volumosos no nitrogênio terminal faz aumentar a atividade e que, em muitos casos, a redução da capacidade quelante acarreta uma diminuição na atividade, embora

se conheçam exemplos de semicarbazonas potencialmente bidentadas que apresentam atividade significativa, como a p-acetamidobenzaldeído semicarbazona, empregada na clínica no tratamento de tuberculose decorrente de infecção pelo vírus HIV, como relatado por (Dimmock 1993).

Nesse trabalho, procuramos dar continuidade ao estudo da semicarbazonas que vem sendo desenvolvido por vários grupos de pesquisadores nos últimos anos, através da síntese de acetil e benzoilsemicarbazona e seus complexos de Níquel, com objetivo de investigar sua atividade contra o fungo *Candida albicans*, até então, não investigada.

1. OBJETIVOS GERAL

Síntese e caracterização de semicarbazonas e do seu complexo de níquel (II) e Investigação da atividade antifúngica.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Equipamentos

- As pesagens foram feitas nas balanças analíticas Mettler AE 163 de precisão 0,0001 g
- Os espectros de absorção na região do infravermelho nas faixas de $4000-400\text{ cm}^{-1}$ e $400-200\text{ cm}^{-1}$, foram registrados em espectrômetros Perkin Elmer 283B, Bomen-Michelson Series, utilizando-se emulsão de nujol entre janelas de CsI e em Perkin Elmer FT-IR system-Spectrum GX empregando-se pastilhas em CsI.
- Os espectros de absorção na região do ultravioleta-visível no sólido foram registrados no espectrofotômetro UV-2401PC (P/N 206-82201)-SHIMADZU CORPORATION, empregando-se partilha de sulfato de bário.
- Análise elementar foi obtida no equipamento Perkin Elmer CHN-2400.
- As medidas de condutimetria dos complexos foram feitas utilizando-se o condutivímetro AT201 Alfa tecnquímica,. As soluções foram preparadas em concentrações na ordem de $10^{-3}\text{ mol L}^{-1}$ a $10^{-4}\text{ mol L}^{-1}$, utilizando-se metanol, H_2O como solvente. Todas as medidas foram realizadas a temperatura ambiente e os resultados foram analisados de acordo com faixas tabuladas.
- Chapa aquecedora.
- Aparelho de agitação mecânica.
- Banho Maria, fabricante NOVA TÉCNICA.
- Estufa- Fabricante QUIMIS, com display 200-50° C.
- Aparelhagem grande modificada de Soxhelt;
- Lã de vidro;
- Papel filtro;
- Rotaevaporador, fabricante QUIMIS, Modelo TLH23;
- Aparelho para destilação;

3.2 Vidrarias

- Becker de 10mL a 1L;
- Pipetas;
- Provetas;
- Funil;
- Espátula;
- Vidro de relógio;
- Bastão de vidro;
- Erlenmeyer;
- Pisseta com água destilada;
- Pisseta co álcool;
- Placa de petri;

3.3 Reagentes e solventes

- Sulfato de hidrazina
- Carbonato de sódio
- Cianeto de potássio
- Éter etílico
- Ácido clorídrico
- Acetato de sódio
- Benzaldeído
- Acetaldeído
- Propanona
- Cloridrato de semicarbazida.

3.4 Síntese do Ligante e complexo

3.4.1 Síntese da semicarbazida: A metodologia otimizada para o síntese da semicarbazida obedeceu o seguinte procedimento: Dissolveu-se 32,5g de sulfato de hidrazina e 13,5g de Carbonato de Sódio Anidro em 125mL de água em ebulição, contidos num Becker de 1 litro, a seguir deixou-se esfriar a solução a 50-55°. Com a solução fria foi adicionada uma solução de 17g de Cianeto de potássio puro em 250 mL de água. A mistura obtida foi deixada em repouso durante 24 horas e secada ao ar durante 36 horas, como mostra (Kasuga et al 2001).

3.4.2 Síntese da benzoil e acetilsemicarbazona: A semicarbazida obtida foi tratada com 60g (76mL) benzaldeído P.A em metanol. A mistura resultante permaneceu sob agitação mecânica durante 8h. Nesse período ocorreu a precipitação da acetilsemicarbazona impura, que foi filtrada e secada sobre papel filtro ao ar. O filtrado restante, foi submetido à agitação mecânica por mais 6h, com isso obteve-se mais uma quantidade de benzoilsemicarbazona (West et al 1997).

O mesmo procedimento foi realizado com acetona com objetivo de se obter uma acetilsemicarbazona, porém com o rendimento muito baixo, não permitindo a continuação dos testes para a acetilsemicarbazona.

3.4.3 Purificação da benzoilsemicarbazona (HBES): A benzoilsemicarbazona foi purificada por solubilização e posterior extração usando Soxhlet, cujas extremidades inferiores foram cobertas com lã de vidro. Nesse aparelho a extração teve duração de 6h, com 100mL de álcool absoluto. O extrato alcoólico contendo precipitado de benzoilsemicarbazona, foi filtrado e em seguida secado ao ambiente ao ar. A semicarbazona foi tratada com 28g da mesma, com 25mL de ácido Clorídrico concentrado, até o ponto no qual ela se dissolveu por completo. Submetendo-se a um choque térmico com gelo, obteve-se um precipitado com aspecto cristalino, que foi filtrado e secado em trompa a vácuo com funil de vidro sinterizado. A semicarbazona foi obtida com um rendimento de 60% 25g, apresentado P.F. 186°C [2,3,4], característico das semicarbazonas (West et al 1997)..

3.4.4 Síntese do complexo de níquel (II) de benzoilsemicarbazona (HBES) obtido a partir de cloreto de níquel (II): A uma solução metanólica contendo 1,5 mmol do ligante (HBES) foi adicionado 0,75 mmol (0,1866 g) de $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. A mistura reagente foi mantida sob refluxo e agitação magnética por 7 horas. O precipitado de cor azul formado foi filtrado, lavado com metanol e éter etílico, secado sob vácuo e mantido em dessecador na presença de sílica gel, como mostra (Beraldo et al 1997).

Os compostos sintetizados foram submetidos a análise elementar, ponto de fusão, espectroscopia na região do infravermelho e ultravioleta e testes de atividade antifúngica.

3.4.5 Atividade Antifúngica : Os testes de atividade antifúngica *in vitro* da benzoilsemicarbazona e do seu complexo de Ni(II) contra *Candida albicans* foram realizados e a toxicidade dos compostos frente aos fungos foi

medida em termos da resposta de uma cultura em relação a uma outra cultura tratada com um controle Micostatin (princípio ativo Nistatina), com comprovada ação antifúngica.

As soluções dos compostos foram testadas, em triplicata, em várias concentrações. Pesou-se a massa apropriada dos compostos, que foi dissolvida em 1 mL de metanol: H₂O. Foram feitas diluições até obter-se a concentração desejada em 1 mL de solução metanólica. Assim, foram usadas concentrações entre 200 µg/mL a 1200 µg/mL.

O microorganismo foi cultivado em tubo de ensaio contendo o meio apropriado para o seu crescimento (caldo Sabouraud Dextrosado), por um período de 24 horas, a uma temperatura de 37°C. Em seguida, retiraram-se 55 µL da suspensão do tubo e semeou-se em placas de petri contendo ágar apropriado (ágar Sabouraud Dextrosado).

Discos de papel (Discos Plank) foram embebidos nas soluções dos compostos e no controle e colocados nas placas, que foram incubadas a 37°C em ambiente de microaerofilia por um período de 24 horas. Verificou-se a inibição do crescimento das colônias dos microorganismos pelo aparecimento de halos de inibição do crescimento ao redor dos discos de papel. A inibição foi então medida através do diâmetro do halo formado e comparada aos controles: Nistatina em torno de 14 mm.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Como já mencionado, inicialmente foi sintetizado semicarbazida que é um reagente de partida na síntese da semicarbazona. Com este reagente a síntese da benzoilsemicarbazona foi realizada conforme método apresentado na literatura, com um rendimento de 45% utilizando como reagente benzaldeído e um rendimento muito baixo com acetona, ficando os testes com a acetilsemicarboza comprometidos.

Os resultados e discussões se restringiram apenas ao ligante benzoilsemicarbazona (HBES) e seu complexo de níquel (II) [Ni(BES)₂].

A Tabela I, apresenta pontos de fusão, massa molar e dados de análise elementar de HBES e [Ni(BES)₂], o que sugere compostos com um grau de pureza satisfatório. Os dados obtidos a partir dos espectros de infravermelho encontram-se relacionados nas Tabelas II. Esses dados são analisados e uma discussão comparativa é apresentada a seguir.

Tabela I - Ponto de fusão (°C), massa molar (g/mol), análise elementar do HBES e do complexo [Ni(BES)₂] e condutividade elétrica do complexo de Ni(II).

Compostos	PF (°C)	MM (g/mol)	Experimental (calculado)			*Λ _M
			%C	%H	%N	
HBES	186	163,01	57,9 (58,9)	5,5 (5,7)	25,8 (25,8)	58
[Ni(BES) ₂]	>400	382,70	50,17(50,2)	3,6(3,7)	21,9(21,8)	

*Λ_M = Ω⁻¹. cm².mol⁻¹ em DMSO/H₂O (1:3).

A Tabela II, mostra as principais atribuições das bandas dos espectros de infravermelho de HBES e do complexo [Ni(BES)₂]. Os espectros apresentam bandas entre 3450 – 3153 cm⁻¹, características das vibrações de estiramento ν(NH) simétrico e assimétrico. Bandas fortes entre 1599 – 1551 cm⁻¹ são atribuídas ao estiramento ν(C=N), como mostra (Zamian et al 1995). Observam-se ainda, as bandas na região entre 1686 -1678 cm⁻¹ que se devem ao modo de estiramento ν(C=O) (Bastos 2003). A Figura 1 mostra o espectro infravermelho de HBES e [Ni(BES)₂], como mostra.

Tabela II - Bandas no espectro infravermelho (cm⁻¹) de HBES e seu complexo com cloreto de níquel (II).

Composto	ν(C=O)	ν(C=N)	ν(Ni-N)	ν(Ni-O)
HBES	1686-1678F	1599- 1551 F	-	-

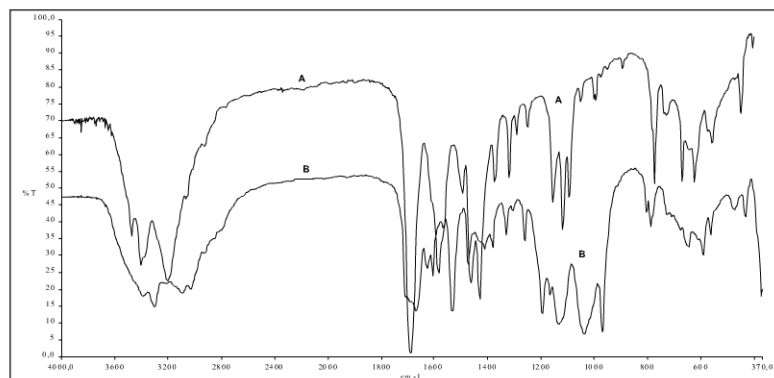


Figura 1 Espectro de infravermelho de HBES (A) e [Ni(BES)₂] (B) em CsI.

O valor de condutividade molar (Tabela I) indica que o complexo é não-eletrólitos, ou seja, é neutro, confirmando as formulações propostas.

Assim, para o complexo, a benzoilsemicarbazona está coordenada ao centro metálico de forma bidentada, através do nitrogênio azometínico e do oxigênio carbonílico, tendo em vista que as bandas fortes entre 1599 – 1551 cm⁻¹ são atribuídas ao estiramento $\nu(\text{C}=\text{N})$, no ligante, deslocou-se no complexo para a região de 1582m. Observam-se ainda, as bandas na região entre 1686 -1678 cm⁻¹ no ligante deslocada no espectro do complexo para a região de 1666-1655 cm⁻¹ que se devem ao modo de estiramento $\nu(\text{C}=\text{O})$, sugerindo a coordenação do ligante ao centro metálico. A geometria do complexo seria possivelmente quadrado planar, como mostra (Akinchan et al 1994).

A Tabela III lista os dados dos espectros eletrônicos (cm⁻¹) para a benzoilsemicarbazona e seu complexo em solução de DMSO/H₂O 1:3. Observa-se nos espectros da semicarbazona livre bandas atribuídas às transições $\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$ da funções azometínica e amida, que se encontram superpostas entre 35714 - 33557 cm⁻¹. Para o complexo essas bandas apresentam-se deslocadas e separadas na região de 38461 – 33898 e 34483 - 31746 cm⁻¹, respectivamente. Novas absorções associadas às transições de transferência de carga $\text{N}(\sigma, \pi) \rightarrow \text{Ni}(\text{II})$ e $\text{O}(\sigma, \pi) \rightarrow \text{Ni}(\text{II})$ aparecem superpostas no espectro do complexos, na região de 31250 – 23809 cm⁻¹. Bandas atribuídas às transições $d \rightarrow d$ foram observadas na região de 12195 – 12500 cm⁻¹ como mostra (Meier et al 1998).

Tabela III - Bandas nos espectros de absorção eletrônica (cm⁻¹) de HBES e e seu complexo [Ni(BES)₂] em solução de DMSO/ H₂O 1:3.

Composto	Transições intraligante $\pi-\pi^*$ e $n-\pi^*$ e de transferência de carga (cm ⁻¹)	transições $d \rightarrow d$ (cm ⁻¹)
HBES	35714 - 33557	
[Ni(BES) ₂]	38461 – 33898 e 34483 - 31746	12195 – 12500

A Tabela IV e a Figura 2 mostra os halos de inibição (HI) de crescimento de *C. albicans* para a benzoilsemicarbazona e seus complexos de Ni(II) (6mm = não inibição). Apesar de ainda preliminares, os

resultados indicam que todos os compostos testados são ativos contra o fungo, nas concentrações de 200, 400, 600, 800 e 1200 µg/mL. Observa-se que pela coordenação a atividade é aumentada em todos os compostos. O ligante HBES e o complexo $[\text{Ni}(\text{BES})_2]$ apresentaram atividade na faixa de (HI = 8,0 – 14,0 mm) e (12,0 – 16,5mm), respectivamente. Essa atividade é igual ou maior que o controle Nistatina (HI = 12,0-14,0 mm).

Tabela IV Atividade antifúngica *in vitro* de benzoilsemicarbazona e seu complexo de Ni(II) contra *Candida albicans* (halos de inibição, HI)

Composto	Concentração ppm (µg/mL) (nistatina 12,0)				
	200	400	600	800	1200
HBES	8,0	8,0	10,5	12,0	14,0
$[\text{Ni}(\text{BES})_2]$	11,0	12,0	12,5	14,0	16,5

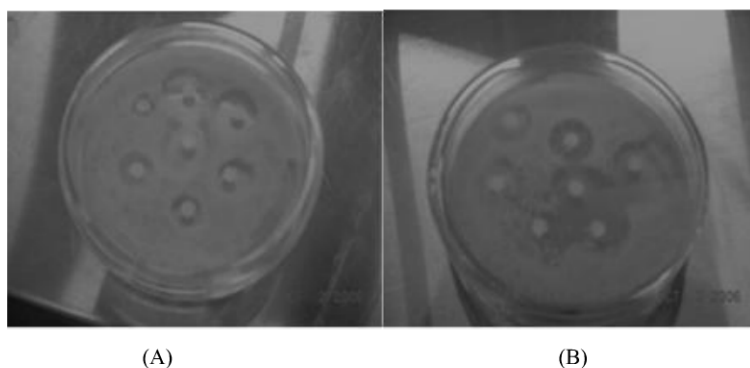


Figura 2 Placas de petri apresentando os halos de inibição do crescimento do fungo *Cândida Albicans* para diferentes doses de benzoilsemicarbazonas (A) e do seu complexo de níquel (II) (B) nas concentrações de 200 - 1200 µg/mL.

5. CONCLUSÕES

Concluindo, neste trabalho foram sintetizados benzoilsemicarbazona derivada de semicarbazida não substituída e seu complexo de Ni(II). A pureza do semicarbazona foi confirmada pela análise elementar. Todos os compostos foram caracterizados empregando-se técnicas espectroscópicas na região do infravermelho e ultravioleta.

O complexo de níquel(II), foi obtido por reações partindo-se do cloreto do metal. De acordo com os resultados, o complexo níquel (II) é do tipo $[\text{M}(\text{HL})_2]$ no qual o ligante é neutro e a geometria provavelmente quadrada planar.

Apesar de ainda preliminares, os resultados dos testes de atividade antifúngica para a benzoilsemicarbazona e seu complexo de níquel (II) mostram que são ativos contra *Candida albicans*. O complexo apresentou atividade superior à do controle (micostatin) e do ligante, confirmando os relatos da literatura de que a coordenação com um centro metálico aumenta a atividade antifúngica.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akinchan N. T., Akinchan R., West, D. X., Yang, Y., **Magnetic measurements and spectral studies on copper(II) complexes of semicarbazones derived from isatin, benzoin and 2-hydroxy-naphthaldehyde**. Transition metal Chemistry, v 19, p.135, 1994.

Bastos, A. M.B., **Structural studies and spectral characteristics of 4-benzoylpyridine thiosemicarbazone and n(4')-phenyl-4-benzoylpyridine thiosemicarbazone**. Journal of Molecular Structure, Journal of molecular structure, v.645, p. 213, 2003.

Beraldo, H., Kaisner, S. B., Turner D., Billeh, I. S., **Copper (II) and Nickel (II) complexes of the bis{N(3)-substituted thiosemicarbazone} of phenylglyoxal and 1-phenylpropane-1,2-dione.**, Transition Metal Chemistry, v 22, p.459, 1997.

Casas, J. S., Garcia- Tasende, M. S., Sordo J., **Main group metal complexes of semicarbazones and thiosemicarbazones. A structural review**. Coordination Chemistry Reviews, v 209, p.197, 2000.

Dimmock J. R., Pandeya S. N., **Recent evaluations of thiosemicarbazones and semicarbazones and related compounds for antineoplastic and anticonvulsant activities**. Journal of Pharmazie, v 48, p.9, 1993.

Hajipour, A., R., Mohammadpoor-Baltork, I., Bigdeli, M., **A Convenient and Mild Procedure for the Synthesis of Hydrazones and Semicarbazones from Aldehydes or Ketones under Solvent-free Conditions**, Journal Chemistry Research (S), v23, p.234,1999.

Kasuga N. C., Sekino, K., Koumo, C., Shimada, N., Ishikawa, M., Nomiya, K., **Synthesis, structural characterization and antimicrobial activities of 4- and 6-coordinate nickel(II) complexes with three thiosemicarbazones and semicarbazones ligands**. Journal of Inorganic Biochemistry, v 84, p.55, 2001

Meier, R., Boddin, M., Mitzenheim, S., Schmid, V., Schönherr, **Elucidation of V(III) coordination numbers by electronic spectra.**, Journal of Inorganic Biochemistry, v 69, 249 1998.

Pandeya, S. N., Ponnilarasan, I.; Pandey, A. Lakahan, R., **Evaluation of p-nitrophenyl substituted semicarbazones for anticonvulsant properties**, Journal of Pharmazie, v 4, 12, 1999.

West, D. X., Salberg M. M. Bain, G. A., Liberta, A. F., **Nickel (II) and Copper (II) complexes of 5-substituted-salicyl-aldehyde thiosemicarbazones**, Transition Met. Chemistry, v 22, p.180, 1997.