

SINTESE, CARACTERIZAÇÃO E INVESTIGAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA DIFENILCARBAZONA E SEUS COMPLEXOS DE Ni(II) e Zn(II).

Ana MENA BARRETO BASTOS(1); Juliana Larissa OLIVEIRA DA SILVA(2); Cristina Grace DE SOUSA GUERRA(3)

(1)Centro Federal de Educação Tecnológica do Amazonas / Gerência Educacional de Química e Meio Ambiente, Av.

Sete de Setembro, 1975- Centro- CEP 60 020-200, 09236216720,e-mail: anamenabarreto@cefetam.edu.br

(2)Centro Federal de Educação Tecnológica do Amazonas,e-mail:juli_lari@yahoo.com.br.

(3)Centro Federal de Educação Tecnológica do Amazonas, e-mail: graceguerra@oi.com.br

RESUMO

Esta pesquisa objetiva sintetizar, caracterizar e investigar atividade antifúngica da 1,5 difenilcarbazona e de seus complexos de Ni(II) e Zn(II). A difenilcarbazona é obtida oxidando a difenilcarbazida com o peróxido de hidrogênio em hidróxido de potássio. Os complexos são sintetizados com solução metanólica contendo 2,0 mmol da difenilcarbazona e 1,0 mmol de $MCl_2 \cdot 2H_2O$. A mistura é mantida sob refluxo e agitação magnética por 8 horas e o precipitado formado é filtrado, lavado com éter etílico e secado sob vácuo. O ligante e os complexos foram caracterizados pelo P.F, análise elementar, além de espectroscopia eletrônica e absorção no infravermelho. O ligante apresenta PF. 156 °C característico da difenilcarbazona pura e os complexos > 400 °C. Os complexos são do tipo $[(L)_2M]$, onde difenilcarbazona está coordenada ao centro metálico de forma bidentada através do nitrogênio azobenzeno e do oxigênio carbonílico. O ligante e os complexos foram testados quanto à atividade antifúngica em meio de ágar-Sabouraud semeado com o fungo *Cândida albicans*. Os resultados preliminares mostram maior inibição para a difenilcarbazona e seu complexo de Ni(II), enquanto o complexo de Zn(II) não apresenta atividade satisfatória, quando comparada com o padrão nistatina.

Palavras-chave:

difenilcarbazona, complexos de Ni(II) e Zn(II).

1 INTRODUÇÃO

Esta pesquisa objetiva sintetizar, caracterizar e investigar atividade antifúngica da difenilcarbazona (DFCZ) (ver Figura 1) e seus complexos de Ni(II) e Zn(II). A investigação a respeito do uso de complexos metálicos como fármacos teve início, de modo sistemático, apenas após a descoberta feita pelo físico Barnett Rosenberg, da atividade antitumoral do cis(diaminodiclouro)platina(II), o “cisplatina” ou cis-ddp, em 1965. Desde então, uma imensa variedade de complexos metálicos foi e tem sido investigada quanto às suas propriedades terapêuticas. É interessante observar que o primeiro número da revista Metal-Based Drugs apareceu em 1994. Pesquisas mostram uma grande versatilidade farmacológica de complexos metálicos com carbazonas, tais como: anticonvulsivantes, ativos contra *Trypanossoma cruzi* que é o agente etiológico da doença de Chagas, hipnóticos, pesticidas e herbicidas. Entre as razões estruturais que explicariam esse amplo perfil estão o fato de serem esses compostos bons agentes quelantes, por apresentarem na estrutura do ligante 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, através da escolha dos substituintes da cadeia, além de atuarem em reações redox, dentro do organismo. Em muitos casos a atividade aumenta pela coordenação aos cátions metálicos, provavelmente porque a lipofilia se altera pela complexação.

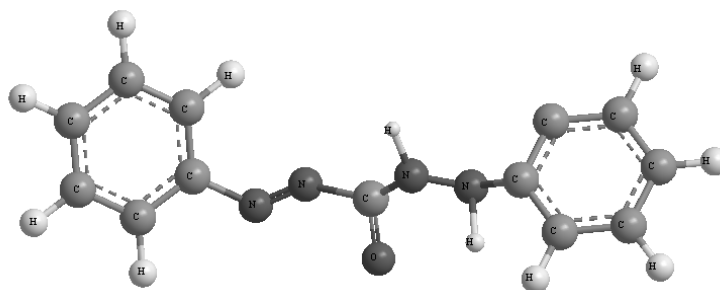


Figura 1- 1,5 difenilcarbazona

A 1,5 difenilcarbazona é obtida oxidando a 1,5 difenilcarbazida com o peróxido de hidrogênio em hidróxido de potássio. Os complexos são sintetizados por meio de uma solução metanólica contendo 2,0 mmol da difenilcarbazona e 1,0 mmol de $MCl_2 \cdot xH_2O$. A mistura é mantida sob refluxo e agitação magnética obtendo um precipitado que é filtrado, lavado com éter etílico e secado sob vácuo. Um pó laranja é obtido com P.F. = 156°C característico da difenilcarbazona pura e os complexos apresentaram P.F. > 400°C. Os sólidos obtidos foram caracterizados por análise elementar, espectroscopia na região do infravermelho e ultravioleta. O ligante e os complexos foram testados quanto à atividade antifúngica frente ao *C. albican*, nas concentrações de 200 a 1200 $\mu g \cdot mL^{-1}$. Observa-se que pela coordenação a atividade é mantida para o complexo $[(DFCZ)_2Ni]$. Para o complexo de Zn(II) a inibição não foi satisfatória.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A literatura recente traz inúmeros trabalhos sobre a crescente importância das semicarbazonas e seus complexos metálicos, principalmente como anticonvulsivantes e antineoplásico. Assim, as aril semicarbazonas derivadas da acetilhidrazona mostraram-se ativas em ratos, no modelo experimental de eletrochoque (DIMMOCK, 2000; PANDEYA, 1993).

Com base nos estudos sobre relação estrutura química e atividade biológica, uma nova tiosemicarbazona foi sintetizada, substituindo-se o agrupamento isatina da metizona pelo grupo fenoxiacetaldeído (Figura 1.4), a qual apresentou atividade quando testada em cepas virais da vaccínia, herpes humano, vírus de poliomielite, vírus da estomatite vesiculosa (AKINCHAN, 1994).

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 tiosemicarbazona 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).

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 tiossemicarbazona foi testada com bom resultado (WEST, 1998).

β -tiossemicarbazonas derivadas da isatina apresentam um amplo espectro de ação como agentes antivirais, bactericidas e antifúngicos. A atividade antiviral foi verificada para a β -tiossemicarbazona da N-metil isatina (Figura 1.3), quando testada em ratos com infecção intracerebral por vírus da vaccínia, por retrovírus e pelo HIV. Em 1962, iniciou-se a comercialização da β -tiossemicarbazona da N-metil isatina (metizona) sob o nome de Marboran (CASA, 2000)

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 (DIMOMOCK, 2000).

Existem relatos de atividade tripanozomicida de semicarbazonas derivadas de 5-nitro-2-furadeído e 5-nitrotiofeno-2-carboxaldeído (CERETTO, 2000).

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)

Complexo com óxido de vanádio derivados de semicarbazonas inibem a lipólise mimetizando a insulina, através da inibição de isoproterenol. Os resultados sugerem que os complexos com acetilacetato de vanádio (VOacac) são melhores inibidores do que os que contêm sulfato, e melhores do que o próprio [VO(acac)₂]. Comparando-se os complexos de formil semicarbazonas com seus análogos acetil, observa-se que a capacidade de inibição dos derivados acetil é maior. A comparação entre VOSO₄ e [VO(acac)₂] revela que o primeiro é mais ativo na inibição da lipólise. Entretanto, pela complexação com as semicarbazonas, [VO(acac)₂] torna-se melhor inibidor do que VOSO₄ (BASTOS 2008).

1. METODOLOGIA

1.1. Síntese da Difenilcarbazona (DFCZ)

A oxidação da difenilcarbazida com o peróxido de hidrogênio em presença de hidróxido de potássio alcoólico produz a difenilcarbazona. Adiciona-se 2mmol de difenilcarbazida e 100 mL de álcool etílico num balão de colo curto de 200 mL.

Aquece-se a solução, até que o sólido se dissolva, e adiciona-se 5 g de de hidróxido de potássio, à solução quente, seguidos por 20 mL de peróxido de hidrogênio “a 10 volumes”. A agitação é essencial para evitar a formação de espuma sobre o volume vermelho-sangue. O sal de potássio da cabarzona se separa lentamente.

Deixa-se a mistura em repouso durante 5 minutos e adiciona-se, então, com agitação, ácido sulfúrico 2N, até que a suspensão alaranjada resultante apresente reação ácida ao papel de tornassol (são necessários cerca de 250 mL).

Transfere-se a suspensão para um béquer de 1L a adiciona-se 500 mL de água para dissolver o sulfato de potássio. Resfria-se, filtra-se a difenilcarbazona alaranjada na trompa, lava-se bem com água e seca-se a cerca de 50 °C.

3.2 Síntese dos complexos de Ni(II) e Zn(II)

A obtenção dos complexos Ni(II) com difenilcarbazida foi realizado de acordo com (GRAÚDO, 1999), (BERALDO 1996). A uma solução metanólica contendo 2,0 mmol da difenilcarbazida adiciona-se 1,0 mmol de NiCl₂ .2 H₂O . A mistura de reagentes será mantida sob refluxo e agitação magnética por 8 horas. O precipitado formado será filtrado, lavado com etanol e éter etílico e secado sob vácuo.

3.3 Investigação de atividade antifúngica e bacteriana dos complexos.

Os testes de atividade antifúngica *in vitro* da difenilcarbazona e dos seus complexos de Ni(II) e Zn(II) contra *Candida albicans* foram realizados e a toxicidade dos compostos frente ao fungo 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 etanol:H₂O. Foram feitas diluições até obter-se a concentração desejada em 1 mL de solução etanólica. Assim, foram usadas concentrações entre 200 µg/mL a 1200 µg.mL⁻¹.

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 12 -14 mm.

4 ANÁLISE E INTERPRETAÇÃO DOS DADOS

O ponto de fusão, massa molar e dados de análise elementar (ver Tabela 1) de DFCZ, [(DFCZ)₂Ni] e [(DFCZ)₂Zn]. Para os complexos, os resultados de análise elementar indicam a formação de compostos do tipo [(L)₂M] (2:1).

Tabela 1 - Análise elementar e condutividade molar dos complexos de 1,5 difenilcarbazona com cloreto de níquel e de zinco.

Composto	Ponto de Fusão (°C)	Massa Molar g/mol	Experimental (teórico) %		
			C	H	N
DFCZ	150	240,0	64,82(65,00)	4,92(5,00)	22,98(23,33)
(DFCZ)Ni	>400	534,7	58,27(58,35)	3,74(3,70)	21,01(20,94)
(DFCZ)Zn	>400	591,40	57,58(57,58)	3,71(3,69)	20,58(20,69)

Os espectros na região do infravermelho (ver Tabela 2) apresentam bandas entre 3313 – 3454 cm⁻¹ para o ligante, que se deslocam nos espectros dos complexos para região de 3263 - 3292 cm⁻¹, características das vibrações de estiramento ν(NH) simétrico e assimétrico. Bandas fortes entre 1660 – 1669 cm⁻¹ são atribuídas ao estiramento ν(C=O) no espectro do ligante, que se deslocam nos espectros dos complexos para 1650 – 1657 cm⁻¹. Observam-se ainda, as bandas na região entre 1438 – 1499 cm⁻¹ no espectro do ligante, mudando no espectro dos complexos para 1431 – 1452 cm⁻¹, que se devem ao modo de estiramento ν(N=N)(ver Figura 2). As bandas correspondentes à vibração ν(M-N) encontram-se em 512 – 480 cm⁻¹ e a absorção atribuída a ν(M-O) em 456 - 429 cm⁻¹. Nos espectros dos complexos, não foram observadas absorções atribuídas à vibração ν(H₂O) (BASTOS, 2005; BERALDO, 1997).

Tabela 2 - Atribuições das bandas (cm^{-1}) dos espectros de infravermelho para a DFCZ e dos complexos Ni(II) e Zn(II) em KBr

Composto	$\nu(\text{HN})$	$\nu(\text{C=O})$	$\nu(\text{N=N})$	$\nu(\text{M-N})$	$\nu(\text{M-O})$
DFCZ	3313 - 3454	1660 - 1669	1438-1499	-	-
(DFCZ)₂Ni	3263	1650	1431	512	456
(DFCZ)₂Zn	3292	1657	1452	480	429

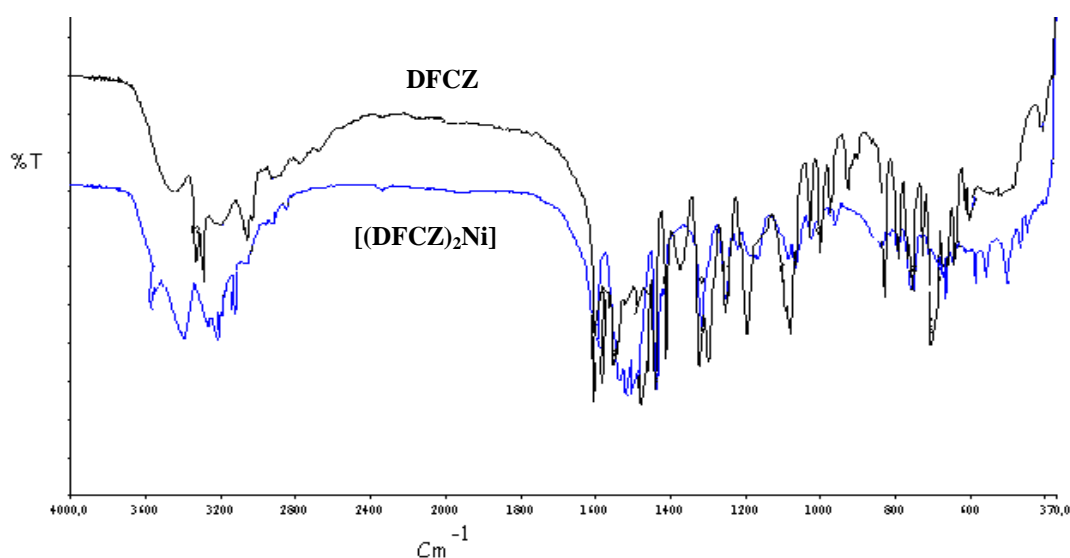


Figura 2. Espectro na região do Infravermelho para a 1,5 difenilcarbazona (DFCZ) e do complexo Ni(II)

Espectros eletrônicos em etanol (ver Tabela 3) observamos que, nos espectros da difenilcarbazona livres, bandas atribuídas às transições $\pi \rightarrow \pi^*$ do anel benzeno e $n \rightarrow \pi^*$ das funções azo e amina em $38145 - 38461 \text{ cm}^{-1}$, deslocam-se, nos complexos, para a região de $33557 - 37316 \text{ cm}^{-1}$ e 34483 cm^{-1} , respectivamente. As bandas atribuídas às transições de transferência de carga aparecem em 26042 cm^{-1} e às transições $d \rightarrow d$ na faixa de $12400 - 12500 \text{ cm}^{-1}$ (PANDEYA, 2000; BASTOS, 2004).

Tabela 3 - Bandas dos espectros eletrônicos (cm^{-1}) de DFCZ e dos complexos de Ni(II) e Zn(II) em etanol.

Composto	Transições intraligante $\pi-\pi^*$ e $n-\pi^*$ e	transições $d \rightarrow d$ (cm^{-1})
DFNL	38145 38461	
[(DFNL)₂Ni]	37736 33557 26042	12500
[(DFNL)₂ Zn]	34483	12400

O ligante e os complexos foram testados quanto à atividade antifúngica (ver Figura 3) e os halos de inibição (HI) de crescimento de *C. albicans* para a difenilcarbazona e seus complexos. Os resultados indicam que o ligante e o complexo de Ni(II) são ativos contra o fungo nas concentrações de 200, 400, 600, 800, 1000 e 1200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (aplicação dos discos na placa de petri obedece o sentido horário, da menor para maior concentração). Observa-se que pela coordenação a atividade é mantida para o complexo $[(\text{DFCZ})_2\text{Ni}]$. Para o complexo de Zn(II), observa-se a formação de halo, mas com algumas colônias do fungo, o que podemos considerar uma inibição não satisfatória. Na concentração de 1200 $\mu\text{g.L}^{-1}$ a uma pequena inibição de halo com 8 mm, menor que a do controle (halo central na placa de petri). O ligante DFCZ e o complexo de Ni(II) apresentaram atividade na faixa de (HI = 10 – 16,0 mm). Essa atividade é igual ou maior que o controle Nistatina (HI = 12,0-14,0 mm) (BASTOS, 2004; WEST, 1995).

Tabela 4- Atividade antifúngica *in vitro* de difenilcarbazona e dos complexos de Ni(II) e Zn(II) contra *Candida albicans* (halos de inibição (mm)(HI).

Composto	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)					
	200	400	600	800	1000	1200
DFCZ	10	8,0	10	11	14	16
$[(\text{DFCZ})_2\text{Ni}]$	8,0	10	10	11	13	16
$[(\text{DFCZ})_2\text{Zn}]$	-	-	-	-	-	8

Álcool (6,0) , (6mm = não inibição)

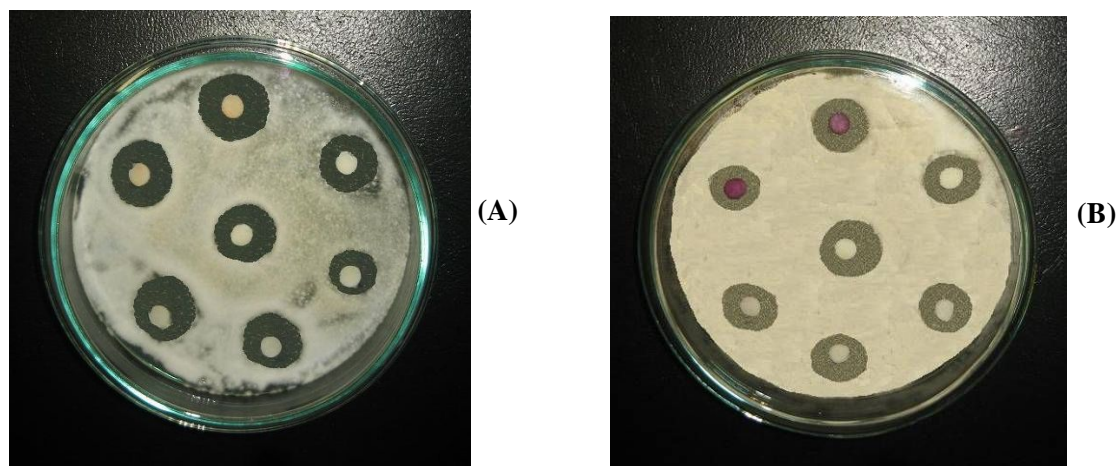


Figura 3- Placas de petri mostrando os H.I. de DFCZ (A) e $[(\text{DFCZ})_2\text{Ni}]$ (B) nas concentrações de 200 a 1200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho a atividade antifúngica da 1,5 difenilcarbazona e de seus complexos metálicos foram investigados frente ao fungo *Candida albicans*.

Na literatura não existem muitos trabalhos a respeito de complexos de níquel(II) e zinco(II) com difenilcarbazonas. Contudo, devido à ocorrência muito comum de tiolatos e carbonilas em metaloproteínas e

em razão da evidência de coordenação M-S e M-O em M-nitrogenases, o estudo desses complexos é de considerável interesse.

A literatura relata que alguns complexos de níquel(II) e zinco(II) com ligantes que se coordenam através de um nitrogênio e de um oxigênio mostraram-se ativos como antifúngicos. No entanto há pouquíssimos trabalhos a respeito de complexos de 1,5 difenilcarbazona com níquel(II) e zinco(II) e, tanto quanto sabemos, não foram feitos testes de atividade antifúngica para complexos desse ligante.

Complexos de níquel(II) e zinco(II) com 1,5 difenilcarbazona foram obtidos e caracterizados. Os complexos são do tipo $[M(L)_2]$ nos quais o ligante é neutro e a geometria provavelmente quadrática distorcida ou tetraédrica.

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 a ocorre a formação de halo, mas com algumas colônias do fungo, o que podemos considerar uma inibição não satisfatória. Na concentração de $1200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a inibição foi 8 mm menor que a do controle.

Com os resultados obtidos no presente trabalho novos aspectos até hoje inexplorados da química e da atividade farmacológica de 1,5 difenilcarbazona e seus complexos foram investigados, tais como a capacidade de complexos de níquel (II) agir inibindo o crescimento do fungo *Candida albicans* cujo perfil farmacológico ainda não havia sido estudado.

REFERÊNCIA

BASTOS, A. M. B.; ALCANTARA, A. F. C.; BERALDO, H.; BASTOS, A. M. B. ; ALCÂNTARA, A. F. C. ; BERALDO, H. **Structural analyses of 4benzoylpyridine thiosemicarbazone using NMR techniques and theoretical calculations**. Tetrahedron (Oxford), v. 61, p. 7045-7053, 2005.

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

BASTOS, A. M. B. **Investigação de algumas semicarbazonas e tiosemicarbazonas: 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.

CERETTO, H. DI MAIO, R.; GONZÁLEZ M.; RISSO, M.; SAGRERA, G.; SEOANE, G; DENICOLA, A.; PELUFFO, G.; QUIJANO, C.; STOPPANI, A. O.M.; PAULINO, M; OLEA-AZAR, C.; BASOMBRÍO, M. A. **Synthesis antitrypanosomal evaluation of E-isomers of 5-nitro-2-furaldehyde and 5-nitrothiophene-2-carboxaldehyde semicarbazone derivatives. Structure-activity relationships**. Eur. J. Med. Chem., 35, 343, 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.

PANDEYA, S. N., DIMMOCK J. R., **Recent evaluations of thiosemicarbazones and semicarbazones and related compounds for antineoplastic and anticonvulsant activities**. Pharmazie, 48, 659, 1993.

PANDEYA, S. N., PONNILAVARASAN I., PANDEY A. LAKHAN R., STABLES J. P., **Evaluation of p-nitrophenyl substituted semicarbazones for anticonvulsant properties**. Pharmazie, 54, 12, 1999.

PANDEYA, S.N; YOGESHWARI P.; STABLES J. P., **Synthesis and anticonvulsant activity of 4-bromophenyl substituted aryl semicarbazones**. Eur. J. Med. Chem., 35, 979, 2000.

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, 2189, 1995.

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.** *Coordenation Chemistry Reviews*, v 209, p.197, 2000.

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.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Fundação ao Apoio a Pesquisa no Estado do Amazonas pelo apoio financeiro, Centro Federal de Educação Tecnológica e as bolsistas Juliana Larissa Oliveira da Silva e Cristina Grace de Sousa Guerra, pela dedicação e apoio a essa pesquisa.