



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS ALCIDES CARNEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E SOCIAIS APLICADAS
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**SÍNTESE, ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL E
AVALIAÇÃO BIOLÓGICA PRELIMINAR DE
DERIVADOS N-ACILIDRAZÔNICOS**

JANDER CAINÃ DA SILVA SANTOS

**JOÃO PESSOA – PB
2012**

JANDER CAINÃ DA SILVA SANTOS

**SÍNTESE, ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL E
AVALIAÇÃO BIOLÓGICA PRELIMINAR DE
DERIVADOS N-ACILIDRAZÔNICOS**

Monografia apresentada ao Curso de Ciências
Biológicas da Universidade Estadual da
Paraíba, em cumprimento à exigência para
obtenção do grau de bacharel.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Olimpio de Moura

JOÃO PESSOA – PB
2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA SETORIAL CAMPUS V – UEPB

S237s Santos, Jander Cainã da Silva.
Síntese, elucidação estrutural e avaliação biológica preliminar de derivados n-acilidrazônicos / Jander Cainã da Silva Santos. – 2012.
59f. : il.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biologia) – Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e Sociais Aplicadas, Curso de Biologia, 2012.

“Orientação: Prof. Dr. Ricardo Olimpio de Moura, Curso de Biologia”.

1. Bioquímica. 2. Microorganismos. 3. Medicamentos farmacêuticos. 4. Citotoxicidade. I. Título.

21. ed. CDD 572.3

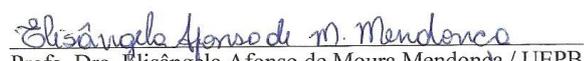
JANDER CAINÃ DA SILVA SANTOS

**SÍNTESE, ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO
BIOLÓGICA PRELIMINAR DE DERIVADOS N-
ACILIDRAZÔNICOS**

Monografia apresentada ao Curso de
Bacharelado em Ciências Biológicas da
Universidade Estadual da Paraíba, em
cumprimento à exigência para obtenção
do grau de bacharel.

Aprovada em 26/11/12.


Prof. Dr. Ricardo Olimpio de Moura / UEPB
Orientador


Profa. Dra. Elisângela Afonso de Moura Mendonça / UEPB
Examinadora


M.e. Rodrigo Santos Aquino de Araújo / UFPB
Examinador

DEDICATÓRIA

A minha vó Maria, por todo o amor, graça e inspiração.

AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte de toda a sabedoria e entendimento;

À minha mãe, por todo o amor dedicado, por não ter medido esforços pra que eu completasse essa jornada, por cada sacrifício, por cada noite em claro junto a mim;

Ao meu pai, por cada palavra de incentivo;

À minha família, por todo o apoio moral e financeiro;

Ao meu orientador e amigo, o prof. Dr. Ricardo Olimpio de Moura, por todo o conhecimento que me foi passado, pela sua infinita e mais que infinita bondade (risos), paciência e compreensão nos momentos mais difíceis;

Ao prof. Dr. Francisco Jaime Bezerra Mendonça Junior, por todo o conhecimento, auxílio nas atividades, esclarecimento de dúvidas e grande prestatividade;

Ao meu amigo pessoal, o Doutorando Allan Albuquerque, pela disponibilidade e ajuda com os testes microbiológicos;

À professora Giselle Medeiros, pelo incentivo a participações nos meus primeiros congressos científicos;

Aos meus colegas de laboratório, em especial, Alisson Felipe, Isley Diniz, Mayara Barbalho, Natalina Dantas, Vanessa Lima, por toda a prestatividade e contribuição direta para a consolidação deste trabalho;

Aos meus amigos, por cada abraço de conforto, cada risada, cada momento de alegria que passamos juntos;

Aos meus colegas de turma, que são também amigos pessoais, e que contribuíram de forma direta durante todo esse processo de verdadeira evolução acadêmica e pessoal.

Quando vos invoco, respondei-me, ó Deus de minha justiça
Vós, que na hora da minha angústia me reconfortastes.
Tende piedade de mim e ouvi minha oração
Salmo 4,2

RESUMO

A busca por novos fármacos que possam ser utilizados como alternativos aos já existentes no mercado tem sido motivada muitas vezes pela resistência dos microrganismos e células tumorais às drogas existentes e também pelo barateamento dos medicamentos, principalmente em países em desenvolvimento. Neste contexto, e levando em consideração as diversas atividades biológicas descritas para derivados acilidrazônicos, estes se mostram como uma importante classe de compostos químicos sintéticos. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi realizar a síntese, elucidação estrutural e avaliação citotóxica frente a *Artemia salina*, avaliação da atividade antibacteriana e antimalárica frente a cepas de *Streptococcus mutans* e *Plasmodium falciparum*, respectivamente. A síntese dos compostos foi realizada por meio de duas etapas. Na primeira etapa, foram obtidos os compostos intermediários, através da reação da 2-ciano-aceto-hidrazida com diferentes aldeídos e com uma cetona cíclica, e na segunda, os intermediários foram condensados com diferentes aldeídos aromáticos. Foram obtidos 16 compostos, sendo destes 5 intermediários e 11 compostos finais. Todos os compostos sintetizados tiveram suas características físico-químicas avaliadas através de ponto de fusão, cálculo do Fator de Retenção, aparência. Três dos compostos sintetizados tiveram suas estruturas confirmadas por RMN ^1H e ^{13}C . Para os testes de citotoxicidade foram calculadas as médias de náuplios mortos em diferentes concentrações, entretanto, não foi possível calcular a CL_{50} dos compostos devido a ausência de um programa estatístico eficiente para os dados obtidos. No que diz respeito aos testes de atividade antibacteriana, apenas o composto AMTAC01 apresentou atividade frente a *S. mutans*, com uma Concentração Inibitória Mínima de 400 $\mu\text{g/mL}$ e, esse mesmo composto apresentou a melhor atividade antimalárica frente *P. falciparum*, inibindo 81,37% do crescimento em uma concentração de 10 μM .

PALAVRAS-CHAVE: Acilidrazona acridina, Citotoxicidade, *Artemia salina*, *Streptococcus mutans*, *Plasmodium falciparum*.

ABSTRACT

The search for new drugs which can be used as alternative to those already existing on the market has often been motivated by the resistance of tumor cells and microorganisms to existing drugs and also by the cheapness of the drug, mainly in developing countries. In this context, and taking into account the diversity of biological activities described for derivatives of the acylhydrazone, these show up as an important class of synthetic chemical compounds. Thus, the objective of this study was the synthesis, structural elucidation and cytotoxicity evaluation against the *Artemia salina*, in addition to the evaluation of antibacterial and antimalarial activity against the *Streptococcus mutans* and *Plasmodium falciparum*, respectively. The synthesis of compounds was performed into two steps. In the first step, the intermediates were obtained by a reaction of 2-cyano-aceto-hydrazide with different aldehydes and with a cyclic ketone, and in the second one, different intermediates were condensed with aromatic aldehydes. 16 compounds were obtained. 5 of them were intermediate ones and 11 of them were final ones. All the synthesized compounds had their physicochemical characteristics evaluated by melting point, calculation of the retention factor and appearance. Three of the synthesized compounds had their structures confirmed by ^1H and ^{13}C NMR. For cytotoxicity assays, dead nauplii averages were calculated at different concentrations. However, it was not possible to calculate LC50 compounds due to the absence of an efficient statistical program for data obtained. With regard to the tests of antibacterial activity, only the AMTAC01 compound showed activity against *S. mutans*, with a minimum inhibitory concentration of 400 $\mu\text{g/mL}$. Besides, the same compound showed better antimalarial activity against *P. falciparum*, by inhibiting 81.37% of the growth at a 10 μM concentration.

KEYWORDS: Acylhydrazone Acrydine, Cytotoxicity, *Artemia salina*, *Streptococcus mutans*, *Plasmodium falciparum*.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|------------------|---|----------|
| FIGURA 1 | Esqueleto hidrazônico..... | 14 |
| FIGURA 2 | Derivado acilidrazônico com propriedade antimicrobiana | 21 |
| FIGURA 3 | Derivados acilidrazônicos com atividade antifúngica..... | 21 |
| FIGURA 4 | Derivado acilidrazônico com atividade antiinflamatória..... | 21 |
| FIGURA 5 | Derivados acilidrazônicos com atividade antitumoral..... | 22 |
| FIGURA 6 | Derivados acilidrazônicos com atividade anti-HIV..... | 22 |
| FIGURA 7 | Derivado acilidrazônico e acilidrazônico-acridínico com atividade antimalária..... | 23 |
| FIGURA 8 | Estruturas químicas dos compostos AMZ-N1 e AMZ-N2..... | 38 |
| FIGURA 9 | Estruturas químicas dos compostos AMZ-C11 e AMZ-DC1..... | 39 |
| FIGURA 10 | Composto com atividade antibacteriana frente a cepas de <i>S. aureus</i> multirresistentes..... | 42 39 |
| FIGURA 11 | Diferenças estruturais entre os compostos AMTAC01, AMTAC02 e AMTAC02..... | 43 |
| FIGURA 12 | Derivado acridinilidrazônico com atividade antimalária constatada.. | 44 |

LISTA DE ESQUEMAS

| | | |
|-------------------|---|----|
| ESQUEMA 1 | Mecanismo geral de obtenção de derivados hidrazônicos..... | 17 |
| ESQUEMA 2 | Obtenção de acilidrazônicos derivados de aminoácidos..... | 18 |
| ESQUEMA 3 | Síntese das hidrazonas..... | 18 |
| ESQUEMA 4 | Síntese de hidrazonas derivadas de aldeídos..... | 19 |
| ESQUEMA 5 | Obtenção de derivados piperidino-hidrazônicos..... | 19 |
| ESQUEMA 6 | Reação de condensação de uma hidrazida com diferentes aldeídos..... | 20 |
| ESQUEMA 7 | Rota para a obtenção dos intermediários acilidrazônicos..... | 29 |
| ESQUEMA 8 | Obtenção dos compostos finais da série AMZ..... | 29 |
| ESQUEMA 9 | Obtenção do Ciano-aceto-ciclohexilideno-hidrazida (CCH)..... | 30 |
| ESQUEMA 10 | Obtenção dos compostos finais da série CCH..... | 30 |
| ESQUEMA 11 | Obtenção dos compostos finais da série AMH..... | 31 |
| ESQUEMA 12 | Obtenção dos compostos finais da série AMT..... | 31 |
| ESQUEMA 13 | Obtenção dos derivados acilidrazônicos-acridínicos | 32 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-----------------|--|----|
| TABELA 1 | – Características físico-químicas dos intermediários acilidrazônicos..... | 36 |
| TABELA 2 | – Características dos intermediários avaliadas nas regras de Lipinski..... | 37 |
| TABELA 3 | – Características físico-químicas dos compostos finais acilidrazônicos..... | 38 |
| TABELA 4 | – Características dos compostos finais avaliadas nas regras de Lipinski..... | 39 |
| TABELA 5 | – Compostos sintetizados e seus respectivos deslocamentos..... | 40 |
| TABELA 6 | – Média de náuplios mortos em diferentes concentrações de derivados da série AMZ..... | 41 |
| TABELA 7 | – Concentração Mínima Inibitória de derivados da série AMZ frente a <i>S. mutans</i> | 42 |
| TABELA 8 | – Atividade antimalárica frente a <i>P. falciparum</i> | 43 |

LISTA DE SIGLAS

| | |
|---------------------|---|
| ATCC | American Type Culture Collection |
| BHI | Brain Heart Infusion |
| CIM | Concentração Inibitória Mínima |
| CL ₅₀ | Concentração Letal Média |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| R _f | Fator de Retenção |
| RMN | Ressonância Magnética Nuclear |
| RMN ¹³ C | Ressonância Magnética Nuclear de Carbono |
| RMN ¹ H | Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio |
| UEPB | Universidade Estadual da Paraíba |
| UFPB | Universidade Federal da Paraíba |
| UFPE | Universidade Federal de Pernambuco |
| UFRN | Universidade Federal do Rio Grande do Norte |

SUMÁRIO

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | Introdução | 13 |
| 2 | Objetivos | 16 |
| 2.1 | Objetivos Gerais..... | 16 |
| 2.2 | Objetivos Específicos..... | 16 |
| 3 | Fundamentação Teórica | 17 |
| 3.1 | Derivados acilidrazônicos | 17 |
| 3.1.1 | Estratégias de síntese dos derivados acilidrazônicos | 17 |
| 3.1.2 | Atividade Biológica dos derivados acilidrazônicos | 20 |
| 3.2 | Testes Biológicos | 23 |
| 3.2.1 | Bioensaios de citotoxicidade frente à <i>Artemia salina</i> | 23 |
| 3.2.2 | Concentração Mínima Inibitória | 24 |
| 3.3 | Resistência bacteriana e <i>Streptococcus mutans</i> | 25 |
| 3.4 | Doenças negligenciadas e Malária | 26 |
| 4 | Metodologia | 28 |
| 4.1 | Síntese dos compostos | 28 |
| 4.2 | Avaliação da citotoxicidade | 33 |
| 4.3 | Teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM)..... | 34 |
| 4.4 | Avaliação da atividade antimalárica | 35 |
| 5 | Resultados e Discussão | 36 |
| 6 | Considerações Finais..... | 45 |
| 7 | Referências Bibliográficas | 46 |
| 8 | Apêndices..... | 54 |
| | Apêndice A..... | 54 |
| | Apêndice B..... | 55 |
| | Apêndice C..... | 56 |
| | Apêndice D..... | 57 |
| | Apêndice E..... | 58 |
| | Apêndice F..... | 59 |

1. Introdução

A química medicinal é uma disciplina que se comunica, fornece e recebe contribuições de diversas áreas do conhecimento, dentre elas, as ciências biológicas. É considerada uma disciplina híbrida e ocupa um espaço inter e multidisciplinar no qual se comunica com a biofísica, a biologia molecular, a clínica médica, a fisiologia dentre outras. A mesma se dedica ao estudo das razões moleculares da ação dos fármacos relacionando estrutura química e atividade farmacológica e tem como objetivo o planejamento, descoberta, invenção, identificação e preparação de compostos biologicamente ativos (MONATANARI, 2000; BARREIRO et al., 2002; LIMA, 2007).

A busca por novos fármacos que possam ser utilizados como alternativos aos medicamentos já existentes no mercado tem sido motivada muitas vezes pela resistência dos microrganismos e células tumorais às drogas existentes e também pelo barateamento dos medicamentos, principalmente em países em desenvolvimento. Segundo Cachiba *et al.* (2012), a pesquisa por novos antimicrobianos constitui uma das estratégias para evitar o insucesso nos tratamentos anti-infecciosos, causado pela emergência de microrganismos resistentes.

Dentre as inúmeras bactérias patogênicas, podemos ressaltar a importância da *Streptococcus mutans*, que juntamente com outras bactérias, atuam na formação do biofilme dental, que podem acarretar em diversas doenças bucais, sendo a cárie a mais comum. Os estreptococos da espécie *mutans* são microrganismos considerados como os agentes etiológicos primários da cárie dental (SILVA *et al.*, 2009). Frente às limitações dos métodos mecânicos de higiene no combate à cárie e na remoção do biofilme dental, diversos agentes antimicrobianos vêm sendo estudados no controle do biofilme (SILVA *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2011).

Outro aspecto relevante a se considerar no desenvolvimento de novos fármacos são as doenças negligenciadas ou doenças tropicais. As doenças negligenciadas matam e mutilam milhares de pessoas em todo o mundo, mas não dispõem de tratamentos eficazes, uma vez que os conhecimentos produzidos não são revertidos em novas ferramentas terapêuticas para as pessoas afetadas. Dentre as doenças consideradas negligenciadas podemos citar a doença de chagas, as leishmanioses, a malária e várias outras (SILVA, 2007; SOUZA, 2010).

A malária ainda é considerada uma doença que ainda põe em risco milhares de pessoas no mundo. Segundo Maciel & Missawa (2012), três bilhões de pessoas estão sob risco de

infecção em 109 países. Casos dessas doenças são relatados há muito tempo. De acordo com Parise *et al.* (2012), a malária é uma doença antiga, cujos relatos de febres intermitentes antecedem a era cristã. Ela é causada pela infecção de protozoários do gênero *Plasmodium* que é transmitido às pessoas através de mosquitos do gênero *Anopheles*.

Neste contexto, os derivados acilidrazônicos se mostram como uma importante classe de compostos químicos sintéticos, uma vez que suas diversas atividades biológicas já foram descritas na literatura, dentre as quais podemos citar atividade leishmanicida (CARDONA *et al.*, 2005), analgésica e antiagregação plaquetária (BARREIRO *et al.*, 2002) e destacamos as atividades atividade antimitótica (SALUM, 2011), antiviral (TIAN *et al.*, 2011), antibacteriana (OLIVEIRA *et al.*, 2012), antifúngica (CACHIBA *et al.*, 2012), antimalárica (MELNYK *et al.*, 2006).

A figura 1 mostra a estrutura da hidrazona, precursora de diversos compostos amplamente sintetizados e de interesse farmacêutico, devido às suas atividades biológicas.

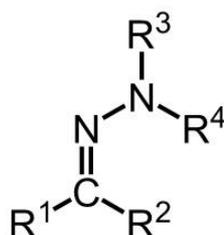


Figura 1. Esqueleto hidrazônico

Para a avaliação da atividade biológica dos compostos, há uma série de testes que podem ser realizados de forma gradativa com o aumento das especificidades dos testes que podem ser realizados *in vitro* ou *in vivo*. Para os testes *in vitro*, temos os de Concentração Inibitória Mínima (CIM), que permitem investigar o crescimento microbiano em resposta à submissão dos microrganismos a essas drogas. De acordo com Alves *et al.* (2008), métodos de diluição são comumente utilizados para determinar a concentração mínima de um agente necessário para inibir ou matar um microrganismo. Ainda para testes *in vitro*, utilizam-se, frequentemente, bioensaios para inferir sobre os níveis de citotoxicidade dos compostos, sejam de origem sintética ou natural. Segundo Maciel *et al.* (2002), os bioensaios podem envolver organismos, como microrganismos e microcrustáceos, através ensaios de bioquímicos visando alvos moleculares e cultura de células animais ou humanas, sendo a escolha dependente da doença-alvo.

No caso dos testes com microcrustáceos, um dos mais amplamente utilizados é o que utiliza larvas de *Artemia salina*, que é uma espécie de microcrustáceo da ordem Anostraca,

utilizada em diversos trabalhos como bioindicador para testes de citotoxicidade (LIMA, *et al.*, 2009; FERREIRA *et al.*, 2006; BEDNARCZUK *et al.*, 2010; STEFANELLO *et al.*, 2006). A utilização da *A. Salina* em estudos citotoxicológicos preliminares deve-se a simplicidade com que pode ser manuseado, além da rapidez e o baixo custo que favorecem a utilização em diversos estudos (BEDNARCZUK *et al.*, 2010). O teste de letalidade é amplamente aplicado através da análise citotóxica, onde é analisado um parâmetro simples: indivíduos **vivos** ou **mortos**.

2. Objetivos

2.1 Objetivos Gerais

Sintetizar, elucidar estruturalmente e avaliar a atividade citotóxica, antibacteriana e antimalárica de derivados acilidrazônicos.

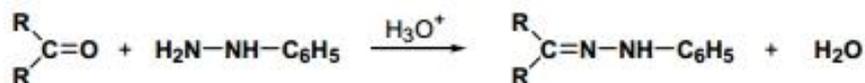
2.2 Objetivos Específicos

- Sintetizar e purificar derivados acilidrazônicos;
- Caracterizar e comprovar a estrutura das moléculas a partir de diferentes técnicas espectroscópicas;
- Realizar testes preliminares de citotoxicidade frente à *Artemia salina*;
- Avaliar o potencial antibacteriano dos compostos através da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) frente a *Streptococcus mutans*;
- Avaliar a atividade antimalárica dos compostos frente a *Plasmodium falciparum*.

3. Fundamentação teórica

3.1 Derivados acilidrazônicos

Não é de hoje que compostos derivados da hidrazona são utilizados para diversos fins, que vão desde a agricultura, passando pelo ramo industrial e, principalmente, no setor farmacêutico. De acordo com Caixeiro (2007), as hidrazonas foram descobertas por Emil Fischer em 1883, quando o mesmo estava sintetizando um derivado indólico a partir da reação fenil hidrazina com propanona. A reação geral de obtenção das hidrazonas está disposta de acordo com o esquema 1.



Esquema 1. Mecanismo geral de obtenção de derivados hidrazônicos

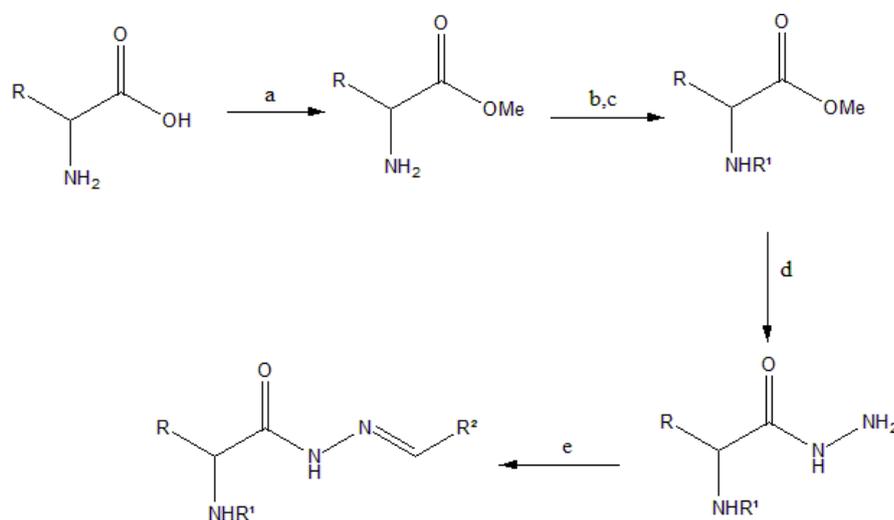
Desde então, esses compostos passaram a ser sintetizados em larga escala. Segundo Zampirolli (2009), compostos hidrazônicos têm tido destaque nas últimas décadas por apresentarem ação contra diferentes tipos de patologias. No Brasil, alguns núcleos de pesquisadores vêm trabalhando na busca por novos fármacos derivados da *N*-acilidrazona, dentre eles, o grupo do Instituto de Tecnologia em Fármacos, da Fiocruz – RJ, e o do Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas, da UFRJ.

3.1.1 Estratégias de síntese dos derivados acilidrazônicos

De acordo com Raitz (2012), os compostos hidrazônicos são comumente sintetizados por catálise ácida, mas também podem ser sintetizados através da catálise básica. Raitz (2012) afirma ainda que em alguns casos de catálise ácida, a depender do solvente, não é necessária sequer a adição de um ácido, pois as quantidades traço do íon hidrônio são suficientes.

Compostos hidrazônicos podem ser obtidos através de diversas séries de reações já descritas na literatura. Pode-se, por exemplo, obter hidrazonas reagindo hidrazidas com aminoácidos (BENDER, 2010).

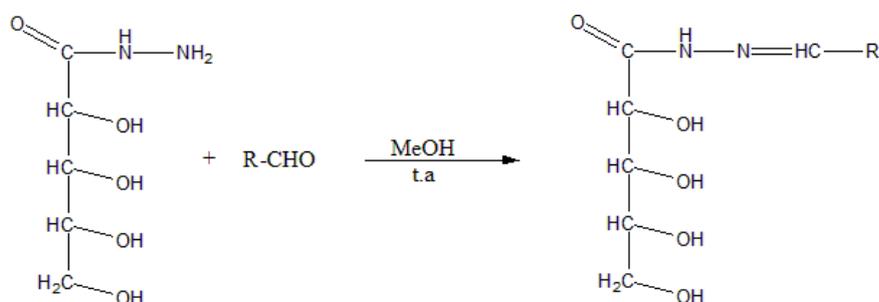
A síntese de derivados acilidrazônicos a partir de aminoácidos também foi descrita por Costa *et al.* (2011). A rota apresentada por esses autores contém 4 etapas reacionais, que pode ser observada no esquema 2.



Esquema 2. Obtenção de acilidrazônicos derivados de aminoácidos – reagentes e condições: a: $SOCl_2$, $MeOH$, $0^\circ C \rightarrow 60^\circ C$, 4h; b: $(BocO)_2O$, Et_3N , THF , t.a; c: cloroformato de benzila, THF , H_2O , K_2CO_3 , $0^\circ C$, 3h; d: NH_2-NH_2 , $EtOH$, t.a, 24h; e: R^2-CHO , $EtOH$, t.a, 24h.

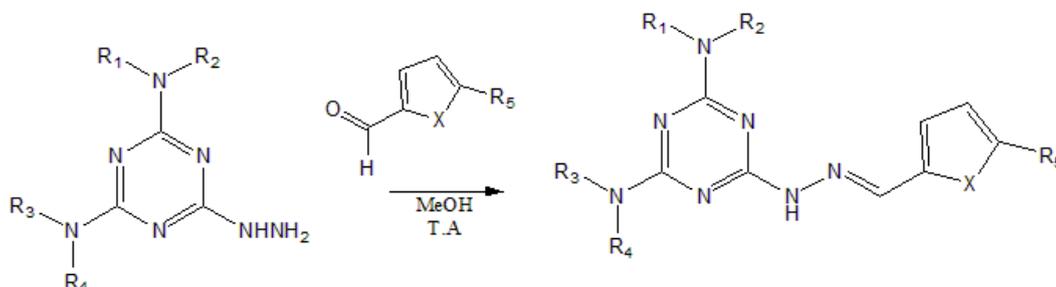
Silva *et al* (2010) descrevem a obtenção de hidrazonas a partir da reação de aldeídos aromáticos ou heteroaromáticos com pirazina-2-carbohidrazida em uma solução contendo etanol absoluto e ácido clorídrico, deixando-se agitar à temperatura ambiente por duas horas e observando-se uma extensiva precipitação do produto reacional.

A síntese da acilidrazona pode ser feita através da reação da hidrazida com aldeídos, em metanol, à temperatura ambiente por 24 horas, de acordo com a metodologia descrita por Reis (2007), mostrada no esquema 3.



Esquema 3. Síntese das hidrazonas

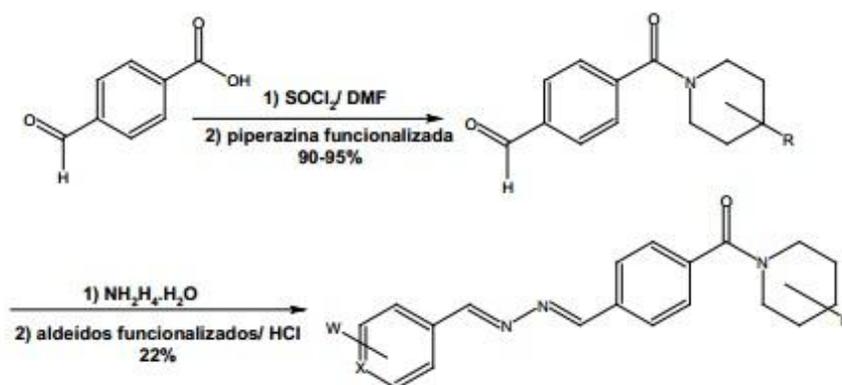
Uma rota sintética similar para a obtenção das hidrazonas foi descrita por Dias *et al.* (2009), partindo de hidrazidas e condensando com uma série de diferentes aldeídos, em metanol, à temperatura ambiente (esquema 4).



Esquema 4. Síntese de hidrazonas derivadas de aldeídos

Para obtenção de hidrazonas, Parrilha (2012) descreveu uma reação de condensação de 2-acetilpiridina e benzoilpiridina com quantidade equimolar de benzoidrazida, 4-clorobenzoidrazida e 4-nitrobenzoidrazida em etanol, com adição de algumas gotas de ácido acético, com a reação mantida sob refluxo e agitação constante por 7h.

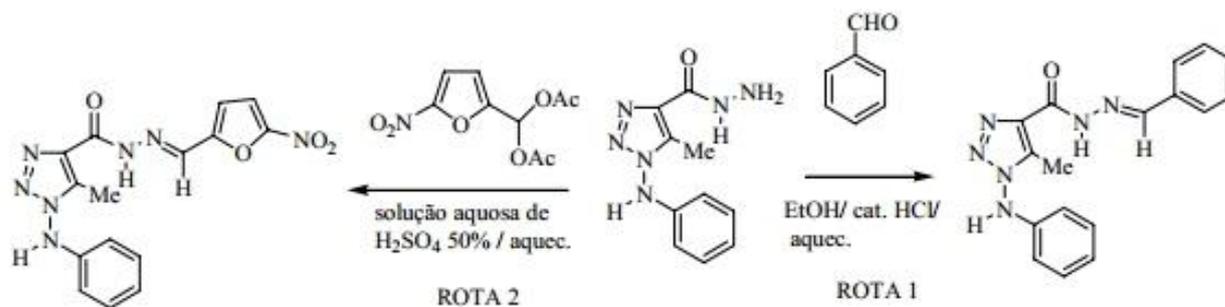
Ávila *et al.* (2009) obtiveram derivados hidrazônicos a partir do 4-carboxialdeído em uma reação *one pot*, promovendo a acilação do anel piperídico, obtendo a subunidade piperidino-fenona, esta, por sua vez, tem seu grupamento aldeído convertido em hidrazida utilizando-se hidrato de hidrazina em etanol. Posteriormente, uma condensação de aldeídos heterocíclicos funcionalizados, catalisada por ácido, findou em novos derivados piperidino-hidrazônicos. O esquema reacional utilizado por tais pesquisadores pode ser observado no esquema 5.



Esquema 5. Obtenção de derivados piperidino-hidrazônicos

Outro processo simples de obtenção de derivados hidrazônicos foi descrito por Muños *et al* (2006), na qual se reage a hidrazida em uma solução com aldeído ou cetona em metanol e, posteriormente, ácido acético glacial sob agitação constante por 2-3 horas. As acilhidrazonas são purificadas através de recristalização em metanol.

Jordão (2007) sintetizou acilidrazonas através de reações de condensação catalisada por ácido de acilidrazida com diferentes aldeídos (esquema 6).



Esquema 6. Reação de condensação de uma acilidrazida com diferentes aldeídos

3.1.2 Atividade Biológica dos derivados acilhidrazônicos

As hidrazonas são bases de Schiff pertencentes a uma classe de compostos caracterizada por conter o esqueleto $R_1R_2C=N-NR_3R_4$ e que apresentam uma variedade de aplicações químicas e farmacológicas (PARRILHA, 2012). A funcionalidade hidrazona consiste no grupo farmacofórico de inúmeras substâncias (ALMEIDA, 2002).

Derivados da hidrazona tendem a apresentar uma ampla lista de atividades biológicas já descritas na literatura, das quais podemos destacar a atividade antitumoral, o que os caracteriza como uma classe de moléculas de grande interesse farmacêutico.

Segundo Reddy *et al.* (2010), hidrazonas e seus derivados continuam a atrair diversos pesquisadores, pois sua estrutura química apresenta uma gama de propriedades farmacológicas.

A atividade antibacteriana de derivados acilidrazônicos já foi relatada frente a diferentes espécies e cepas de bactérias. Reis (2007) encontrou atividade antimicrobiana de derivados acilidrazônicos derivados da *D*-ribolactona frente a uma cepa de *Mycobacterium tuberculosis* e uma de *Staphylococcus aureus*. Oliveira *et al.* (2012) também constataram significativa atividade antimicrobiana de derivados da acilidrazona frente a diferentes cepas multirresistentes de *S. aureus* (figura 2).

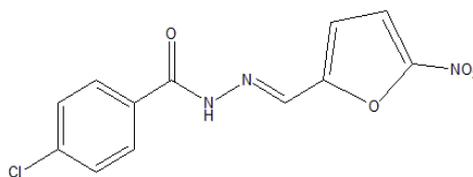


Figura 2. Derivado acilidrazônico com propriedade antimicrobiana

A atividade antifúngica também já foi constatada para derivados acilidrazônicos. Malik *et al* (2012) e Cachiba *et al.*(2012) também detectaram atividade antifúngica destes derivados frente a diferentes espécies do gênero *Candida sp.* A seguir, alguns compostos que apresentaram tais atividades nestes respectivos trabalhos (figura 3).

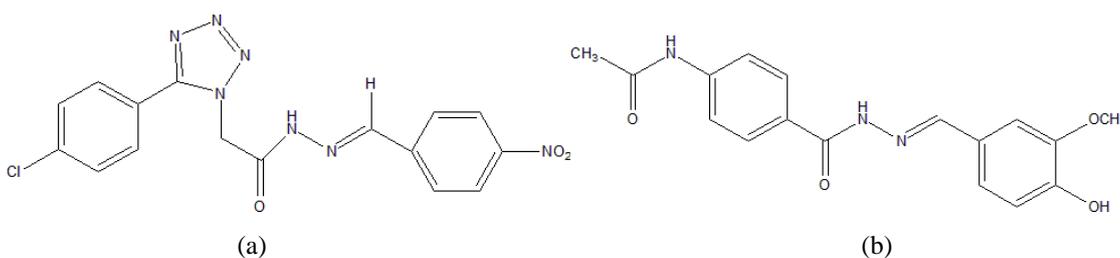


Figura 3. Derivados acilidrazônicos com atividade antifúngica

Pesquisas de derivados acilidrazônicos com atividade antiinflamatória tem sido realizadas em larga escala. Já foram relatados diversos derivados da *N*-acilidrazona com ação antiinflamatória (BISPO JÚNIOR *et al.*, 2011; AUGUSTO *et al.*, 2008; DUARTE, 2006). Substâncias que contêm em suas estruturas uma porção hidrazona têm sido relatadas na literatura como inibidoras da Ciclo-oxigenase e 5-Lipo-oxigenase, apresentando, portanto, pronunciadas atividades analgésica e anti-inflamatória (REIS *et al.*, 2011). O autor relata ainda a atividade antinociceptiva provenientes de derivados da hidrazona. Um exemplo de derivado com atividade antiinflamatória pode ser observado na figura 4.

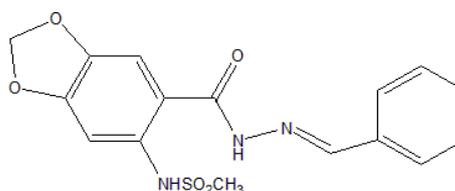


Figura 4. Derivado acilidrazônico com atividade antiinflamatória

Peterson *et al.* (2009) avaliaram a atividade de uma série de compostos acilidrazônicos frente a células tumorais e constataram a capacidade de um dos compostos (figura 5a) de induzir a célula à morte. Salum (2011) encontrou atividade antiproliferativa, antitubulina, antimitótica e inibitória da migração celular para derivados da acilidrazona. Cui *et al.* (2010) também evidenciaram derivados hidrazônicos com potencial atividade antitumoral (figura 5b).

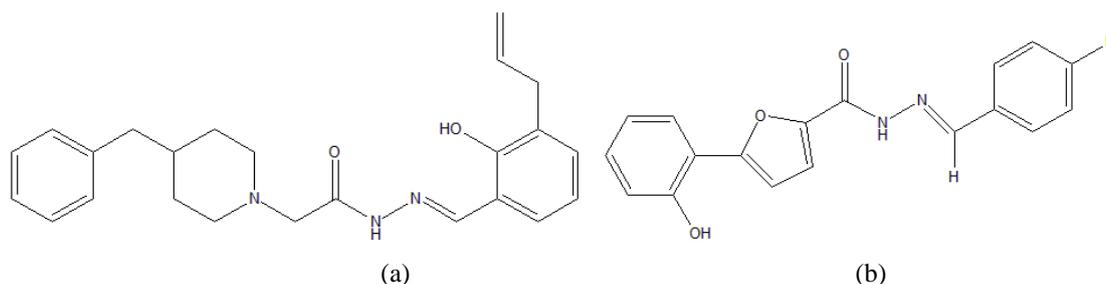


Figura 5. Derivados acilidrazônicos com atividade antitumoral

Outra atividade já relatada que gostaríamos de destacar aqui é antiviral. Tian *et al.* (2011) sintetizaram uma nova série de compostos acilidrazônicos, a qual foi avaliada e comprovada atividade anti-HIV. O composto representado na figura 6a foi um dos que apresentaram tal atividade de forma mais efetiva. A atividade desestabilizadora da transcriptase reversa de derivados acilidrazônicos foi observada por Sluis-Cremer *et al.* (2002). A estrutura de um dos compostos avaliados neste trabalho pode ser observada de acordo com a figura 6b.

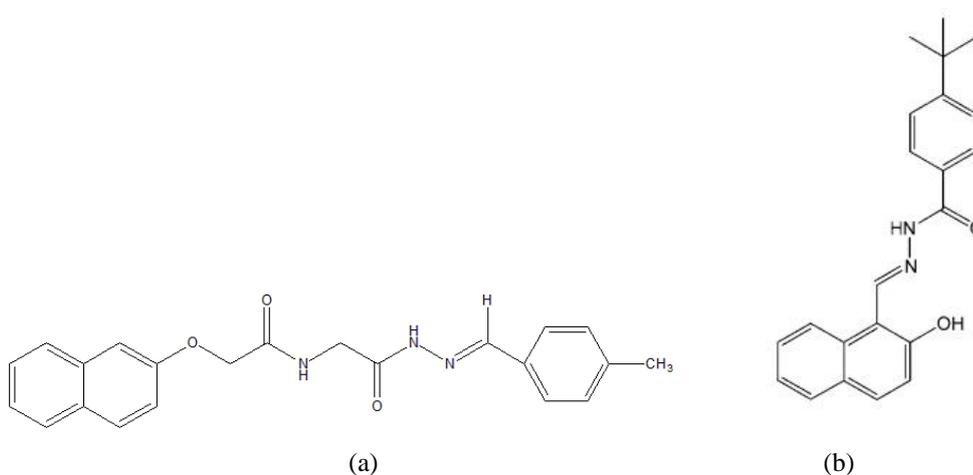


Figura 6. Derivados acilidrazônicos com atividade anti-HIV

A atividade antimalárica de derivados acilidrazônicos também já foi relatada na literatura (IFA *et al.*, 2000; MELNYK *et al.*, 2006). Derivados acridinilhidrazônicos também

já foram relatados como potenciais agentes antimaláricos frente a cepas de *P. falciparum* resistentes a cloroquinas (GEMMA *et al.*, 2006). Na figura 7 estão demonstrados exemplos de compostos com tal atividade já comprovada.

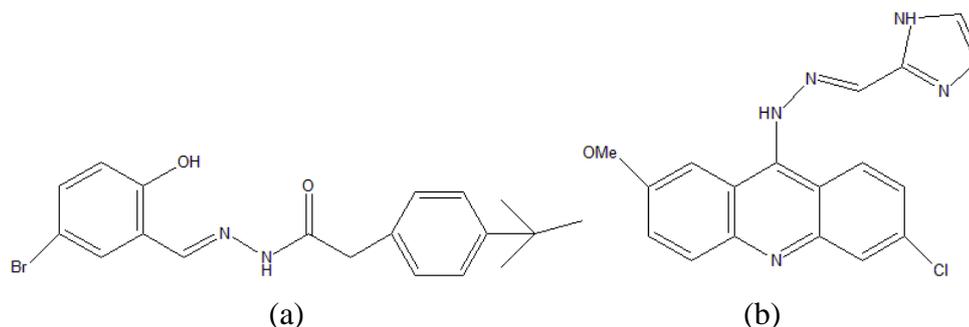


Figura 7. Derivado acilidrazônico (a) e acilidrazônico acridínico com atividade antimalárica (b)

Além das atividades farmacológicas supracitadas, podemos citar ainda de atividade tripanocida (LOBACK; FIGUEIRA; SILVA, 2010), antitubercular (COSTA *et al.*, 2011), antinociceptiva (MATHEUS, 1991; SAUZEM, 2004), antiagregação plaquetária (RODRIGUES *et al.*, 2007), antitrombótica (BARREIRO, 2002), entre outras.

3.2 Testes biológicos

3.2.1 Bioensaios de citotoxicidade frente à *Artemia salina*

Um dos problemas encontrados para a maioria dos compostos candidatos a fármacos é a alta toxicidade. Diante disso, testes de citotoxicidade são utilizados para determinar os níveis de toxicidade dos compostos. Tais testes podem ser realizados em cultura de células saudáveis, células tumorais, células de animais não-humanos, além de poder ser realizados testes alternativos com microrganismos, tais como microcrustáceos.

No caso dos testes com microcrustáceos, um dos mais amplamente utilizados é o que utiliza larvas náuplios de *Artemia salina*. Sendo *A. salina* uma espécie de microcrustáceo da ordem Anostraca, utilizada em diversos trabalhos como bioindicador para testes de citotoxicidade (LIMA *et al.*, 2009; FERREIRA *et al.*, 2006; BEDNARCZUK *et al.*, 2010; STEFANELLO *et al.*, 2006).

A ampla utilização da *A. Salina* em estudos toxicológicos preliminares deve-se a simplicidade com que pode ser manuseado, além da rapidez e o baixo custo. Outro fator relevante, é a boa correlação entre os resultados desse tipo de bioensaio com testes de citotoxicidade para diversas linhagens de células tumorais que favorecem a utilização em

diversos estudos (MANNETI, 2010). O teste de letalidade é amplamente aplicado através da análise citotóxica, onde é analisado um parâmetro simples: indivíduos vivos ou mortos.

Após a determinação das doses letais, se os compostos forem considerados viáveis, pode-se partir para testes mais específicos, como os de atividade antimicrobiana. Para tais, podem ser utilizados cepas de bactérias como *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e de fungos como *Candida* sp. (PESSINI *et al.*, 2003), entre outros. Além destes, podem ser feitos testes antiparasitários para diversos helmintos e protozoários, inclusive alguns de extrema relevância médica como *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania* sp., *Toxoplasma gondii* (CARIGNANI *et al.*, 2000; SILVA *et al.*, 2009; CARVALHO *et al.*, 2010).

3.2.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A avaliação preliminar da eficácia de um determinado compostos sintético ou natural contra um microrganismo pode ser mensurada através de testes de Concentração Inibitória Mínima (CIM). Neste tipo de ensaio, são utilizadas pequenas quantidades das substâncias a fim de determinar a concentração (mínima) necessária para inibir o crescimento do microrganismo-teste (OTROSKY *et al.*, 2008).

Segundo Alves *et al.* (2008), várias técnicas podem ser utilizadas para determinar a CIM de extratos vegetais ou substâncias puras, dentre elas podemos citar os métodos de difusão em ágar (pelas técnicas de disco, poço e *template*) e microdiluição em caldo. Otrosky *et al.* (2008) dividiu as técnicas em métodos de difusão (teste de difusão em disco, cilindros de aço inoxidável, perfuração em ágar) e métodos de diluição (macrodiluição e microdiluição).

Para a realização do teste de microdiluição, utilizam-se microplacas, geralmente, contendo 96 poços dispostos em 12 colunas (1 a 12) e 8 linhas (A a H). São estabelecidas diferentes concentrações das drogas de forma decrescente, bem como os controles positivos (um fármaco com atividade já conhecida) e o controle negativo (o microrganismo inoculado apenas em meio de cultura). Os testes podem ser realizados em triplicata, quadruplicata ou quintuplicata, para aumentar o grau de confiança estatística dos resultados. Após a submissão dos microrganismos às drogas testadas, os mesmos são encubados (geralmente em estufa à temperatura de 37°C, por tempo que pode variar a depender do metabolismo microbiano). Passado o tempo de encubação, podem se utilizar corantes para visualizar os poços que

contém microrganismos metabolicamente ativos, por exemplo, a resazurina. (CAVALCANTI; ALMEIDA; PADILHA, 2011; MARTINS *et al.*, 2010).

3.3 Resistência bacteriana e *Streptococcus mutans*

Segundo Davies & Davies (2010), a utilização bem sucedida de qualquer agente terapêutico é comprometida pelo potencial de desenvolvimento de tolerância ou resistência ao composto a partir do momento em que o mesmo é utilizado pela primeira vez. O uso indiscriminado de medicamentos para o combate de infecções levou ao aparecimento de microrganismos resistentes às drogas convencionais utilizadas para o tratamento de inúmeras doenças.

De acordo com Mota *et al.* (2005), “o aparecimento de resistência a antibióticos e outras drogas antimicrobianas foi, é e provavelmente continuará a ser um dos grandes problemas da medicina, pois é causada pela mutação espontânea e recombinação de genes, que criam variabilidade genética sobre a qual atua a seleção natural dando vantagens aos mais aptos.

A resistência microbiana é, sem dúvidas, um problema de saúde pública, pois diminui as possibilidades de tratamentos para as doenças que estes ocasionam. Segundo Rocha *et al.* (2011), a rápida evolução da resistência aos antibióticos tem diminuído drasticamente o arsenal de drogas disponíveis.

O grupo de bactérias conhecidas como estreptococcus está entre os predominantes no biofilme bucal, a espécie *Streptococcus mutans*, em especial, é bastante conhecida no meio clínico, principalmente, por ser o principal agente etiológico da cárie humana, estando esta associação já bem estabelecida. (BARROSO, 2010; GERALDO-MARTINS & MARQUES, 2009).

Alves *et al.* (2010) afirmam que *S. mutans* são os microrganismos mais relacionados à cárie devido à sua capacidade de colonizar os dentes, produzir polissacarídeos intra e extracelulares, serem altamente acidogênicos e acidúricos e metabolizarem uma série de glicoproteínas salivares, além dos açúcares presentes nos alimentos ingeridos, fermentando-os pela formação de ácidos, que em contato com os tecidos dentários os destroem (ALVES *et al.*, 2010; PEGADO, 2010).

Consta ainda na literatura que *S. mutans* está relacionado com o aparecimento de doenças cardíacas, sobretudo, a endocardite (NAKANO; NOMURA; OOSHIMA, 2007; BALLINI, 2011).

3.4 Doenças negligenciadas e Malária

As doenças denominadas negligenciadas, ou ainda, em grande medida, doenças tropicais, são aquelas que ainda acometem e ameaçam um grande número de pessoas pelo mundo, mas não possuem tratamentos ou medicamentos eficazes para o seu combate.

A Organização Mundial da Saúde e a organização Médicos Sem Fronteiras propuseram as denominações de “doenças negligenciadas” para se referir àquelas enfermidades, geralmente transmissíveis, cuja ocorrência se dá em maior número nos países em desenvolvimento (GARCIA *et al.*, 2011). Dentre estas doenças estão enquadradas a dengue, a hanseníase, a tuberculose, as leishmanioses, a raiva, a febre amarela e outras arboviroses, hepatites virais, clamidioses e ricketioses entre outras (SOUZA *et al.*, 2010).

Para Silva (2007), tais doenças têm sido marginalizadas, essencialmente, porque as pessoas que são acometidas por elas são pobres e não oferecem retorno lucrativo suficiente para que a indústria farmacêutica invista em pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos voltados ao tratamento. Segundo Carvalheiro (2008), essas doenças merecem atenção especial das agências de fomento de pesquisa por não serem tidas como prioritárias pela indústria farmacêutica.

A malária é uma doença infecciosa, não contagiosa, causada por protozoários pertencentes ao filo *Apicomplexa*, classe *Sporozoea*, ordem *Eucoccidia*, família *Plasmodiidae*, sendo as espécies *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* e *P. malariae* as que mais comumente parasitam o homem, mas no Brasil, a malária humana está relacionada principalmente com as espécies *P. vivax* e *P. falciparum*, e só eventualmente a espécie *P. malariae* (TEIXEIRA, 2011; PARISE; ARAÚJO; CASTRO, 2012). A transmissão do plasmódio para o homem se dá através de mosquitos do gênero *Anopheles*.

Segundo Osório-de-Castro *et al.* (2011), a espécie *P. falciparum* é a responsável pelo maior número de mortes, em todo o mundo. De acordo com Mota (2009), o *P. falciparum* apresenta resistência diversos agentes quimioterápicos utilizados para o tratamento contra a malária, dentre eles a cloroquina, que é a droga mais utilizada.

No panorama das doenças negligenciadas, a malária aparece com uma doença que ainda hoje acomete milhares de pessoas por todo o mundo, entretanto, persiste com severidade nos países subdesenvolvidos. Segundo Camargo (2003), a doença já foi erradicada da Europa e América do Norte, mas ainda mata milhares de crianças na África.

No Brasil, foram aproximadamente 306 mil casos registrados em 2009, sendo o país das Américas que registra o maior número de pessoas afetadas por tal enfermidade, cerca de

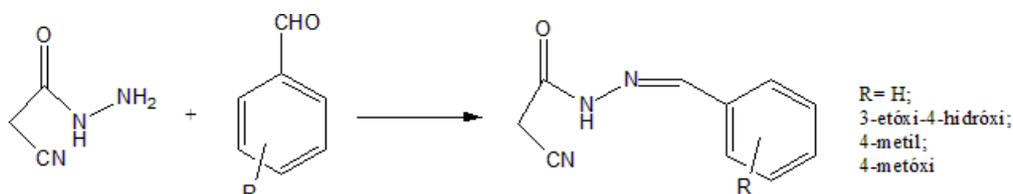
50% dos casos registrados no continente, sendo a região amazônica a mais afetada (99,9% dos casos do Brasil ocorrem na Região (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010; PARISE; ARAÚJO; CASTRO, 2012).

Com base no que foi exposto, fomos motivados a sintetizar diferentes derivados acilidrazônicos e encaminhá-los para avaliação frente a diferentes alvos biológicos, a fim de gerar resultados preliminares de atividade biológica e direcioná-los para testes mais específicos, posteriormente.

4. Metodologia

4.1 Síntese dos compostos (Procedimento geral)

Para a obtenção dos derivados acilidrazônicos intermediários, foram realizadas reações de condensação da 2-cianoacetohidrazida com os diferentes aldeídos substituídos, em equivalência molar de 1:1. O solvente utilizado na reação foi o etanol, além disso, utilizou-se para catálise da reação o ácido acético (esquema 7). As reações foram submetidas à agitação e tiveram seus desenvolvimentos acompanhados por Cromatografia em Camada Delgada (CCD). A precipitação do produto ocorria rapidamente no meio reacional e as reações duravam poucas horas. Ao serem finalizadas as reações, observava-se a formação de um produto único e os produtos de partida eram completamente consumidos. As reações foram levadas à geladeira para baixar a energia do sistema e estimular a precipitação de uma maior quantidade de produto. Posteriormente, filtrou-se os produtos em papel de filtro. Os produtos foram levados à estufa para secar em com temperatura variando entre 40-50 °C e, por fim, foi pesado em balança de precisão, para que fossem calculados os rendimentos.



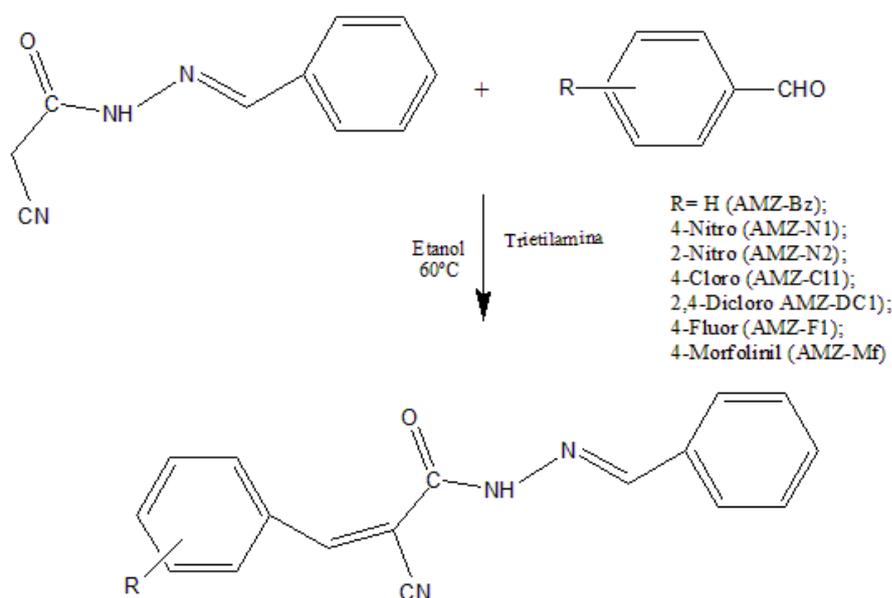
Esquema 7. Rota para a obtenção dos intermediários acilidrazônicos.

Todas as reações foram realizadas à temperatura ambiente, entretanto, a obtenção do 2-ciano-aceto-benzilideno-hidrazida (AMZ) foi refeita, pois foi necessária uma maior quantidade de maior quantidade do produto para prosseguir com a obtenção dos compostos finais da série. Então, relançamos a reação e a submetemos a aquecimento, obtendo um rendimento superior ao encontrado a princípio.

Visto o aumento no rendimento do AMZ ao lançar a reação aquecida, os dois últimos intermediários sintetizados, o 2-ciano-aceto-(3-etoxi-4-hidroxi-benzilideno)-hidrazida (AMH) e o 2-ciano-aceto-(4-metoxi-benzilideno)-hidrazida (AMT), foram lançados em um meio reacional diferenciado, no qual se utilizou o tolueno como solvente e a reação foi submetida a aquecimento de 110°C. Ambas as reações foram acompanhadas através de CCD e duraram 3 horas e 20 minutos e 2 horas e 20 minutos, respectivamente.

Dentre todos os intermediários sintetizados, apenas o 2-ciano-aceto-(4-metil-benzilideno)-hidrazida (AMP) não foi submetido à reação com aquecimento.

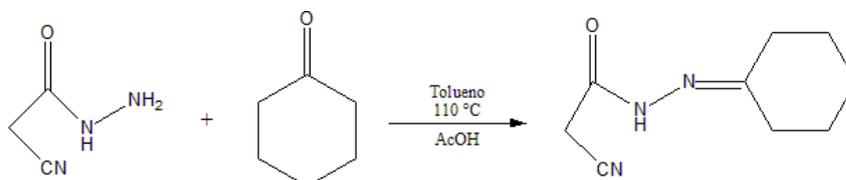
Posteriormente, o primeiro intermediário sintetizado (AMZ), foi submetido a diversas reações de condensação com diferentes aldeídos (esquema 8). As reações foram lançadas em equivalência molar de 1:1, partindo-se de 300mg (0.160 mols) do AMZ. Foi utilizado o etanol como solvente e a trietilamina como catalisador reacional. As reações foram aquecidas a 60°C, e submetidas à agitação constante e refluxo. O tempo reacional variou entre 1 hora e 30 minutos e 8 horas. Depois de finalizadas, as reações foram levadas à geladeira para estimular a precipitação dos produtos e, posteriormente, foram filtradas. Os produtos retidos no filtro de papel foram levados à estufa para secagem e posterior pesagem. A rota de síntese dos compostos finais desta série esta disposta no esquema 8.



Esquema 8. Obtenção dos compostos finais da série AMZ

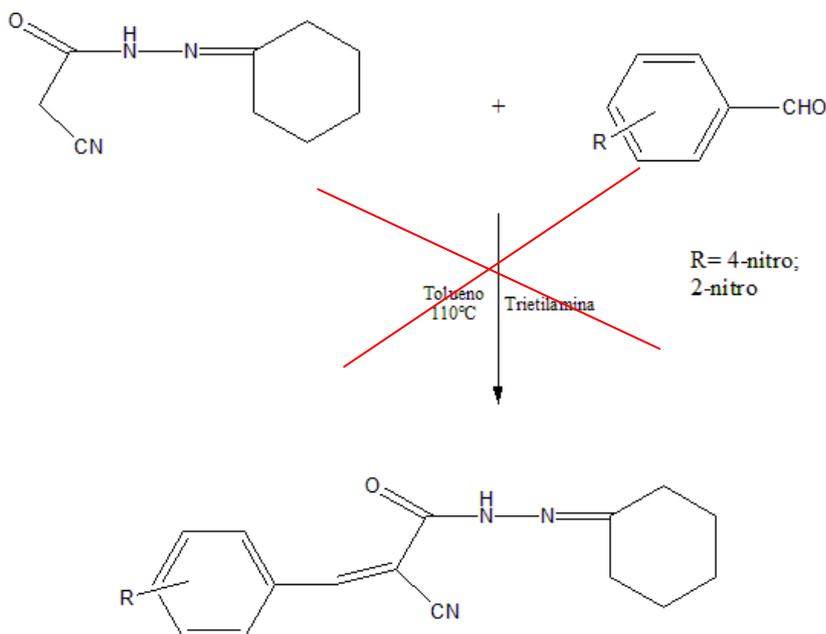
Além dos compostos intermediários acima demonstrados, foi sintetizado mais um composto acilidrazônico derivado de cetona, em uma reação de condensação da 2-cianoaceto-hidrazida com uma cetona cíclica (ciclohexanona), em equivalência molar de 1:1. Partiu-se de 300mg da 2-cianoacetohidrazida (0.303 mols) e 0,313mL da ciclohexanona, utilizou-se o etanol como solvente da reação e como catalisador o ácido acético. A reação foi aquecida a 60°C. Pela baixa reatividade da ciclohexanona, foi necessário mudar o sistema reacional, alterando a utilização do solvente de etanol para o tolueno e aquecendo a 110°C. A reação de obtenção do CCH durou 3 horas. Após desligada, a reação foi levada à geladeira para estimular a precipitação do produto que foram filtrados, levados à estufa para secagem à

temperatura entre 40-50°C e, por fim, pesados em balança de precisão. A rota de síntese pode ser visualizada de acordo com o esquema 9.

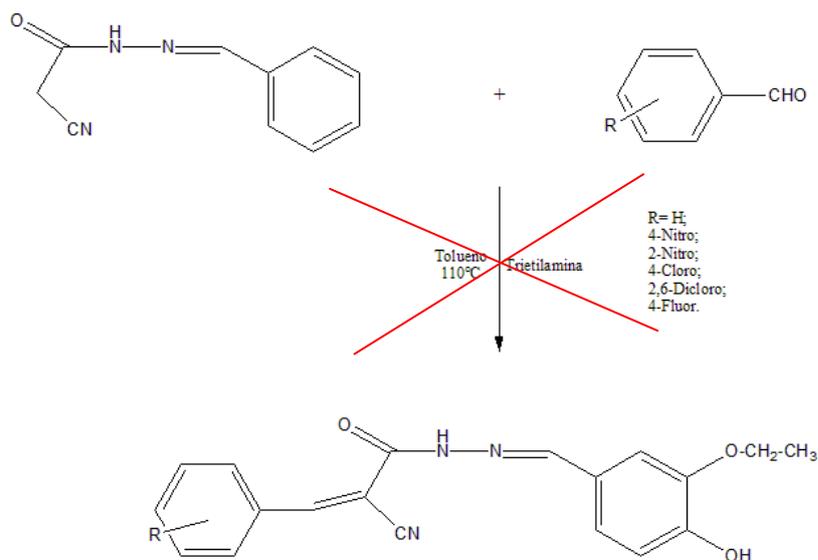


Esquema 9. Obtenção do Ciano-aceto-ciclohexilideno-hidrazida (CCH).

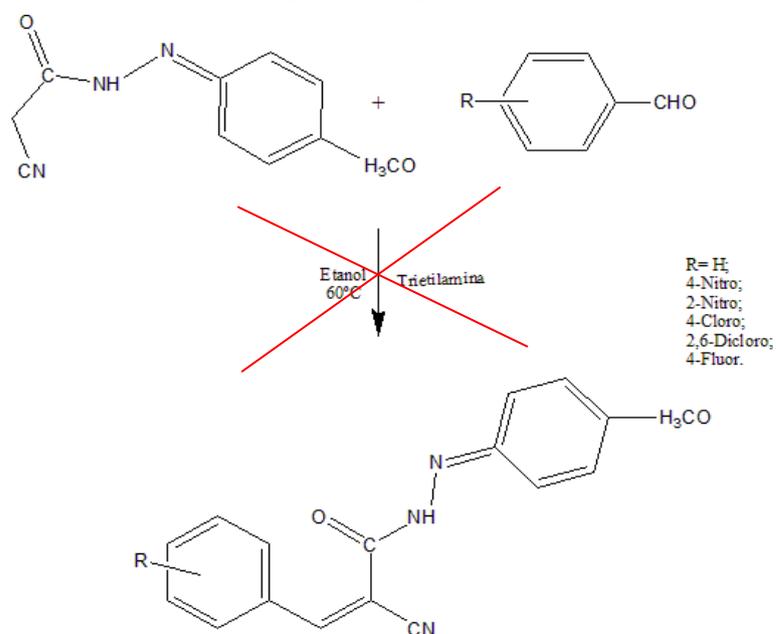
Posteriormente, foram realizadas tentativas de obtenção dos compostos finais das séries CCH, AMH e AMT. Os procedimentos utilizados foram similar aos aplicados na obtenção dos compostos finais da série AMZ (solvente, catalisador e substituintes - aldeídos), mas as reações não foram satisfatórias, como pode ser observado nos esquemas 10, 11 e 12.



Esquema 10. Obtenção dos compostos finais da série CCH.



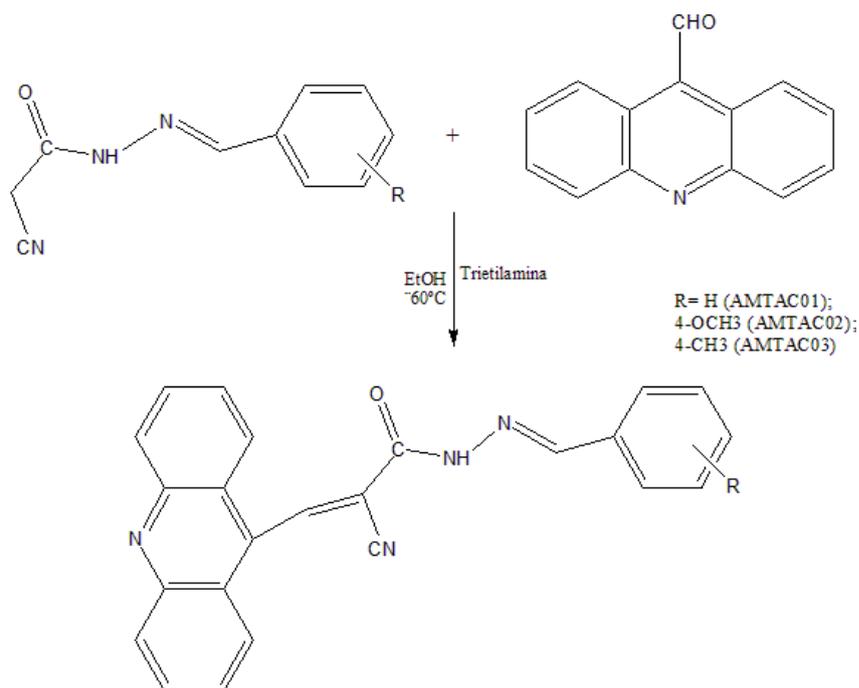
Esquema 11. Obtenção dos compostos finais da série AMH



Esquema 12. Obtenção dos compostos finais da série AMT

Foi realizada ainda a síntese de derivados acilidrazônicos-acridínicos (AMTAC). A obtenção de tais derivados foi feita através da condensação do aldeído de acridina com três diferentes intermediários. O aldeído de acridina utilizado para tais reações foi produzido em nosso laboratório, pela aluna Vanessa de Lima Serafim, durante a execução do seu projeto de Iniciação Científica.

Os intermediários utilizados para a síntese dos compostos acilidrazônicos-acridínicos foram o AMZ, o AMP e o AMT. As reações para a obtenção de tais compostos foi realizada em equivalência molar de 1:1, em meio etanólico a 60°C e tiveram a trietilamina como catalisador (esquema 13).



Esquema 13. Obtenção dos derivados acilidrazônicos-acridínicos

Os compostos sintetizados tiveram suas características físico-químicas descritas através do cálculo do Fator de Retenção (R_f) e Faixa de Fusão (F.F) e suas estruturas elucidadas por Ressonância Magnética Nuclear de Carbono (RMN ^{13}C) e Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H). Além disso, foi calculado o rendimento de cada um dos compostos.

Outros parâmetros físico-químicos analisados foram os referentes às regras de Lipinski ou regra dos cinco (LIPINSKI *et al.*, 1997). Tal regra analisa 4 diferentes parâmetros para inferir sobre a solubilidade dos compostos (log P, peso molecular, número de grupos doadores de ligação de hidrogênio, número de grupos receptores de ligação de hidrogênio).

4.2 Avaliação da citotoxicidade

Foram selecionados 4 compostos da série AMZ, baseados no log P teórico, que foi calculado através do programa ChemDraw Ultra®. Sendo estes, o AMZ, AMZ-BZ, AMZ-N1, AMZ-F1. Optou-se, ainda, por utilizar o AMT-AC01 para avaliação da citotoxicidade, uma vez que os compostos que apresentam o grupo acridina em sua composição tendem a ser citotóxicos.

Para avaliar a citotoxicidade, foram realizados a *Artemia salina* Leach foram baseados na metodologia descrita por Meyer *et al.* (1982), sendo feitas adaptações.

Os cistos foram colocados para eclodir em um aquário adaptado com uma divisória com poros de 2 mm, dividindo-o em duas partes iguais, sendo uma delas protegido da luz e o outro exposto à luz. No aquário foi adicionada solução salina sintética, preparada de acordo com as instruções do rótulo do produto, e uma bomba de ar utilizada para oxigenar a água.

No lado protegido da luz foram adicionados os cistos de *A. salina*, que eclodiram após 24-48 horas. Por apresentarem comportamento fototrópico positivo, as larvas náuplius migraram através dos poros para o lado que havia incidência luminosa, sendo coletadas através de uma pipeta Pasteur para serem submetidas ao experimento.

Foi preparada uma solução-mãe para cada um dos compostos. Pesou 5 mg em balança analítica. Feito isso, em um béquer de 10 mL foi adicionado os 5mg do produto, 0,5mL de Tween 80 (10 gotas), 0,05mL de DMSO (uma gota) e 2 mL de água destilada. Homogeneizou-se com o auxílio de uma espátula e, posteriormente, a mistura foi transferida para um balão volumétrico de 5 mL para se ter maior precisão, e o volume foi completado com água destilada. Gerando, então, uma solução de 5mg/mL. A solução foi transferida para um béquer e submetida à agitação em placa magnética por 7 minutos (tempo em que se foi observado mudança na transparência do líquido – aparente solubilização).

Para preparar as diferentes concentrações, utilizou-se micropipetas, com as quais se subtraía da solução-mãe um determinado valor que fora previamente calculado, adicionava-se ao tubo de ensaio que continha as larvas náuplios e completava-se até o volume de 2mL com solução salina sintética. As concentrações utilizadas foram 500 µg/mL, 100 µg/mL, 50 µg/mL, 10 µg/mL e 5 µg/mL. Tais procedimentos foram utilizados para todos os compostos que foram submetidos ao bioensaio de citotoxicidade. Os testes foram realizados em triplicata.

Para controle negativo, foram submetidas náuplios a uma solução contendo água salina sintética contendo 1% de DMSO e 10% de tween 80.

Após 24h de exposição dos náuplios aos compostos, foram contabilizados os números de vivos e mortos em cada tubo.

4.3 Teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Os testes antibacterianos foram realizados no laboratório de Biologia Bucal (Labial) da Universidade Federal da Paraíba. Foram selecionados para os testes os mesmos compostos escolhidos para os testes de citotoxicidade, seguindo o mesmo critério de seleção (LogP).

Para o cultivo de bactérias do grupo estreptococos, utiliza-se o caldo BHI como meio de cultura. De acordo com a Anvisa (2004), o BHI é um meio de cultura derivado de cérebro e coração de gado, que contém peptona e dextrose.

Para a realização do cultivo, utilizou-se tubo de vidro esterelizado e com tampa. Foi utilizados 0,6 mL (600 µL) do inóculo bacteriano de *S.mutans* cepa UA159, em 7 mL (7000 µL) de meio BHI (brain heart infusion) e agitados em vortex para homogeneizar. Os tubos com as tampas semi-abertas foram colocados em jarras de anaerobiose e deixados em estufa microbiológica por 24 horas, a 37 °C.

Na preparação da solução-mãe, as drogas foram pesadas em balança analítica dentro de tubos tipo Falcon, seguindo-se a proporção de 1 mg de droga para 1 mL de DMSO (dimetilsulfóxido). A partir dessa solução mãe original, foram feitas as diluições para SM1 (1,5 mL BHI + 1,5 mL SM da droga) e SM2 (2,5 mL BHI + 0,5 mL SM da droga). Após 24h de cultivo, foi retirado 3 mL de cada tubo e colocado em tubos tipo Falcon.

Em seguida, os tubos foram centrifugados por 10 – 15 min à 6.000 rpm, removeu-se o sobrenadante e acrescentou-se ao tubo 5 mL de solução salina, e ressuspendeu-se. As bactérias foram então levadas para estufa por 1 hora, agitando no vórtex a cada 15 minutos. Após este descanso, nova centrifugação por 10 – 15 minutos e descartou-se o sobrenadante.

Foram acrescentados 2,4 mL de solução salina, homogeneizado em vórtex e feita a leitura no aparelho de espectrofotometria OPTIMA (leitura de absorbância em 640 nm). Padronizada a concentração bacteriana em 0,135 UFC da Escala de MacFarland, as bactérias puderam ser submetidas aos testes de CIM em placas de ELISA. Todo o procedimento foi feito em capela de fluxo laminar e com vidrarias, ponteiras e meios de cultura previamente esterilizados. Após limpar a capela com álcool 70%, os materiais foram colocados à exposição de luz Ultravioleta por 20 minutos.

As placas com poços em forma de “U” com 96 orifícios foram preparadas de forma que cada poço tivesse um volume final de 100 μL . Na placa as colunas foram distribuídas nos números de 1 a 12 e as linhas nas letras “A” até o “H”. Nos poços foram distribuídas as soluções de forma a conter as diferentes concentrações do produto teste. O sistema de diluição é controlado pelo volume da solução-mãe utilizada.

De acordo com a Tabela de diluição para microplacas fornecida de forma que se obtenham as diferentes concentrações que variem de 400 $\mu\text{g/mL}$ até 50 $\mu\text{g/mL}$ das drogas, ocupando os poços A1 a A12. Para os controles positivos foi utilizada a Clorexidina a 0,12%. Foram feitos ainda o controle de esterilidade do caldo, controle de culturas, controle de esterilidade do antimicrobiano e controle de esterilidade das amostras.

Com o piloto e teste inicial, deve-se primeiro testar apenas a primeira série de diluições. Não há sentido, fazer tudo de SM1 à SM3 sem antes verificar se há algum efeito na concentração mais elevada (A1), equivalente a 400 $\mu\text{g/mL}$. Após o pré-enchimento de todos os poços, as microplacas são seladas com parafilme e incubadas a 37 °C por 24 horas.

Após o período de incubação, adicionou-se em cada orifício 35 μL de resazurina preparado em solução aquosa (10 mg diluída em 80 mL), misturando o conteúdo do poço com micropipeta. Reincubou-se as placas seladas com parafilme por mais 1 hora para se fazer a leitura. A mudança de cor nos orifícios (de azul para rosa) é interpretada como microrganismo sensível ao produto testado. Os experimentos foram realizados em triplicata. O último poço azul representa a concentração inibitória mínima.

4.4 Avaliação da atividade antimalárica

Os testes de atividade antimalárica foram realizados no Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM), da Fiocruz-BA. Os compostos submetidos a teste foram: AMTAC01, AMTAC02 e AMTAC03.

5. Resultados e Discussão

Foram obtidos 5 compostos intermediários, sendo eles, o AMH, o AMP, o AMT, o AMZ e o CCH. Suas características físico-químicas estão dispostas na tabela 1. Os rendimentos dos intermediários variaram de 48,53 a 96,96%. Dentre os intermediários, o composto com menor rendimento foi o AMP. Acreditamos que o seu rendimento inferior aos demais intermediários se deve ao fato de que a sua obtenção foi realizada à temperatura ambiente e os demais foram submetidos a aquecimento. Os parâmetros de Lipinski destes compostos estão apresentados na tabela 2.

Tabela 1 – Características físico-químicas dos intermediários acilidrazônicos

| Código do composto | Fator de Retenção (R.F) | Faixa de fusão (°C) | Rendimento (%) | Solúvel | | Aparência |
|--------------------|--|---------------------|----------------|---------|-------------|--------------------|
| | | | | DMSO | Clorofórmio | |
| AMH | 0,44 (DCM:MetOH ¹ /10:1) | 203-206 | 96,96% | Sim | Não | Pó bege |
| AMP | 0,51 (H:A ² /7:3) | 199-206 | 57,7% | Sim | Sim | Cristais amorfos |
| AMT | 0,38 (H:A/6:4) | 212 | 94% | Sim | Não | Pó bege |
| AMZ | 0,54 (H:A/ 7:3) | 174-176 | 82,4% | Sim | Não | Pó branco brilhoso |
| CCH | 0,47 (H:A/6:4) | 110-112 | 48,53% | Sim | Não | Cristais amorfos |

¹Diclorometano:Metanol

²Hexano:Acetato

Tabela 2 – Características dos intermediários avaliadas nas regras de Lipinski

| Código do Composto | Peso Molecular (g) | Log P | Grupos Aceptores de ligação de Hidrogênio | Grupos Doadores de ligação de Hidrogênio |
|---------------------------|---------------------------|--------------|--|---|
| AMH | 193,1 | 1.29 | 6 | 2 |
| AMP | 201,1 | 2.15 | 4 | 1 |
| AMT | 233,1 | 1.54 | 5 | 1 |
| AMZ | 187,1 | 1.67 | 4 | 1 |
| CCH | 193,1 | 1.29 | 4 | 1 |

Foram obtidos 11 compostos finais, destes, 8 são da série AMZ e 3 da série AMTAC (derivado acilidrazônicos-acridínicos). Tais compostos apresentaram rendimentos entre 6,62 (AMZ-Mf) e 79,82% (AMTAC01). Suas características físico-químicas, bem como os rendimentos estão dispostos na tabela 3. Os 7 compostos finais da série AMZ são: 3-fenil-2-ciano-aceto-benzilideno-hidrazida (**AMZ-Bz**), 3-(4-cloro-fenil)-2-ciano-aceto-benzilideno-hidrazida (**AMZ-CI1**), 3-(2-4-dicloro-fenil)-2-ciano-aceto-benzilideno-hidrazida (**AMZ-DC**), 3-(4-fluor-fenil)-2-ciano-aceto-benzilideno-hidrazida (**AMZ-F1**), 3-(4-morfolinil)-2-ciano-aceto-benzilideno-hidrazida (**AMZ-Mf**), 3-(4-nitro-fenil)-2-ciano-aceto-benzilideno-hidrazida (**AMZ-N1**) e 3-(2-nitro-fenil)-2-ciano-aceto-benzilideno-hidrazida (**AMZ-N2**).

Os 3 compostos finais da série AMTAC são: 3-acridin-2-il-2-ciano-aceto-benzilideno-hidrazida (**AMTAC01**), 3-acridin-2-il-2-ciano-aceto-(4-metoxi-benzilideno)-hidrazida (**AMTAC02**) e 3-acridin-2-il-2-ciano-aceto-(4-metil-benzilideno)-hidrazida (**AMTAC03**).

Tabela 3 – Características físico-químicas dos compostos finais acilidrazônicos

| Código do composto | Fator de Retenção (R.F) | Faixa de fusão (°C) | Rendimento (%) | Solúvel | | Aparência |
|--------------------|-------------------------|---------------------|----------------|---------|-------------|-----------------------|
| | | | | DMSO | Clorofórmio | |
| AMZ-Bz | 0,58 (H:A*/7:3) | 170-171 | 50,1 | Sim | Sim | Pó bege |
| AMZ-Cl1 | 0,48 (H:A/7:3) | 228 | 72,6 | Sim | Não | Pó marfim |
| AMZ-DC | 0,58 (H:A/7:3) | 180-182 | 18 | Sim | Não | Pó amorfo bege |
| AMZ-F1 | 0,37 (H:A/7:3) | 215-220 | 34,04 | Sim | Não | Pó marfim |
| AMZ-Mf | 0,58 (H:A/1:1) | 203-206 | 6,62 | Sim | Não | Pó amarelo |
| AMZ-N1 | 0,62 (H:A/6:4) | 238-239 | 33,03 | Sim | Não | Pó verde |
| AMZ-N2 | 0,46 (H:A/6:4) | 250-252 | 10,9 | Sim | Não | Pó marfim |
| AMTAC01 | 0,44 (H:A/7:3) | 217-222 | 79,82 | Sim | Sim | Pó verde brilhoso |
| AMTAC02 | 0,56 (H:A/7:3) | 236-240 | 60,17 | Sim | Sim | Pó amarelo-esverdeado |
| AMTAC03 | 0,40 (H:A/7:3) | 228-234 | 39,21 | Sim | Sim | Pó amarelo-alaranjado |

*Hexano: Acetato

Para os compostos da série AMZ, observamos que os aldeídos com grupos retiradores, quando na reação de condensação em meio básico, apresentaram menores rendimentos, principalmente quando tais grupos estão ligados ao anel benzênico em posição *orto* do aldeído aromático. Isso pode ser observado quando comparamos o composto AMZ-N1(b) e AMZ-N2 (a), cuja diferença é apenas a posição do grupo nitro (figura 8).

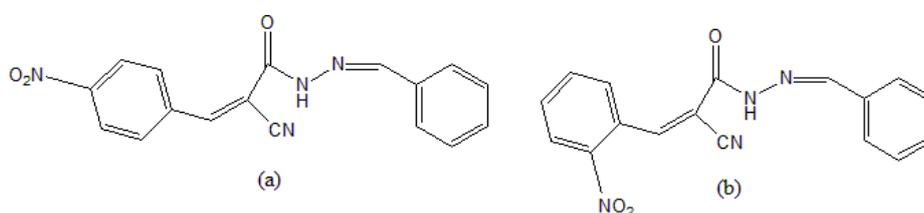


Figura 8. Estruturas químicas dos compostos AMZ-N1(a) e AMZ-N2 (b)

Outra observação pode ser feita quando comparamos os compostos AMZ-C11 e AMZ-DC1 (figura 9), o segundo apresenta um átomo de cloro na posição *orto* o que diminui a reatividade da carbonila do aldeído.

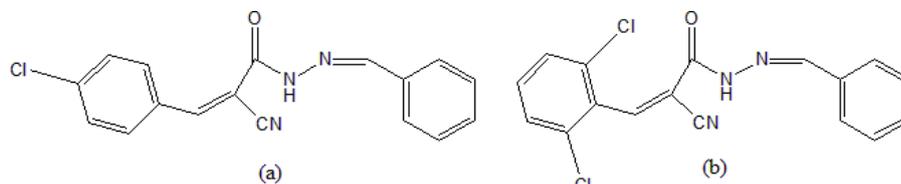


Figura 9. Estruturas químicas dos compostos AMZ-C11(a) e AMZ-DC1 (b).

Nos dois casos, tanto para os compostos nitrados quanto para os clorados, as substituições na posição *orto* acarretaram em declínio no rendimento dos compostos finais.

Na tabela 4 se encontram dispostos os valores referentes aos parâmetros da regra de Lipinski dos compostos finais acilidrazônicos.

Tabela 4 – Características dos compostos finais avaliadas nas regras de Lipinski

| Código do Composto | Peso Molecular (g) | Log P | Grupos Aceptores de ligação de Hidrogênio | Grupos Doadores de ligação de Hidrogênio |
|--------------------|--------------------|-------|---|--|
| AMZ-Bz | 275,1 | 3.60 | 4 | 1 |
| AMZ-C11 | 309,1 | 4.16 | 4 | 1 |
| AMZ-DC | 343 | 4.72 | 4 | 1 |
| AMZ-F1 | 293,1 | 3.76 | 4 | 1 |
| AMZ-Mf | 360,2 | 3.49 | 6 | 1 |
| AMZ-N1 | 320,1 | 2.60 | 7 | 1 |
| AMZ-N2 | 320,1 | 2.60 | 7 | 1 |
| AMTAC01 | 376,1 | 5.11 | 5 | 1 |
| AMTAC02 | 390,1 | 5.59 | 5 | 1 |
| AMTAC03 | 406,1 | 4,98 | 6 | 1 |

Todos os compostos relatados foram encaminhados para laboratórios parceiros para a realização da confirmação estrutural dos compostos (UFPE) e avaliação da atividade antitumoral (UFRN). No entanto, devido à greve das Universidades Federais no período de execução dos projetos, apenas três dos compostos foram tiveram suas estruturas elucidadas, porém, devido à similaridade entre as rotas sintéticas bem como os resultados físico-químicos (aparência, faixa de fusão e fator de retenção), acredita-se que os produtos obtidos são os desejados com grau de pureza relativamente aceitável. Os compostos elucidados estruturalmente foram: **AMZ-Bz**, **AMTAC01** e o **CCH** (Apêndices). Aguardamos ainda a confirmação estrutural dos demais produtos, bem como os resultados dos testes biológicos. Na tabela 5 estão dispostos os resultados de RMN ^1H e RMN ^{13}C .

Tabela 5 – Compostos sintetizados e seus respectivos deslocamentos

| Composto | RMN | |
|----------|--|--|
| | ^1H | ^{13}C |
| AMTAC01 | $\delta= 9,86$ ppm (1H, s, NH); $\delta= 8,56$ ppm (1H, s, CH); $\delta= 8,39$ ppm (1H, s, CH); $\delta= 7,30$ ppm (7H, m, aromático); $\delta= 7,02$ ppm (4H, m, aromático); $\delta= 6,83$ ppm (3H, m, aromático) | $\delta= 160$ ppm; $\delta= 147$ ppm; $\delta= 138$; $\delta= 133$ ppm; $\delta= 130$ ppm; $\delta= 128$ ppm; $\delta= 127$ ppm; $\delta= 126$ ppm; $\delta= 120$ ppm; $\delta= 115$ ppm; $\delta= 112$ ppm; $\delta= 111$ ppm; $\delta= 108$ ppm; $\delta= 68$ ppm |
| AMZ-Bz | $\delta= 11,962$ ppm (1H, s, NH); $\delta= 8,46$ ppm (1H, s, CH); $\delta= 8,28$ ppm (1H, s, CH); $\delta= 8,17$ ppm (1H, m, aromático); $\delta= 7,74$ ppm (2H, m, aromático); $\delta= 7,61$ ppm (3H, s, aromático); $\delta= 7,46$ ppm (3H, s, aromático) | $\delta= 158$ ppm; $\delta= 151$ ppm; $\delta= 149$ ppm; $\delta= 133$ ppm; $\delta= 132$ ppm; $\delta= 131$ ppm; $\delta= 131$ ppm; $\delta= 130$ ppm; $\delta= 129$ ppm; $\delta= 128$ ppm; $\delta= 127$ ppm; $\delta= 116$ ppm; $\delta= 105$ ppm |
| CCH | $\delta= 9,90$ ppm (1H, s, NH); $\delta= 3,81$ ppm (1H, s, CH ₂); $\delta= 2,35$ ppm (2H, t, ciclohexil); $\delta= 2,25$ ppm (2H, t); $\delta= 1,66$ ppm (6H, m) | $\delta= 165$ ppm; $\delta= 159$ ppm; $\delta= 114$ ppm; $\delta= 77$ ppm; $\delta= 77$ ppm; $\delta= 76$ ppm; $\delta= 35$ ppm; $\delta= 27$ ppm; $\delta= 26$ ppm; $\delta= 25$ ppm; $\delta= 25$ ppm; $\delta= 24$ ppm |

simpleto (s); duplete (d); tripleto (t); multiplete (m).

Para o composto AMTAC01 observamos um pico em 9,86 ppm referente ao sinal do NH, seguido de mais dois picos em 8,56 e 8,39 ppm referentes às condensações com os aldeídos, além dos sinais dos aromáticos na faixa de 7,34 a 8,31 ppm.

Para o composto AMZ-Bz, observamos um pico em 11,96 ppm, caracterizando também o NH, além de mais dois picos em 8,46 e 8,28 ppm, referentes aos CH das condensações com os aldeídos, não sendo observados traços de sinais de aldeídos no espectro.

Para o composto CCH, observamos um sinal de NH em 9,9 ppm, não apresentando nenhum outro sinal característico da hidrazida.

Para os testes de *A. salina* não foi encontrado nenhum tipo de pacote estatístico para os dados obtidos, sendo o Probit ineficaz e gerando valores negativos para a CL₅₀ dos compostos. Diante disso, optamos por incluir apenas as faixas de concentração em que provavelmente se encontrará os valores de CL₅₀ destas drogas. As médias de náuplios mortos nas diferentes concentrações se encontram dispostas na tabela 6.

Tabela 6 – Média de náuplios mortos em diferentes concentrações de derivados da série AMZ

| Composto | Concentração (µ/mL) | | | | |
|----------|---------------------|------|------|------|------|
| | 500 | 100 | 50 | 10 | 5 |
| AMZ | 8.66 | 1.33 | 1 | 2 | 0.33 |
| AMZ-Bz | 9.33 | 4.33 | 3.66 | * | 0.33 |
| AMZ-F1 | 6.33 | 1.33 | 2.33 | 0.33 | 2 |
| AMZ-N1 | 9 | 1 | 0.33 | 0.33 | * |
| AMTAC01 | * | 1 | 0.66 | 0.33 | 0.33 |
| Controle | | | * | | |

* Não houve indivíduos mortos

No que diz respeito aos testes de CIM, os compostos AMZ, AMZ-Bz, AMZ-F1 e AMZ-N1 não apresentaram atividade antimicrobiana frente à cepas de *S. mutans*. Em contrapartida, encontrou-se a CIM para o composto AMTAC01, sendo esta de 400 µg/mL, que de qualquer forma, demonstra baixa atividade antibacteriana para *S. mutans*. Os resultados dos testes de CIM encontram-se dispostos na tabela 7.

Tabela 7 – Concentração Inibitória Mínima de derivados da série AMZ frente a *S. mutans*

| Composto | <i>Streptococcus mutans</i> |
|-------------|-----------------------------|
| AMZ | N.A |
| AMTAC01 | 400 µg/mL |
| AMZ-Bz | N.A |
| AMZ-F1 | N.A |
| AMZ-N1 | N.A |
| Clorexidina | 0.2 µg/mL |

N.A: Não apresentou atividade

De acordo com as regras de Lipinski, para apresentar boa solubilidade e permeabilidade em sistemas biológicos, os compostos devem apresentar $\log P \leq 5$, peso molecular ≤ 500 g/mol, grupos aceptores de hidrogênio ≤ 10 e grupos doadores de hidrogênio ≤ 5 .

Problemas com a baixa solubilidade dos compostos podem ter interferido nos resultados, levando os compostos a não apresentarem atividade antimicrobiana. No entanto, quando analisamos os valores do Log de P teórico dos compostos testados e comparamos a outros derivados acilidrazônicos, como os sintetizados por Oliveira et al. (2012), constatamos que compostos com valores de log de P semelhantes aos nossos compostos apresentam atividade antibacteriana superior. A boa atividade antibacteriana encontrada no trabalho supracitado pode estar relacionada aos grupos que foram combinados com a porção acilidrazônica e já possuem um histórico para tal atividade, por exemplo, o nitrofurano (figura 10).

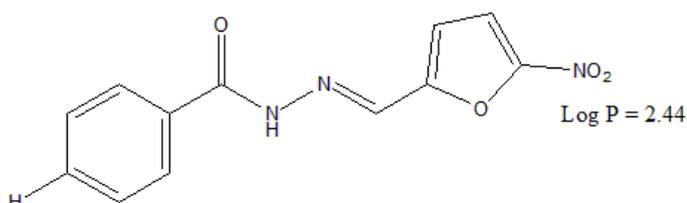


Figura 10. Composto com atividade antibacteriana frente a cepas multirresistentes

Com isso acreditamos que a falta de atividade antibacteriana não está apenas relacionada com a baixa solubilidade dos compostos, pois os mesmos foram selecionados de acordo com seus log de P teóricos, assim podemos atribuir a falta de atividade aos aldeídos

utilizados, uma vez que o que apresentou indicio de atividade foi o AMTAC01, que de todos os compostos testados apresenta o maior log de P teórico, como também a cepa testada que provavelmente não é sensível às drogas.

Cachiba et al.(2012) não encontraram resultado antibacteriano muito significativos para testes com bactérias. No trabalho desenvolvido, eles avaliaram a eficácia de derivados acilidrazônicos frente a três espécies de bactérias *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*, sendo utilizada uma cepa de cada espécie.

Os resultados da avaliação antimalárica frente ao protozoário *P. falciparum* estão dispostos na tabela 8.

Tabela 8 – Atividade antimalárica frente à *P. falciparum*

| Composto | [] μM | % Inibição |
|----------|-------------------|------------|
| AMTAC01 | 10 | 81,37 |
| AMTAC02 | 10 | 60,85 |
| AMTAC03 | 10 | 26,73 |

Analisando a estruturas dos compostos testados para a cepa W2 de *P. falciparum* observamos que a única diferença estrutural é a presença do grupo metoxila (AMTAC02) e o grupamento metil (AMTAC03) na posição 4 do benzilideno em relação ao composto mais ativo, o AMTAC01 (figura 11). Vários parâmetros podem estar relacionados à perda de atividade, dentre eles a solubilidade no meio testado, parâmetros estéricos e eletrônicos. Entretanto, parece estar claro que grupos doadores ligados ao anel benzilidênico não favorecem à atividade farmacológica

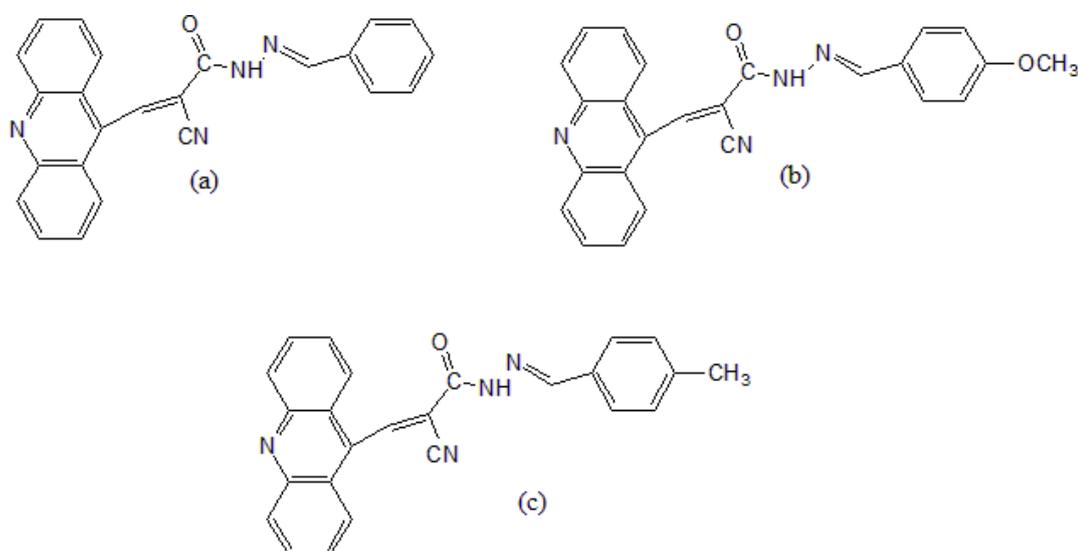


Figura 11. Diferenças estruturais entre os compostos AMTAC01, AMTAC02 e AMTAC03

Gemma et al. (2006) também relataram atividade antimalárica de compostos derivados acridinilhidrazônicos contra cepas de *P. falciparum* resistentes à cloroquina (figura 12).

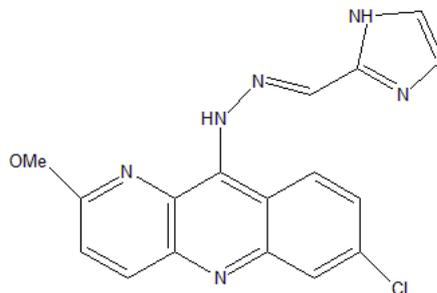


Figura 12. Derivado acridinilhidrazônico com atividade antimalárica constatada

Além disso, tais autores observaram perda de atividade antimalárica de compostos acridinilhidrazônicos quando eram inseridos substituintes com característica doadora de elétrons no grupo arilideno. Tal resultado corrobora com a nossa proposição sobre substituintes no anel benzilidênico.

6. Considerações Finais

No total, foram sintetizados 16 compostos. Destes, 5 foram intermediários (AMH, AMP, AMT, AMZ e CCH), que apresentaram rendimentos satisfatórios, variando de 48,53 a 96,96%, e 11 compostos finais, dos quais apresentaram os melhores rendimentos o AMTAC01 e o AMZ-C11 (79,82% e 72,6%,) respectivamente.

Três compostos foram caracterizados estruturalmente por RMN ^1H e ^{13}C , sendo estes, o AMTAC01, o AMZ-Bz e o CCH.

Devido a ausência de pacote estatístico para os dados analisados, não foi possível calcular a CL_{50} dos compostos submetidos a testes de citotoxicidade frente a *Artemia salina*, portanto, foi verificada a média de náuplios mortos nas diferentes concentrações testadas para os compostos AMZ, AMZ-Bz, AMZ-F1, AMZ-N1 e AMTAC01.

Os mesmos compostos tiveram suas propriedades antimicrobianas avaliadas através da busca pela Concentração Mínima Inibitória frente a uma cepa de *Streptococcus mutans*, sendo o AMT-AC01 o único ativo na concentração de 400 $\mu\text{g/mL}$.

A atividade preliminar frente à *P. falciparum* revelou mostrou que o derivado AMTAC01 é um potencial candidato a fármaco contra malária, apresentando uma inibição de crescimento de 81,37% em uma concentração de 10 μM .

7. Referências Bibliográficas

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Descrição dos meios de cultura empregados nos exames microbiológicos.** Disponível em : <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/microbiologia/mod_4_2004.pdf> Acesso em : 02 de dezembro de 2012.

ALMEIDA, V.M. ; DE ALMEIDA, G. C. ; DE ANDRADE, J. J. *et al.* Síntese de Hidrazidas e N-acil-aril-hidrazonas, potencialmente bioativas, derivadas do Azabicyclo Pirrolidina[3,2-d]2-isoxazolina. *In: Anais da 25ª Reunião da Sociedade Brasileira de Química*, Poços de Caldas, 2002.

ALVES, E. G.; VINHOLIS, A. H. C.; CASEMIRO, L. A. *et al.* Estudo comparativo de técnicas de *screening* para avaliação da atividade anti-bacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Química Nova**, v.31, n.5, p. 1224-1229, 2008.

ALVES, T. M. S.; SILVA, C. A.; SILVA, N. B. *et al.* Atividade antimicrobiana de produtos fluoretados sobre bactérias formadoras de biofilme dentário: Estudo *in vitro*. **Pesq. Bras. Odontoped. Clin. Integr.**, v.10, n.2, 2010.

ÁVILA, R.M.D.; VIEGAS JÚNIOR, C.; VELOSO, M.P. Síntese de derivados piperidino-hidrazônicos planejados como potenciais inibidores da enzima pteridina redutase (PTR1). *In: Anais da 32ª Reunião da Sociedade Brasileira de Química*, Fortaleza, 2009.

AUGUSTO, C. V. DA SILVA, Y. K. C.; MOREIRA, M. S. A. *et al.* Novas N-acilidrazonas Pirazínicas antiinflamatórias e analgésicas, desenhadas por otimização do protótipo LASSBio-1018. *In: Anais da 31ª reunião da Sociedade Brasileira de Química*, Águas de Lindóia, 2008.

BALLINI, M. B. Estudo de fatores de virulência de *Streptococcus mutans* e componentes da saliva na susceptibilidade à cárie em crianças. **Dissertação (Mestrado) – Pós-graduação em Ciências da Saúde**, Universidade São Francisco, 2011.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M.; MIRANDA, A. L. P.; RODRIGUES, C. R. A química medicinal de novos de N-Acilidrazonas: Novos compostos-protótipos de fármacos analgésicos, antiinflamatórios e anti-trombóticos. **Química Nova**. v.25, n.1, 129-148, 2002.

BARROSO, J. A. Atividade do carvacrol e timol *in vitro* na inibição de *Streptococcus mutans* e experiência de cárie em crianças livres de cárie: um estudo longitudinal. **Dissertação (Mestrado) – Pós-graduação em Odontologia - Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem**, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

BENDER, C.R.; DORNELLES, L.; RODRIGUES, O. E. D. *et al.* Síntese de compostos com potencial atividade biológica: 1,3,4-oxidiazóis derivados de L-aminoácidos. *In: Anais da 25ª Jornada Acadêmica Integrada da Universidade Federal de Santa Maria*, Santa Maria, 2010.

BEDNARCZUK, V. O. ; VERDAM, M. C. S. ; MIGUEL, M. D. *et al.*. Testes *In Vitro* e *In Vivo* utilizados na triagem toxicológica de produtos naturais. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v.11, n.2, p. 43-50, 2010.

BISPO JÚNIOR, W.; ALEXANDRE-MOREIRA, M. S.; ALVES, M. A. *et al.* Analgesic and Anti-Inflammatory activities of Salicylaldehyde 2-Chlorobenzoyl Hydrazone (H₂LASSBio-466), Salicylaldehyde 4-Chlorobenzoyl Hydrazone (H₂LASSBio-1064) and Their Zinc (II) Complexes. **Molecules**, v.16, 2011.

CACHIBA, T. H.; CARVALHO, B. D.; CARVALHO, D. T. *et al.* Síntese e avaliação preliminar da atividade antibacteriana e antifúngica de derivados *N*-acilidrazônicos. **Química Nova**, v.35, n.8, p;1566-1569, 2012.

CAIXEIRO, J. M. R. Dialquilfosforidilidrazonas e *N,N'* Bis(Diisobutilfosforiltioamida)diaminas: Síntese, caracterização, modelagem molecular e estudo da atividade biológica. **Tese de doutorado**, Instituto de Ciências exatas – Programa de Pós-graduação em Química orgânica, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2007.

CAMARGO, E. P. Malária, maleita, paludismo. **Cienc. Cult.**, v.55, n.1, p.26-29, 2003

CARDONA, A. A.; TORRES, F.; ECHEVERRI, F. *et al.* Síntesis, Caracterización y Evaluación de Actividad Leishmanicida de Acil Hidrazonas. **Actualidades Biológicas**, 27, p.58, 2005.

CARIGNANI, F. L.; BRAZ, L. M. A.; AMATO NETO, V. *et al.* Avaliação da atividade antiparasitária do alopurinol, referente ao *Trypanosoma cruzi*, em sistema experimental que utiliza triatomíneos infectados. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.33. n.6, p.613-615, 2000.

CARVALHEIRO, J. R. Epidemias em escala mundial e no Brasil. **Estudos avançados**, v.22, n.64, 2008.

CARVALHO, C.S.; de MELO, E.J.T.; TENÓRIO, R.P; GÓES, A.J.S. Anti-parasitic action and elimination of intracellular *Toxoplasma gondii* in the presence of novel

thiosemicarbazone and its 4-thiazolidinone derivatives. **Braz J Med Biol Res**, v.43, n.2, p. 139-149, 2010.

CASTRO, R.A. Avaliação do Potencial Analgésico e Anti-inflamatório do Composto Pirazólico 1,5-difenil-3-hidrazinopirazol(a) – DHP. **Dissertação (Mestrado) – Instituto de Medicina Veterinária**, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2011.

CAVALCANTI, Y. W.; ALMEIDA, L. F. D.; PADILHA, W. W. N. Atividade antifúngica de três óleos essenciais sobre cepas de *Candida*. **Rev Odontol Bras Central**, v.20, n.52, 2011.

COSTA, C.F. ; PINHEIRO, A. C. ; ALMEIDA, M. V. *et al.* Síntese de novas *N*-acyl hidrazonas derivadas de aminoácidos potenciais agentes antituberculares. *In: Anais da 34ª Reunião da Sociedade Brasileira de Química*, Florianópolis, 2011.

DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.74, n.3, p.417-433, 2010.

DIAS, L.C. ; DESSOY, M. A. ; SILVA, J. J. N. *et al.* Quimioterapia da doença de chagas: Estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. **Química Nova**, v.32, n.9, p.2444-2457, 2009.

DUARTE, C. M. Novos derivados acilidrazônicos planejados como candidatos a fármacos analgésicos e antiinflamatórios. **Tese de Doutorado – Instituto de Química**, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

FERREIRA, A. A.; OLIVEIRA, P. M.; EVANGELISTA, P. M. *et al.* Atividades biológicas das partes aéreas de *Ipomoea cairica* (Convolvulaceae). **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.8, n.2, p.14-18, 2006.

GARCIA, L. P.; MAGALHÃES, L. C. G.; ÁUREA, A. P. *et al.* Epidemiologia das doenças negligenciadas no Brasil e gastos federais com medicamentos. **Texto para discussão**, Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada, Brasília, 2011.

GEMMA, S.; KUKREJA, G.; FATTORUSSO, C. *et al.* Synthesis of *N*1-arylidene-*N*2-quinolyl- and *N*2-acrydinyldrazones as potent antimalarial agents active against CQ-resistant *P. falciparum* strains. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.16, p.5384-5388, 2006.

GERALDO-MARTINS, V. R.; MARQUES, M. M. Aspectos microbiológicos, histopatológicos e clínicos da cárie radicular. **Rev Inst Ciênc Saúde**, v.27, n.1, p. 67-72, 2009.

IFA, D.R.; RODRIGUES, C. R. DE ALENCASTRO, R. B. *et al.* A possible molecular mechanism for the inhibition of cysteine proteases by salicylaldehyde *N*-acylhydrazones and related compounds. **Journal of Molecular Structure**, v.505, p.11-17, 2000.

JORDÃO, A. L. Planejamento e síntese de novos *N*-amino-triazóis e prospecção de atividade farmacológica. **Dissertação de Mestrado**, Programa de Pós-graduação em Química Orgânica – Instituto de Química, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2007.

LIMA, J. M.; SILVA, C.A.; ROSA, M.B. *et al.* Prospecção fitoquímica de *Sonchus oleraceus* e sua toxicidade sobre o microcrustáceo *Artemia salina*. **Planta Daninha**, Viçosa-MG, v. 27, n. 1, p. 7-11, 2009.

LIMA, L. M. Química Medicinal Moderna: Desafios e contribuição brasileira. **Química Nova**, vl. 30, n. 6, p.1456-1468, 2007.

LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W. *et al.* Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.23, p. 3-25, 1997.

LOBACK, V.B.; FIGUEIRA, C.D.; SILVA, E.F. Preparação de um intermediário triazínico, visando a síntese de novas hidrazonas com potencial atividade contra *T. cruzi*. In: **33ª Reunião da Sociedade Brasileira de Química**, Águas de Lindóia, 2010.

MACIEL, G. B. M. L.; MISSAWA, N. A. Descrição de fauna anofélica em área endêmica de malária no Município de Colniza, Estado de Mato Grosso, Brasil. **Epidemiol. Serv. Saúde**, v.21, n.1, p. 141-148, Brasília, 2012.

MACIEL, M.A.; PINTO, A.C.; VEIGA JUNIOR; V.F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química nova**, v.25, n.3, p.429-438, 2002.

MALIK, M. A.; AL-THABAITI, S. A.; MALIK, M. A. Syntesis, Structure Optimization and Antifungal Screening of Novel Tetrazole Ring Bearing Acyl-Hidrazones. **International Journal of Molecular Sciences**, v.13, 2012.

MANNETI, L. M. ; TURRA, A. F. ; TAKEMURA, O. S. *et al.* Avaliação das atividades antimicrobiana, citotóxica, moluscicida e antioxidante de *Bromelia antiacantha* Bertol. (Bromeliaceae). **Rev. Bras. Pl. Med.**, V.12, n.4, p.406-413, Botucatu, 2010.

MARTINS, C. H. G. *et al.* Determinação *in vitro* da atividade antibacteriana dos extratos brutos da casca e polpa farinácea de *Hymenaea courbaril* L. **Investigação**, v.10, p.37-43, 2010.

MATHEUS, M. E. ; OLIVEIRA, L. F. ; FREITAS, A. C. *et al.* Antinociceptive property of new 4-acyl-arylhydrazone pyrazole compounds. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 24, p. 1219-1222, 1991.

MELNYK, P.; LEROUX, V.; SERGHERAERT, C. *et al.* Design, synthesis and *in vitro* antimalarial activity of an acylhydrazone library. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v.16, p.31-35, 2006.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R. PUTNAM, J. E. *et al.* Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **J. Med. Plant Res.**, v.45, p.31, 1982.

MONTANARI, C. A. A química medicinal na próxima década. **Química Nova**, v.23, n.1, 134-137, 2000.

MOTA, M. L. Atividade antimalárica de plantas medicinais da biorregião do Araripe-CE em modelo murino – *Plasmodium berghei*. **Dissertação (Mestrado) – Pós graduação em Ciências Biológicas – Centro de Biociências**, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2009.

MOTA, R. A. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v.42, n.6, p.465-470, 2005.

MUÑOS, D. L.; CARDONA, D. P.; CARDONA, A. *et al.* Efecto de hidrazonas sobre amastigotes intracelulares de *Leishmania panamensis* y una proteasa de cisteína parasitaria. **Vitae**, v.13, n.2, p.5-12, 2006.

NAKANO, K.; NOMURA, R. OOSHIMA, T. *Streptococcus mutans* and cardiovascular diseases. **Japanese Dental Science Review**, v.44, p.29-37, 2007.

OLIVEIRA-FERREIRA, J.; LACERDA, M. V. G.; BRASIL, P. *et al.* Malaria in Brazil: na overview. **Malaria Journal**, v.9, n.1, p.1-15.

OSÓRIO-DE-CASTRO, C. G. S.; MIRANDA, E. S.; ESHER, A. *et al.* Conhecimentos, práticas e percepções sobre o tratamento da malária não complicada em municípios de alto risco da Amazônia Legal. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.16, supl. 1, 1445-1456, 2011.

OTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L. *et al.* Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.2, p.301-307, 2009.

PARISE, E. V.; ARAÚJO, G. C.; CASTRO, J. G. D. Situação epidemiológica da malária no Estado do Tocantins, Brasil, a partir da emancipação política e administrativa, 1989 a 2009. **Epidemiol. Serv. Saúde**, v.21, n.1, p. 129-140, Brasília, 2012.

PARRILHA, G.L. Complexos metálicos de hidrazonas, tiossemicarbazonas e lapachol: atividades farmacológicas e relações de estrutura-atividade. **Tese (Doutorado) – Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas**, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

PEGADO, F. J. N. Infecções orais por *Streptococcus spp.* e suas repercussões por via sistêmica: relevância clínica em Medicina Dentária? **Monografia (licenciatura em Medicina Dentária)**, Faculdade de Ciências da Saúde - Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2010.

PESSINI, G. L.; HOLETZ, F.B.; SANCHES, N.R. *et al.* Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de extratos de plantas utilizados na medicina popular. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.14 supl., p.21-24, 2003.

PETERSON, Q. P.; HSU, D.; GOODE, D. R. *et al.* Procaspase-3 Activation as an Anti-cancer Strategy: Structure-Activity Relationship of Procaspase-Activating Compound 1 (PAC-1) and Its Cellular Co-Localization with Caspase-3. **J. Med. Chem.**, 2009, v.52, p.721-731, 2009.

PINHATTI, V. R. Avaliação das atividades biológicas e genotóxicas em dois derivados de guanilhidrazonas. **Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

RAITZ, I. Síntese de derivados *N*-acilidrazônicos com potencial atividade parasitária. **Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Química**, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

REDDY, L.V.; SUMAN, A.; BEEVI, S. S. *et al.* Design and synthesis of 1-Aroyl-2-ylidene Hydrazines under conventional and microwave irradiation conditions and their cytotoxic activities. **J. Bra., Chem. Soc.**, v.21, n.1, p.98-104, 2010.

REIS, R. C. N. Síntese de surfactantes Derivados da D-ribolactona. **Dissertação de Mestrado – Departamento de Química**, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2007.

REIS, S. L. G. B. ; DE ALMEIDA, V. M. ; DE ALMEIDA, G. C. *et al.* Síntese e avaliação preliminar da atividade antinociceptiva de novas isoxazolil-aril-hidrazonas. **Química nova**, v.34, n.1, p.76-81, 2011.

ROCHA, D. P. Coordenação de metais a antibióticos como uma estratégia de combate à resistência bacteriana. **Química Nova**, v.34, n.1, 2011.

RODRIGUES, A. P. C.; COSTA, L. M. M.; DE MIRANDA, A. L. P. *et al.* Síntese e avaliação das propriedades antiagregante plaquetárias de novos compostos acil-hidrazônicos bioativos. *In: Anais do XI Encontro da SBQ-Rio de Janeiro*, Rio de Janeiro, 2007.

SALUM, L. B. Planejamento de ligantes da tubulina com propriedades antitumorais. **Tese (Doutorado) – Instituto de Física de São Carlos**, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

SAUZEM, P. D. Derivados pirazolidínicos inéditos causam antinocicepção em camundongos no teste da formalina. **Dissertação (Mestrado) – Pós graduação em Bioquímica toxicológica**, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2004.

SILVA, F. W. G. P.; ASSED, S.; DE QUEIROZ. *et al.* Impacto da adoção de medidas preventivas direcionadas a mães altamente infectadas sobre a saúde bucal do bebê. **Pediatria**, v.31, n.4, p. 274-280, 2009.

SILVA, J. Relevância social na pesquisa clínica. **Revista Bioética**, v.15, n.1, p.133-139, 2007.

SILVA, Y. K. C. ; AUGUSTO, C. V. ; DE CASTRO BARBOSA. *et al.* Synthesis and pharmacological evaluation of pyrazine *N*-acylhydrazone derivates designed as novel analgesic and anti-inflammatory drug candidates. **Bioorganic e Medicinal Chemistry**, v.18, p.5007-5015, 2010.

SILVA, V. A.; OLIVEIRA, C. R. M.; DE FREITAS, A. F. R. *et al.* Eficácia antimicrobiana do extrato do *Croton sonderianos* Müll. sobre bactérias causadoras da cárie dentária. **Revista de Odontologia da UNESP**, v.40, n.2, p.69-72, 2011.

SOUZA, W. *et al.* Doenças negligenciadas. **Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, 2010.

SLUIR-CREMER, N.; ARION, D.; PARNIAK, M. A. Destabilization of the HIV-1 Reverse Transcriptase Dimer upon interaction with *N*-Acyl Hydrazone Inhibitors. **Molecular Pharmacology**, v.62, n.2, 2002.

STEFANELLO, M. É. A.; SALVADOR, M. J.; ITO, I. Y. *et al.* Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica de extratos de *Gochnatia polymorpha* ssp *fl occosa*. Rev. Bras. Farmacogn. Braz J. Pharmacogn. v.16, n.4, 525-530, 2006. *In: 49º Congresso Brasileiro de Química*, 2009, Porto Alegre - RS. A Química e a Sustentabilidade, 2009. v. 49.

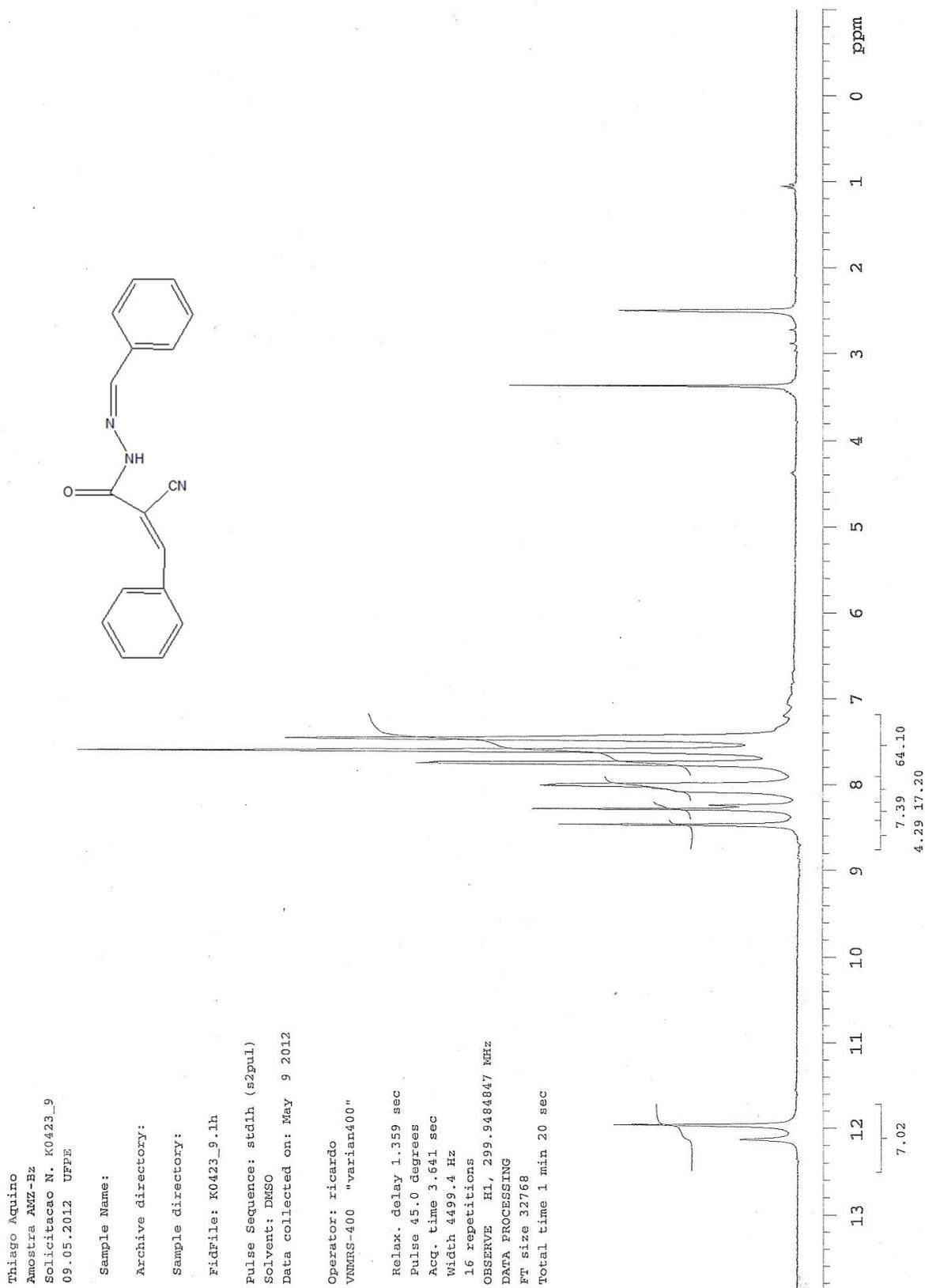
TEIXEIRA, J. R. M. Avaliação terapêutica da malária por *Plasmodium vivax*: perfil cinético da cloroquina e primaquina. **Tese (Doutorado) – Pós graduação em Biologia de Agentes Infeciosos e Parasitários**, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2011.

TIAN, B.; HE, M.; TAN, Z. *et al.* Synthesis and antiviral evaluation of New *N*-Acylhydrazones Containing Glycine Residue. **Chem Biol Drug Des**, v.77, p.189-198, 2011.

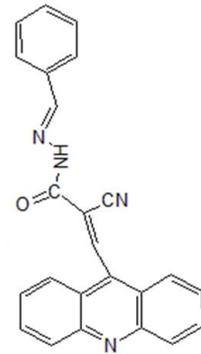
ZAMPIROLI, L. S. Dialquilfosforidilidrazonas derivadas de isatinas *N*-substituídas com potencial atividade biológica. **Dissertação de mestrado – Programa de Pós-graduação em Química**, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2009.

8. APÊNDICES

APÊNDICE A – Espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio do 3-fenil-2-ciano-aceto-benzilideno-hidrazida (AMZ-Bz)



APÊNDICE B – Espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio do 3-acridin-2-il-2-ciano-aceto-benzilideno-hidrazida AMTAC01 (AMZ-AC)



Thiago Aquino
Amostra AMZ-AC
Solicitacao N. K0423-12
10.05.2012 UFPE

Sample Name:

Archive directory:

Sample directory:

Fidfile: K0423_12.fh

Pulse Sequence: stdlh (s2pul)

Solvent: DMSO

Data collected on: May 10 2012

Operator: ricardo
VNMR-400 "varian400"

Relax. delay 1.359 sec

Pulse 45.0 degrees

Acq. time 3.641 sec

Width 4499.4 Hz

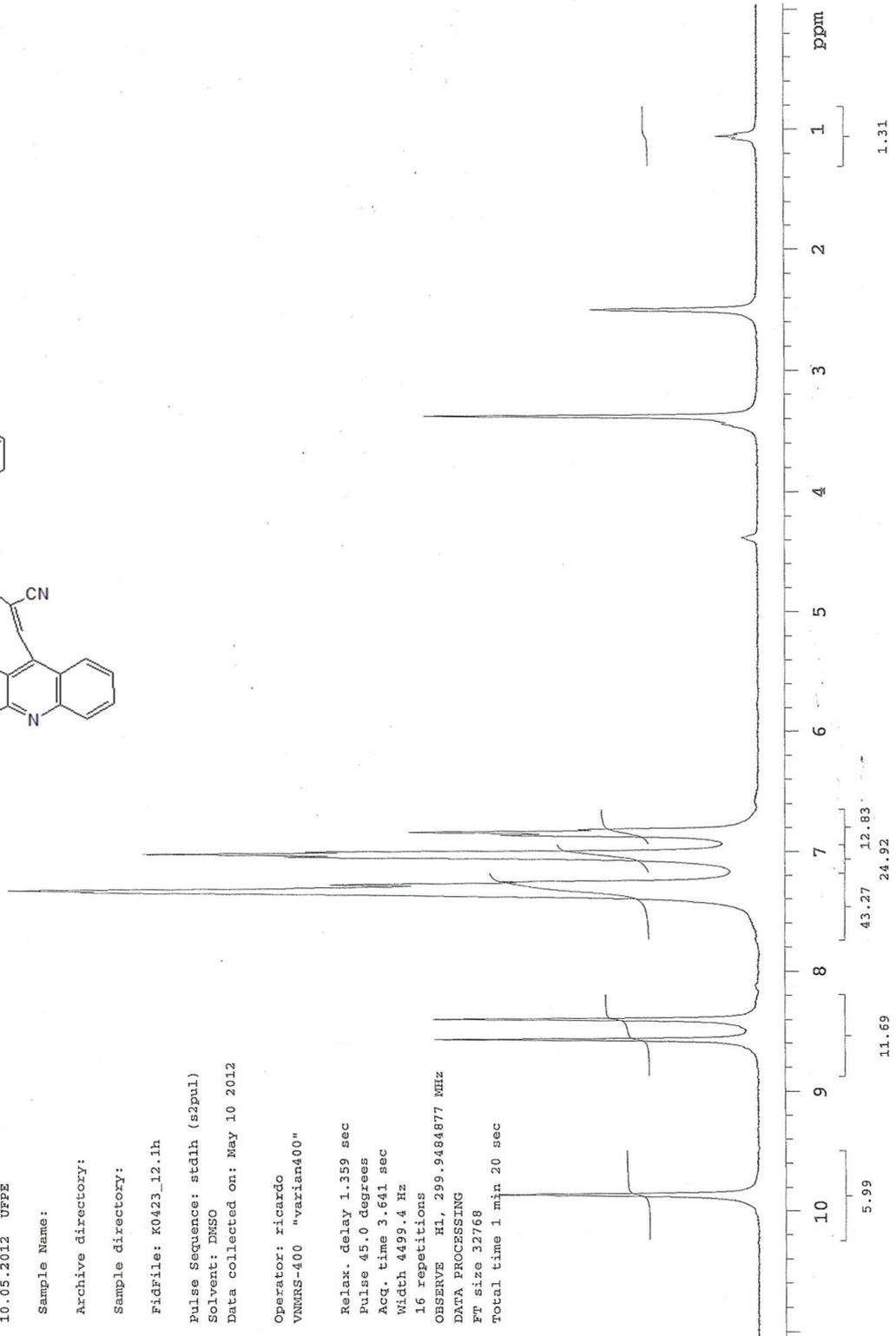
16 repetitions

OBSERVE H1, 299.9484877 MHz

DATA PROCESSING

FT size 32768

Total time 1 min 20 sec



APÊNDICE C – Espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio do 2-ciano-
aceto-ciclohexilideno-hidrazida (CCH)

Thiago Aquino
 Amostra CCH
 Solicitação N. K0423-7
 09.05.2012 UFPE

Sample Name:

Archive directory:

Sample directory:

File: K0423_7.1h

Pulse Sequence: stdlh (s2pul)

Solvent: CDCl₃

Data collected on: May 9 2012

Operator: ricardo

VNMRS-400 "varian400"

Relax. delay 1.359 sec

Pulse 45.0 degrees

Acq. time 3.641 sec

Width 4499.4 Hz

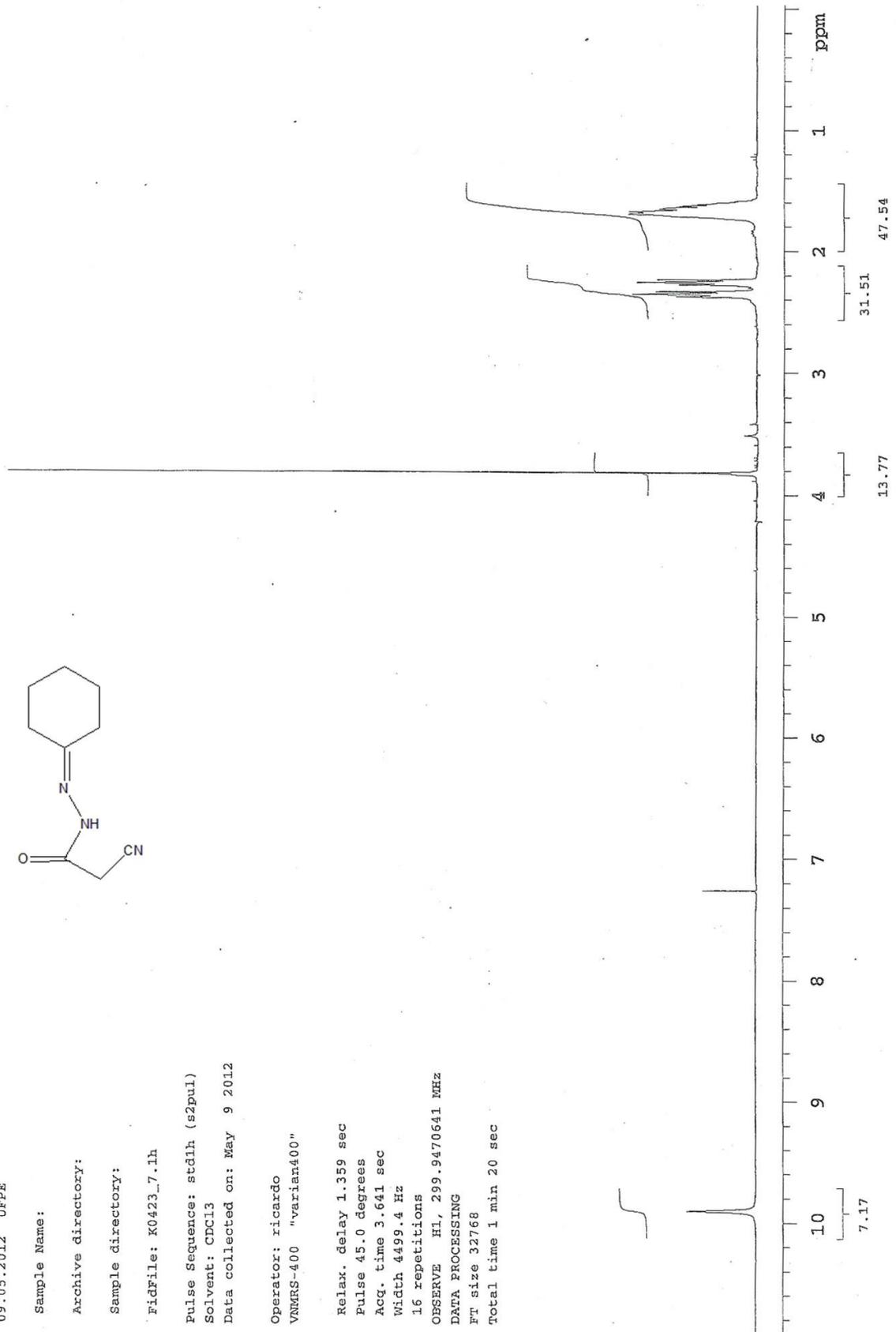
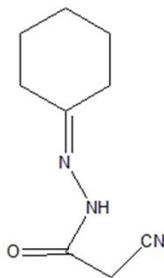
16 repetitions

OBSERVE H1, 299.9470641 MHz

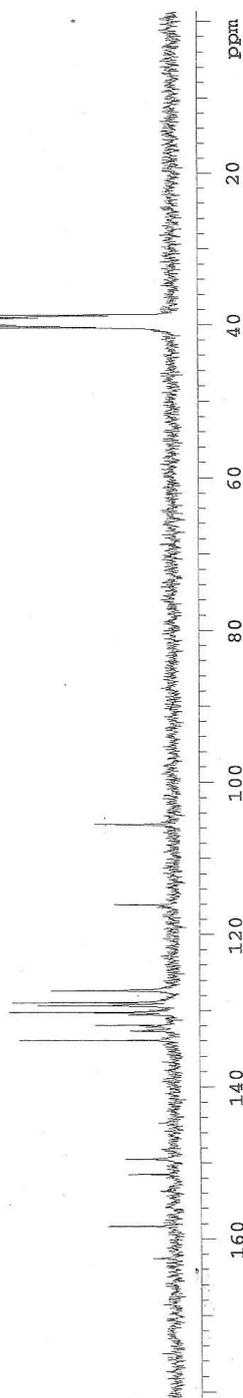
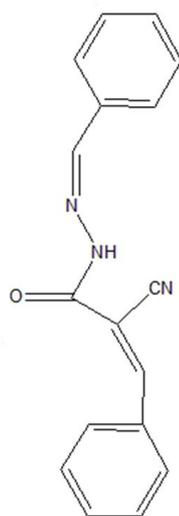
DATA PROCESSING

FT size 32768

Total time 1 min 20 sec

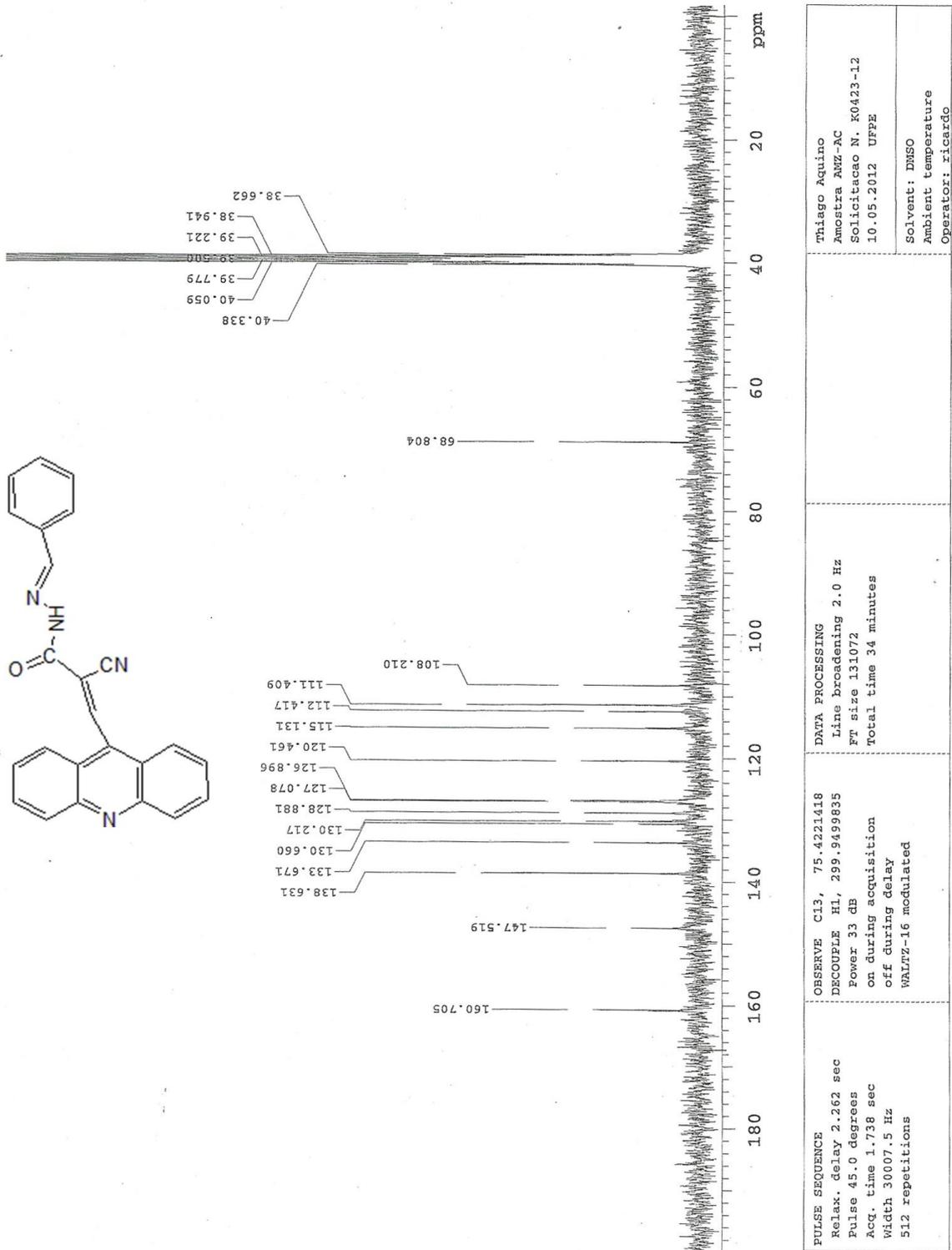


APÊNDICE D – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono do 3-fenil-2-ciano-aceto-benzilideno-hidrazida (AMZ-Bz)



| | | | |
|--|--|---|---|
| <p>PULSE SEQUENCE</p> <p>Relax. delay 2.262 sec</p> <p>Pulse 45.0 degrees</p> <p>Acq. time 1.738 sec</p> <p>Width 30007.5 Hz</p> <p>1024 repetitions</p> | <p>OBSERVE C13, 75.4221409</p> <p>DECOUPLE H1, 299.9499835</p> <p>Power 36 dB</p> <p>on during acquisition</p> <p>off during delay</p> <p>WALTZ-16 modulated</p> | <p>DATA PROCESSING</p> <p>Line broadening 2.0 Hz</p> <p>FT size 131072</p> <p>Total time 68 minutes</p> | <p>Thiago Aquino</p> <p>Amostra AMZ-Bz</p> <p>Solicitacao N. K0423_9</p> <p>09.05.2012 UFPE</p> |
| | | | <p>Solvent: DMSO</p> <p>Ambient temperature</p> <p>Operator: Ricardo</p> |

APÊNDICE E – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono do 3-acridin-2-il-2-ciano-aceto-benzilideno-hidrazida (AMTAC01 [AMZ-AC])



APÊNDICE F – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono do 2-ciano-ciclohexilideno-aceto-hidrazida (CCH)

