

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Exatas

Departamento de Química

Rafael Pinto Vieira

Estudo do perfil farmacológico de bases de Schiff e de
suas interações com metais

Belo Horizonte

2013

UFMG-ICEX/DQ-942^a

T. 421

Rafael Pinto Vieira

Estudo do perfil farmacológico de bases de Schiff e de
suas interações com metais

Tese apresentada ao
Departamento de Química do
Instituto de Ciências Exatas da
Universidade Federal de Minas
Gerais como requisito parcial
para a obtenção do grau de
Doutor em Ciências - Química

Belo Horizonte

2013

V657e
2013
T

Vieira, Rafael Pinto
Estudo do perfil farmacológico de bases de Schiff e
de suas interações com metais / Rafael Pinto Vieira.
2013.
xiv, 124 f. : il.

Orientadora: Heloisa de Oliveira Beraldo.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas
Gerais. Departamento de Química.
Inclui bibliografia.

1. Química Inorgânica - Teses 2. Schiff, Bases de -
Teses 3. Complexos metálicos - Teses 4. Inflamação -
Teses 5. Alzheimer, Doença de - Teses 6. Dor - Teses
7. Gálio - Teses 8. Zinco - Teses 9. Atividade
antifúngica - Teses I. Beraldo, Heloisa de Oliveira,
Orientadora II. Título.

CDU 043



"Estudo do Perfil Farmacológico de Bases de Schiff e de Suas Interações com
Metais"

Rafael Pinto Vieira

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Heloisa Beraldo

Profa. Heloisa de Oliveira Beraldo
UFMG

Maria Domingues Vargas

Profa. Maria Domingues Vargas
UFF

Julio Santos Rebouças

Prof. Julio Santos Rebouças
UFPB

Rosimíriam Pereira de Freitas

Profa. Rosimíriam Pereira de Freitas
UFMG

Ângelo de Fátima

Prof. Ângelo de Fátima
UFMG

Belo Horizonte, 25 de fevereiro de 2013.

O trabalho descrito nesta tese foi
realizado sob orientação da Profa.
Dra. Heloisa de Oliveira Beraldo.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Heloisa pela orientação, ensinamentos e amizade.

Aos meus pais, pelo apoio, oportunidades e exemplo de perseverança.

Aos meus irmãos, Heloisa, Maria Inês, Márcia e Francisco pelas experiências vividas. Agradeço especialmente à minha irmã Eliane pelo apoio nos últimos anos.

Aos meus sobrinhos Nathália, Gabriel, Augusto e Marina, pelo aprendizado e pela alegria de sempre.

Aos meus amigos de todos os cantos, por deixarem a vida sempre mais leve.

Aos colegas de doutorado Angel, Débora, Gabrieli, Josane, Luiza, Jeferson e Karina pela amizade, ensinamentos e diversão demonstrados no cotidiano.

Aos alunos de Iniciação Científica Ana Carolina, Fernanda Berlini, Mariany, Pedro, Sarah e Wallace, pelo auxílio, convivência e aprendizado.

Aos Professores e Pesquisadores Dr. Márcio de Matos Coelho, Leandro Silva Bastos, Dra. Isolda Maria de Castro Mendes, Dr. Nivaldo Speziali, Dr. Daniel de Assis Santos, Dr. Willian Rocha, Dra. Maria Aparecida Gomes, Dr. Eliézer Barreiro e Dra. Lúcia Lima pelos ensinamentos adquiridos durante as parcerias de trabalho.

Aos Professores Dr. Chris Orvig e Dr. Tim Storr pela oportunidade de trabalho em conjunto no Canadá.

Aos colegas de trabalho do Storr lab e a todos que conheci durante o estágio sanduíche no Canadá, fazendo-o ainda mais prazeroso e produtivo.

Às secretárias do Programa de Pós-graduação em Química da UFMG, Paulete, Lilian e Tatiane, pela atenção durante todo o doutorado.

Aos professores e colegas do Departamento de Química pela amizade e ensinamentos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

Resumo

O presente trabalho consistiu no preparo, estudo das propriedades físico-químicas e do perfil farmacológico de semicarbazonas, tiosemicarbazonas, hidrazonas e seus complexos metálicos.

Uma vez que benzaldeído semicarbazona (BS) mostra atividades anti-inflamatória, antinociceptiva e contra a dor neuropática, foram preparados no presente trabalho os análogos 2-, 3- e 4-hidroxibenzaldeído semicarbazona (2-, 3- e 4-OHBS). Foi realizado um estudo correlacionando espectros de RMN, dados cristalográficos e resultados de cálculos teóricos das energias dos isômeros conformacionais mais estáveis e propriedades físico-químicas para BS, 2-OHBS, 3-OHBS e 4-OHBS. Concluiu-se que 2-OHBS seria o composto mais suscetível a um ataque nucleofílico e conseqüente à hidrólise. Valores de logP experimentais e calculados permitiram afirmar que BS e 2-OHBS são compostos mais hidrofóbicos que 3-OHBS e 4-OHBS.

2-OHBS, 3-OHBS e 4-OHBS foram avaliados em protocolos *in vivo* de caracterização das atividades antinociceptivas e anti-inflamatórias, utilizando BS como controle positivo. Apenas 2-OHBS induziu efeito antinociceptivo estatisticamente significativo quando comparado a BS nos modelos do *Zymosan*, do formaldeído e do edema de pata induzido por carragenina. Na avaliação da atividade antinociceptiva no modelo do formaldeído, 2-OHBS inibiu apenas a segunda fase, caracterizando-se como um protótipo de fármaco com atividade anti-inflamatória e analgésica relacionadas a mecanismos periféricos, diferentemente de BS, que é ativo na fase neurogênica e na segunda fase do modelo.

Com o objetivo de correlacionar as atividades biológicas de BS e 2-OHBS à suscetibilidade de hidrólise dos compostos e às suas propriedades físico-químicas, avaliou-se a atividade do produto de hidrólise semicarbazida nos modelos do edema em pata de rato e no modelo do formaldeído. A semicarbazida é um dos principais produtos de hidrólise das arilsemicarbazonas e um conhecido inibidor da enzima VAP-1, relacionada aos processos inflamatórios. Os resultados permitiram sugerir que a atividade periférica das arilsemicarbazonas, principalmente em modelos de dor aguda, estaria relacionada à hidrólise parcial do composto, formando semicarbazida *in vivo*. Paralelamente, a semicarbazida não apresentou atividade na fase neurogênica do modelo, reforçando a hipótese de que a atividade de BS na primeira fase estaria associada a um mecanismo não relacionado à hidrólise da semicarbazona.

Em uma segunda etapa, foi avaliada a cinética de hidrólise de BS e 2-OHBS em meio gástrico simulado com o objetivo de relacionar os aspectos cinéticos aos termodinâmicos (cálculos teóricos) anteriormente discutidos. Além disso, avaliou-se a influência do composto de inclusão de BS em β -ciclodextrina (BS β CD) sobre a biodisponibilidade de BS após

administração *per os*, na tentativa de elucidar a influência da β CD na farmacocinética da semicarbazona. Observou-se que a velocidade média de hidrólise de 2-OHBS foi aproximadamente quatro vezes superior à de BS, confirmando a tendência evidenciada nos cálculos teóricos e permitindo sugerir que, termodinâmica e cineticamente, 2-OHBS seria mais suscetível à hidrólise que BS. Na avaliação da influência de β CD no processo de hidrólise de BS, observou-se que as velocidades iniciais de hidrólise de BS, de BS no composto de inclusão BS β CD ou de BS simplesmente misturado a β CD são estatisticamente equivalentes.

Complexos de 2-OHBS com zinco(II) e gálio(III) foram preparados, e avaliados quanto à sua atividade antifúngica em diferentes cepas e isolados clínicos de *Candida* e *Trychophyton rubrum*. O complexo [Zn(2OBS)AcO] não apresentou atividade significativa, ao passo que os resultados para o complexo [Ga₂(2OBS)₃] sugeriram que a atividade antifúngica do composto estaria relacionada exclusivamente ao metal. A atividade antifúngica de Ga(NO₃)₃ frente a quatro cepas/isolados clínicos de *Trychophyton rubrum* diminuiu na presença de concentrações crescentes de Fe(NO₃)₃, evidenciando que o mecanismo de ação antifúngica do gálio(III) poderia estar relacionado à substituição de ferro(III) por gálio(III) ou ao bloqueio de processos redox ferro-dependentes nos meios biológicos. Os resultados demonstraram, pela primeira vez na literatura, a atividade antifúngica do gálio(III) frente a *Trychophyton rubrum*.

Uma vez que íons cobre(II) e zinco(II) poderiam estar associados à indução de agregação do peptídeo β -amilóide (β A) em cérebros de pacientes com a Doença de Alzheimer (DA), foram obtidos os agentes quelantes pentadentados 2,6 diacetilpiridina *bis*(tiossemicarbazona) (DAPT), 2,6 diacetilpiridina *bis*(semicarbazona) (DAPS) e 2,6 diacetilpiridina *bis*(hidrazona) (DAPH) para serem avaliados em modelos *in vitro* de DA.

DAPT e DAPH mostraram-se insolúveis nas condições do teste de turbidez, sugerindo que modificações em suas estruturas seriam necessárias para aumentar a solubilidade. Os resultados dos testes de inibição da agregação do peptídeo β A₁₋₄₀ induzida pelos metais mostraram que DAPS é capaz de inibir a agregação do peptídeo nas condições do teste. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET) confirmaram a atividade anteriormente evidenciada pelo teste de turbidez. Estes resultados demonstraram o potencial de *bis*(tiossemicarbazonas), *bis*(semicarbazonas) e *bis*(hidrazonas) como agentes quelantes úteis na terapêutica da DA.

O presente trabalho é uma importante contribuição ao estudo de bases de Schiff na Química Medicinal, uma vez que demonstrou que esses compostos seriam potencialmente úteis no tratamento da dor, inflamação e doença de Alzheimer (DA).

Palavras-chave: bases de Schiff, dor, inflamação, Doença de Alzheimer

Abstract

The present work involved the preparation and a study on the physicochemical properties and pharmacological activities of semicarbazones, thiosemicarbazones, hydrazones and their metal complexes.

Since benzaldehyde semicarbazone (BS) presents anti-inflammatory and antinociceptive properties, including activities on central pain conditions, the analogues 2-, 3- and 4-hydroxybenzaldehyde semicarbazones (2-, 3- and 4-OHBS) were prepared in the present work. A study correlating NMR spectra, crystallography data and theoretical calculations of the conformational isomers' energies and physicochemical properties of BS, 2-OHBS, 3-OHBS and 4-OHBS was performed. According to the results, 2-OHBS was the compound presenting the highest susceptibility to nucleophilic attack and subsequent hydrolysis. Besides, theoretical and experimental octanol-water partition coefficients are in accordance to higher hydrophobicity of BS and 2-OHBS in comparison with 3-OHBS and 4-OHBS.

The antinociceptive and anti-inflammatory properties of 2-OHBS, 3-OHBS and 4-OHBS were evaluated in animal models using BS as positive control. Among the three isomers, only 2-OHBS presented statistically different antinociceptive effect in comparison to BS in Zymosan, formaldehyde and carrageenan-induced paw edema models. 2-OHBS inhibited exclusively the second phase of formaldehyde protocol, being characterized as an inhibitor of peripheral mechanisms of pain and inflammation. In contrast, BS acts on both, neurogenic (first) and inflammatory (second) phases of the formalin model.

In order to correlate the biological activities of BS and 2-OHBS to their susceptibilities to hydrolysis and physicochemical properties, the immediate product of hydrolysis, semicarbazide, was evaluated in the formaldehyde and carrageenan-induced paw edema models. Semicarbazide is a well-known inhibitor of VAP-1, an enzyme strictly related to inflammatory processes. Results suggested that the peripheral activity of arilsemicarbazones, mainly in acute pain models, would be related to partial hydrolysis of the compounds, releasing semicarbazide *in vivo*. Besides, semicarbazide didn't present activity in neurogenic phase of the formaldehyde model, indicating that the activity of BS in first phase could be due to a particular mechanism, non-related to its hydrolysis.

In a second step, the kinetics of hydrolysis of BS and 2-OHBS were evaluated in simulated gastric fluid in order to correlate their kinetic and thermodynamics (theoretical calculations) properties. Furthermore, the kinetics of hydrolysis of BS in its inclusion compound with β -cyclodextrin (BS β CD) and of BS mixed β CD were investigated in order to evaluate the influence of β CD on the semicarbazone's pharmacokinetics. It was observed that the initial rate of hydrolysis of 2-OHBS was about 4-fold higher than that BS, confirming the tendency previously established by theoretical calculations. Thus, results suggest that 2-OHBS would be

more susceptible to hydrolysis in comparison do BS, both kinetically and thermodynamically. The initial rate of hydrolysis of BS, BS β CD or a mixture of BS with β CD were statistically equivalent.

Complexes of zinc(II) and gallium(III) with 2-OHBS were synthesized and evaluated as antifungal agents. Compounds were evaluated for their antifungal activities against *Candida* and *Trichophyton rubrum* strains and clinical isolates. The complex [Zn(2OBS)AcO] did not show significant activity. Besides, results for [Ga₂(2OBS)₃] suggested that the antifungal activity of the compound would be related to the metal itself. The antifungal activity of gallium nitrate decreased against four strains and clinical isolates of *Trichophyton rubrum* in the presence of increasing concentrations of iron nitrate suggesting that the mechanism of antifungal action of galium(III) could be related to replacement of iron(III) by galium(III) or to the disruption of iron-related redox processes in biological media. Results showed for the very first time the antifungal activity of galium(III) against *Trichophyton rubrum*.

Since copper(II) and zinc(II) can be related to the aggregation process of amyloid β (A β) peptide in the brain of Alzheimer's disease (AD) patients, the pentadentate chelators 2,6-diacetylpyridine *bis*(thiosemicarbazone) (DAPT), 2,6-diacetylpyridine *bis*(semicarbazone) (DAPS) and 2,6-diacetylpyridine *bis*(hydrazone) (DAPH) were prepared and evaluated in *in vitro* models of AD. DAPT and DAPH were insoluble in the turbidity test conditions, suggesting structural modifications of these compounds would be necessary in order to increase their solubility in aqueous medium. Results of the anti-aggregation assay using A β ₁₋₄₀ in the presence of metals showed that DAPS is able to inhibit peptide's aggregation in turbidity test conditions. Transmission electron microscopy (TEM) images confirmed the results obtained in the turbidity test. These results showed the potential of *bis*(thiosemicarbazones), *bis*(semicarbazones) and *bis*(hidrazones) as promising chelating agents for AD therapy.

The present work is an important contribution to the study of the role of Schiff's bases in Medicinal Chemistry, since these compounds proved to be potentially useful for the treatment of pain, inflammation, and Alzheimer's disease.

Keywords: Schiff bases, pain, inflammation, Alzheimer's disease

Índice de figuras

Figura 1.1. Estrutura do Salvarsan	2
Figura 1.2. Estruturas da cisplatina (A) e da auranofina (B)	2
Figura 1.3. Estrutura genérica das tiossemicarbazonas (A), semicarbazonas (B) e hidrazonas (C), onde R, R ₁ , R ₂ , R ₃ = H, alquila, arila	3
Figura 1.4. Estrutura de benzaldeído semicarbazona (BS)	4
Figura 1.5. Esquema indicando vias para produção de mediadores inflamatórios, como prostaglandinas e leucotrienos, a partir de lesão tecidual	5
Figura 1.6. Representação esquemática das diferenças entre o cérebro sadio e o cérebro de um paciente com doença de Alzheimer (DA), evidenciando a presença de emaranhados de proteína tau e agregado de peptídeo β-amilóide	8
Figura 1.7. Inibidores de acetilcolinesterase utilizados na terapia da DA	9
Figura 1.8. Clioquinol, protótipo de fármaco utilizado na terapia quelante da AD	10
Figura 1.9. Estruturas da sulfanilamida (A) e penicilina G (B)	11
Figura 1.10. Fotomicrografia de <i>T. rubrum</i> (A) e dermatofitose causada por fungo (B).	12
Figura 1.11. Estruturas de antifúngicos utilizados no tratamento de dermatofitoses causadas por <i>T. rubrum</i>	12
Figura 1.12. Estrutura da β-ciclodextrina	16
Figura 2.1. Avaliação da resposta nociceptiva induzida por <i>Zymosan A</i> em camundongos	32
Figura 2.2. Avaliação da resposta nociceptiva induzida por formaldeído em camundongos	33
Figura 2.3. Avaliação da resposta anti-inflamatória no modelo do edema em pata de rato induzido por carragenina	34
Figura 3.1. Espectro de RMN de ¹ H (200 MHz) de 2-OHBS em DMSO- <i>d</i> ₆	37
Figura 3.2. Espectro de RMN de ¹³ C (50 MHz) de 2-OHBS em DMSO- <i>d</i> ₆ , com ampliação na região de 115 a 160 ppm	38
Figura 3.3. Isômeros <i>E</i> e <i>Z</i> para arilsemicarbazonas. R ₁ , R ₂ e R ₃ representam H ou OH	40
Figura 3.4. Mapa de contorno NOESY (200 MHz) de 2-OHBS em DMSO- <i>d</i> ₆ , evidenciando as correlações existentes e o isômero <i>E</i> relacionado. Em detalhe, ampliação da correlação N2H e H7, possível apenas no isômero <i>E</i>	40

Figura 3.5. Mapa de contorno NOESY (200 MHz) de 3-OHBS em DMSO- <i>d</i> ₆ , evidenciando as correlações existentes e o isômero <i>E</i> relacionado. Em detalhe, ampliação da correlação N2H e H7, possível apenas no isômero <i>E</i>	41
Figura 3.6. Mapa de contorno NOESY (200 MHz) de 4-OHBS em DMSO- <i>d</i> ₆ , evidenciando as correlações existentes e o isômero <i>E</i> relacionado. Em detalhe, ampliação da correlação N2H e H7, possível apenas no isômero <i>E</i>	42
Figura 3.7. Equilíbrio tautomérico imina-enamina de 2-hidroxibenzaldeído semicarbazona (2-OHBS) e 4-hidroxibenzaldeído semicarbazona (4-OHBS)	47
Figura 3.8. Distribuição das densidades LUMO para BS (A), 2-OHBS (B), 3-OHBS (C), 4-OHBS (D), 2-OHBS enamina (E) e 4-OHBS enamina (E) em meio aquoso. Positivo (cinza escuro) e negativo (cinza claro)	49
Figura 3.9. Curvas de calibração de BS em <i>n</i> -octanol saturado com tampão pH 7,4 (A) e BS em tampão pH 7,4 saturado com <i>n</i> -octanol (B)	50
Figura 3.10. Efeitos de benzaldeído semicarbazona (BS, 50 mg.kg ⁻¹) e 2-, 3- e 4-hidroxibenzaldeído semicarbazona (2-OHBS, A; 3-OHBS, B; e 4-OHBS, C) (55 e 110 mg.kg ⁻¹), i.p., -30 min, na resposta nociceptiva induzida por <i>Zymosan A</i> (i.p., 40 mg.kg ⁻¹) em camundongos, n = 8. * e ** estatisticamente significativos com relação ao veículo, p<0,05 e p<0,01, respectivamente	53
Figura 3.11. Efeitos de benzaldeído semicarbazona (BS, 25 mg.kg ⁻¹) e 2-hidroxibenzaldeído semicarbazona (2-OHBS, 20,6 e 27,5 mg.kg ⁻¹), i.p., -30 min, na resposta nociceptiva induzida por <i>Zymosan A</i> (i.p., 40 mg.kg ⁻¹) em camundongos, n = 6. ** estatisticamente significativo com relação ao veículo, p<0,01	53
Figura 3.12. Efeitos de benzaldeído semicarbazona (BS, 50 mg.kg ⁻¹) e 2-, 3- e 4-hidroxibenzaldeído semicarbazona (A, B e C; 55 e 110 mg.kg ⁻¹), i.p., -30 min, no edema em pata de rato induzido por carragenina (1%, 50 µl, i.pl.). O volume da pata foi medido 2, 4 e 6 horas após a injeção da carragenina. n = 5. ** estatisticamente significativo com relação ao veículo, p<0,01	54
Figura 3.13. Efeitos de benzaldeído semicarbazona (BS, 50 mg.kg ⁻¹) 2-hidroxibenzaldeído semicarbazona (2-OHBS; 27,5, 55 e 110 mg.kg ⁻¹), i.p., -30 min, na resposta nociceptiva induzida por formaldeído (s.c., 0,34%, 20 µL) em camundongos. n=5-6. * e *** estatisticamente significativos com relação ao veículo, p<0,05 e p<0,001, respectivamente	55

Figura 3.14. Efeitos de 2-hidroxibenzaldeído semicarbazona (2-OHBS, 110 mg.kg ⁻¹), i.p., -30 min e fenobarbital (Feno, 40 mg/kg) i.p., -30 min, no tempo de permanência dos camundongos na haste girante (14 r.p.m.), n = 6. *** estatisticamente significativo com relação ao veículo, p<0,001	56
Figura 3.15. A) Efeitos de benzaldeído semicarbazona (BS, 50 mg.kg ⁻¹), benzaldeído (Bz, 32,5 mg.kg ⁻¹), cloridrato de semicarbazida (Semi, 34,2 mg.kg ⁻¹) e veículo (V), i.p., isolados ou em combinação, -30 min, na resposta nociceptiva induzida por formaldeído (s.c., 0,34%, 20 µL) em camundongos. n=10. B) Efeitos de cloridrato de semicarbazida (Semi, 17,1; 34,2 e 68,4 mg.kg ⁻¹), i.p., -30 min, na resposta nociceptiva induzida por formaldeído (s.c., 0,34%, 20 µL) em camundongos. n=7-8. *, ** e *** estatisticamente significativos com relação ao veículo, p<0,05, p<0,01 e p<0,001, respectivamente	58
Figura 3.16. Efeitos de cloridrato de semicarbazida (Semi, 68,4 mg.kg ⁻¹), i.p., -30 min e fenobarbital (Feno, 40 mg/kg) i.p., -30 min, no tempo de permanência dos camundongos na haste girante (14 r.p.m.), n = 6-7. *** estatisticamente significativo com relação ao veículo, p<0,001	59
Figura 3.17. Efeitos de benzaldeído semicarbazona (BS, 50 mg.kg ⁻¹) e cloridrato de semicarbazida (Semi, 34,2 e 68,4 mg.kg ⁻¹), i.p., -30 min, no edema em pata de rato induzido por carragenina (1%, 50 µl, i.pl.). O volume da pata foi medido 2, 4 e 6 horas após a injeção da carragenina. n = 5. *, ** e *** estatisticamente significativos com relação ao veículo; p<0,05, p<0,01 e p<0,001, respectivamente	60
Figura 4.1. Mecanismo de obtenção de semicarbazona a partir semicarbazida e aldeído	62
Figura 4.2. Espectro eletrônico de benzaldeído semicarbazona em 0 e 120 minutos após o preparo de solução 3,0 x 10 ⁻⁵ mol.L ⁻¹ , 1% DMSO em meio gástrico simulado (tampão pH 1,2) a 25°C	63
Figura 4.3. Espectros eletrônicos de benzaldeído semicarbazona (BS, A) e 2-, 3- e 4-hidroxibenzaldeído semicarbazonas (2-OHBS, B; 3-OHBS, C; e 4-OHBS, D, respectivamente) 0, 10, 20, 30 e 40 minutos após o preparo de solução 4,0 x 10 ⁻⁵ mol.L ⁻¹ , 1% DMSO em meio gástrico simulado (tampão pH 1,2) a 25°C. Máximos de absorvância observados em 280, 276, 280 e 286 nm, respectivamente	64
Figura 4.4. A) Curva de calibração de BS em 1% DMSO em meio gástrico simulado, pH = 1,2. B) Valores médios de absorvância <i>versus</i> tempo (segundos) para as triplicatas de quatro concentrações de BS em 1% DMSO em meio gástrico simulado ..	65

Figura 4.5. A) Valores médios de concentrações médias <i>versus</i> tempo (segundos) para a triplicata da solução de BS $1,0 \times 10^{-5}$ mol.L ⁻¹ em 1% DMSO em meio gástrico simulado. B) Valores médios de concentrações médias <i>versus</i> tempo (segundos) para a triplicata da solução de BS $2,0 \times 10^{-5}$ mol.L ⁻¹ em 1% DMSO em meio gástrico simulado, pH 1,2	65
Figura 4.6. A) Valores médios de concentrações médias <i>versus</i> tempo (segundos) para a triplicata da solução de BS $3,0 \times 10^{-5}$ mol.L ⁻¹ em 1% DMSO em meio gástrico simulado. B) Valores médios de concentrações médias <i>versus</i> tempo (segundos) para a triplicata da solução de BS $4,0 \times 10^{-5}$ mol.L ⁻¹ em 1% DMSO em meio gástrico simulado, pH 1,2	66
Figura 4.7. A) Velocidade inicial (V_0 , mol.L ⁻¹ .s ⁻¹) <i>versus</i> concentração (mol.L ⁻¹) para as triplicatas de quatro concentrações de BS em 1% DMSO em meio gástrico simulado. B) Logaritmo base 10 da velocidade inicial <i>versus</i> logaritmo base 10 concentração (mol.L ⁻¹) para as triplicatas de quatro concentrações de BS em 1% DMSO em meio gástrico simulado, pH 1,2	66
Figura 4.8. A) Curva de calibração de 2-OHBS em 1% DMSO em meio gástrico simulado. B) Valores médios de absorvância <i>versus</i> tempo (segundos) para as triplicatas de quatro concentrações de 2-OHBS em 1% DMSO em meio gástrico simulado, pH 1,2	68
Figura 4.9. Logaritmo base 10 da velocidade inicial <i>versus</i> logaritmo base 10 concentração (mol.L ⁻¹) para as triplicatas de quatro concentrações de 2-OHBS em 1% DMSO em meio gástrico simulado, pH = 1,2	69
Figura 4.10. A) Efeitos de benzaldeído semicarbazona (BS, 100 mg.kg ⁻¹) e 2-hidroxibenzaldeído semicarbazona (2-OHBS, 110, 220 e 330 mg.kg ⁻¹), p.o., -60 min, no edema em pata de rato induzido por carragenina (1%, 50 µl, i.pl.). O volume da pata foi medido 2, 4 e 6 horas após a injeção da carragenina. n = 5. B) Efeitos de benzaldeído semicarbazona (BS, 110 mg.kg ⁻¹) e 2-hidroxibenzaldeído semicarbazona (2-OHBS, 55 e 110 mg.kg ⁻¹), p.o., -30 min, na resposta nociceptiva induzida por <i>Zymosan A</i> (i.p., 40 mg.kg ⁻¹) em camundongos, n = 7-8. * e ** estatisticamente significativos com relação ao veículo, p<0,05 e p<0,01, respectivamente	71
Figura 4.11. A) Curva de calibração de BSβCD em 1% DMSO em meio gástrico simulado. B) Valores médios de absorvância <i>versus</i> tempo (segundos) para as triplicatas de quatro concentrações de BSβCD em 1% DMSO em meio gástrico simulado, pH = 1,2	73

Figura 4.12. Logaritmo base 10 da velocidade inicial <i>versus</i> logaritmo base 10 concentração (mol.L^{-1}) para as triplicatas de quatro concentrações de BS β CD em 1% DMSO em meio gástrico simulado, pH = 1,2	73
Figura 4.13. A) Curva de calibração de BS+ β CD em 1% DMSO em meio gástrico simulado. B) Valores médios de absorbância <i>versus</i> tempo (segundos) para as triplicatas de quatro concentrações de BS+ β CD em 1% DMSO em meio gástrico simulado, pH = 1,2	75
Figura 4.14. Logaritmo base 10 da velocidade inicial <i>versus</i> logaritmo base 10 concentração (mol.L^{-1}) para as triplicatas de quatro concentrações de BS+ β CD em 1% DMSO em meio gástrico simulado, pH = 1,2	76
Figura 4.15. Representação esquemática do equilíbrio de associação/dissociação entre fármaco (BS) e ciclodextrina	78
Figura 5.1. Valores de pKa teóricos de 2-, 3- e 4-OHBS (A , B e C , respectivamente) ..	81
Figura 5.2. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz) em DMSO- d_6 de $[\text{Ga}_2(2\text{OBS})_3]$	86
Figura 5.3. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz) em DMSO- d_6 de $[\text{Zn}(2\text{OBS})\text{AcO}]$	86
Figura 5.4. Espectros de RMN de ^{13}C e DEPT (50 MHz) em DMSO- d_6 de $[\text{Ga}_2(2\text{OBS})_3]$	87
Figura 5.5 Espectros de RMN de ^{13}C e DEPT (50 MHz) em DMSO- d_6 de $[\text{Zn}(2\text{OBS})\text{AcO}]$	87
Figura 5.6. Proposta de formação de novo complexo em solução de DMSO a partir de $[\text{Zn}(\text{SAS})\text{AcO}]$. Evidencia-se o deslocamento do acetato pelo DMSO	88
Figura 5.7. Diagrama ORTEP para $[\text{Zn}(2\text{OBS})\text{AcO}]_2$ (A) e diagrama de empacotamento (B)	89
Figura 5.8. Destaque das ligações de 2-OHBS diretamente relacionadas aos ângulos com maior distorção após complexação com o zinco(II)	91
Figura 5.9. Espectros eletrônicos de 2OHBS ($10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$, A), $[\text{Zn}(2\text{OBS})\text{AcO}]$ ($10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$, B) e $[\text{Ga}_2(2\text{OBS})_3]$ ($10^{-9} \text{ mol.L}^{-1}$, C) em DMSO	94
Figura 5.10. Espectros eletrônicos de 2OHBS ($10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$), $[\text{Zn}(2\text{OBS})\text{AcO}]$ ($10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) e $[\text{Ga}_2(2\text{OBS})_3]$ ($10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$) 1% DMSO em meio gástrico (pH 1,2), meio intestinal (pH 6,8), água destilada (pH 7,0) e meio fisiológico (pH 7,4)	95
Figura 5.11. Espectro de massa do complexo $[\text{Ga}_2(2\text{OBS})_3]$ em solução metanólica	97
Figura 5.12. Espectro de massa do complexo $[\text{Ga}_2(2\text{OBS})_3]$ em solução metanólica acidificada	98

Figura 5.13. Representação esquemática de GaL_2 , complexo de gálio(III) descrito na literatura	98
Figura 5.14. Representação esquemática das reações de formação dos complexos $[\text{Ga}(\text{2OBS})_2]^-$ e $[\text{Ga}(\text{DMSO})_6]^{3+}$ após solubilização de $[\text{Ga}_2(\text{2OBS})_3]$ em DMSO	99
Figura 5.15. Valores médios da combinação de $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ e itraconazol frente a 13 cepas/isolados clínicos diferentes de <i>Trychophyton rubrum</i> . O valor médio de concentração inibitória fracionária (CIF) foi 0,9, caracterizando a interação entre os dois compostos como adição. Os pontos indicam a combinação onde houve inibição do crescimento	105
Figura 5.16. Valores médios da combinação de $[\text{Ga}_2(\text{2OBS})_3]$ e itraconazol frente a 13 cepas/isolados clínicos diferentes de <i>Trychophyton rubrum</i> . O valor médio de concentração inibitória fracionária (CIF) foi 1,0, caracterizando a interação entre os dois compostos como adição. Os pontos indicam a combinação onde houve inibição do crescimento	105
Figura 5.17. Combinação de $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ e $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ frente a 4 cepas/isolados clínicos diferentes de <i>Trychophyton rubrum</i> . Os pontos indicam a combinação onde houve inibição do crescimento	107
Figura 6.1. 2,6 diacetilpiridina bis(tiossemicarbazona) (DAPT, A), 2,6 diacetilpiridina bis(semicarbazona) (DAPS, B) e 2,6 diacetilpiridina bis(hidrazona) (DAPH, C)	108
Figura 6.3. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz) de DAPS em $\text{DMSO}-d_6$	110
Figura 6.4. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz) de DAPT em $\text{DMSO}-d_6$	110
Figura 6.5. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz) de DAPT em $\text{DMSO}-d_6$, com ampliação na região entre 7,60 e 10,70 ppm	111
Figura 6.6. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz) de DAPT em $\text{DMSO}-d_6$, com ampliação na região entre 2,30 e 2,60 ppm	111
Figura 6.7. Ressonância na porção tioamida de DAPT	112
Figura 6.8. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz) de DAPH em CDCl_3-d_1 , com ampliação na região entre 7,20 e 8,50 ppm	112
Figura 6.9. Estudo de especiação em solução para DAPS na faixa de pH = 2-12, $[\text{DAPS}] = 40 \text{ mM}$. Diagrama de especiação e valores de pKa obtidos por meio dos programas HySS2009 (Protonic Software, UK) e HypSpec (Protonic Software, UK), respectivamente	115

<p>Figura 6.10. Estudo de especiação em solução para DAPT realizado na faixa de pH compreendida entre 2 e 12, [DAPT] = 40 mM. Diagrama de especiação e valores de pKa obtidos por meio dos programas HySS2009 (Protonic Software, UK) e HypSpec (Protonic Software, UK), respectivamente.....</p>	116
<p>Figura 6.11. Grau de agregação do peptídeo Aβ₁₋₄₀ determinado por meio de espectroscopia UV-vis - Solução peptídica na presença de íons metálicos e ligantes. Os dados representam a média de absorvância de amostras em quadruplicata medidas a 405 nm. Valor de pH igual a 6,6 e 7,4 para Cu(II) e Zn(II), respectivamente. As barras de erro representam o desvio padrão do valor médio de absorvância. DAPS = 2,6 diacetilpiridina <i>bis</i>(semicarbazona), ADTP = ácido dietilenotriamino pentacético, controle positivo) e M + Pep = metal (Cu(II) ou Zn(II)) + peptídeo Aβ₁₋₄₀, controle negativo</p>	117
<p>Figura 6.12. Imagens MET de amostras incubadas com 25 mM de βA₁₋₄₀, 25 mM de CuCl₂ e 50 mM de DAPS. As amostras foram incubadas por 24 horas a 37 °C. Peptídeo (A), Peptídeo+Cu(II) (B), Peptídeo+DAPS (C) e Peptídeo+DAPS+Cu(II) (D)</p>	118
<p>Figura 6.13. Imagens MET de amostras incubadas com 25 mM de βA₁₋₄₀, 25 mM de ZnCl₂ e 50 mM de DAPS. As amostras foram incubadas por 24 horas a 37 °C. Peptídeo (A), Peptídeo+Zn(II) (B), Peptídeo+DAPS (C) e Peptídeo+DAPS+Zn(II) (D)</p>	119

Índice de tabelas

Tabela 2.1. Atribuição de tipo de eletrólito em solução (DMF e metanol)	21
Tabela 2.2. Atribuição de tipo de eletrólito em solução (DMSO)	22
Tabela 3.1. Rendimento, cor e faixas de fusão de 2-, 3- e 4-hidroxibenzaldeído semicarbazonas (2-, 3- e 4-OHBS, respectivamente)	36
Tabela 3.2. Atribuições, multiplicidade (M), número de átomos (nº) e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de ^1H e ^{13}C em $\text{DMSO}-d_6$ de 2-, 3- e 4-OHBS	39
Tabela 3.3. Energias calculadas pelo método MMFF para os isômeros conformacionais mais estáveis de BS, 2-OHBS, 3-OHBS e 4-OHBS	43
Tabela 3.4. Energias calculadas pelo método DFT para os isômeros conformacionais mais estáveis de BS, 2-OHBS, 3-OHBS e 4-OHBS	44
Tabela 3.5. Energias calculadas pelo método MP2 para os isômeros conformacionais mais estáveis de BS, 2-OHBS, 3-OHBS e 4-OHBS	44
Tabela 3.6. Distâncias de ligação calculadas e experimentais (dados cristalográficos) para BS, 2-OHBS, 3-OHBS e 4-OHBS	45
Tabela 3.7. Ângulos de ligação calculados e experimentais (dados cristalográficos) para BS, 2-OHBS, 3-OHBS e 4-OHBS	45
Tabela 3.8. Ângulos diedros calculados e experimentais (dados cristalográficos) para BS, 2-OHBS, 3-OHBS e 4-OHBS	46
Tabela 3.9. Propriedades físico-químicas e eletrônicas calculadas no vácuo para os isômeros <i>E</i> de BS, 2-OHBS, 3-OHBS e 4-OHBS e a forma enamina de 2-OHBS	48
Tabela 3.10. Propriedades físico-químicas e eletrônicas calculadas em meio aquoso para BS, 2-OHBS, 3-OHBS e 4-OHBS	48
Tabela 3.11. Valores máximos de absorvância em <i>n</i> -octanol e tampão pH 7,4 para BS, 2-OHBS, 3-OHBS e 4-OHBS. Valores obtidos em duplicata para cada razão <i>n</i> -octanol/tampão pH 7,4	51
Tabela 3.12. Valores calculados (programas ChemSketch e ALOGPS 2.1) e experimentais de LogP <i>n</i> -octanol/água para BS, 2-OHBS, 3-OHBS e 4-OHBS e semicarbazida	51

Tabela 5.1. Análise elementar (valores teóricos entre parêntesis), massa molar, faixa de fusão e condutividade molar (Λ_M) dos complexos de gálio(III) e zinco(II) de 2-hidroxibenzaldeído semicarbazona (2-OHBS). DMF (dimetilformamida), MeOH (metanol) e DMSO (dimetilsulfóxido)	81
Tabela 5.2. Bandas nos espectros de infravermelho (cm^{-1}) de 2-hidroxibenzaldeído semicarbazona (2OHBS) e seus complexos $[\text{Ga}_2(2\text{OBS})_3]$ e $[\text{Zn}(2\text{OBS})\text{AcO}]$ – suportes: KBr (4000-400 cm^{-1}); CsI (400-200 cm^{-1})	83
Tabela 5.3. Atribuições, multiplicidade (M), número de hidrogênios (n°) e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de ^1H em DMSO- d_6 de 2-OHBS e seus complexos de gálio(III) e zinco(II)	84
Tabela 5.4. Atribuições e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de ^{13}C e DEPT 135 em DMSO- d_6 de 2-OHBS e seus complexos de gálio(III) e zinco(II)	85
Tabela 5.5. Dados do cristal e refinamento da estrutura do $[\text{Zn}(2\text{OBS})(\text{OAc})]_2$	90
Tabela 5.6. Distância das ligações na estrutura do $[\text{Zn}(2\text{OBS})(\text{OAc})]_2$	91
Tabela 5.7. Ângulos de ligação na estrutura do $[\text{Zn}(2\text{OBS})(\text{OAc})]_2$	92
Tabela 5.8 Ligações de hidrogênio na estrutura do $[\text{Zn}(2\text{OBS})(\text{OAc})]_2$	93
Tabela 5.9. Valores de CIM ($\mu\text{mol.L}^{-1}$) para 2-hidroxibenzaldeído semicarbazona (2-OHBS), seus complexos de gálio(III) e zinco(II), 2-hidroxibenzaldeído cloridrato de semicarbazida, $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$, $\text{Zn}(\text{OAc})_2$. CIM para Itraconazol (controle positivo) igual a 0,25 - 0,50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (0,35 - 0,70 $\mu\text{mol.L}^{-1}$)	101
Tabela 5.10. Valores de CIM ($\mu\text{mol.L}^{-1}$) para 2-hidroxibenzaldeído semicarbazona (2-OHBS), seus complexos de gálio(III) e zinco(II), reagentes utilizados na obtenção do ligante e sais utilizados na obtenção dos complexos. CIM para Itraconazol (controle positivo) igual a 0,25 - 0,50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (0,35 - 0,70 $\mu\text{mol.L}^{-1}$)	102
Tabela 5.11. Concentração inibitória mínima (CIM) de $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$, $[\text{Ga}_2(2\text{OBS})_3]$ e itraconazol e concentração inibitória fracionária média (CIF) das combinações $[\text{Ga}_2(2\text{OBS})_3]$ + itraconazol e $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ + itraconazol frente a 13 isolados clínicos/ cepas de <i>Trychophyton rubrum</i>	104
Tabela 6.1. Tabela 6.1. Bandas nos espectros de infravermelho (cm^{-1}) de DAPH, DAPS e DAPT	113

Lista de Abreviaturas

CIF	Concentração inibitória fracionária
CIM	Concentração inibitória mínima
DAPH	2,6 diacetilpiridina hidrazona
DAPS	2,6 diacetilpiridina semicarbazona
DAPT	2,6 diacetilpiridina tiossemicarbazona
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMSO- d_6	Dimetilsulfóxido deuterado
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Correlation
i.p.	Administração intraperitoneal
2-OHBS	2-hidroxibenzaldeído semicarbazona
3-OHBS	3-hidroxibenzaldeído semicarbazona
4-OHBS	4-hidroxibenzaldeído semicarbazona
p.o.	Administração <i>per os</i>
RMN de ^{13}C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN de ^1H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
TMS	Tetrametilsilano

Sumário

Capítulo 1- Introdução	1
1.1. Química Medicinal	1
1.2. Química Inorgânica Medicinal	1
1.3. Tiossemicarbazonas, semicarbazonas, hidrazonas e a Química Medicinal	3
1.4. Inflamação e dor	4
1.5. Doença de Alzheimer (DA): um processo inflamatório	7
1.6. Atividade antimicrobiana de fármacos	10
1.7. Fungos patogênicos e a Química Inorgânica Medicinal	11
1.8. Gálio: atividade farmacológica e usos em medicina	13
1.9. Zinco: atividade farmacológica e usos em medicina	14
1.10. Estudo de estabilidade de fármacos e formulações	14
1.11. Formulações farmacêuticas: ciclodextrinas	15
1.12. Determinação do coeficiente de partição teórico e experimental de fármacos .	16
1.13. Cálculos teóricos	17
1.14. Objetivos	18
Capítulo 2 - Parte Experimental.....	19
2.1. Preparo e caracterização dos compostos	19
2.1.1. Equipamentos, métodos e materiais	19
2.1.1.1. Reagentes e Solventes	19
2.1.1.2. Pesagens	19
2.1.1.3. Obtenção de benzaldeído semicarbazona (BS), 2-, 3- e 4- hidroxibenzaldeído semicarbazonas (2-, 3- e 4-OHBS)	19
2.1.1.4. Obtenção de 2,6 diacetilpiridina tiossemicarbazona, 2,6 diacetilpiridina semicarbazona e 2,6 diacetilpiridina hidrazona (DAPT, DAPS, DAPH, respectivamente)	20
2.1.1.5. Complexos de gálio(III) e zinco(II) de 2-OHBS	20
2.1.1.6. Obtenção de compostos de inclusão de BS em β -ciclodextrina (BS β CD)	21
2.1.1.7. Ponto de Fusão	21
2.1.1.8. Análise condutimétrica	21
2.1.1.9. Análise Elementar	22
2.1.1.10. Difração de Raios X	22
2.1.1.11. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV)	22

2.1.1.12. Ressonância magnética nuclear (RMN)	23
2.1.1.13. Espectros eletrônicos (UV-vis)	23
2.1.1.14. Determinação dos valores de pH	23
2.1.1.15. Cálculos teóricos das propriedades físico-químicas das arilsemicarbazonas	23
2.1.1.16. Determinação experimental do coeficiente de partição <i>n</i> -octanol/água ($P_{o/a}$, tampão pH 7,4) de BS, 2-OHBS, 3-OHBS, 4-OHBS ..	24
2.1.1.17. Cinética de hidrólise de BS, 2-OHBS, composto de inclusão BS β CD e mistura BS+ β CD em meio gástrico simulado	25
2.1.1.18. Determinação das constantes de acidez (pKa) por UV-vis	26
2.2. Ensaio biológicos	27
2.2.1. Ensaio <i>in vitro</i>	27
2.2.1.1. Atividade antifúngica frente a cepas de <i>Candida sp</i> e <i>Trichophyton rubrum</i>	27
2.2.1.1.1. Determinação da Concentração Inibitória Fracionária (CIF)	28
2.2.1.1.2. Elucidação do mecanismo da ação antifúngica de gálio(III)	28
2.2.1.2. Teste de Turbidez – modelo <i>in vitro</i> da Doença de Alzheimer	29
2.2.1.3. Microscopia eletrônica de transmissão (MET) – modelo <i>in vitro</i> da Doença de Alzheimer	30
2.2.2. Ensaio <i>in vivo</i>	30
2.2.2.1. Atividades antinociceptiva e anti-inflamatória	30
2.2.2.1.2. Animais experimentais	30
2.2.2.1.3. Substâncias	31
2.2.2.1.4. Soluções e suspensões	31
2.2.2.1.5. Avaliação da resposta nociceptiva induzida por <i>zymosan A</i> em camundongos	32
2.2.2.1.6. Avaliação da resposta nociceptiva induzida por formaldeído em camundongos	32
2.2.2.1.7. Avaliação da atividade motora de camundongos	33
2.2.2.1.8. Avaliação do edema em pata de rato induzido por carragenina	33
2.2.2.1.9. Análise estatística dos ensaios <i>in vivo</i>	34

Capítulo 3 - 2-, 3- e 4-hidroxibenzaldeído semicarbazonas (2-, 3- e 4-OHBS): correlação entre atividade farmacológica e parâmetros físico-químicos	35
3.1. Obtenção de 2-, 3- e 4-hidroxibenzaldeído semicarbazonas	35
3.1.1. Faixas de fusão e rendimento.....	35
3.1.2. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	36
3.2. Cálculos teóricos das propriedades físico-químicas das arilsemicarbazonas	43
3.3. Cálculo dos coeficientes de partição (P) <i>n</i> -octanol/água experimental	49
3.4. Ensaio biológico: atividade antinociceptiva e anti-inflamatória das arilsemicarbazonas	52
Capítulo 4 - Estudos de estabilidade de benzaldeído semicarbazona (BS), 2-hidroxibenzaldeído semicarbazona (2-OHBS), composto de inclusão BS: β-ciclodextrina (BS:βCD) e mistura BS+βCD em meio gástrico simulado	61
4.1. Espectro eletrônico das arilsemicarbazonas em meio gástrico simulado	62
4.2. Velocidade inicial para a hidrólise de BS em meio gástrico simulado	64
4.3. Velocidade inicial para a hidrólise de 2-OHBS em meio gástrico simulado	68
4.3.1. Ensaio biológico – atividade antinociceptiva e anti-inflamatória de BS e 2-OHBS <i>per os</i>	70
4.4. Velocidade inicial para a hidrólise do composto de inclusão BS β CD e da mistura BS+ β CD em meio gástrico simulado	72
4.4.1. Velocidade inicial para a hidrólise do composto de inclusão BS β CD em meio gástrico simulado	72
4.4.2. Velocidade inicial para a hidrólise da mistura BS+ β CD em meio gástrico simulado	75
Capítulo 5 – Complexos de gálio(III) e zinco(II) de 2-hidroxibenzaldeído semicarbazona. Investigação do papel do metal na atividade antifúngica do complexo de gálio(III)	79
5.1. Caracterização dos complexos de gálio(III) e zinco(II) de 2-hidroxibenzaldeído semicarbazona (2-OHBS)	80
5.1.1. Espectroscopia na região do infravermelho (IV)	81
5.1.2. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	83
5.1.3. Estrutura cristalográfica do complexo [Zn(2OBS)AcO] ₂	88
5.1.4. Espectroscopia eletrônica dos complexos [Ga ₂ (2OBS) ₃] e [Zn(2OBS)AcO]	93
5.1.5. Espectrometria de massas por elétron spray do complexo [Ga ₂ (2OBS) ₃]	96
5.2. Ensaio biológico dos complexos de gálio(III) e zinco(II) de 2-hidroxibenzaldeído semicarbazona	100

5.2.1 Atividade antifúngica de $[Ga_2(2OBS)_3]$ e $[Zn(2OBS)AcO]$	100
Capítulo 6 – Bases de Schiff derivadas de 2,6 diacetilpiridina: avaliação da atividade em modelos <i>in vitro</i> da Doença de Alzheimer	108
6.1. Obtenção dos compostos	109
6.1.1. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	109
6.1.2. Espectroscopia na região do infravermelho (IV)	112
6.1.3. Espectrometria de massas por elétron spray	113
6.2. Determinação das constantes de acidez (pKa) por UV-vis	113
6.3. Teste de turbidez (modelo <i>in vitro</i> da Doença de Alzheimer)	116
6.4. Microscopia eletrônica de transmissão (MET) - modelo <i>in vitro</i> da Doença de Alzheimer	117
Capítulo 7 – Discussão e Conclusões	120
Anexos	124

Capítulo 1. Introdução

1.1. Química Medicinal

A Química Medicinal envolve o estudo dos aspectos relacionados ao desenvolvimento e planejamento de novos fármacos, e investiga os fatores estruturais relacionados à absorção, distribuição, metabolismo, eliminação e toxicidade de novos compostos candidatos a fármacos.¹

Apesar dos recentes avanços tecnológicos, a indústria farmacêutica nacional, em quase sua totalidade, dedica-se à produção de formulações baseadas em moléculas desenvolvidas e patenteadas no exterior. Portanto, a obtenção de um fármaco brasileiro e suas formulações farmacêuticas que são os principais objetivos daqueles que se dedicam à Química Medicinal em nosso país.

No presente trabalho, buscamos obter novos protótipos de fármacos e metalofármacos.

1.2. Química Inorgânica Medicinal

Compostos orgânicos sempre foram considerados indispensáveis para a vida, deixando, por muito tempo, compostos inorgânicos à margem da terapêutica². Os metais têm sido utilizados há cerca de 5000 anos no tratamento e prevenção de doenças, mesmo que de forma menos significativa que os compostos orgânicos.³ No Egito, cerca de 3500 anos atrás, o ferro era utilizado em formulações. O ouro era empregado na fabricação de medicamentos por árabes e chineses na mesma época, acreditando-se que metais nobres traziam benefícios à saúde. No século XVI, o médico suíço Philippus Aureolus Theophrastus Bombastus von Hohenheim – Paracelsus – desenvolveu e utilizou medicamentos à base de mercúrio, e introduziu conceitos importantes para o desenvolvimento da Toxicologia atual.⁴ Na primeira década do século XX, Paul Ehrlich foi o primeiro a relacionar estrutura-atividade com o desenvolvimento de compostos de arsênio para o tratamento de sífilis, entre os quais o Salvarsan (Figura 1.1).⁵ Por essas e outras contribuições, Paul Ehrlich é considerado o pai da quimioterapia.

¹ L. M. Lima, *Quím. Nova*, 6 (2007) 1456.

² E. J. Baran, *Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola*, 6 (2005) 7.

³ C. X. Zhang, S. J. Lippard, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 7 (2003)481.

⁴ H. Beraldo, *Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola* 6 (2005) 4.

⁵ C. Orvig, M. J. Abrams, *Chem. Rev.* 99 (1999) 2201.

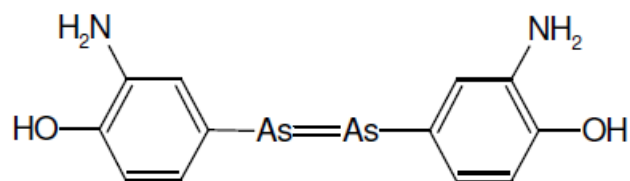


Figura 1.1. Estrutura do Salvarsan

O estabelecimento da Química Inorgânica Medicinal como ciência capaz de introduzir novos compostos à terapêutica ocorreu somente em 1965, com a descoberta da atividade antitumoral da cisplatina (Figura 1.2, **A**).⁶ Este composto, em conjunto com seus análogos, estão entre os principais fármacos utilizados no tratamento de tumores. Hoje, vários complexos metálicos ou simplesmente sais inorgânicos constituem ferramentas de primeira escolha ou alternativas importantes no tratamento de diversas patologias. Compostos de ouro, como a auranofina (Figura 1.2, **B**), são usados no tratamento de artrite reumatóide; o nitroprussiato de sódio ($\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NO})]$) é utilizado como vasodilatador em emergências hipertensivas; o citrato de bismuto é empregado no tratamento de úlcera; o carbonato de lítio (Li_2CO_3) é utilizado em patologias do sistema nervoso central, como na recidiva de doença bipolar maníaco-depressiva.^{7,8}

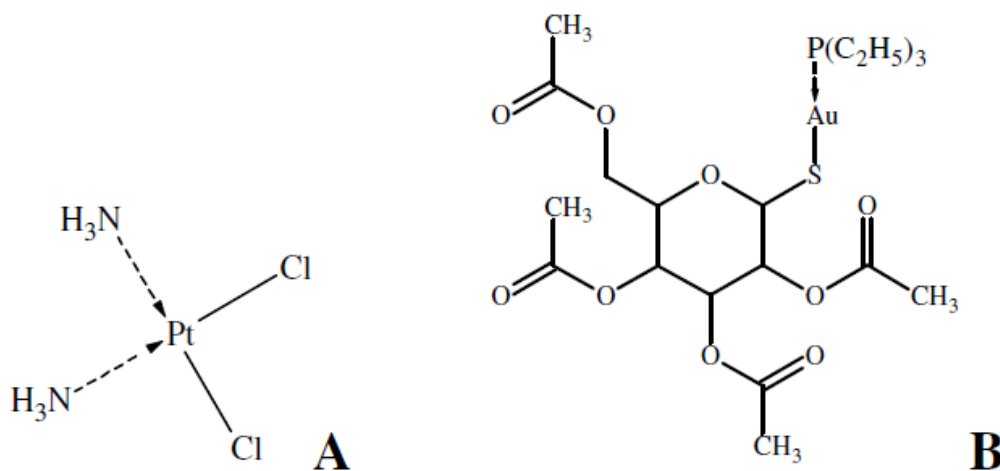


Figura 1.2. Estruturas da cisplatina (**A**) e da auranofina (**B**).

Apesar da crescente importância dos metais na medicina, a maior parte das descobertas de complexos ou sais como agentes terapêuticos se deu ao acaso.⁹ Atualmente, a busca ao acaso deu lugar ao desenvolvimento racional de metalofármacos baseado nas propriedades químicas dos metais e ligantes de interesse. Os metais podem se ligar a biomoléculas carregadas

⁶ T. Storr, K. H. Thompson, C. Orvig, Chem. Soc. Rev., 35 (2006) 534.

⁷ S. J. Berners-Price, P. J. Sadler. Coord. Chem. Rev. 151 (1996) 1.

⁸ Goodman & Gilman, As bases farmacológicas da terapêutica. 11 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, c2006.

⁹ K. H. Thompson, C. Orvig, Science, 300 (2003) 936.

negativamente, como proteínas e ácidos nucleicos e, além disso, possuem ampla faixa de números de coordenação, geometrias, diversos estados redox e propriedades termodinâmicas e cinéticas características. Estas propriedades fornecem um amplo espectro de reatividade a ser explorado.¹⁰ Para compostos orgânicos, a complexação ao metal pode modificar suas propriedades físicas, químicas e físico-químicas, como reatividade e lipofilia, proporcionando um efeito sinérgico à ação farmacológica desejada.⁹

1.3. Tiossemicarbazonas, semicarbazonas, hidrazonas e a Química Medicinal

Nosso grupo se interessa há muitos anos por tiossemicarbazonas, semicarbazonas e hidrazonas (Figura 1.3), procurando investigar seus aspectos estruturais, características espectrais e propriedades farmacológicas. Essas moléculas são classificadas como bases de Schiff, uma vez que possuem grupos imina (C=N) e obrigatoriamente fórmula mínima $R_2C=NR'$ ($R' \neq H$).¹¹ Esses compostos apresentam um amplo espectro de bioatividades e, como são agentes quelantes, seus complexos metálicos possuem também propriedades farmacológicas. Especificamente no caso das semicarbazonas e seus complexos metálicos, podemos citar atividades como anticonvulsivante, analgésica, anti-inflamatória, antitripanossoma.^{12,13,14}

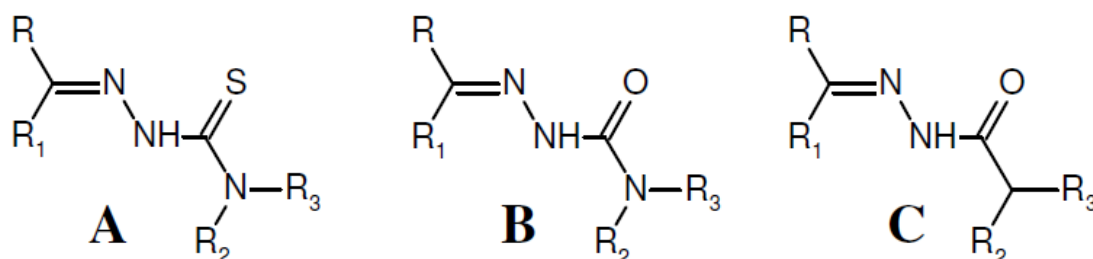


Figura 1.3. Estrutura genérica das tiossemicarbazonas (A), semicarbazonas (B) e hidrazonas (C), onde R, R₁, R₂, R₃ = H, alquila, arila

Dentre as semicarbazonas, nosso grupo tem estudado as aril semicarbazonas, principalmente benzaldeído semicarbazona (BS, Figura 1.4), em razão de suas propriedades anticonvulsivante, antinoceptiva e anti-inflamatória.^{15,16,17} Em modelos animais de dor e

¹⁰ P. C. A. Bruijninx, P. J. Sadler, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 12 (2008) 197.

¹¹ União Internacional de Química Pura e Aplicada, IUPAC. *Compendium of Chemical Terminology – the Gold Book*. Disponível em < <http://goldbook.iupac.org/S05498.html> > 25 jan 2013.

¹² H. Beraldo, *Quim. Nova* 27 (2004) 461.

¹³ J. R. Dimmock, K. K. Sidhu, R. S. Thayer, P. Mack, M. J. Duffy, R. S. Reid, J. W. Quail, U. Pugazhenti, A. Ong, J. A. Bikker, *J. Med. Chem.* 36 (1993) 2243.

¹⁴ J. R. Dimmock, S. N. Pandeya, J. W. Quail, U. Pugazhenti, T. M. Allen, G. Y. Kao, J. Balzarini, E. DeClercq, *Eur. J. Med. Chem.* 30 (1995) 303.

¹⁵ L. R. Teixeira, R. D. Sinisterra, R. P. Vieira, M. C. Doretto, H. Beraldo, *J. Incl. Phenom. Macro.*, 47 (2003) 77.

inflamação, BS destacou-se por apresentar atividade central, podendo em princípio ser útil no tratamento de patologias, como a dor neuropática, caracterizada como um dos principais desafios da farmacoterapia moderna.¹⁸

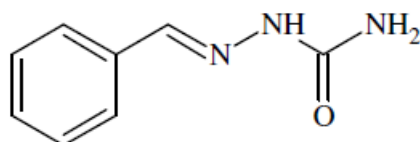


Figura 1.4. Estrutura de benzaldeído semicarbazona (BS).

Esses resultados nos estimularam a continuar a busca por novas semicarbazonas com atividade em modelos de dor e inflamação, como proposto no presente trabalho.

1.4. Inflamação e dor

Lesão tecidual ou presença de antígenos (proteínas ou compostos exógenos) em função de várias patologias, como artrite reumatóide, doença de Alzheimer ou infecções microbianas, podem desencadear uma reação biológica no organismo denominada inflamação.¹⁹ Celsus, no século I d.C, descreveu pela primeira vez seus principais sinais e sintomas como *rubor*, *tumor*, *calor* e *dor* (eritema, edema, calor e dor, respectivamente).²⁰

A inflamação é um processo complexo, que envolve vários tipos celulares e seus mediadores, leitos capilares e fibras sensoriais, além de proteínas presentes no sangue. O processo tem como objetivo isolar, neutralizar e destruir um antígeno e estimular a reconstituição do tecido danificado.²¹ Como os principais mecanismos de defesa contra antígenos estão no sangue (anticorpos e leucócitos), é normal que uma das primeiras alterações seja o aumento do fluxo sanguíneo na região lesada, o que leva ao eritema, seguido pelo extravasamento de plasma e desenvolvimento de edema. Os leucócitos são direcionados para o sítio da inflamação e seu acúmulo máximo ocorre aproximadamente 24 horas após o estímulo

¹⁶ H. Beraldo, R. D. Sinisterra, L. R. Teixeira, R. P. Vieira, M. C. Doretto, Biochem. Biophys. Res. Commun. 16 (2002) 241.

¹⁷ L. T. S. Rocha, K. A. Costa, A. C. P. Oliveira, E. B. Nascimento Jr, C. M. Bertollo, F. Araújo, L. R. Teixeira, S. P. Andrade, H. Beraldo, M. M. Coelho, Life Sci., 79 (2006) 499.

¹⁸ M. Backonja, C. J. Woolf, Oncologist, 15 (2010) 2.

¹⁹ Goodman & Gilman, As bases farmacológicas da terapêutica. 11 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, c2006.

²⁰ R. S. Cotran, V. Kumar, T. Collins, Robbins pathologic basis of disease. Philadelphia: Saunders, c1999.

²¹ K. J. Tracey, Nature, 420 (2002) 853.

inflamatório.²² As células que migraram para o sítio inflamatório têm como principal função fagocitar substâncias estranhas ou mesmo resíduos teciduais.²³

As células residentes e aquelas que migraram para o sítio inflamatório liberam substâncias que contribuem para o desenvolvimento e manutenção da inflamação, como histamina e 5-hidroxitriptamina. Outra importante classe de mediadores produzidos durante a inflamação é a dos metabólitos do ácido 5,8,11,14-eicosatetraenóico, ou ácido araquidônico, que compreende as prostaglandinas (PG) e os tromboxanos (TX), produtos da via das ciclooxigenases (COX), e os leucotrienos (LT), produtos da via da 5-lipoxigenase (Figura 1.5).

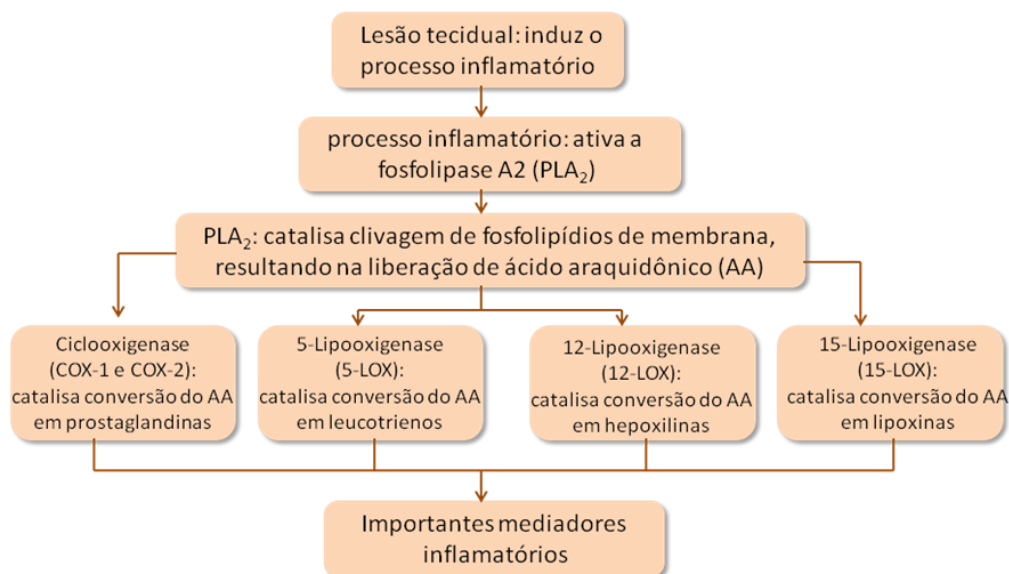


Figura 1.5. Esquema indicando vias para produção de mediadores inflamatórios, como prostaglandinas e leucotrienos, a partir de lesão tecidual.²⁴

Como citado anteriormente, um dos sintomas mais frequentes da resposta inflamatória é a dor, definida pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) como uma experiência sensorial, emocional e cognitiva desagradável associada a uma lesão real ou potencial. A dor representa o sintoma associado a doenças que mais causa desconforto aos pacientes e que mais frequentemente os leva a procurar atendimento médico.

Ao contrário de outras sensações, codificadas por receptores em terminações nervosas diferenciadas, a percepção de um estímulo nocivo é feita por terminações livres dos neurônios, os nociceptores.²⁵ Os mecanismos pelos quais os nociceptores codificam estímulos nocivos não foram completamente compreendidos. Receptores pertencentes à família dos receptores de

²² R. S. Cotran, V. Kumar, T. Collins, Robbins pathologic basis of disease. Philadelphia: Saunders, c1999.

²³ P. Martin, S. J. Leibovich, Trends Cell Biol. 15 (2005) 599.

²⁴ Adaptado de: R. P. Vieira, L. T.S. Rocha, L. R. Teixeira, R. D. Sinisterra, M. M. Coelho, H. Beraldo, *Revista Virtual de Química*, 2 (2010) 2.

²⁵ D. Julius, A. I. Basbaum, Nature, 413 (2001) 203.

potencial transitório (família TRP),²⁶ presentes em aproximadamente 45% dos neurônios de pequeno calibre, provavelmente são os principais responsáveis pela percepção de estímulos térmicos de baixa intensidade ou estímulos causados por substâncias naturais como a capsaicina, presente nos frutos das plantas do gênero *Capsicum* (pimentas).²⁷

Além da sensibilidade aos estímulos térmicos e mecânicos, os nociceptores podem ser ativados ou ter seu limiar para ativação reduzido mediante a presença de mediadores químicos, liberados durante o processo inflamatório. Muitas vezes, a dor resulta da lesão das vias responsáveis pela condução do estímulo nociceptivo. Esse fato pode levar à excitação exacerbada desses neurônios e, conseqüentemente, ao relato de dor sem necessidade de estímulo adicional. Além disso, a liberação de neurotransmissores pela terminação periférica da fibra lesada pode levar a uma reação inflamatória de origem neurogênica, com surgimento de edema e eritema nas áreas inervadas pelas fibras lesadas.²⁸

Conforme mencionado anteriormente, a inflamação aguda é fundamentalmente uma resposta protetora. Entretanto, é comum que alguns sinais e sintomas da inflamação aguda, como dor e edema, causem desconforto aos pacientes. Por sua vez, a resposta inflamatória crônica pode ser prejudicial, levando a sequelas indesejáveis, com grande destruição de tecidos. Nesses casos, são usados fármacos que reduzem o processo inflamatório por meio do impedimento da produção, liberação ou ação de mediadores inflamatórios ou mesmo que induzam a produção de fatores endógenos com propriedades anti-inflamatórias.

A redução de um processo inflamatório, com conseqüente alívio de sinais e sintomas associados, tem sido o motivo da utilização de diversas classes de fármacos. Anti-inflamatórios não-esteróides (AINES) são fármacos que, por meio da inibição da síntese de mediadores inflamatórios, como prostaglandinas (PGs),²⁹ apresentam grande eficácia como agentes analgésicos e antiedematogênicos. Além de serem importantes no sítio da inflamação, as PGs também são importantes no sistema nervoso central (SNC), o que torna os AINES uma classe de fármacos eficazes como antipiréticos e no tratamento de cefaléias.

Em casos de dores crônicas, notadamente neuropatias, os AINES não apresentam eficácia analgésica satisfatória. Nesses casos, geralmente usam-se alguns fármacos menos tradicionais com atividade analgésica, como anticonvulsivantes e antidepressivos.^{30,31} Entre os fármacos menos tradicionais usados como analgésicos estão os anticonvulsivantes. Muitos deles apresentam atividade antinociceptiva em diversos modelos experimentais e também podem ser úteis para aliviar diferentes condições dolorosas em humanos. O tratamento sistêmico com a

²⁶ M. J. Caterina, M. A. Schumacher, M. Tominaga, T. A. Rosen, J. D. Levine, D. Julius, *Nature*, 389 (1997) 816.

²⁷ I. Nagy, H. Rang. *Neuroscience*, 88 (1999) 995.

²⁸ F. Lembeck, P. Holzer, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 310 (1979) 175.

²⁹ J. R. Vane, *Nat New Biol.*, 231(1971) 232.

³⁰ S. H. Sindrup, T. S. Jensen., *Neurology*, 55 (2000) 915

³¹ T. S. Jensen, *Eur J Pain*, 6 (2002) 61.

lamotrigina, o felbamato e a gabapentina, anticonvulsivantes utilizados com frequência na clínica, inibe a dor neuropática em ratos,³² enquanto a carbamazepina, um dos anticonvulsivantes mais utilizados atualmente na terapêutica, inibe de maneira dose-dependente a hiperalgesia e o edema induzidos por levedura em ratos.³³ Além disso, foi demonstrado que o efeito antinociceptivo induzido por anticonvulsivantes pode resultar de mecanismos periféricos ou centrais.^{34,35,36,37}

O uso de anticonvulsivantes no tratamento de dores específicas, já estabelecido na clínica, ressalta a importância do teste de atividades anti-inflamatória e antinociceptiva das semicarbazonas, moléculas com atividade anticonvulsivante conhecida.³⁸

1.5. Doença de Alzheimer (DA): um processo inflamatório crônico

Doenças neurodegenerativas são patologias que acometem principalmente indivíduos com 85 anos ou mais. Em todo o mundo, cerca de 35,6 milhões de pessoas possuem alguma doença neurodegenerativa. Este número deve dobrar até 2030 (65,7 milhões) e mais que triplicar até 2050 (115,4 milhões), um reflexo do aumento da expectativa de vida mundial.³⁹ Essas patologias afetam populações em todos os países e estima-se que 60% dos casos no mundo estejam nas populações de países em desenvolvimento.⁴⁰

O tratamento atual de pessoas portadoras de doenças degenerativas gera um grande desgaste físico e emocional ao paciente e às famílias envolvidas, além de um custo estimado em aproximadamente 604 bilhões de dólares anualmente para todo o mundo.³⁹ A doença de Alzheimer (DA) caracteriza-se como um dos quadros clínicos mais comuns de patologias neurodegenerativas, representando cerca de 50 a 60% de todos os casos descritos. A DA e outras patologias neurodegenerativas caracterizam-se como problemas crescentes de saúde pública.⁴¹

A DA pode ser descrita como um quadro clínico onde há diminuição progressiva da cognição, assim como progressivos danos funcionais, sociais e profissionais decorrentes do

³² J. C. Hunter, K. R. Gogas, L. R. Hedley, L. O. Jacobson, L. Kassotakis, J. Thompson, D. J. Fontana, *Eur J Pharmacol.*, 324 (1997) 153.

³³ M. Bianchi, G. Rossoni, P. Sacerdote, A. E. Panerai, F. Berti, *Eur. J. Pharmacol.*, 294 (1995) 71.

³⁴ S. M. Todorovic, V. Edu, V. Jevtovic-Todorovic, *Br. J. Pharmacol.* 140 (2003) 255.

³⁵ S. M. Carlton, S. Zhou, *Pain.* 76 (1998) 201.

³⁶ F. W. Foong, M. Satoh, *Br. J. Pharmacol.* 83 (1984) 493.

³⁷ Y. Lu, K. N. Westlund, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 290 (1999) 214.

³⁸ H. Beraldo, *Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola* 6 (2005) 4.

³⁹ Organização Mundial da Saúde, OMS. Dementia cases set to triple by 2050 but still largely ignored. Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2012/dementia_20120411/en/> 12 set 2012.

⁴⁰ K. Blennow, M. J. de Leon, H. Zetterberg, *Lancet* 368 (2006) 387.

⁴¹ C. P. Ferri, M. Prince, C. Brayne, H. Brodaty, L. Fratiglioni, M. Ganguli, K. Hall, K. Hasegawa, H. Hendrie, Y. Huang, A. Jorm, C. Mathers, P. R. Menezes, E. Rimmer, M. Scazufca, *Lancet* 366 (2005) 2112.

processo degenerativo. Além da senilidade, outros fatores foram atribuídos ao desenvolvimento da patologia, mas muitos dados são inconclusivos. Dentre esses fatores, podem ser citados baixos índices de desenvolvimento intelectual e ocupacional principalmente nos primeiros períodos da vida do paciente, atividades física e mental reduzidas na terceira idade, injúrias provocadas no sistema nervoso central, hipertensão, aterosclerose, obesidade, fumo e diabetes.^{42,43} Dentre todos os fatores, destaca-se o fator genético que, por meio de estudos, demonstrou-se estar associado a cerca de 80% dos casos descritos.⁴⁴

Com relação às suas características patológicas, cérebros de pacientes acometidos por DA apresentam lesões associadas à formação de agregados ao nível microscópico (Figura 1.6). Estes agregados caracterizam-se, principalmente, pela precipitação do peptídeo β -amilóide (β A) no espaço extracelular e de emaranhados ou novelos neurofibrilares resultantes da agregação da proteína tau (proteína τ) nos corpos celulares e dendritos dos neurônios.^{40,45} Os agregados podem provocar danos neuronais e conseqüente perda sináptica. A correlação entre o número de agregados e a severidade do processo degenerativo da DA é bem descrita e, nas últimas décadas, tem despertado a atenção dos pesquisadores para o processo de formação das placas senis. Estas placas são consideradas manifestações estreitamente relacionadas ao desenvolvimento da patologia.⁴⁶ A crescente formação de agregados de β A e de proteína τ durante o desenvolvimento da DA promove a migração celular e conseqüente liberação local de citocinas, caracterizando a DA como um processo inflamatório crônico.⁴⁷

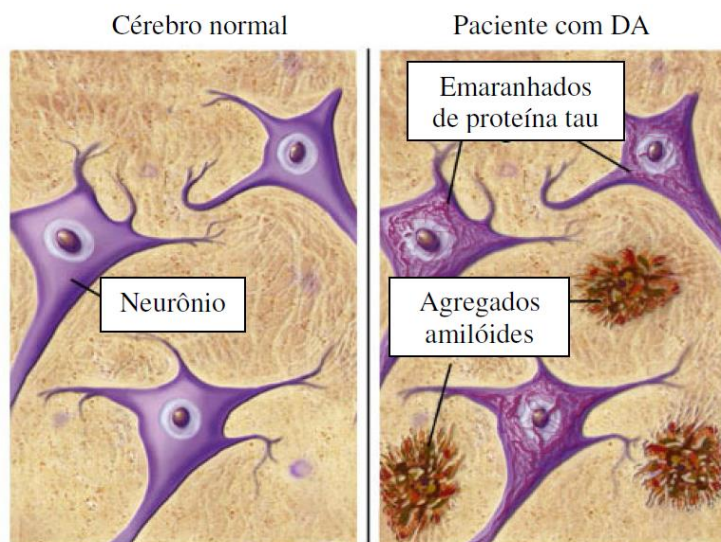


Figura 1.6. Representação esquemática das diferenças entre o cérebro sadio e o cérebro de um

⁴² R. Mayeux, *Annu. Rev. Neurosci.* 26 (2003) 81.

⁴³ J. A. Mortimer, D. A. Snowdon, W. R. Markesbery, *J. Clin. Exp. Neuropsychol.* 25 (2003) 671.

⁴⁴ M. Gatz, C. A. Reynolds, L. Fratiglioni, B. Johansson, J. A. Mortimer, S. Berg, A. Fiske, N. L. Pedersen, *Arch. Gen. Psychiatry* 63 (2006) 168.

⁴⁵ M. Kidd, *Nature* 197 (1963) 192.

⁴⁶ G. Blessed, B. E. Tomlinson, M. Roth, *Br. J. Psychiatry* 114 (1968) 797.

⁴⁷ J. M. Rubio-Perez, J. M. Morillas-Ruiz, *Scientific World Journal* 2012:756357 .

paciente com doença de Alzheimer (DA), evidenciando a presença de emaranhados de proteína tau e agregado de peptídeo β -amilóide.⁴⁸

Ainda não há tratamento eficaz para a DA. Entre os compostos disponíveis na clínica, destacam-se os inibidores de acetilcolinesterase (Figura 1.7). Estes compostos promovem o aumento da concentração de acetilcolina em cérebros de pacientes com DA, nos quais os níveis do neurotransmissor encontram-se baixos, ou antagonizam receptores glutamatérgicos NMDA, prevenindo estimulação neuronal aberrante.⁴⁹ São fármacos úteis, porém seus efeitos são transientes. Além disso, apresentam significativos efeitos adversos, tais como distúrbios gastrintestinais e cardíacos, espasmos musculares, cefaléia e insônia.⁵⁰

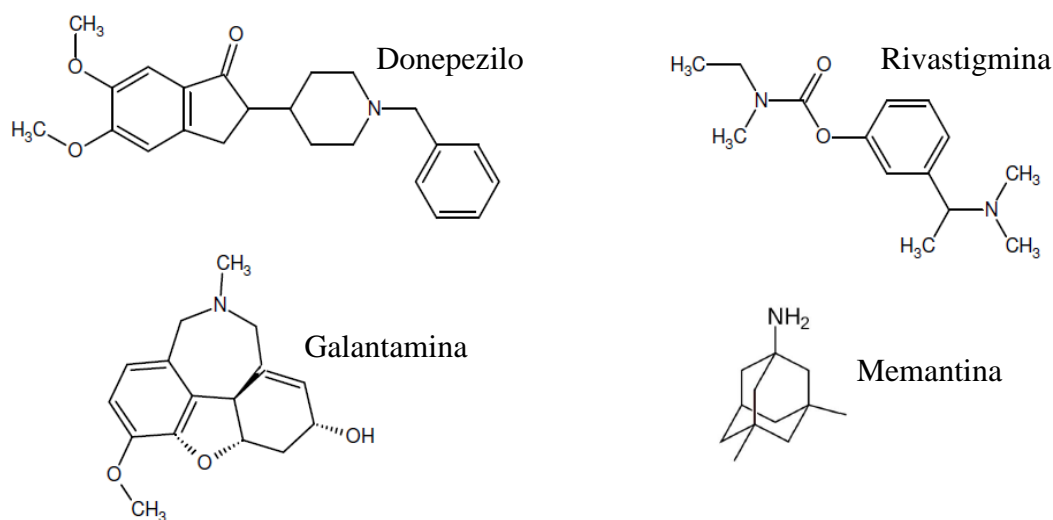


Figura 1.7. Inibidores de acetilcolinesterase utilizados na terapia da DA.

Uma das hipóteses para o desenvolvimento da doença de Alzheimer (DA) baseia-se no desequilíbrio entre a produção e eliminação do peptídeo β -amilóide (β A) no metabolismo celular.⁵¹ Foi observado que íons metálicos tais como cobre(II) e zinco(II) promovem a agregação de β A *in vitro*.^{52,53} Paralelamente, a administração de agentes quelantes a extratos de tecido cerebral obtido de pacientes com DA promoveu a desagregação das placas de β A.⁵⁴ Neste contexto, a terapêutica tem procurado alternativas para o tratamento da patologia por meio do

⁴⁸ Adaptado de: American Health Assistance Foundation (AHAF). Acesso em 18 set 2012.

Disponível em <<http://www.ahaf.org/alzheimers/about/understanding/plaques-and-tangles.html>>

⁴⁹ J. L. Cummings, N. Engl. J. Med. 351 (2004) 56.

⁵⁰ T. C. Russ, J. R. Morling, Cochrane Database Syst Rev. 12 (2012) 9:CD009132.

⁵¹ J. Hardy, D. J. Selkoe, Science 297 (2002) 353.

⁵² C. S. Atwood, R. D. Moir, X. Huang, R. C. Scarpa, N. M. Bacarra, D. M. Romano, M. A. Hartshorn, R. E. Tanzi, A. I. Bush, J. Biol. Chem. 273 (1998) 12817.

⁵³ A. I. Bush, W. H. Pettingell, G. Multhaup, M. d Paradis, J. P. Vonsattel, J. F. Gusella, K. Beyreuther, C. L. Masters, R. E. Tanzi, Science 265 (1994) 1464.

⁵⁴ J. Fonte, J. Miklossy, C. Atwood, R. J. Martins, J. Alzheimers Dis. 3 (2001) 209.

planejamento de agentes quelantes, que merecem destaque dentre os protótipos de fármacos atualmente desenvolvidos.⁵⁵ Experimentos em modelos animais de DA demonstraram que a administração sub-crônica de clioquinol (Figura 1.8) diminuía a deposição de placas de β A no cérebro de camundongos.⁵⁶

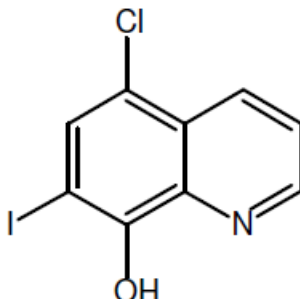


Figura 1.8. Clioquinol, protótipo de fármaco utilizado na terapia quelante da DA.

Em função da fisiopatologia da DA e da ausência de compostos realmente seguros e eficazes na terapêutica, a busca por novos protótipos de fármacos que atuem em diferentes alvos biológicos tornou-se uma abordagem crescente nas últimas décadas. Neste contexto, a inibição ou interferência na agregação de β A e da proteína τ surgem como áreas promissoras e semicarbazonas, tiosemicarbazonas e hidrazonas, atuando como agentes quelantes, são considerados potenciais candidatos a protótipos de fármacos para o tratamento da DA.

1.6. Atividade antimicrobiana de fármacos

O conceito de que uma substância produzida por um ser vivo possa matar outro (*antibiose*) é tão antigo quanto o estudo da microbiologia. Há mais de 2.500 anos, os chineses já conheciam as propriedades terapêuticas da coalhada mofada de soja, aplicando-a em furúnculos e infecções similares. Mais recentemente, o uso clínico da sulfanilamida (Figura 1.9, A) em 1936 iniciou a moderna era de terapia antimicrobiana. Esta era teve sua “idade áurea” com o advento da penicilina G (Figura 1.9, B) em 1941, considerada uma das dez mais importantes descobertas da humanidade em função da quantidade de vidas que foram salvas. Hoje, cerca de 30% de todos os pacientes hospitalizados recebem um ou mais tratamentos com antimicrobianos e milhões de infecções potencialmente fatais causadas por bactérias, fungos ou protozoários são curadas.⁵⁷

⁵⁵ L. R. Perez, K. J. Franz, Dalton Trans. 39 (2010) 2177.

⁵⁶ R. A. Cherny, C. S. Atwood, M. E. Xilinas, D. N. Gray, W. D. Jones, C. A. McLean, K. J. Barnham, I. Volitakis, F. W. Fraser, Y. Kim, X. Huang, L. E. Goldstein, R. D. Moir, J. T. Lim, K. Beyreuther, H. Zheng, R. E. Tanzi, C. L. Masters, A. I. Bush, Neuron 30 (2001) 665.

⁵⁷ Goodman & Gilman, As bases farmacológicas da terapêutica. 11 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, c2006.

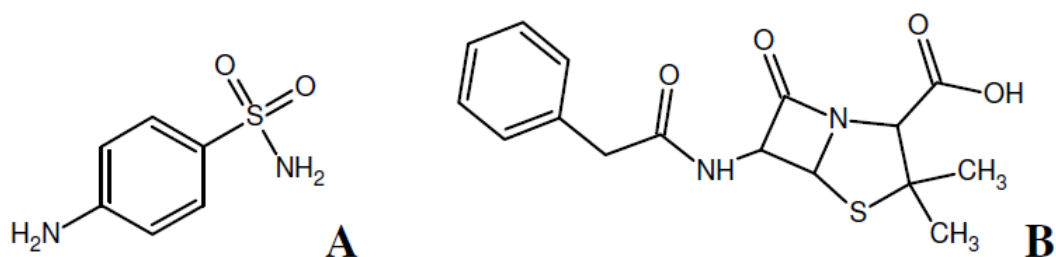


Figura 1.9. Estruturas da sulfanilamida (A) e penicilina G (B).

Os antibióticos, como as penicilinas, são substâncias originalmente produzidas por organismos vivos, como fungos, e suprimem o crescimento ou até mesmo destroem outros organismos, como bactérias. O termo *antimicrobiano* é mais abrangente, e compreende compostos derivados de síntese, ou mesmo antibióticos anteriormente obtidos de fontes naturais e hoje produzidos por meio de síntese. Produtos obtidos a partir de síntese são as substâncias que, atualmente, mais enriqueceram nosso arsenal terapêutico.⁵⁷

Há alguns anos, nosso grupo se dedica ao estudo de protótipos de fármacos antimicrobianos, como as semicarbazonas, seus complexos metálicos ou mesmo os complexos metálicos de fármacos já existentes no mercado, com o objetivo de desenvolver novos agentes terapêuticos, mais eficazes ou capazes de driblar a crescente resistência microbiana aos fármacos já disponíveis no mercado.

1.7. Fungos patogênicos e a Química Inorgânica Medicinal

O número estimado de espécies de fungos no planeta é de cerca de 1,5 milhões, mas as espécies descritas até hoje estão em torno de apenas 70 mil.⁵⁸ Basicamente, fungos podem ser classificados em unicelulares (leveduras) e multicelulares. A maior parte é formada por seres que não parasitam outros organismos, ou seja, de vida livre. Porém, fungos patogênicos uni- ou multicelulares constituem um grande problema de saúde pública.⁵⁹

Dermatofitoses são patologias ocasionadas pela colonização de fungos na pele e seus anexos, como cabelos e unhas e são também denominadas onicomicoses.⁶⁰ Popularmente, são conhecidas como “tinhas” e “pé-de-atleta”, por exemplo. *Trichophyton rubrum* (Figura 1.10) é um fungo multicelular causador de dermatofitoses e, desde 1950, é a principal espécie encontrada em 80-90% dos casos clínicos, acometendo todo o mundo.⁶¹

⁵⁸ D. L. Hawksworth, A. Y. Rossman, *Phytopathol*, 87 (1997) 888.

⁵⁹ G. J. Tortora. *Microbiologia*. 8 ed. Porto Alegre: ArtMed, c2005

⁶⁰ O. Welsh, L. Vera-Cabrera, E. Welsh, *Clin Dermatol*. 28 (2010) 151.

⁶¹ C. Seebacher, J. P. Bouchara, B. Mignon, *Mycopathologia*, 166 (2008) 335



Figura 1.10. Fotomicrografia de *T. rubrum* (A)⁶² e dermatofitose causada por fungo (B).⁶³

O tratamento de dermatofitoses causadas por *T. rubrum* geralmente é feito por meio do debridamento (químico ou mecânico) associado à administração de antifúngicos, como griseofulvina, clotrimazol, cetoconazol e fluconazol (Figura 1.11). Apesar de eficazes e seguros, tratamentos com esses fármacos são longos (podendo levar meses), o que muitas vezes prejudica a continuidade da terapia pelo paciente. Além disso, efeitos adversos como irritações na pele, dermatites, prurido, cefaléia, náuseas e vômitos podem ocorrer.⁵⁷ Estes fatores reforçam a importância da busca de novos agentes antifúngicos.

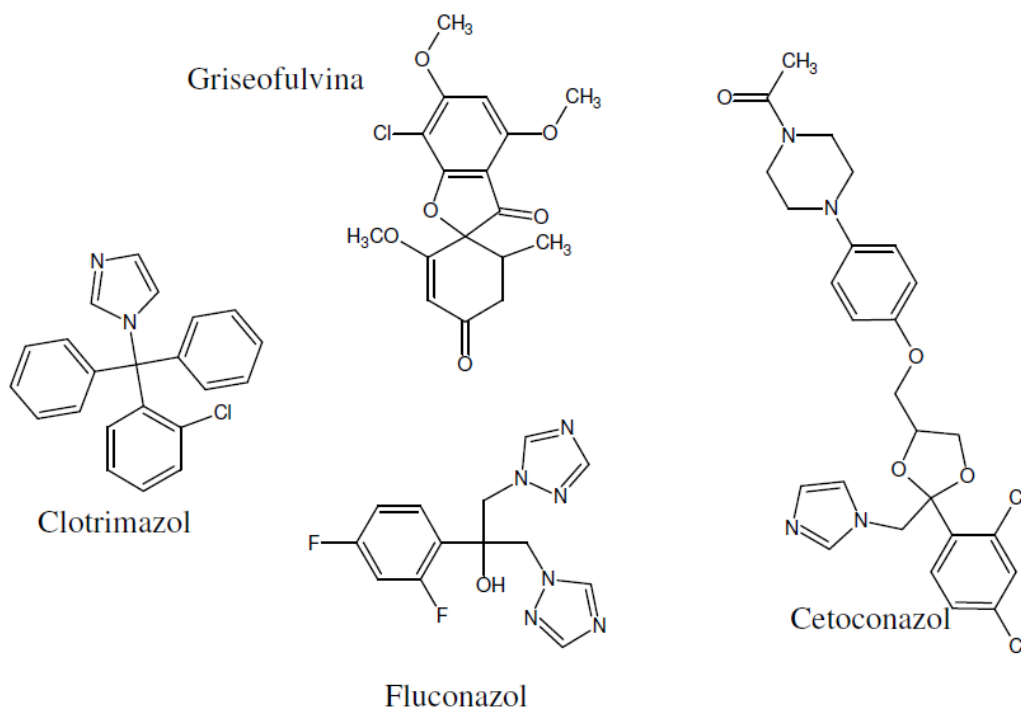


Figura 1.11. Estruturas de antifúngicos utilizados no tratamento de dermatofitoses causadas por *T. rubrum*.

⁶² Imagem *Trichophyton rubrum*. Disponível em <http://www.ciriscience.org/ph_91Hyphae_mycelium_of_Trichophyton_rubrum_Copyright_Dennis_Kunkel_Microscopy>19 jan 2011.

⁶³ Imagem dermatofitose. Disponível em <<http://www.marcoantoniodeoliveira.com.br/micose-de-pele.php>> 19 jan 2011.

1.8. Gálio: atividade farmacológica e usos em medicina

O gálio, elemento do grupo 13, mostra-se ativo em diversas patologias como distúrbios de reabsorção óssea, alguns tipos de tumores, doenças infecciosas e processos inflamatórios. Atualmente, é o segundo metal mais utilizado no tratamento de câncer, depois da platina, na forma de nitrato de gálio.^{64,65}

As atividades antimicrobiana e antineoplásica do íon gálio(III) parecem estar relacionadas às suas similaridades com o íon ferro(III). Esses íons se assemelham quanto à sua eletronegatividade, afinidade eletrônica, raio iônico e geometria de coordenação.⁶⁶ No entanto, o íon gálio(III) não é reduzido em condições fisiológicas. Portanto, o íon gálio(III) pode interferir no metabolismo celular do ferro. Estudos recentes sugerem que o gálio é transportado para o interior das células pela transferrina e, uma vez dentro das células, pode competir com o ferro(III) presente na enzima ribonucleotídeo redutase (RDR), substituindo-o.⁶⁷ A RDR está envolvida na biossíntese do DNA, na conversão de ribonucleotídeos em desoxirribonucleotídeos. Sua atividade torna-se exacerbada em muitas doenças, o que a torna um alvo interessante para a quimioterapia.

A complexação de gálio (III) com moléculas orgânicas é uma estratégia promissora no desenvolvimento de fármacos antineoplásicos. O nitrato de gálio, apesar de eficaz na terapia do câncer, hidrolisa-se facilmente em meio biológico, formando óxidos insolúveis e bloqueando a absorção e a penetração na membrana dos íons gálio(III). Complexos de gálio(III) poderiam, portanto, aumentar a biodisponibilidade do metal e, conseqüentemente, sua eficácia.⁶⁸ Além disso, a formação de complexos de gálio(III) com moléculas que possuem atividade antitumoral comprovada pode conferir ao produto final maior atividade, por meio do sinergismo.

A atividade antimicrobiana do gálio também é atribuída à perturbação de mecanismos relacionados ao ferro(III).⁶⁹ Sais de gálio, como o maltolato de gálio(III)⁷⁰ e o nitrato de gálio(III)⁷¹, bem como compostos de gálio com moléculas orgânicas⁶⁶ são relatados como potenciais agentes antimicrobianos, incentivando o desenvolvimento e estudo de novos complexos deste metal.

⁶⁴ D. Chen, M. Frezza, R. Shakya, Q. C. Cui, V. Milacic, C. N. Verani, Q. P. Dou, *Cancer Res.* 67 (2007) 9258.

⁶⁵ G. Bandoli, A. Dolmella, F. Tisato, M. Porchia, F. Refosco, *Coord. Chem. Rev.* 253 (2009) 56.

⁶⁶ L. R. Bernstein, *Pharmacol Rev.* 50 (1998) 665.

⁶⁷ S. Gomez-Ruiz, B. Gallego, M. R. Kaluderović, H. Kommera, E. Hey-Hawkins, R. Paschke, G. N. Kaluderovic, *J. Organomet. Chem.* 694 (2009) 2191.

⁶⁸ A. V. Rudnev, L. S. Foteeva, C. Kowol, R. Berger, M. A. Jakupec, V. B. Arion, A. R. Timerbaev, B. K. Keppler, *J. Inorg. Biochem.* 100 (2006) 1819.

⁶⁹ J. E. Moore, A. Murphy, B. C. Millar, A. Loughrey, P. J. Rooney, J. S. Elborn, C. E. Goldsmith, *J. Microbiol. Meth.* 76 (2009) 201.

⁷⁰ J. R. Harrington, R. J. Martens, N. D. Cohen, L. R. Bernstein, *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 29 (2006) 121.

⁷¹ Y. Kaneko, M. Thoendel, O. Olakanmi, B. E. Britigan, P. K. Singh, *J. Clin. Invest.* 117 (2007) 877.

1.9. Zinco: atividade farmacológica e usos em medicina

O zinco, elemento do grupo 12, é o segundo metal mais abundante no organismo, depois do ferro. Em 1934, foi comprovado que o zinco é essencial ao crescimento normal de ratos,⁷² e desde então estudos nutricionais e farmacológicos relacionados ao metal são frequentemente encontrados. Hoje, sabe-se que é um metal importante em diversos processos bioquímicos do nosso organismo, estando presente em muitas metaloenzimas, como na anidrase carbônica, relacionada à manutenção do pH do sangue,⁷³ e na enzima conversora de angiotensina (ECA), relacionada ao processo de manutenção da pressão sanguínea.⁷⁴ Estas e outras metaloenzimas de zinco(II) são arquétipos úteis como alvos no desenvolvimento de novos fármacos.

Atualmente, compostos de zinco(II) são utilizados na clínica no tratamento tópico de infecções causadas por fungos⁷⁵ e mucosites (inflamações da mucosa oral) decorrentes da quimioterapia do câncer.⁷⁶ Sais de zinco(II) fazem parte do tratamento de doenças metabólicas graves, como a doença de Wilson.⁷⁷ Estudos clínicos evidenciam a relação entre a deficiência de zinco(II) e maior suscetibilidade a parasitoses, como giardíase.⁷⁸ Além disso, estudos recentes demonstraram a promissora atividade antibacteriana e anti-inflamatória de complexos de zinco(II).^{79,80}

Associando sua baixa toxicidade às atividades biológicas, o zinco(II) torna-se um promissor componente na busca de novos complexos metálicos seguros e eficazes para a terapia de várias patologias.

1.10. Estudo de estabilidade de fármacos e formulações farmacêuticas

Desde o início do século XX, quando fármacos como as sulfas e a penicilina G foram introduzidos na clínica, já se sabia da possibilidade de efeitos adversos induzidos por formulações farmacêuticas e seus componentes. Após alguns acidentes graves, como os mais de 100 óbitos decorrentes da presença de dietilenoglicol em xarope de sulfanilamida nos Estados Unidos no início do século XX, as agências reguladoras de saúde de todo o mundo iniciaram o

⁷² W. R. Todd, C. A. Elvehjem, E. B. Hart, *Am. J. Physiol.* 107 (1934) 146.

⁷³ T. K. Hurst, D. Wang, R. B. Thompson, C. A. Fierke, *Biochim. Biophys. Acta.* 1804 (2010) 393.

⁷⁴ V. Dive, C. F. Chang, A. Yiotakis, E. D. Sturrock, *Curr. Pharm. Des.* 15 (2009) 3606.

⁷⁵ Y. S. Bae, N. D. Hill, Y. Bibi, J. Dreiherr, A. D. Cohen *Dermatol Clin.* 28 (2010) 587.

⁷⁶ H. V. Worthington, J. E. Clarkson, O. B. Eden, *Cochrane Database Syst. Rev.* 17 (2007) CD000978.

⁷⁷ M. L. Schilsky, *Biochimie*, 91 (2009) 1278

⁷⁸ L. Quihui, G. G. Morales, R. O. Méndez, J. G. Leyva, J. Esparza, M. E. Valencia, *BMC Public Health*, 10 (2010) 85.

⁷⁹ J.G. Da Silva, S.M.S.V. Wardell, J.L. Wardell; H. Beraldo, *J. Coord. Chem.* 62 (2009) 1400.

⁸⁰ C.T. Dillon, T.W. Hambley, B.J. Kennedy, P.A. Lay, Q. Zhou, N.M. Davies, J.R. Biffin, H.L. Regtop, *Chem. Res. Toxicol.* 16 (2003) 28.

estabelecimento de medidas regulatórias rígidas e o acompanhamento dos medicamentos comercializados. O objetivo era manter a qualidade dos produtos em todo o período em que eles fossem ofertados aos pacientes. Os estudos de estabilidade das formulações farmacêuticas e dos seus componentes, incluindo os princípios ativos, são parte deste movimento em prol da garantia da qualidade dos fármacos ofertados à população.^{81,82}

O estudo de estabilidade é uma etapa importante no desenvolvimento de fármacos e candidatos a fármacos, mas muitas vezes é negligenciada nas investigações iniciais. Prazos de validade e as vias ideais de administração das substâncias e dos produtos acabados podem ser estabelecidos por meio da avaliação das propriedades físicas, químicas e físico-químicas. Especialmente em trabalhos iniciais, quando são obtidos os princípios ativos, variáveis como alterações de temperatura, umidade, luminosidade e a suscetibilidade aos processos de oxidação ou hidrólise devem ser consideradas.⁸³

Portanto, além da caracterização dos compostos e de suas propriedades farmacológicas, o estudo de estabilidade deve ser incluído nas etapas iniciais de obtenção de candidatos a fármaco.

1.11. Formulações farmacêuticas: ciclodextrinas

Um dos focos de interesse de nossa equipe tem sido a preparação de novas formulações farmacêuticas de medicamentos em uso clínico ou de candidatos a novos fármacos. Entre as diferentes formulações, aquelas com ciclodextrinas têm apresentado resultados muito promissores.^{84,85}

Ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos constituídos de unidades de glicose unidas pela ligação $\alpha(1-4)$, sendo as mais conhecidas as que apresentam 6, 7 ou 8 unidades de glicose, denominadas respectivamente α , β e γ -ciclodextrina. A Figura 1.12 apresenta a estrutura esquemática da β -ciclodextrina.

⁸¹ J. R. Laporte, G. Tognoni. *Princípios de epidemiologia del medicamento*. 2 ed. Barcelona: Ediciones Científicas y Técnicas S. A. c1993.

⁸² BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 17, de 16 de abril de 2010. Dispõe sobre as boas práticas de fabricação de medicamentos. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/6347788044658f63970cbf8b9c163b5b/RDC+N+17-10.pdf?MOD=AJPERES&useDefaultText=0&useDefaultDesc=0>> Acesso em 20 jan 2010.

⁸³ International Conference on Harmonisation (ICH) of requirements for registration of pharmaceuticals for human use. Stability Testing of New Drugs Substances and Products Q1A(R2). Disponível em: <<http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA419.pdf>>. Acesso em 20 jan 2010.

⁸⁴ L. R. Teixeira, R. D. Sinisterra, R. P. Vieira, M. C. Doretto, H. Beraldo, J. Incl. Phenom. Macro., 47 (2003) 77.

⁸⁵ H. Beraldo, R. D. Sinisterra, L. R. Teixeira, R. P. Vieira, M. C. Doretto, Biochem. Biophys. Res. Commun. 16 (2002) 241.

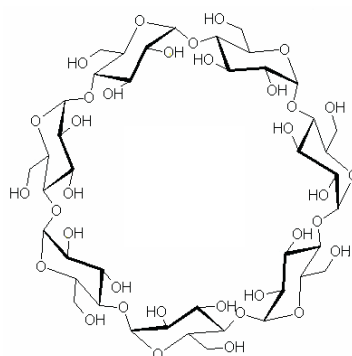


Figura 1.12. Estrutura da β -ciclodextrina

Ciclodextrinas são compostos quimicamente estáveis, que podem ser modificados de maneira regiosseletiva. Conforme estudos detalhados de toxicidade, mutagenicidade, teratogenicidade e carcinogenicidade, as ciclodextrinas se apresentam aptas a serem utilizadas em formulações farmacêuticas, principalmente a β -ciclodextrina. As ciclodextrinas (hospedeiros) formam complexos com várias moléculas hidrofóbicas (hóspedes), incluindo-as em sua cavidade, de forma completa ou parcial. A inclusão, além de levar a um aumento de estabilidade, solubilidade e biodisponibilidade das moléculas hóspedes, em muitos casos melhora também a liberação do fármaco.⁸⁶

O preparo de compostos de inclusão em ciclodextrinas e a avaliação da estabilidade constituem parte importante deste trabalho.

1.12. Determinação do coeficiente de partição teórico e experimental de fármacos

A otimização das propriedades físico-químicas das moléculas é uma etapa importante no desenvolvimento de novos fármacos. A solubilidade em fluidos biológicos é um dos principais parâmetros a ser avaliado. O equilíbrio entre hidrofilia e lipofilia é importante para a distribuição do fármaco em todo o organismo e subsequente ligação das moléculas ativas ao alvo biológico. A solubilidade em água é desejável para que o fármaco se disperse inicialmente nos fluidos biológicos, como o suco gástrico em casos de administração *per os*.^{87,88} Simultaneamente, a afinidade por compostos lipofílicos, como lipídeos, permite às moléculas atravessar membranas biológicas e alcançar seus receptores, etapas subsequentes à solubilização nos fluidos.⁸⁹

Atualmente, a determinação do coeficiente de partição *n*-octanol/água consiste no método usual de previsão de hidrofilia e lipofilia de um candidato a fármaco. A partir de uma

⁸⁶ M. E. Davis, M. E. Brewster, *Nature Rev.*, 3 (2004) 1024.

⁸⁷ S. Stegemann, F. Leveiller, D. Franchi, H. de Jong, H. Lindén, *Eur. J. Pharm. Sci.* 31 (2007) 249.

⁸⁸ C. A. Lipinski, *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* 44 (2000) 235.

⁸⁹ A. P. Hill, R. J. Young, *Drug Discov. Today*, 15 (2010) 648.

massa conhecida, o método descreve a partição da molécula não-ionizada em meio aquoso e em *n*-octanol, solvente que simula lipídeos das membranas celulares. Uma vez que a determinação experimental do coeficiente de partição é trabalhosa, pode requisitar técnicas sofisticadas e de alto custo (cromatografia líquida de alta eficiência) e demandar bastante tempo, programas de computadores foram criados para prever e otimizar os valores do coeficiente de partição para diversas moléculas. Quando possível, a comparação entre valores teóricos e experimentais é importante na validação dos resultados obtidos.

Portanto, seja *in silico* ou de forma experimental, a previsão do valor do coeficiente de partição é uma etapa que auxilia na elucidação da biotransformação e dos mecanismos de ação de um candidato a fármaco.

1.13. Cálculos teóricos

Os primeiros estudos visando estabelecer relações estrutura-atividade para fármacos demandavam a síntese de diversos análogos estruturais e a realização de sucessivos testes de atividade biológica *in vitro* e *in vivo*. Estas técnicas ainda são importantes na descoberta de novos protótipos de fármacos, mas são dispendiosas, requerem muito tempo e nem sempre alcançam os resultados desejados.⁹⁰ Neste contexto, os programas de simulação em computadores e os bancos de dados surgiram como ferramentas úteis na triagem de novos fármacos e, atualmente, permitem uma análise rápida da atividade biológica *versus* propriedades físico-químicas de uma série de análogos estruturais.⁹¹

De acordo com a IUPAC, a Química Computacional aborda métodos matemáticos utilizados no cálculo de propriedades moleculares e simulação do comportamento molecular. No caso da modelagem molecular, objetiva-se a investigação das estruturas e das propriedades moleculares utilizando técnicas de visualização gráfica, visando fornecer uma representação tridimensional em condições experimentais pré-estabelecidas.⁹² Como consequência, são obtidas propriedades físico-químicas e relativas à reatividade dos compostos, permitindo elucidar os mecanismos de ação dos fármacos, associando conhecimentos fundamentais de Química Orgânica, Bioquímica, Biologia Molecular, Fisiologia e Farmacologia.

Dessa forma, os métodos de química computacional são ferramentas úteis, permitindo associação e discussão dos resultados obtidos *in silico* com os resultados farmacológicos *in vitro* e *in vivo*.

⁹⁰ G. Thomas. Medicinal Chemistry: An introduction, Wiley: Chichester, c2000.

⁹¹ I. Carvalho, M. T. Pupo, Á. D. L. Borges, L. S. C. Bernardes, Quim. Nova, 26 (2003) 428.

⁹² C. M. R. Sant'Anna, Quim. Nova 25 (2002) 505.

1.14. Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória de semicarbazonas análogas de BS, derivadas de 2-, 3- e 4-hidroxibenzaldeídos, e relacionar as bioatividades das semicarbazonas ao seu caráter lipofílico e a outras propriedades físico-químicas por meio de cálculos computacionais. A discussão dos resultados baseou-se na correlação entre resultados experimentais *in vitro* e *in vivo* e propriedades físico-químicas dos compostos, calculadas ou obtidas experimentalmente. Outro objetivo do presente trabalho foi avaliar a estabilidade das semicarbazonas e a influência da inclusão em ciclodextrinas sobre a estabilidade desses compostos.

Ainda na linha de investigação sobre compostos anti-inflamatórios foram avaliadas *bis*(semicarbazonas), *bis*(tiossemicarbazonas) e *bis*(hidrazonas) derivadas de 2,6-diacetilpiridina quanto à sua capacidade de inibir a agregação do peptídeo β -amilóide por meio da complexação ao cobre(II) e zinco(II), considerados indutores da agregação.

Finalmente constituiu objetivo do presente trabalho investigar a atividade de semicarbazonas selecionadas e seus complexos metálicos contra fungos patogênicos.

Capítulo 2. Parte Experimental

2.1 Preparo e caracterização dos compostos

2.1.1 Equipamentos, métodos e materiais

2.1.1.1 Reagentes e Solventes

As reações foram realizadas utilizando reagentes com alto grau de pureza e solventes P.A. adquiridos de fontes comerciais (Sigma-Aldrich, Fluka, Merck, Synth, Vetec, Quimex e Strem Chemicals, Anachemia, EMD, Tokyo Chemical Industry). Os solventes deuterados foram oriundos do Cambridge Isotope Laboratories, Inc (CIL).

2.1.1.2 Pesagens

As pesagens foram realizadas em balança analítica Mettler AE 163, precisão 0,0001g. Na Universidade Simon Fraser / Canadá, as pesagens foram realizadas em balança analítica Sartorius MC1 AC 1205, precisão 0,0001g.

2.1.1.3 Obtenção de benzaldeído semicarbazona (BS), 2-, 3- e 4-hidroxibenzaldeído semicarbazonas (2-, 3- e 4-OHBS)

As arilsemicarbazonas foram preparadas conforme o método descrito na literatura e por membros de nosso grupo.^{1,2,3,4} Uma solução etanólica (10 mL) do respectivo aldeído (benzaldeído, 2-, 3- ou 4-hidroxibenzaldeído, 2,5 mmol) foi adicionada lentamente a uma solução aquosa (7,0 mL) contendo cloridrato de semicarbazida (2,5 mmol) e acetato de sódio (2,5 mmol). As suspensões foram mantidas sob agitação e refluxo por 8 horas. Os sólidos obtidos foram filtrados sob pressão reduzida e lavados com água destilada, etanol e éter, nesta ordem. Os produtos foram caracterizados por seus pontos de fusão, espectroscopia de IV, UV-visível e RMN.

¹ J. R. Dimmock, K. K. Sidhu, R. S. Thayer, P. Mack, M. J. Duffy, R. S. Reid, J. W. Quail, U. Pugazhenthii, A. O. N. G., J. A. Bikker, D. F. Weaver, *J. Med. Chem.* 36 (1993) 2243.

² H. Beraldo, R. D. Sinisterra, L. R. Teixeira, R. P. Vieira, M. C. Doretto, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 16 (2002) 241.

³ R. P. Vieira, L. T.S. Rocha, L. R. Teixeira, R. D. Sinisterra, M. M. Coelho, H. Beraldo, *Revista Virtual de Química*, 2 (2010) 2.

⁴ M. Vieites, P. Buccino, L. Otero, M. González, O. E. Piro, R. S. Delgado, C. M. R. Sant'Anna, E. J. Barreiro, H. Cerecetto, D. Gambino, *Inorg. Chim. Acta*, 358 (2005) 3065.

2.1.1.4 Obtenção de 2,6 diacetilpiridina tiossemicarbazona, 2,6 diacetilpiridina semicarbazona e 2,6 diacetilpiridina hidrazona (DAPT, DAPS, DAPH, respectivamente)

Os derivados foram preparados na Universidade Simon Fraser (SFU) / Canadá, baseado em um método adaptado da literatura.⁵ Foram adicionados 10 mL da solução de 2,6-diacetilpiridina (2 mmol) em etanol absoluto aquecido a 4 mmols de tiossemicarbazida, acetil hidrazida ou cloridrato de semicarbazida (previamente neutralizado com acetato de sódio), dissolvidos em 10 mL de água. Gotas de solução de ácido clorídrico foram adicionadas até que o meio reacional apresentasse valor de pH entre 4 e 5, a fim de catalisar a reação de condensação. As suspensões foram mantidas sob agitação e refluxo por 8 horas. Os sólidos obtidos foram filtrados sob pressão reduzida e lavados com água destilada, etanol e éter, nesta ordem. Os produtos foram caracterizados por espectroscopias de RMN e infravermelho e espectrometria de massas.

2.1.1.5 Complexos de gálio(III) e zinco(II) de 2-OHBS

Procuramos preparar complexos de gálio(III) e zinco(II) com 2-, 3- e 4-OHBS utilizando os métodos descritos abaixo. No entanto só conseguimos obter complexos com 2-OHBS. Nos outros casos, a semicarbazona não reagiu.

O complexo de gálio(III) foi preparado a partir da reação de 1 mmol de 2-OHBS com 1 mmol de nitrato de gálio(III) ($\text{GaNO}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$) em metanol anidro, na presença de 2 mmol de acetato de sódio. A mistura foi submetida a refluxo e agitação por 24 horas. Após este período, o precipitado formado foi isolado por filtração e lavado com metanol anidro e éter etílico. Em seguida, o sólido foi secado sob pressão reduzida. O complexo de 2-OHBS, $[\text{Ga}_2(2\text{OBS})_3]$, foi caracterizado por faixa de fusão, análise elementar, medida de condutividade, espectroscopias de infravermelho e RMN de ^1H , ^{13}C , DEPT e HMQC.

O complexo de zinco(II) foi preparado a partir da reação de 1 mmol da semicarbazona desejada com 4 mmol de acetato de zinco(II) ($\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) em metanol anidro. A mistura foi submetida a refluxo e agitação por 10 minutos. Após este período, o precipitado formado foi isolado por filtração e lavado com metanol anidro e éter etílico. Em seguida, o sólido foi submetido à secagem, sob pressão reduzida.

O complexo de zinco(II) de 2-OHBS ($[\text{Zn}(2\text{OBS})(\text{AcO})]$) foi obtido e caracterizado por faixa de fusão, análise elementar, medida de condutividade, espectroscopia de infravermelho e RMN de ^1H , ^{13}C , DEPT e HMQC. Cristais do complexo foram obtidos a partir da água-mãe e classificados como satisfatórios para medidas de difração de raios X.

⁵ A. A. Abu-Hussen, W. Linert, Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc., 74 (2009) 214.

2.1.1.6 Obtenção de compostos de inclusão de BS em β -ciclodextrina (BS β CD)

O composto de inclusão 1:1 BS β CD foi preparado e caracterizado conforme o método descrito na literatura por nosso grupo.⁶

2.1.1.7 Ponto de Fusão

Os pontos de fusão dos compostos foram determinados utilizando-se o equipamento Mettler FP 90.

2.1.1.8 Análise condutimétrica

O equipamento utilizado nas medidas de condutividade molar foi um condutivímetro YSI Conductivity Bridge, modelo 31, com célula condutimétrica do mesmo fabricante, de constante 0,088 cm⁻¹. As medidas foram feitas a partir de soluções de concentração 1,0 x 10⁻³ mol.L⁻¹ e 1,0 x 10⁻⁴ mol.L⁻¹ dos compostos, utilizando-se dimetilformamida (DMF), metanol e dimetilsulfóxido (DMSO) como solventes. Os resultados obtidos para soluções em DMF e metanol foram analisados conforme a atribuição apresentada na Tabela 2.1. Para as soluções em DMSO, os resultados obtidos para os compostos foram comparados às medidas de compostos padrão, descritos na Tabela 2.2.

Tabela 2.1. Atribuição de tipo de eletrólito em solução (DMF e metanol).⁷

Solvente	Λ_M (cm ² . Ω^{-1} .mol ⁻¹)	Tipo de eletrólito
DMF	65-90	1:1
	130-170	2:1
	200-240	3:1
Metanol	80-115	1:1
	160-220	2:1
	290-350	3:1

⁶ L. R. Teixeira, R. D. Sinisterra, R. P. Vieira, M. C. Doretto, H. Beraldo, J. Incl. Phenom. Microc. Chem., 47 (2003) 77.

⁷ J. W. Geary, Coord. Chem. Rev. 7 (1971) 81.

Tabela 2.2. Atribuição de tipo de eletrólito em solução (DMSO).

Solvente	Λ_M ($\text{cm}^2 \cdot \Omega^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$)	Tipo de eletrólito	Soluções referência ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
DMSO	0,73 – 0,86	Neutro	2-hidroxibenzaldeído semicarbazona, 3-hidroxibenzaldeído semicarbazona, 4-hidroxibenzaldeído semicarbazona
	27,02 – 43,14	1:1	KCl (cloreto de potássio), NaCl (cloreto de sódio), $\text{CH}_3\text{COO} \cdot \text{Na}^+$ (acetato de sódio), $\text{LiClO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (perclorato de lítio triidratado), NH_4PF_6 (hexafluorofosfato de amônio)
	72,08 – 74,02	2:1	$\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (cloreto de bário diidratado), $\text{Ba}(\text{NO}_3)_2$ (nitrato de bário)

2.1.1.9 Análise Elementar

As análises elementares foram realizadas no Departamento de Química da UFMG, e na Central Analítica do Instituto de Química da USP. Em ambos os casos, utilizou-se o equipamento CHN 2400, Perkin Elmer.

2.1.1.10 Difração de Raios X

As estruturas cristalográficas foram determinadas em colaboração com o Prof. Dr. Nivaldo Speziali do Departamento de Física da UFMG e com a Profa. Dr^a. Isolda Maria de Castro Mendes do Departamento de Química da UFMG. Os detalhes e as condições experimentais de cada medida são descritas nos capítulos correspondentes.

2.1.1.11 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV)

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos por meio de um espectrofotômetro Perkin Elmer FT-IR System-Spectrum GX, localizado no Departamento de Química da UFMG. Os espectros foram registrados nas regiões 4000-400 e 710-200 cm^{-1} , empregando pastilhas de KBr ou emulsões de nujol em janelas de CsI. Na Universidade Simon Fraser / Canadá, os espectros na região do infravermelho foram obtidos por meio de um espectrofotômetro Thermo Nicolet Nexus 670 FTIR na região 4000-700 cm^{-1} .

2.1.1.12 Ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de RMN foram registrados em espectrômetros Bruker DRX-400 Avance (400 MHz) e Bruker DPX-200 (200 MHz) localizados no Laboratório de Ressonância Magnética de Alta Resolução (Laremar) do Departamento de Química da UFMG. As soluções foram preparadas utilizando-se DMSO-*d*₆ como solvente e TMS como referência interna, em tubos de 5 mm de diâmetro externo. Na SFU, os espectros de RMN foram registrados em espectrômetros Bruker AV-500 (500 MHz). As soluções foram preparadas utilizando-se CDCl₃ e DMSO-*d*₆ como solventes.

2.1.1.13 Espectros eletrônicos (UV-vis)

No Departamento de Química da UFMG, os espectros eletrônicos em solução foram registrados no espectrofotômetro HP8453 diode array, acoplado a um banho termostatizado VWR1160A operando a 25 ± 0,1 °C, utilizando-se uma cubeta de quartzo com 1 cm de caminho ótico. Na SFU, os espectros eletrônicos em solução foram registrados no espectrofotômetro Varian CARY 5000, operando a 25 °C, igualmente utilizando-se uma cubeta de quartzo com 1 cm de caminho ótico.

2.1.1.14 Determinação dos valores de pH

O equipamento utilizado nas medidas foi um pHmetro de bancada Marte, modelo M-10/MB-10P, com eletrodo combinado de vidro para determinações em solução aquosa. O equipamento utilizado nas medidas na Universidade Simon Fraser / Canadá foi um pHmetro portátil Iq 140, com eletrodo combinado de vidro para determinações em solução aquosa e compensador interno de temperatura.

2.1.1.15 Cálculos teóricos das propriedades físico-químicas das arilsemicarbazonas

Os cálculos teóricos foram realizados utilizando o programa Gaussian'03. As análises conformacionais foram realizadas em fase gasosa pelo método MMFF. As distâncias e os ângulos foram refinados por meio dos métodos DFT (B3LYP) e MP2 e comparados aos dados cristalográficos disponíveis na literatura.^{8,9,10} A partir dos isômeros conformacionais de menor

⁸ J. R. Dimmock, J. K. K. Sidhu, R. S. Thayer, P. Mack, M. J. Duffy, J. R. S. Reid, J. W. Quail, U. Pugazhenthii, A. Ong, J. A. Bikker, D. F. Weaver, J. Med. Chem., 36 (1993) 2243.

⁹ X. ShiTai, M. YangHao, J. Yinc, Z. P. Liang, Acta Crystallogr. Sect. E, E63 (2007) o1725.

¹⁰ J. Valdés-Martínez, R. A. Toscano, R. Salcedo, R. Cea-Olivares, A. Meléndez, Monatsh. Chem. Chem. Mon. 121 (1990) 641.

energia foram obtidas, em vácuo e meio aquoso, as propriedades físico-químicas de cada molécula, tais como as cargas atômicas, as energias do LUMO e a contribuição dos orbitais do carbono imínico (C=N) para a energia total do LUMO.

2.1.1.16 Determinação experimental do coeficiente de partição *n*-octanol/água ($P_{o/a}$, tampão pH 7,4) de BS, 2-OHBS, 3-OHBS, 4-OHBS

O coeficiente de partição *n*-octanol/água das arilsemicarbazonas foi determinado utilizando o método de agitação (*shake flask*).¹¹ O método se mostrou adequado à determinação de $P_{o/a}$, uma vez que os valores teóricos do logP para os compostos encontram-se entre -2 e 4, cumprindo um dos requisitos normativos.¹¹ Utilizou-se tampão fosfato (NaCl 137 mM, fosfato 10 mM e KCl 2,7 mM, pH 7,4) como fase aquosa com o objetivo de simular meios biológicos e permitir que os compostos avaliados estivessem em sua forma não-ionizada. Antes do experimento, as fases foram mutuamente saturadas por agitação mecânica durante 24 horas. As fases saturadas foram obtidas após repouso de 2 horas e separação, utilizando-se um balão de extração. As arilsemicarbazonas foram solubilizadas em *n*-octanol saturado com tampão, obtendo-se uma solução $4,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$. Os experimentos foram conduzidos em duplicata, utilizando as fases orgânica e aquosa nas proporções 1:1, 1:2 e 2:1, perfazendo volumes finais de 1,2 mL em tubos plásticos. Os tubos foram agitados em torno do seu eixo longitudinal a uma velocidade de 5 r.p.m. durante 10 minutos, permitindo que as fases entrassem em contato. Após a agitação, os tubos foram submetidos à centrifugação durante 5 minutos, a 2000 r.p.m. Alíquotas de 0,1 mL de cada fase foram coletadas e diluídas a fim de se obter soluções da ordem de 10^{-5} e $10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$. Os espectros eletrônicos das soluções resultantes foram registrados e os máximos de absorvância em *n*-octanol e tampão foram utilizados na determinação das concentrações em cada fase a partir das curvas de calibração, obtidas em *n*-octanol e tampão mutuamente saturados nas concentrações $1,0 \times 10^{-6}$, $1,0 \times 10^{-5}$, $2,0 \times 10^{-5}$, $3,0 \times 10^{-5}$, $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ para todas as arilsemicarbazonas avaliadas. Os valores dos coeficientes de partição óleo/água ($P_{o/a}$) foram determinados a partir da equação abaixo,

$$P_{o/a} = \frac{C_{n\text{-octanol}}}{C_{\text{tampão}}}$$

¹¹ OECD, Organisation for Economic Cooperation and Development: 1995, Guideline for the Testing of Chemicals 107 – Partition Coefficient (*n*-Octanol/Water): Shake Flask Method, Paris.

onde $C_{n\text{-octanol}}$ e $C_{\text{tampão}}$ representam as concentrações das arilsemicabrazonas obtidas experimentalmente nas fases hidrofóbica e hidrofílica, respectivamente. Os resultados considerados satisfatórios apresentaram variações no valor do logP inferiores a $\pm 0,3$ unidades entre as replicatas.

2.1.1.17 Cinética de hidrólise de BS, 2-OHBS, composto de inclusão BS β CD e mistura BS+ β CD em meio gástrico simulado

Os estudos cinéticos foram realizados com o objetivo de se obter a velocidade inicial da reação com relação às semicabrazonas, em tampão pH 1,2. Uma equação geral para a reação pode ser descrita como:

$$v = k [\text{arilsemicabrazona}]^n [\text{H}_2\text{O}]^m$$

onde

k = constante de velocidade da reação, a ser determinada;

n = ordem da reação em relação à concentração do composto (BS, 2-OHBS, composto de inclusão BS β CD) e mistura BS+ β CD);

m = ordem da reação em relação à concentração de H₂O.

O método das velocidades iniciais e o método do isolamento foram utilizados para a determinação dos parâmetros cinéticos k e, principalmente, n.¹² O método das velocidades iniciais consiste em determinar a velocidade no início da reação. Nesta condição, considera-se que a quantidade dos reagentes consumida é mínima, de forma que se pode considerar a concentração desses igual às suas concentrações iniciais. É obtida, neste caso, a velocidade inicial da reação, v_0 :

$$v_0 = k [\text{composto}]_0^n [\text{H}_2\text{O}]_0^m$$

A partir do método do isolamento, é possível analisar a dependência entre a velocidade e a concentração de cada reagente. Assim, para uma reação entre um composto e H₂O, numa série de experimentos, a concentração de água permanece fixa, obtendo-se a ordem da reação para cada composto.

Então a equação global da velocidade pôde ser descrita como:

¹² P. Atkins, J. de Paula, Físico-Química. 8 ed. vol. 1. Rio de Janeiro: LTC, c2008.

$$v_0 = k'[\text{composto}]_0^n$$

onde $k' = k [\text{H}_2\text{O}]_0^m$

Aplicando-se log à equação acima, obtém-se:

$$\log v_0 = \log k' + n \log [\text{composto}]_0$$

O gráfico v_0 vs $\log [\text{composto}]_0$ é uma reta cujo coeficiente angular define a ordem da reação para o composto. A partir do coeficiente linear foi calculado o valor da constante de velocidade k' .

Os estudos foram realizados em meio gástrico simulado, em que o uso de solvente em pH 1,2 tem como objetivo simular o meio ácido estomacal humano.^{13,14} Foram utilizadas as concentrações $5,0 \times 10^{-5}$; $4,0 \times 10^{-5}$; $3,0 \times 10^{-5}$; $2,0 \times 10^{-5}$; $1,0 \times 10^{-5}$ e $1,0 \times 10^{-6}$ mol.L⁻¹ das arilsemicarbazonas em DMSO (1%) e tampão pH 1.2 para a obtenção das curvas de calibração e posterior cálculo de concentração dos compostos durante os estudos cinéticos. Nos estudos cinéticos, foram utilizadas as concentrações $4,0 \times 10^{-5}$, $3,0 \times 10^{-5}$, $2,0 \times 10^{-5}$ e $1,0 \times 10^{-5}$ mol.L⁻¹ das arilsemicarbazonas. Os experimentos foram conduzidos a 25° C, sendo que imediatamente após o preparo das soluções dos compostos, foram realizadas leituras com intervalos de 30 segundos durante 10 minutos. Os dados foram obtidos a partir da leitura das absorvâncias em comprimentos de onda fixos, específicos para cada arilsemicarbazona. Os estudos foram realizados em triplicata.

No caso do composto de inclusão BSβCD, o experimento foi conduzido da mesma maneira que anteriormente descrito para as arilsemicarbazonas isoladas, com a diferença que as massas de composto de inclusão utilizadas foram pesadas considerando a proporção entre BS e β-ciclodextrina igual a 1:1, conforme caracterização prévia. Para a mistura BS+βCD, o experimento foi conduzido da mesma forma que para o composto de inclusão. Neste caso, porém, a ciclodextrina em solução foi adicionada às soluções-teste de BS na proporção 1:1, imediatamente antes da obtenção das medidas de absorvância.

2.1.1.18 Determinação das constantes de acidez (pKa) por UV-vis

A especiação e os valores de pKa dos compostos foram determinados a partir da variação dos valores de pH e obtenção dos espectros eletrônicos, simultaneamente. Soluções dos compostos (40 mM) foram preparadas utilizando 5% DMSO em NaCl 0,1M. Hidróxido de

¹³ US Pharmacopeia XXXI 2008. US Pharmacopeial Convention. Rockville, MD.

¹⁴ M. Lemieux, P. Gosselin, M. A. Mateescu, Int. J. Pharm. 382 (2009) 172.

sódio foi utilizado para aumentar o valor de pH das soluções dos compostos até pH 12, o ponto de partida do teste. Alíquotas de HCl 1 mol/L foram adicionadas à solução do ligante e, a cada valor de pH fixado, os espectros foram obtidos na faixa de 250 – 600 nm. Ao menos 30 espectros foram obtidos na faixa de pH 2-12. Os dados foram analisados utilizando o programa HypSpec (Protonic Software, UK). Os diagramas de especiação foram obtidos por simulação, utilizando o programa HySS2009 (Protonic Software, UK).^{15,16} O procedimento foi realizado na SFU.

2.2 Ensaios biológicos

2.2.1 Ensaios *in vitro*

2.2.1.1 Atividade antifúngica frente a cepas de *Candida sp* e *Trichophyton rubrum*

Os testes foram realizados no Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, em colaboração com o Prof. Dr. Daniel de Assis Santos.

Inicialmente, 10 mg de cada composto foram solubilizados em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO). O volume foi completado para 10 mL, utilizando-se 9 mL de água destilada, obtendo-se a concentração final de 1000 µg/mL das soluções-estoque. Posteriormente, foram realizadas diluições seriadas a partir das soluções estoque, usando como diluente o meio RPMI (Roswell Park Memorial Institute), com a finalidade de se obter concentrações na faixa de 256 a 0,5 µg/mL.¹⁷

Alíquotas de 100 µL de cada diluição foram colocadas em orifícios da placa de microdiluição de 96 poços de fundo chato, distribuídos em 12 colunas. Foram adicionados 100 µL do inóculo em todas as colunas, com exceção da 12ª coluna, utilizada como controle de esterilidade. A primeira coluna, contendo o meio RPMI juntamente com o inóculo do microrganismo foi usada como controle de crescimento. Como controle positivo, foi empregado o itraconazol com concentração variando de 8 a 0,015 µg/mL. As placas foram incubadas a 28 °C durante 7 dias. Todas as concentrações foram testadas em duplicata.

A leitura dos resultados, expressos em µg/mL, foi baseada na escala de crescimento aferida de modo visual e a concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a concentração mínima que inibiu totalmente o crescimento visual do fungo em comparação com

¹⁵ M. R. Jones, E. L. Service, J. R. Thompson, M. C. P. Wang, I. J. Kinsey, A. S. DeToma, A. Ramamoorthy, M. H. Lim, T. Storr, *Metallomics*, 9 (2012) 210.

¹⁶ X. He, H. M. Park, S. J. Hyung, A. S. DeToma, C. Kim, B. T. Ruotolo, M. H. Lim, *Dalton Trans.*, 21 (2012), 6558.

¹⁷ G. L. Parrilha, J. G. da Silva, L. F. Gouveia, A. K. Gasparoto, R. P. Dias, W. R. Rocha, D. A. Santos, N. L. Speziali, H. Beraldo, *Eur J Med Chem*, 46 (2011) 1473.

o controle de crescimento. Para itraconazol (controle positivo), a CIM foi considerada como aquela que inibiu 80% do crescimento do fungo.

Concentrações inibitórias mínimas inferiores a 256 µg/mL foram consideradas significativas para os compostos investigados. Os valores das CIMs foram apresentados em µmol.L⁻¹, permitindo a comparação das atividades dos compostos avaliados.

2.2.1.1.1 Determinação da Concentração Inibitória Fracionária (CIF)

Os compostos que apresentaram atividade antifúngica isoladamente foram avaliados em conjunto com o itraconazol, antifúngico de uso clínico. A técnica do tabuleiro de xadrez foi utilizada para os testes de combinação, proporcionando uma matriz de todas as prováveis combinações das concentrações de cada composto.¹⁸ Foram testadas as combinações itraconazol + [Ga₂(2OBS)₃] e itraconazol + nitrato de gálio(III). A partir da leitura, foi calculado o valor da concentração inibitória fracionária (CIF) como:

$$\text{CIF}_{[\text{Ga}_2(2\text{OBS})_3]} = \text{CIM} [\text{Ga}_2(2\text{OBS})_3] \text{ em combinação} / \text{CIM} [\text{Ga}_2(2\text{OBS})_3]$$

$$\text{CIF}_{\text{nitrato de gálio(III)}} = \text{CIM nitrato de gálio(III) em combinação} / \text{CIM nitrato de gálio(III)}$$

A interação foi definida como sinérgica se $\text{CIF} \leq 0,5$, aditiva se a CIF for $> 0,5$ e $\leq 1,0$, indiferente se $1,0 < \text{CIF} \leq 4,0$, e antagonista se $\text{CIF} > 4,0$.^{19,20}

2.2.1.1.2 Elucidação do mecanismo da ação antifúngica de gálio(III)

A atividade antifúngica do nitrato de gálio(III) foi avaliada em conjunto com o nitrato de ferro(III) utilizando novamente a técnica do tabuleiro de xadrez, que fornece uma matriz de todas as prováveis combinações das concentrações de cada composto.²¹ Utilizaram-se as concentrações de 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256 e 512 µg.mL⁻¹. Os resultados foram colocados em um gráfico para determinação da concentração mínima de nitrato de ferro(III) para inibição da atividade antifúngica do nitrato de gálio(III).

¹⁸ D.A. Santos, J. S. Hamdan, *Med. Mycol.*, 44 (2006) 357.

¹⁹ A. Gómez-López, M. Cuenca-Estrella, E. Mellado, J. L. Rodríguez-Tudela, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 45 (2003) 199.

²⁰ A. Gómez-López, G. Garcia-Effron, E. Mellado, A. Monzon, J. L. Rodríguez-Tudela, M. Cuenca-Estrella, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 47 (2003) 3085.

²¹ D.A. Santos, J. S. Hamdan, *Med. Mycol.*, 44 (2006) 357.

2.2.1.2 Teste de Turbidez – modelo *in vitro* da Doença de Alzheimer

A solução de peptídeo sintético humano beta-amilóide (βA_{1-40} , 21st Century Biochemicals) foi preparada imediatamente antes da realização do teste. Frascos contendo 0,25 mg de peptídeo foram dissolvidos em 290 mL de água deionizada, obtendo-se uma solução estoque de 200 μM . A fim de obter completa dissolução do peptídeo, a solução foi submetida a um banho de ultrassom por 60 segundos, seguido de pausa por 30 segundos. O procedimento foi repetido duas vezes. Tampão HEPES 20 mM contendo 150 mM de NaCl e tratado com resina Chelex[®] foi preparado utilizando água deionizada. O tratamento com Chelex[®] previne a presença de metais na solução tampão final, evitando interferências no resultado. O valor de pH da solução tampão foi ajustado para 6,6 nos ensaios de Cu(II) e 7,4 nos ensaios Zn(II), imediatamente antes dos testes. Essas soluções tampão (pH 6,6 e 7,4) foram empregadas como solventes no preparo das soluções estoque dos compostos e dos metais. Compostos, metais e peptídeo βA_{1-40} foram pipetados para as placas de 96 poços Microtest BD Falcon de fundo chato e transparente, de forma que suas concentrações finais em 200 μL de solução foram 150 mM, 25 mM e 25 mM, respectivamente. Testes em quadruplicata foram realizados para cada composto. As soluções dos compostos foram preparadas de forma a obter concentrações finais de 5% DMSO em tampão. Soluções de cloreto de Cu(II) e cloreto de Zn(II) foram preparadas a partir de padrões de absorção atômica (Sigma-Aldrich). As soluções foram adicionadas à placa na sequência metal – peptídeo – tampão – composto. As placas foram incubadas por 45 minutos a 37°C em banho sob agitação constante e imediatamente submetidas à leitura a 405 nm em fluorímetro Synergy 4 BioTek. Amostras em quadruplicata de brancos contendo o composto, metais e tampão também foram medidas e os valores médios e desvios padrão foram subtraídos dos valores médios e desvios padrão dos valores obtidos nos poços correspondentes contendo o peptídeo. Soluções de peptídeo e metais foram utilizadas como controle negativo, para demonstrar a agregação do ligante na presença do metal. Simultaneamente, soluções de peptídeo, metais e ácido dietilenotriamino pentacético (ADTP) foram utilizadas como controle positivo, para demonstrar a interferência de um agente quelante na agregação do peptídeo, promovida pelos metais em solução. Os controles também se constituíram de soluções 5% DMSO em tampão.^{15,22} O procedimento foi realizado na SFU.

²² L. E. Scott, M. Telpoukhovskaia, C. Rodriguez-Rodriguez, M. Merkel, M. L. Bowen, B. D. G. Page, D. E. Green, T. Storr, F. Thomas, D. D. Allen, P. R. Lockman, B. O. Patrick, M. J. Adam, C. Orvig, Chem. Sci., 2 (2011) 642.

2.2.1.3 Microscopia eletrônica de transmissão (MET) – modelo *in vitro* da Doença de Alzheimer

A MET foi realizada para confirmar visualmente os resultados obtidos nos testes de turbidez. As amostras foram preparadas incubando o peptídeo βA_{1-40} isoladamente (25 Mm), na presença ou ausência de cloreto de cobre(II) e cloreto de zinco(II) (25 mM), na presença ou ausência de cada um dos compostos testados (50 mM) e na presença ou ausência de cada um dos metais e dos compostos. O valor de pH da solução tampão (HEPES 20 mM) foi ajustado para 6,6 nos ensaios de Cu(II) e 7,4 nos ensaios Zn(II), imediatamente antes dos testes. Essas soluções tampão (pH 6,6 e 7,4) foram empregadas como solventes no preparo das soluções estoque dos compostos e dos metais. As amostras permaneceram em banho durante 24 horas a 37 °C. Telas utilizadas como suporte (*Formvar/Carbon 300-mesh grids*, Electron Microscopy Sciences) foram submetidas à descarga incandescente por 15 segundos para aumento da hidrofília. Amostras (10 mL) foram gotejadas sobre uma folha de Parafilm® e a tela foi colocada em contato com a amostra por 5 minutos. Em seguida, as telas foram colocadas em contato com solução 5% de acetato de uranila. O procedimento foi repetido duas vezes. A tela foi mantida a temperatura ambiente por 15 minutos para secagem. Imagens foram obtidas a 200kV, com aumento de 9000 vezes.^{15,23} O procedimento, da mesma forma que o teste de turbidez, foi realizado na SFU.

2.2.2 Ensaios *in vivo*

2.2.2.1 Atividades antinociceptiva e anti-inflamatória

A avaliação das atividades antinociceptiva e anti-inflamatória foi realizada no Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Farmácia da UFMG, em colaboração com o Prof. Dr. Márcio de Matos Coelho.

2.2.2.1.2 Animais experimentais

Foram utilizados ratos Wistar (250-350 g) na avaliação do edema induzido por carragenina e camundongos Swiss (25-35 g) machos na avaliação da resposta nociceptiva induzida por formaldeído e *Zymosan A*, e na avaliação da coordenação motora. Os animais foram mantidos em ciclo claro-escuro de 12 h e ração e água foram fornecidas *ad libitum*. Os experimentos foram conduzidos em sala com temperatura de 27 °C, correspondente à zona de

²³ A. M. Mancino, S. S. Hindo, A. Kochi, M. H. Lim, *Inorg. Chem.*, 48 (2009) 9596.

termoneutralidade para roedores.²⁴ A ambientação dos animais na sala de experimentação foi realizada por pelo menos três dias antes da realização dos protocolos. Todos os experimentos foram realizados de acordo com as recomendações para investigações de dor experimental em animais conscientes.²⁵

2.2.2.1.3 Substâncias

O agente suspensor Carboximetilcelulose (CMC; Galena, Brasil) foi utilizada como veículo para a gavagem – administração *per os* (p.o.) – dos compostos. Carragenina λ (Sigma, USA) foi administrada como estímulo inflamatório. O miorelaxante de ação central fenobarbital (Gardenal[®] pediátrico, Aventis, Brasil) foi utilizado como controle positivo. Formaldeído (Ecibra, Brasil) foi administrado para o estímulo inflamatório. Indometacina (Sigma, USA), um fármaco anti-inflamatório não-esteróide, foi utilizada como controle positivo. Polissorbato 80 (Tween 80[®], Ecibra, Brasil) foi o tensoativo usado como veículo na preparação das suspensões para administração intraperitoneal (i.p.). Complexo proteína/carboidrato derivado de paredes celulares de *Saccharomyces cerevisiae* (Zymosan A[®], Sigma, USA) foi utilizado como estímulo inflamatório.

2.2.2.1.4 Soluções e suspensões

Nos protocolos nos quais as semicarbazonas foram administradas i.p., utilizou-se como veículo uma preparação contendo 6 % de Tween 80 como agente suspensor. Esta suspensão foi administrada nos volumes de 1 mL/kg ou 4 mL/kg em ratos ou camundongos, respectivamente. Nos protocolos nos quais as semicarbazonas e seus complexos foram administradas *per os*, utilizou-se uma suspensão 0,5% de CMC em salina como agente suspensor. Esta suspensão foi administrada nos volumes de 1 ou 4 mL/kg em ratos ou camundongos, respectivamente.

A suspensão de carragenina foi preparada em salina na concentração de 10 mg/mL. As soluções do formaldeído (0,34%), e a suspensão do Zymosan A (5 mg/mL) foram feitas em salina imediatamente antes da realização dos experimentos. A solução de indometacina (4 mg/mL) foi feita em bicarbonato de sódio a 5% em salina. A solução de fenobarbital foi preparada por meio da diluição da solução estoque em salina para obtenção da concentração 12,5 mg/mL.

²⁴ C. J. Gordon, *Physiol. Behav.*, 47(1990) 963.

²⁵ M. Zimmermann, *Pain*, 16 (1983) 109.

2.2.2.1.5 Avaliação da resposta nociceptiva induzida por *Zymosan A* em camundongos

Os animais foram colocados sob um funil de vidro transparente (18 cm de diâmetro, 15 cm de altura) para avaliação. *Zymosan A* (40 mg/kg) foi administrado 30 (i.p.) ou 60 minutos (p.o.) após a administração dos compostos. O número de constrições abdominais realizadas pelos animais durante 30 minutos após a administração de *Zymosan A* foi determinado.²⁶ Os resultados foram apresentados em número de constrições (ver Figura 2.1).

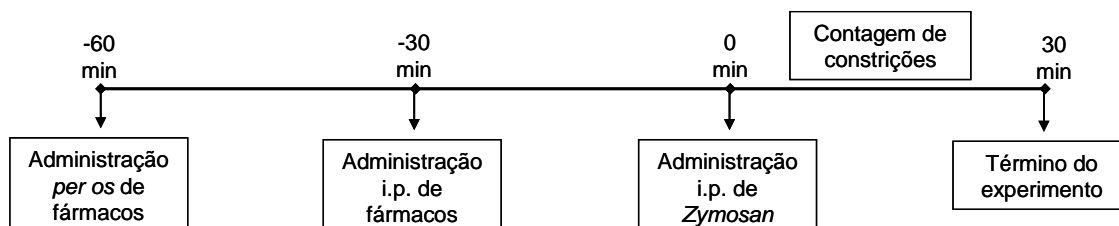


Figura 2.1. Avaliação da resposta nociceptiva induzida por *Zymosan A* em camundongos.

2.2.2.1.6 Avaliação da resposta nociceptiva induzida por formaldeído em camundongos

Os animais foram colocados sob um funil de vidro transparente (18 cm de diâmetro, 15 cm de altura) para avaliação. Formaldeído (20 μ L) foi administrado por via subcutânea (s.c.) na região dorsal da pata posterior direita 30 (i.p.) ou 60 minutos (p.o.) após a administração das semicarbazonas e complexos. O tempo de lambida da pata gasta pelos animais foi determinado entre 0 e 5 minutos (primeira fase) e 15 e 30 minutos (segunda fase) após a administração do formaldeído.²⁷ Os resultados foram apresentados como tempo de lambida, em segundos (ver Figura 2.2).

²⁶ G. A. Brito, S. N. Saraiva, J. L. Falcão, M. L. Vale, A. A. Lima, F. Q. Cunha, R. A. Ribeiro, Eur. J. Pharmacol. 30 (2001) 223.

²⁷ L. T. S. Rocha, K. A. Costa, A. C. P. Oliveira, E. B. Nascimento Jr, C. M. Bertollo, F. Araújo, L. R. Teixeira, S. P. Andrade, H. Beraldo, M. M. Coelho, Life Sci., 79 (2006) 499.

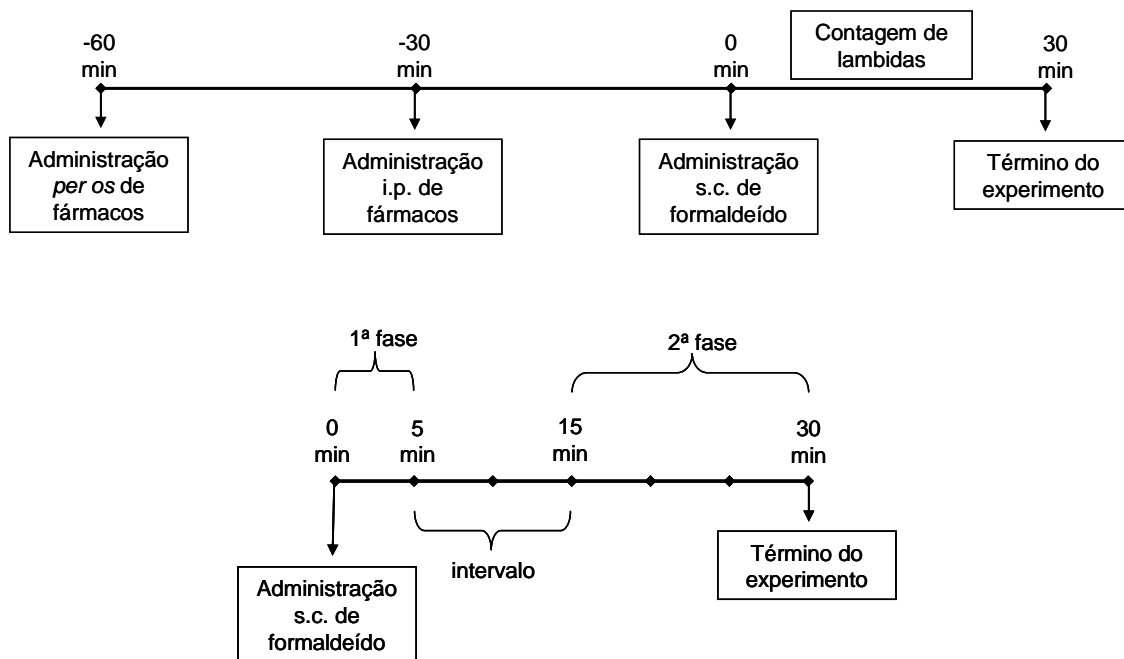


Figura 2.2. Avaliação da resposta nociceptiva induzida por formaldeído em camundongos.

2.2.2.1.7 Avaliação da atividade motora de camundongos

A atividade motora dos animais foi avaliada no aparato da haste girante. Durante três dias antes do experimento, os animais foram treinados no equipamento. No dia do experimento, os animais foram colocados no aparato que girava a uma frequência de 14 rpm e o tempo de permanência na haste foi determinado. Determinou-se o tempo de corte em 120 segundos. Após a determinação dos valores basais, os animais foram tratados com as semicarbazonas, complexos e fenobarbital e, em seguida, avaliados novamente. Os resultados foram apresentados como tempo de permanência na haste girante, em segundos.

2.2.2.1.8 Avaliação do edema em pata de rato induzido por carragenina

O edema de pata foi medido utilizando-se um Pletismômetro (Modelo 7140, Ugo Basile, Itália). O volume basal da pata esquerda dos animais foi determinado antes da administração dos fármacos. De acordo com o volume basal, os animais foram divididos em grupos experimentais cujas médias dos volumes eram semelhantes. As semicarbazonas e complexos foram administrados 30 (i.p.) ou 60 (p.o.) minutos antes da administração intraplantar (i.pl.) de carragenina (50 μ L). O volume da pata foi medido 2, 4 e 6 horas após a administração do estímulo inflamatório (ver Figura 2.3). Os resultados foram apresentados como a média das diferenças dos volumes medidos em relação aos valores basais.²⁷

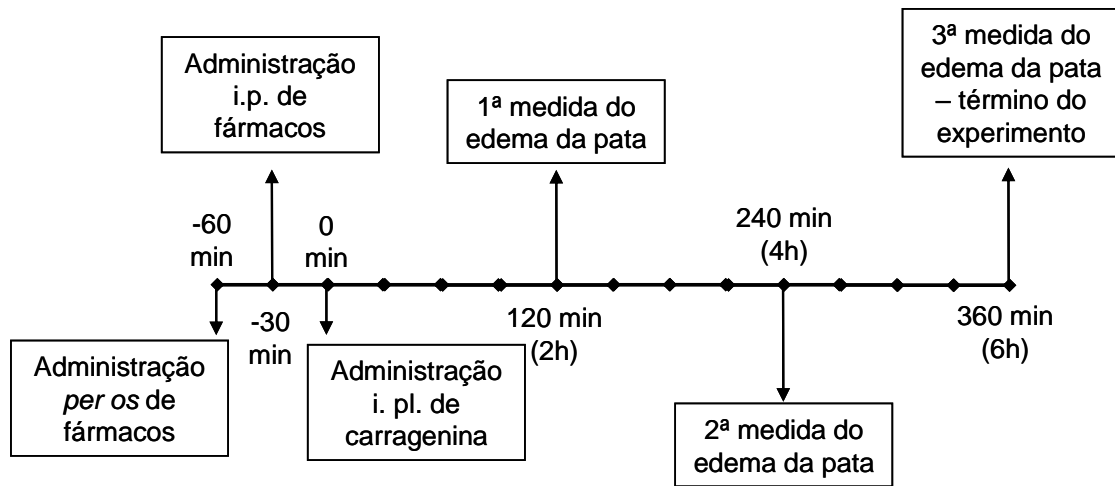


Figura 2.3. Avaliação da resposta anti-inflamatória no modelo do edema em pata de rato induzido por carragenina.

2.2.2.1.9 Análise estatística dos ensaios *in vivo*

Os resultados foram analisados por análise de variância seguida por teste Newman-Keuls. Valores de p inferiores a 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

Capítulo 3. 2-, 3- e 4-hidroxibenzaldeído semicarbazonas (2-, 3- e 4-OHBS): correlação entre atividade farmacológica e parâmetros físico-químicos

Arilsemicarbazonas apresentam atividades anticonvulsivantes, antinociceptiva, anti-inflamatória e antitripanossoma.¹ No entanto, dados relacionados à biotransformação e mecanismos de ação dessas moléculas, ou seja, suas interações com os meios biológicos, não se encontram com frequência na literatura.

Estudos *in vitro* e *in vivo* sugerem a hidrólise de semicarbazonas por meio de ataque nucleofílico à ligação imínica (C=N).^{2,3} Entretanto, não há relatos de estudos da cinética de reação de hidrólise de semicarbazonas ou mesmo o estabelecimento de requisitos estruturais que afetariam a suscetibilidade dessas moléculas ao ataque nucleofílico.

Neste trabalho, obtivemos os três isômeros de posição 2-, 3- e 4-OHBS e realizamos cálculos teóricos para essas moléculas e para a benzaldeído semicarbazona (BS), a fim de obter descritores e parâmetros que permitissem uma correlação dos resultados *in silico* com resultados experimentais, como o coeficiente de partição *n*-octanol/água, estabilidade em meio aquoso e ensaios biológicos *in vivo*. O conjunto de resultados permitiu sugerir vias de biotransformação das arilsemicarbazonas e relacioná-las às respectivas atividades farmacológicas.

3.1. Obtenção de 2-, 3- e 4-hidroxibenzaldeído semicarbazonas

As arilsemicarbazonas foram obtidas conforme já descrito na literatura.^{2,4} A caracterização foi realizada por meio da determinação das faixas de fusão e por espectroscopia de RMN de ¹H, ¹³C, DEPT e mapas de contorno HMQC (correlação heteronuclear múltiplo-quântica, ¹³C-¹H ¹J), HMBC (coerência heteronuclear ¹³C-¹H ²J e ³J) e NOESY (efeito espectroscópico nuclear Overhauser – correlação homonuclear).

3.1.1 Faixas de fusão e rendimento

Na Tabela 3.1, estão listados os rendimentos na síntese, cor e as faixas de fusão para as arilsemicarbazonas.

¹ H. Beraldo, *Quim. Nova* 27 (2004) 461.

² M. Vieites, P. Buccino, L. Otero, M. González, O. E. Piro, R. S. Delgado, C. M. R. Sant'Anna, E. J. Barreiro, H. Cerecetto, D. Gambino, *Inorg. Chim. Acta*, 358 (2005) 3065.

³ K. Ramu, G. N. Lam, H. Hughes, *Drug Metab. Dispos.* 28 (2000) 1153.

⁴ J. R. Dimmock, K. K. Sidhu, R. S. Thayer, P. Mack, M. J. Duffy, R. S. Reid, J. W. Quail, U. Pugazhenthii, A. O. N. G., J. A. Bikker, D. F. Weaver, *J. Med. Chem.* 36 (1993) 2243.

Tabela 3.1. Rendimento, cor e faixas de fusão de 2-, 3- e 4-hidroxibenzaldeído semicarbazonas (2-, 3- e 4-OHBS, respectivamente).

Composto	Rendimento (%)	Cor	Faixa de Fusão (°C)
2-OHBS	87	Branca	222,2 a 223,1
3-OHBS	95	Branca	197,0 a 197,8
4-OHBS	94	Amarela	225,4 a 225,9

Os valores para as faixas de fusão indicaram a pureza dos sólidos obtidos.

3.1.2 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

No espectro de RMN de ^1H de 2-OHBS, representado na Figura 3.1, o sinal do hidrogênio *OH1* é um simpleto em δ 9,99 ppm e o sinal do hidrogênio *N2H* é um simpleto em δ 10,20 ppm. Os hidrogênios ligados a *N3* apresentam-se como um simpleto em δ 6,42 ppm. Os sinais dos hidrogênios *H3* e *H4* encontram-se sobrepostos, apresentando-se como um multiplete entre δ 6,77 – δ 6,87 ppm. O sinal de *H5* é um tripleto centrado em δ 7,17 ppm. O hidrogênio *H6* apresenta-se como um duplete centrado em δ 7,75 ppm. Finalmente, o sinal do hidrogênio *H7* é observado em δ 8,14 ppm. Os valores das integrações e o número de sinais estão de acordo com o número de hidrogênios esperados para a molécula.

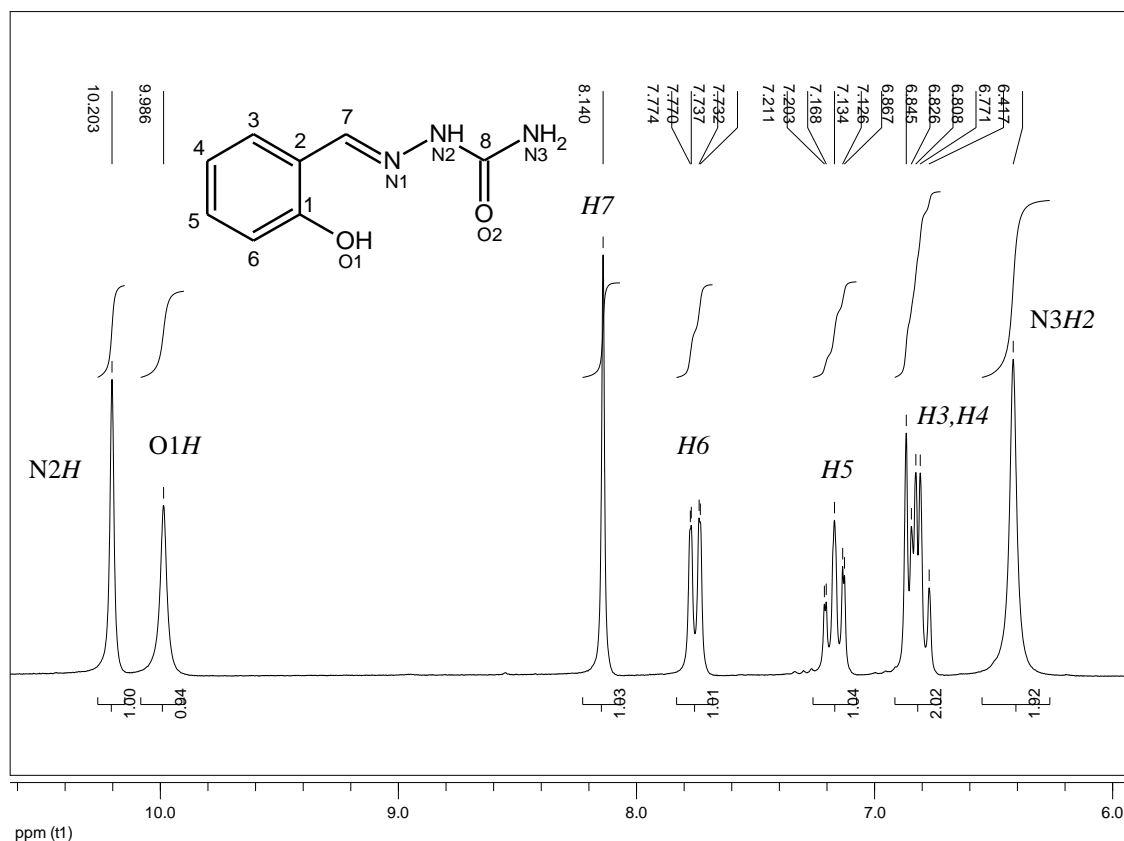


Figura 3.1. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz) de 2-OHBS em $\text{DMSO-}d_6$.

No espectro de RMN de ^{13}C de 2-OHBS (Figura 3.2), os deslocamentos químicos dos sinais atribuídos ao carbono carbonílico C8 e a C1 são δ 156,59 e δ 155,77, respectivamente. O deslocamento do sinal atribuído a C7 é observado em δ 137,39. Os sinais dos carbonos aromáticos C2, C3, C4, C5 e C6 são observados em δ 120,58, δ 119,20, δ 115,92, δ 130,16 e δ 126,62, respectivamente. O espectro de RMN de DEPT 135 e os mapas de contorno HMQC e HBQC confirmaram as atribuições dos sinais do espectro de ^{13}C .

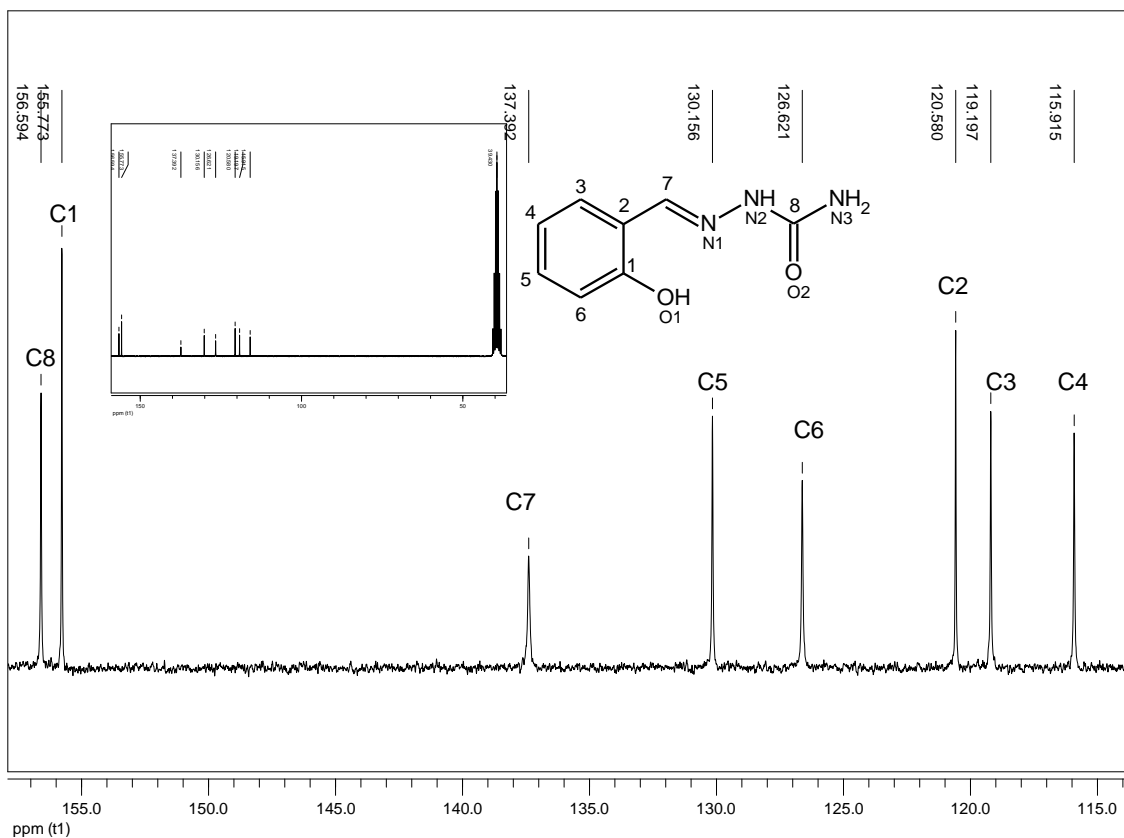
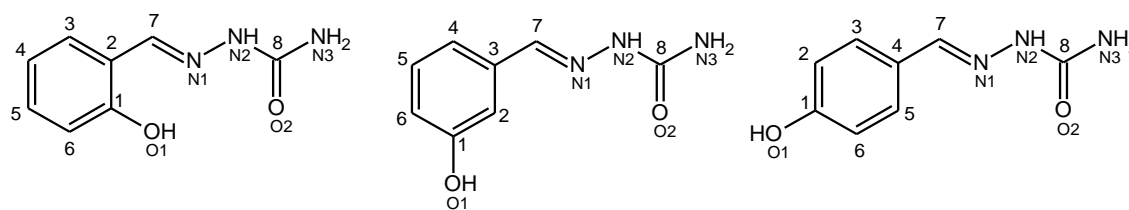


Figura 3.2. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz) de 2-OHBS em $\text{DMSO-}d_6$, com ampliação na região de 115 a 160 ppm.

As atribuições de sinais nos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C para 3-OHBS e 4-OHBS são condizentes com a obtenção dos compostos. A Tabela 3.2 relaciona os deslocamentos químicos citados anteriormente para as arilsemicarbazonas.

Tabela 3.2. Atribuições, multiplicidade (M), número de átomos (n°) e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de ^1H e ^{13}C em DMSO- d_6 de 2-, 3- e 4-OHBS.



2-OHBS

3-OHBS

4-OHBS

2-OHBS				3-OHBS				4-OHBS			
Atribuições δ (ppm)		n°	M	Atribuições δ (ppm)		n°	M	Atribuições δ (ppm)		n°	M
H1	-	-	-	H2	6,15 – 6,27	1	M	H3	6,81 – 6,76	1	d
H2	-	-	-	H3	-	-	-	H4	-	-	-
H3	6,83	1	m	H4	5,84 – 5,83	1	D	H5	6,81 – 6,76	1	d
H4	6,83	1	m	H5	6,15 – 6,27	1	M	H6	7,56 – 7,52	1	d
H5	7,17	1	t	H6	6,15 – 6,27	1	M	H1	-	-	-
H6	7,77 – 7,73	1	d	H1	-	-	-	H2	7,56 – 7,52	1	d
H7	8,14	1	s	H7	6,84	1	s	H7	7,78	1	s
N2H	10,20	1	s	N2H	9,27	1	s	N2H	10,16	1	s
N3-2H	6,42	2	s	N3-2H	5,50	2	s	N3-2H	6,50	2	s
O1H	9,99	1	s	O1H	8,57	1	s	O1H	9,82	1	s
C1	155,77	1	s	C2	129,55	1	s	C3	115,38	1	s
C2	120,58	1	s	C3	135,97	1	s	C4	125,78	1	s
C3	119,20	1	s	C4	117,69	1	s	C5	115,38	1	s
C4	115,92	1	s	C5	112,87	1	s	C6	128,08	1	s
C5	130,16	1	s	C6	116,26	1	s	C1	158,43	1	s
C6	126,62	1	s	C1	156,75	1	s	C2	128,08	1	s
C7	137,39	1	s	C7	135,97	1	s	C7	139,68	1	s
C8	156,59	1	s	C8	157,48	1	s	C8	156,88	1	s

s=simpleto; d=dupleto, t=tripleto, m=multipleto.

Semicarbazonas podem apresentar isômeros *E* e *Z*,⁵ como exemplificado na Figura 3.3. Os espectros e mapas de contorno evidenciam a presença de apenas um dos isômeros para todas as arilsemicarbazonas, uma vez que não foram observados sinais duplicados. Com o objetivo de definir o isômero existente em solução, foram obtidos os mapas de contorno NOESY para 2-, 3- e 4-OHBS.

⁵ N. C. Kasuga, K. Onodera, S. Nakano, K. Hayashi, K. Nomiya, J. Inorg. Biochem. 100 (2006) 1176.

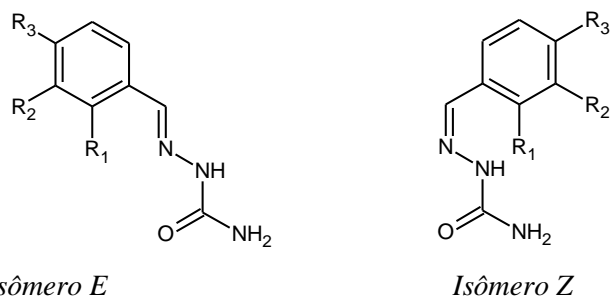


Figura 3.3 Isômeros *E* e *Z* para arilsemicarbazonas. R_1 , R_2 e R_3 representam H ou OH.

A Figura 3.4 apresenta o mapa de contorno NOESY para 2-OHBS. Observaram-se correlações entre os hidrogênios, provavelmente os vicinais *H4* e *H5*. No entanto, a correlação mais significativa para determinação da configuração da molécula foi observada entre *H7* e *N2H*. Essa correlação só seria possível no isômero *E*. Além disso, a ausência de correlação entre o *O1H* e *N2H*, presente somente no isômero *Z*, confirma a configuração mais provável sendo a *E* e as atribuições para *N2H* e *O1H* no espectro de ^1H .

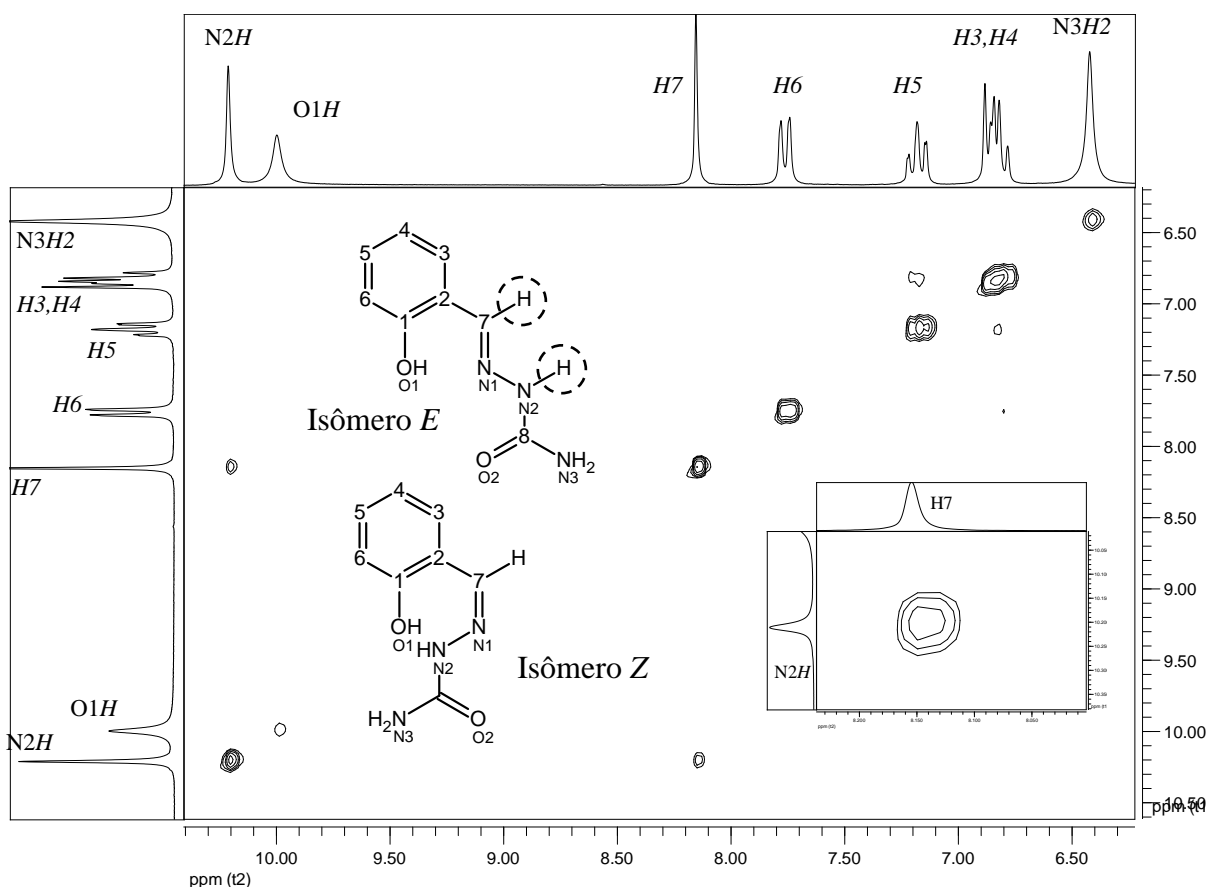


Figura 3.4. Mapa de contorno NOESY (200 MHz) de 2-OHBS em $\text{DMSO-}d_6$, evidenciando as correlações existentes e o isômero *E* relacionado. Em detalhe, ampliação da correlação *N2H* e *H7*, possível apenas no isômero *E*.

A Figura 3.5 apresenta o mapa de contorno NOESY para 3-OHBS. Observaram-se correlações entre o hidrogênio O1H e hidrogênios aromáticos, provavelmente vicinais (H2 e H6) e entre o hidrogênio H7 e hidrogênios aromáticos, possivelmente H2. No entanto, a correlação mais significativa para determinação da configuração da molécula foi observada entre H7 e N2H. Essa correlação só seria possível no isômero E. Novamente, como já descrito para 2-OHBS, a ausência de correlação entre o O1H e N2H, presente somente no isômero Z, confirma a configuração mais provável sendo a E e as atribuições para N2H e O1H no espectro de ^1H .

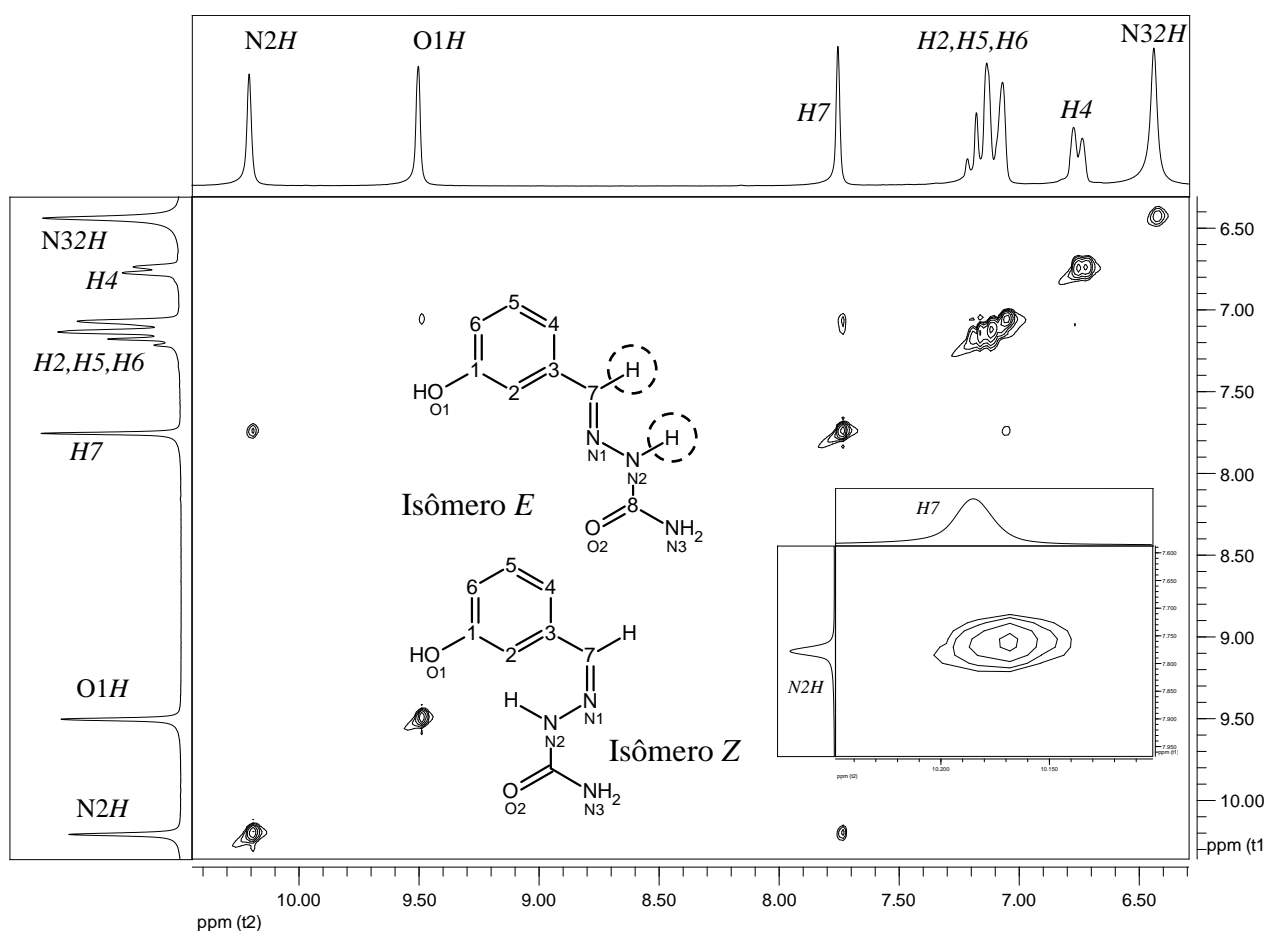


Figura 3.5. Mapa de contorno NOESY (200 MHz) de 3-OHBS em $\text{DMSO-}d_6$, evidenciando as correlações existentes e o isômero E relacionado. Em detalhe, ampliação da correlação N2H e H7, possível apenas no isômero E.

A Figura 3.6 apresenta o mapa de contorno NOESY para 4-OHBS. Observaram-se correlações entre os hidrogênios aromáticos ($H2$, $H6$ e $H3$, $H5$). A correlação mais significativa para determinação da configuração da molécula foi novamente observada entre $H7$ e $N2H$. Como descrito para 2- e 3-OHBS, não foi encontrada a correlação entre o $O1H$ e $N2H$, presente somente no isômero Z , confirmando a configuração E como a mais provável, e as atribuições para $N2H$ e $O1H$ no espectro de 1H .

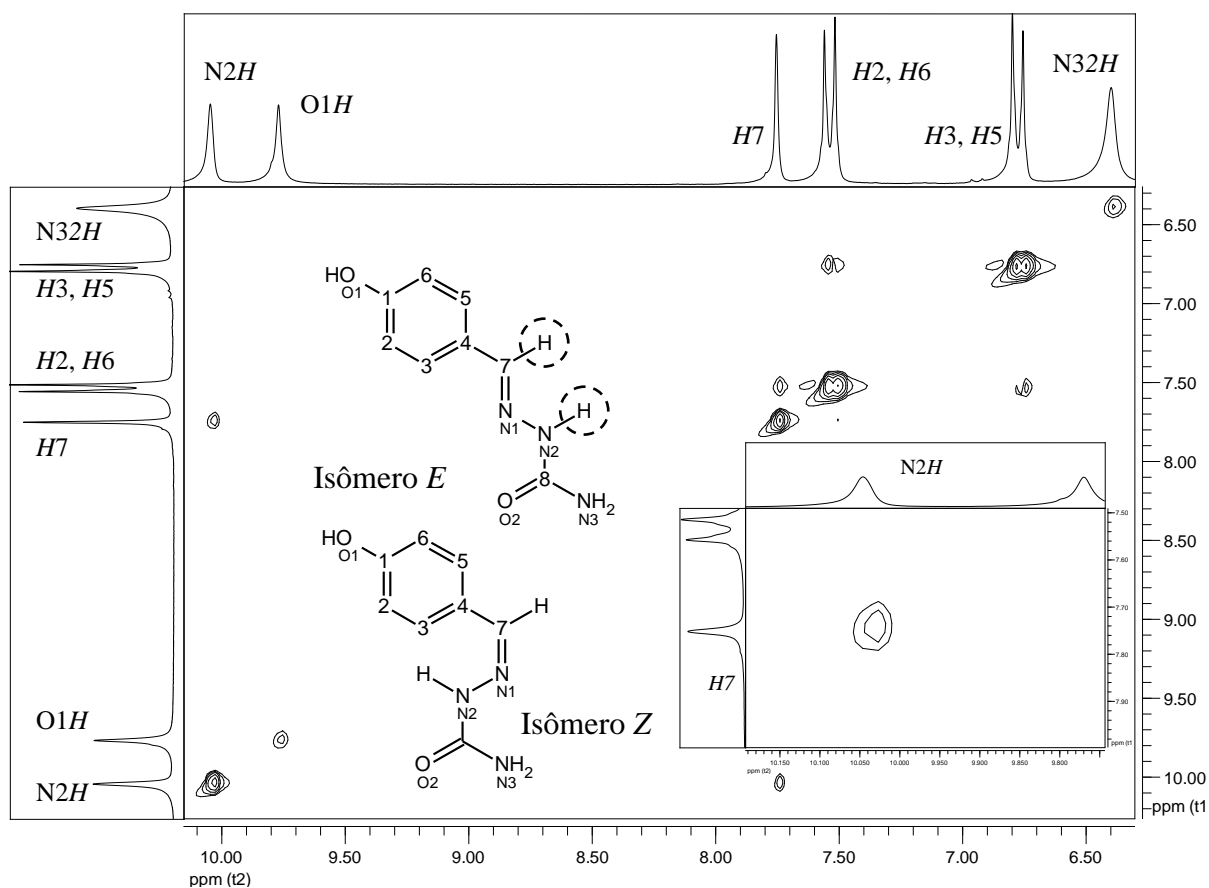


Figura 3.6. Mapa de contorno NOESY (200 MHz) de 4-OHBS em $DMSO-d_6$, evidenciando as correlações existentes e o isômero E relacionado. Em detalhe, ampliação da correlação $N2H$ e $H7$, possível apenas no isômero E .

Portanto, evidenciou-se a presença apenas do isômero E em solução para as arilsemicarbazonas estudadas.

3.2 Cálculos teóricos das propriedades físico-químicas das arilsemicarbazonas

As estruturas cristalográficas de BS ⁶, 2-OHBS ⁷ e 4-OHBS ⁸ são descritas na literatura e mostram os compostos na configuração *E*. Uma vez que a formação do cristal é um processo físico de precipitação do composto em solução, sugeriu-se que as moléculas apresentam-se na mesma configuração no monocristal, dissolvidas ou em pó.

As Tabelas 3.3, 3.4 e 3.5 apresentam os resultados do cálculo das energias dos isômeros conformacionais mais estáveis para BS, 2-OHBS, 3-OHBS e 4-OHBS, nas configurações *Z* e *E*, empregando-se os métodos MMFF, DFT e MP2. Para todos os compostos, os isômeros *Z* apresentaram valores superiores de energia quando comparados aos *E*, sugerindo que os últimos sejam as configurações mais estáveis e, conseqüentemente, mais prováveis para as semicarbazonas avaliadas.

Portanto, as estruturas cristalográficas e os cálculos das energias dos isômeros conformacionais reforçaram o fato evidenciado pelos espectros de RMN. A estrutura cristalográfica do composto 3-OHBS não é relatada na literatura.

Diante das evidências, as análises conformacionais e os cálculos dos descritores para BS, 2-OHBS, 3-OHBS e 4-OHBS foram realizados considerando os isômeros *E*.

Tabela 3.3. Energias calculadas pelo método MMFF para os isômeros conformacionais mais estáveis de BS, 2-OHBS, 3-OHBS e 4-OHBS.

Composto	Energia (Kcal.mol ⁻¹)	
	Configuração	
	<i>E</i>	<i>Z</i>
BS	- 11,19	-3,19
2-OHBS	- 14,53	-5,32
3-OHBS	- 26,11	-17,79
4-OHBS	-25,09	-16,38

⁶ J. R. Dimmock, J. K. K. Sidhu, R. S. Thayer, P. Mack, M. J. Duffy, J. R. S. Reid, J. W. Quail, U. Pugazhenti, A. Ong, J. A. Bikker, D. F. Weaver, J. Med. Chem., 36 (1993) 2243.

⁷ J. Valdés-Martínez, R. A. Toscano, R. Salcedo, R. Cea-Olivares, A. Meléndez, Monatsh. Chem. Chem. Mon. 121 (1990) 641.

⁸ X. ShiTai, M. YangHao, J. Yinc, Z. P. Liang, Acta Crystallogr. Sect. E, E63 (2007) o1725.

Tabela 3.4. Energias calculadas pelo método DFT para os isômeros conformacionais mais estáveis de BS, 2-OHBS, 3-OHBS e 4-OHBS.

Composto	Energia (Hartree)	
	Configuração	
	<i>E</i>	<i>Z</i>
BS	-549,783	-549,777
2-OHBS	-625,018	-625,007
3-OHBS	-625,010	-625,004
4-OHBS	-625,010	-625,005

Nota: 1 Hartree = 621 Kcal.mol⁻¹

Tabela 3.5. Energias calculadas pelo método MP2 para os isômeros conformacionais mais estáveis de BS, 2-OHBS, 3-OHBS e 4-OHBS.

Composto	Energia (Hartree)	
	Configuração	
	<i>E</i>	<i>Z</i>
BS	-548,149	-548,145
2-OHBS	-623,205	-623,198
3-OHBS	-623,197	-623,193
4-OHBS	-623,197	-623,194

Nota: 1 Hartree = 621 Kcal.mol⁻¹

As Tabelas 3.6 e 3.7 apresentam as distâncias e os ângulos de ligação calculados para os isômeros conformacionais de menor energia na configuração *E*, comparados aos dados experimentais, quando disponíveis. As estruturas otimizadas estavam de acordo com os dados experimentais. Paralelamente, o cálculo dos ângulos diedros, apresentados na Tabela 3.8, demonstrou que as torções calculadas para os principais ângulos das moléculas estavam de acordo com os valores observados experimentalmente. Esse conjunto de dados mostrou que as estruturas tridimensionais dos isômeros conformacionais de menor energia estão de acordo com os dados experimentais, permitindo a utilização das estruturas otimizadas *in silico* no cálculo das propriedades físico-químicas e eletrônicas.

Tabela 3.6. Distâncias de ligação calculadas e experimentais (dados cristalográficos)^a para BS⁶, 2-OHBS⁷, 3-OHBS e 4-OHBS⁸.

Distâncias de ligação (Å)	BS	2-OHBS	3-OHBS	4-OHBS
C1-C2	1,46 (1,46)	-	-	-
C2-C7	-	1,46 (1,45)	-	-
C3-C7	-	-	1,47	-
C4-C7	-	-	-	1,46 (1,47 e 1,46) ^b
C(X) ^c =N1	1,29 (1,28)	1,29 (1,28)	1,29	1,29 (1,28 e 1,28) ^b
N1-N2	1,35 (1,38)	1,35 (1,37)	1,35	1,35 (1,28 e 1,38) ^b
N2-C8	1,40 (1,37)	1,40 (1,36)	1,40	1,40 (1,36 e 1,36) ^b
C8=O(X) ^d	1,22 (1,24)	1,22 (1,24)	1,22	1,22 (1,25 e 1,25) ^b
C8-N3	1,37 (1,33)	1,38 (1,33)	1,37	1,37 (1,33 e 1,33) ^b
OH—N1	-	1,79 (1,68)	-	-

^a Dados cristalográficos entre parêntesis.

^b Duas moléculas na unidade assimétrica.

^c C(X) equivalente a C(2) para BS e a C(7) para 2-OHBS, 3-OHBS e 4-OHBS.

^d O(X) equivalente a O(1) para BS e a O(2) para 2-OHBS, 3-OHBS e 4-OHBS.

Tabela 3.7. Ângulos de ligação calculados e experimentais (dados cristalográficos)^a para BS⁶, 2-OHBS⁷, 3-OHBS e 4-OHBS⁸.

Ângulos de ligação (Å)	BS	2-OHBS	3-OHBS	4-OHBS
C1-C2-N1	122,59 (121,10)	-	-	-
C2-C7-N1	-	122,22 (122,5)	-	-
C3-C7-N1	-	-	122,44	-
C4-C7-N1	-	-	-	122,82 (119,03 e 119,27) ^b
C(X) ^c -N1-N2	118,22 (114,89)	119,00 (116,4)	118,25	118,05 (115,31 e 115,64) ^b
N1-N2-C8	122,75 (119,57)	123,20 (121,4)	122,69	122,75 (120,82 e 120,70) ^b
N2-C8- O(X) ^d	119,98 (118,78)	120,01 (118,4)	119,989	120,14 (119,50 e 119,25) ^b

^a Dados cristalográficos entre parêntesis.

^b Duas moléculas na unidade assimétrica.

^c C(X) equivalente a C(2) para BS e a C(7) para 2-OHBS, 3-OHBS e 4-OHBS.

^d O(X) equivalente a O(1) para BS e a O(2) para 2-OHBS, 3-OHBS e 4-OHBS.

Tabela 3.8. Ângulos diedros calculados e experimentais (dados cristalográficos)^a para BS⁶, 2-OHBS,⁷ 3-OHBS e 4-OHBS.⁸

Ângulos diedros (°)	BS	2-OHBS	3-OHBS	4-OHBS
C3-C2-C1-N1	179,28 (174,93)	-	-	-
C2-C1-C7-N1	-	175,88 (176,16)	-	-
C2-C3-C7-N1	-	-	179,81	-
C3-C4-C7-N1	-	-	-	-179,25 (177,81 e 178,86) ^b
C(X)-N1-N2-C8	179,23 (173,68)	177,97 (176,82)	179,26	-179,17 (171,52 e 172,01) ^b
N1-N2-C8-N3	4,64 (2,22)	-4,72 (-8,01)	4,56	-4,914 (2,346 e 0,00) ^b

^a Dados cristalográficos entre parêntesis.

^b Duas moléculas na unidade assimétrica.

^c C(X) equivalente a C(2) para BS e a C(7) para 2-OHBS, 3-OHBS e 4-OHBS.

As propriedades físico-químicas e eletrônicas calculadas no vácuo e em meio aquoso para os isômeros *E* de BS, 2-OHBS, 3-OHBS e 4-OHBS estão descritas nas Tabelas 3.9 e 3.10. Conforme os resultados, 2-OHBS apresentou a mais baixa energia de LUMO e a mais alta contribuição do carbono imínico (C=N) ao LUMO total da molécula. Ao mesmo tempo, 2-OHBS apresentou a mais alta carga positiva no carbono imínico e maior densidade eletrônica sobre N1, sugerindo ser a arilsemicarbazona mais suscetível ao ataque nucleofílico entre as moléculas avaliadas.

2-OHBS e 4-OHBS apresentam um equilíbrio tautomérico (Figura 3.7) que está ausente na 3-OHBS.² Apesar da predominância da forma imina, uma pequena quantidade da forma enamina em solução poderia ser suficiente para promover a hidrólise de ambos os compostos. As propriedades eletrônicas e físico-químicas calculadas para as semicarbazonas (Tabelas 3.9 e 3.10) indicaram que a forma enamina de ambas semicarbazonas exibiu valores de energias de LUMO inferiores às respectivas formas imina. Ao mesmo tempo, as contribuições dos carbonos imínicos ao LUMO total das moléculas foram superiores para as formas enaminas quando comparadas aos respectivos tautômeros. Além disso, as formas enamina possuem cargas positivas mais altas no carbono α a N1 e densidades eletrônicas mais altas nos nitrogênios N1 quando comparado às respectivas formas imina. Portanto, mesmo em baixas concentrações, as formas enaminas de 2-OHBS e 4-OHBS podem interferir de forma significativa na susceptibilidade à hidrólise e, conseqüentemente, na estabilidade dos compostos em meio aquoso.

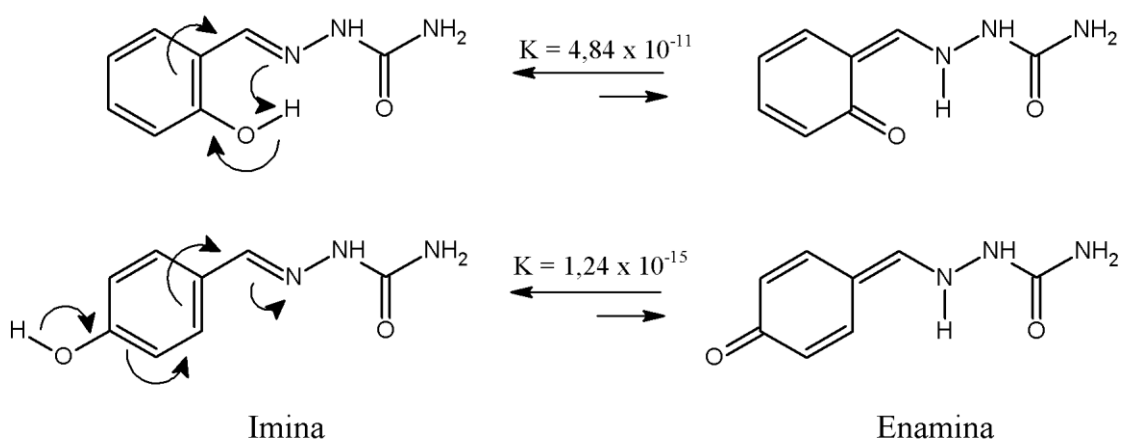


Figura 3.7. Equilíbrio tautomérico imina-enamina de 2-hidroxibenzaldeído semicarbazona (2-OHBS) e 4-hidroxibenzaldeído semicarbazona (4-OHBS)

As constantes de equilíbrio K referentes à interconversão imina-enamina em solução aquosa foram calculadas para 2-OHBS e 4-OHBS (Figura 3.7). Os valores $K = 4,84 \times 10^{-11}$ (2-OHBS) e $K = 1,24 \times 10^{-15}$ (4-OHBS) indicaram que a formação do tautômero enamina para 2-OHBS é cerca de 10.000 vezes mais favorecida em comparação com 4-OHBS. Esta diferença pode ser atribuída à ligação de hidrogênio intramolecular que ocorre em 2-OHBS,⁷ mas não está presente em 4-OHBS. Esta ligação de hidrogênio também é um fator que colabora para o aumento da carga positiva no carbono imínico de 2-OHBS, consequentemente, aumentando sua suscetibilidade ao ataque nucleofílico, em comparação com as outras semicarbazonas.

As energias livres de Gibbs (ΔG) de solvatação em meio aquoso para as arilsemicarbazonas também estão descritas na Tabela 3.10. Como pode ser observado, BS e 2-OHBS apresentam valores absolutos inferiores aos de 3-OHBS e 4-OHBS. Isso pode indicar maior afinidade de 3-OHBS e 4-OHBS pelo meio aquoso. Esta afinidade pode estar relacionada ao coeficiente de partição *n*-octanol/água, que será discutido posteriormente. Seguindo a mesma tendência observada nas demais propriedades, a forma enamina de 2-OHBS apresentou valor absoluto de ΔG superior ao do tautômero imina, evidenciando maior afinidade da forma enamina pelo meio aquoso. Esta afinidade, aliada às demais propriedades descritas, aumenta a suscetibilidade de 2-OHBS ao ataque nucleofílico da água e reforça o papel do tautomerismo no processo de hidrólise da semicarbazona.

Tabela 3.9. Propriedades físico-químicas e eletrônicas calculadas no vácuo para os isômeros *E* de BS, 2-OHBS, 3-OHBS e 4-OHBS e as formas enamina de 2-OHBS e 4-OHBS.

Composto	E _{LUMO} (eV) ^a	Contribuição atômica LUMO (%) ^{b,c}	Carga atômica (u.a.)	
			q C	q N
BS	2,15	11,95	0,055	-0,263
2-OHBS	2,01	16,61	0,071	-0,310
2-OHBS enamina	1,37	32,42	0,156	-0,419
3-OHBS	2,14	11,81	0,061	-0,267
4-OHBS	2,38	13,98	0,055	-0,267
4-OHBS enamina	1,36	34,09	0,108	-0,461

^a Cálculos realizados para isômeros *E*.

^b Contribuições do átomo de carbono imínico (C=N) em LUMO

^c Porcentagem calculada como $[\Sigma c^2 \text{ (C eletrofílico)} / \Sigma c^2 \text{ (todos os átomos)}] \cdot 100$, sendo *c* os coeficientes do orbital atômico de LUMO.

Tabela 3.10. Propriedades físico-químicas e eletrônicas calculadas em meio aquoso para BS, 2-OHBS, 3-OHBS e 4-OHBS e as formas enamina de 2-OHBS e 4-OHBS.

Composto	E _{LUMO} (eV) ^a	Contribuição atômica LUMO ^{b,c}	Carga atômica (u.a.)		ΔG solvatação (Kcal/mol)
			q C	q N	
BS	2,33	12,04	0,048	-0,263	-13,63
2-OHBS	2,24	14,93	0,063	-0,310	-14,67
2-OHBS enamina	1,63	29,83	0,176	-0,419	-19,84
3-OHBS	2,32	12,06	0,055	-0,280	-19,69
4-OHBS	2,59	14,50	0,050	-0,281	-20,29
4-OHBS enamina	1,68	32,99	0,139	-0,438	-32,10

^a Cálculos realizados para isômeros *E*.

^b Contribuições do átomo de carbono imínico (C=N) em LUMO

^c Porcentagem calculada como $[\Sigma c^2 \text{ (C eletrofílico)} / \Sigma c^2 \text{ (todos os átomos)}] \times 100$, sendo *C* os coeficientes do orbital atômico de LUMO.

A Figura 3.8 apresenta a distribuição das densidades LUMO para BS, 2-OHBS (imina e enamina), 3-OHBS, 4-OHBS em meio aquoso. Em todas as moléculas, as densidades LUMO envolvendo os carbonos C7 são nitidamente maiores quando comparadas àquelas relacionadas às demais ligações, confirmando a maior susceptibilidade do carbono imínico ao ataque nucleofílico da água, por exemplo. A Figura, ao contrário dos valores obtidos a partir dos cálculos teóricos, não permitiu diferenciar qual arilsemicrabazona apresenta a maior energia de LUMO relacionada à ligação C=N. Particularmente nos casos das formas enamina de 2-OHBS e 4-OHBS, percebeu-se que a distribuição do LUMO sobre o C7 não é compartilhada com o

carbono aromático adjacente, como observado para as formas imina de 2-OHBS e 4-OHBS e também para as demais arilsemicarbazonas, evidenciando novamente a maior suscetibilidade dessa forma tautomérica ao ataque nucleofílico. Os mesmos perfis observados em meio aquoso se repetiram no vácuo.

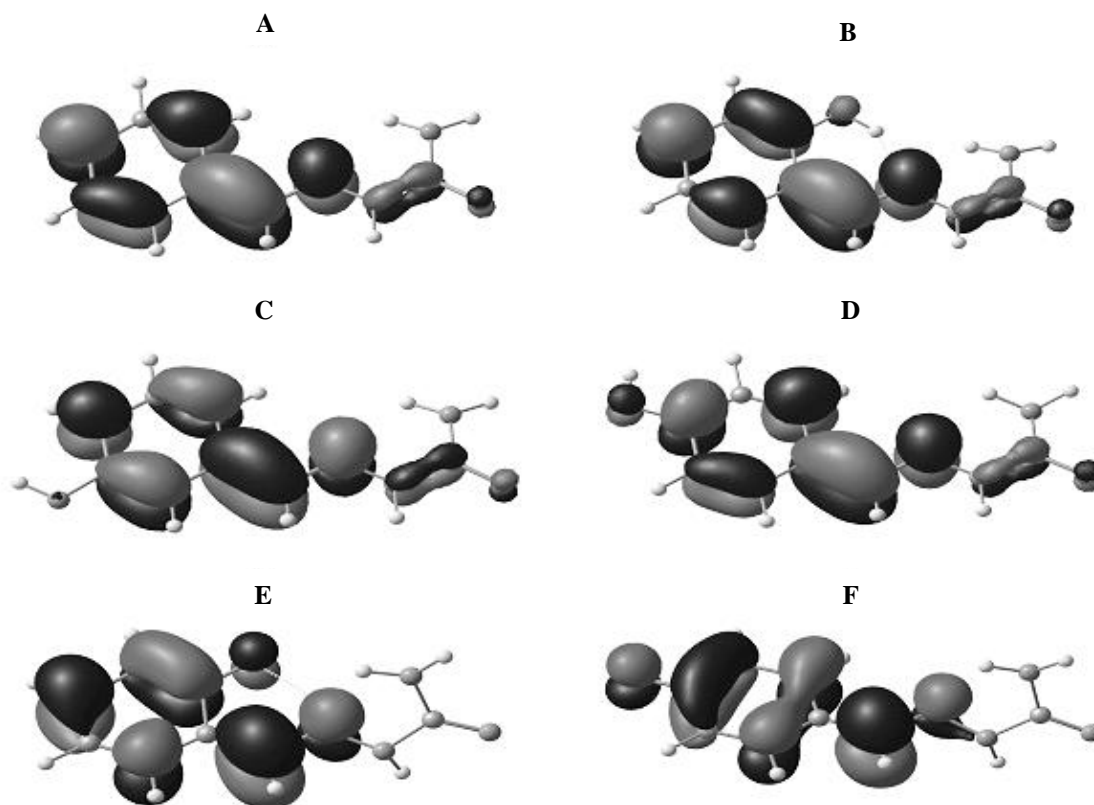


Figura 3.8. Distribuição das densidades LUMO para BS (A), 2-OHBS (B), 3-OHBS (C), 4-OHBS (D), 2-OHBS enamina (E) e 4-OHBS enamina (F) em meio aquoso. Positivo (cinza escuro) e negativo (cinza claro).

3.3. Cálculo dos coeficientes de partição (P) *n*-octanol/água experimental

Foram feitas as curvas de calibração de BS, 2-OHBS, 3-OHBS e 4-OHBS em *n*-octanol e tampão pH 7,4 mutuamente saturados. A Figura 3.9 mostra as curvas de BS. Todas as curvas apresentaram linearidade de acordo, como verificado por meio dos valores de dos coeficientes de linearidade (R^2).

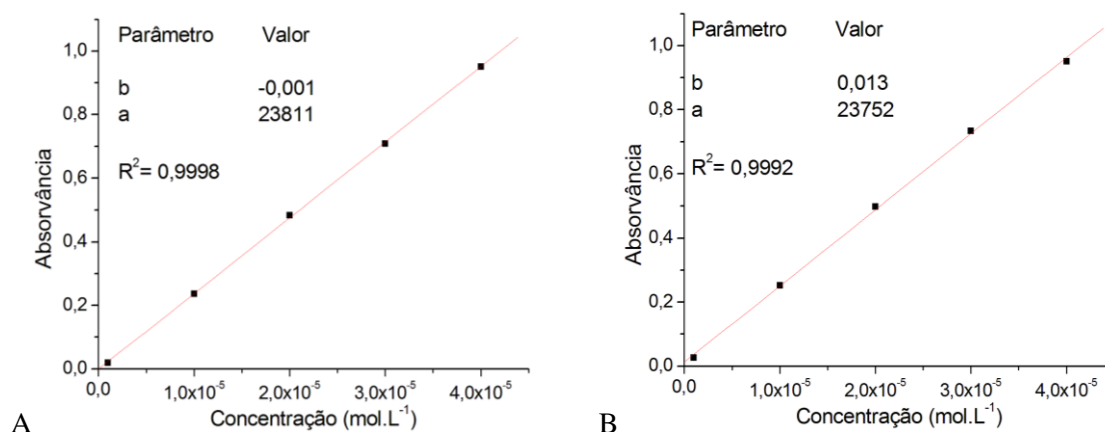


Figura 3.9. Curvas de calibração de BS em *n*-octanol saturado com tampão pH 7,4 (A) e BS em tampão pH 7,4 saturado com *n*-octanol (B).

A Tabela 3.11 apresenta os valores máximos de absorvância dos compostos obtidos por meio dos seus espectros eletrônicos em *n*-octanol e tampão 7,4 mutuamente saturados.

Para cada composto, os valores médios dos coeficientes de partição foram calculados utilizando as seis medidas realizadas (três duplicatas)⁹ e, por conseguinte, foram obtidos os valores de logP experimental, apresentados na Tabela 3.12 em conjunto com os resultados teóricos, calculados por meio dos programas ChemSketch e ALOGPS 2.1.

Observou-se que os valores de logP experimentais atenderam à especificação⁹, apresentando desvio padrão dentro da faixa $\pm 0,3$. Os valores absolutos calculados pelo ChemSketch apresentaram a seguinte tendência para o valor de logP: BS > 2-OHBS > 4-OHBS > 3-OHBS. De acordo com o programa ALOGPS 2.1 e o método OECD, a tendência para o valor de logP é BS > 2-OHBS > 3-OHBS > 4-OHBS. Apesar da ausência de correspondência direta entre todos os métodos e dos altos desvios observados para os valores obtidos por meio dos cálculos teóricos, todos os métodos utilizados permitem dividir as arilsemicarbazonas em dois grupos, sendo BS e 2-OHBS considerados compostos mais hidrofóbicos que 3-OHBS e 4-OHBS, mais hidrofílicos. A divisão das semicarbazonas nesses dois grupos também é condizente com as energias livres de Gibbs (ΔG) em meio aquoso obtidas por meio dos cálculos teóricos e apresentadas anteriormente na Tabela 3.10.

⁹ OECD, Organisation for Economic Cooperation and Development: 1995, Guideline for the Testing of Chemicals 107 – Partition Coefficient (*n*-Octanol/Water): Shake Flask Method, Paris.

Tabela 3.11. Valores máximos de absorvância em *n*-octanol e tampão pH 7,4 para BS, 2-OHBS, 3-OHBS e 4-OHBS. Valores obtidos em duplicata para cada razão *n*-octanol/tampão pH 7,4.

Composto fase (λ_{\max})	Razão <i>n</i> -octanol/ tampão pH 7,4	Medidas de absorvância nas replicatas	
		<i>n</i> -octanol	Tampão pH 7,4
BS <i>n</i> -octanol (283 nm) tampão 7,4 (280 nm)	1:1	1 – 0,7602	1 – 0,0991
		2 – 0,6185	2 – 0,1013
	1:2	1 – 0,7473	1 – 0,0853
		2 – 0,7323	2 – 0,0959
	2:1	1 – 0,7473	1 – 0,1085
		2 – 0,5590	2 – 0,0946
2-OHBS <i>n</i> -octanol (278 nm) tampão 7,4 (277 nm)	1:1	1 – 0,5350	1 – 0,0987
		2 – 0,5928	2 – 0,0995
	1:2	1 – 0,5374	1 – 0,0899
		2 – 0,5728	2 – 0,0988
	2:1	1 – 0,5921	1 – 0,1095
		2 – 0,5819	2 – 0,1027
3-OHBS <i>n</i> -octanol (282 nm) tampão 7,4 (274 nm)	1:1	1 – 0,6040	1 – 0,1735
		2 – 0,4759	2 – 0,1646
	1:2	1 – 0,5202	1 – 0,1521
		2 – 0,3524	2 – 0,1513
	2:1	1 – 0,6205	1 – 0,1832
		2 – 0,5701	2 – 0,1804
4-OHBS <i>n</i> -octanol (291 nm) tampão 7,4 (284 nm)	1:1	1 – 0,6516	1 – 0,3112
		2 – 0,6172	2 – 0,3054
	1:2	1 – 0,4822	1 – 0,2711
		2 – 0,6429	2 – 0,2837
	2:1	1 – 0,6364	1 – 0,3568
		2 – 0,5824	2 – 0,3698

Tabela 3.12. Valores calculados (programas ChemSketch e ALOGPS 2.1) e experimentais de LogP *n*-octanol/água para BS, 2-OHBS, 3-OHBS e 4-OHBS e semicarbazida*.

Método	Valor do logP				
	BS	2-OHBS	3-OHBS	4-OHBS	Semicarbazida
ChemSketch	1,27 ± 0,28	1,24 ± 0,32	0,88 ± 0,29	1,02 ± 0,30	-2,75 ± 0,19
ALOGPS 2.1	1,14 ± 0,19	0,88 ± 0,36	0,78 ± 0,20	0,75 ± 0,28	-1,98 ± 0,31
Experimental	0,91 ± 0,06	0,85 ± 0,02	0,43 ± 0,06	0,31 ± 0,06	-

* em razão da alta hidrofília da semicarbazida, somente os valores calculados são apresentados

Os valores teóricos do logP também foram obtidos para a semicarbazida, produto resultante da hidrólise das arilsemicarbazonas avaliadas. A ausência do valor experimental para a semicarbazida é justificada. Os valores calculados, considerando os desvios, não se encontram na faixa recomendada pelo método (entre -2 e 4). Além disso, a semicarbazida não apresenta absorvância na região do UV-visível, o que impossibilitaria a determinação das concentrações do composto em solução por este método.

Apesar da ausência do valor experimental para semicarbazida, a tendência apresentada por meio da correspondência entre os valores teóricos e experimentais para as arilsemicarbazonas permite sugerir que a semicarbazida é o composto mais hidrofílico dentre os avaliados.

3.4. Ensaio biológico: atividade antinociceptiva e anti-inflamatória das arilsemicarbazonas

Benzaldeído semicarbazona (BS, 50 mg.kg⁻¹, i.p.) foi definido como controle positivo para os protocolos de caracterização das atividades antinociceptivas e anti-inflamatórias de 2-OHBS, 3-OHBS e 4-OHBS, uma vez que BS tem sua atividade farmacológica caracterizada em modelos experimentais de dor, inflamação e angiogênese.¹⁰ As arilsemicarbazonas avaliadas foram administradas em duas diferentes doses (55 e 110 mg.kg⁻¹, i.p), de forma que a menor dose era equimolar a BS 50 mg.kg⁻¹.

A administração de *Zymosan A* induziu uma rápida resposta nociceptiva nos camundongos, cerca de 5 minutos após a injeção. Estes resultados estão representados na Figura 3.10. Conforme os resultados, 4-OHBS e 3-OHBS não apresentaram efeito antinociceptivo estatisticamente significativo no modelo do *Zymosan A*, nas doses avaliadas. Por outro lado, 2-OHBS apresentou atividade em ambas as doses e, conseqüentemente, uma tendência a melhores efeitos quando comparado a BS. Para confirmar esta tendência, uma dose inferior de BS (25 mg.kg⁻¹, i.p.) e a dose equimolar de 2-OHBS (27,5 mg.kg⁻¹, i.p.) foram testadas a fim de definir a dose mínima eficaz de ambas semicarbazonas no modelo testado, definindo a mais ativa. A dose de 20,6 mg.kg⁻¹ de 2-OHBS, correspondente a 75% da dose 27,5 mg.kg⁻¹, foi incluída no experimento a fim de aumentar a confiabilidade da definição dos limites da atividade antinociceptiva. Esses resultados estão representados na Figura 3.11. O experimento mostrou que 27,5 mg.kg⁻¹ de 2-OHBS é a dose mínima eficaz do composto no modelo de constrições, enquanto que a dose de BS correspondente não foi suficiente para manifestação da atividade. O resultado evidencia que 2-OHBS, em doses equimolares a BS, apresentou-se mais eficaz neste modelo de dor inflamatória.

¹⁰ L. T. S. Rocha, K. A. Costa, A. C. P. Oliveira, E. B. Nascimento Jr, C. M. Bertollo, F. Araújo, L. R. Teixeira, S. P. Andrade, H. Beraldo, M. M. Coelho, *Life Sci.*, 79 (2006) 499.

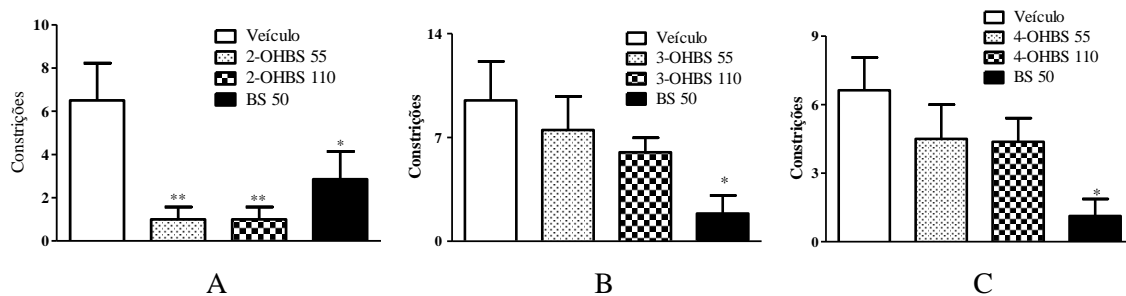


Figura 3.10. Efeitos de benzaldeído semicarbazona (BS, 50 mg.kg⁻¹) e 2-, 3- e 4-hidroxibenzaldeído semicarbazona (2-OHBS, A; 3-OHBS, B; e 4-OHBS, C) (55 e 110 mg.kg⁻¹), i.p., -30 min, na resposta nociceptiva induzida por *Zymosan A* (i.p., 40 mg.kg⁻¹) em camundongos, n = 8. * e ** estatisticamente significativos com relação ao veículo, p<0,05 e p<0,01, respectivamente.

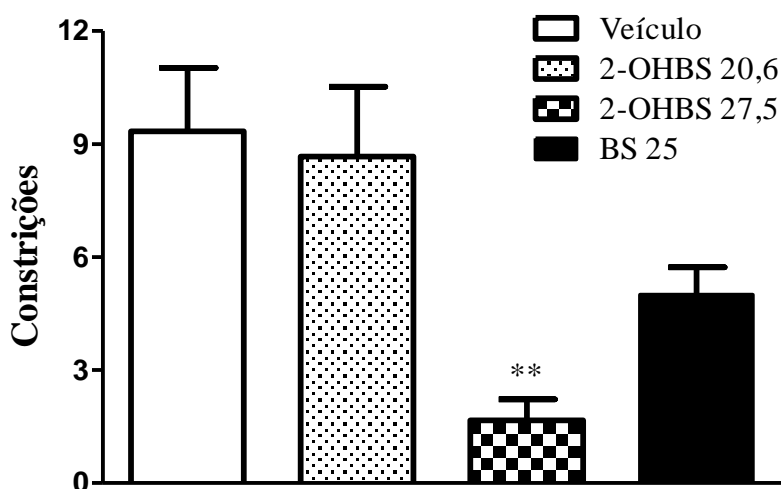


Figura 3.11. Efeitos de benzaldeído semicarbazona (BS, 25 mg.kg⁻¹) e 2-hidroxibenzaldeído semicarbazona (2-OHBS, 20,6 e 27,5 mg.kg⁻¹), i.p., -30 min, na resposta nociceptiva induzida por *Zymosan A* (i.p., 40 mg.kg⁻¹) em camundongos, n = 6. ** estatisticamente significativo com relação ao veículo, p<0,01.

Paralelamente à avaliação da atividade antinociceptiva, o teste de atividade anti-inflamatória mostrou que a administração de carragenina promoveu um aumento significativo no volume da pata dos ratos duas horas após a administração do estímulo. Benzaldeído semicarbazona (BS, 50 mg.kg⁻¹, i.p.) evitou a progressão do edema, apresentando diferença estatisticamente significativa com relação ao veículo (controle negativo). Dentre as arilsemicarbazonas avaliadas, 3-OHBS e 4-OHBS novamente não apresentaram atividade em doses equimolares ou na dose duas vezes superior à dose eficaz de BS (Figura 3.12, B e C). Por sua vez, duas horas após a administração de carragenina, a dose de 110 mg.kg⁻¹ de 2-OHBS

apresentou atividade equivalente a BS 50 mg.kg⁻¹, diminuindo significativamente o edema na pata dos animais, quando comparado ao controle negativo. Neste modelo, ao contrário do observado anteriormente no modelo de constrictões, 2-OHBS não se mostrou tão eficaz quanto BS, necessitando de uma dose duas vezes maior para manifestação da atividade farmacológica equivalente (Figura 3.12, A). Esta diferença pode ser atribuída ao metabolismo particular dos animais utilizados em cada modelo (camundongos e ratos) e a fatores intrínsecos associados a cada teste. De qualquer forma, independente da dose, 2-OHBS apresentou-se como a única arilsemicarbazona ativa em ambos os modelos dentre os três isômeros avaliados.

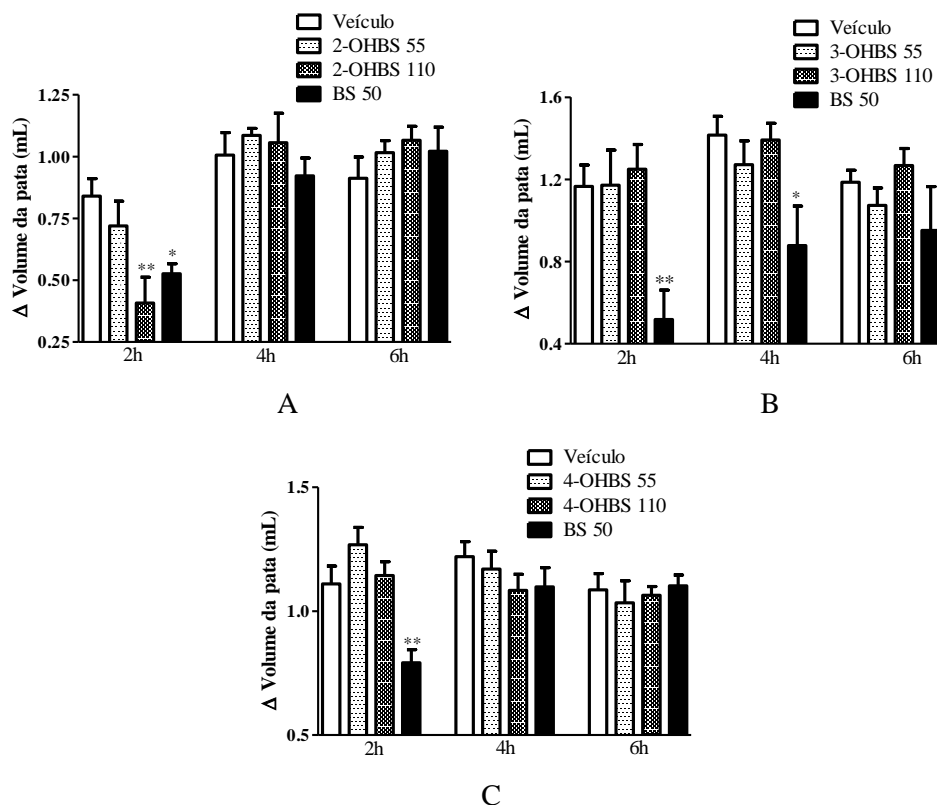


Figura 3.12. Efeitos de benzaldeído semicarbazona (BS, 50 mg.kg⁻¹) e 2-, 3- e 4-hidroxibenzaldeído semicarbazona (A, B e C; 55 e 110 mg.kg⁻¹), i.p., -30 min, no edema em pata de rato induzido por carragenina (1%, 50 µl, i.pl.). O volume da pata foi medido 2, 4 e 6 horas após a injeção da carragenina. n = 5. ** estatisticamente significativo com relação ao veículo, p<0,01.

Uma vez que 2-OHBS apresentou atividade no modelo do *Zymosan A*, o composto foi também avaliado no modelo do formaldeído de dor nociceptiva. A resposta nociceptiva induzida por formaldeído tem duas fases distintas (ver Figura 2.2, página 33). A primeira (fase neurogênica) é geralmente inibida por fármacos com perfil de ação central.¹⁰ Fibras C e ativação de receptores da família TRP (receptor de potencial transiente vaniloide 1) estão relacionados a

este processo.^{11,12} A segunda fase apresenta um maior caráter inflamatório, sendo inibida principalmente por fármacos anti-inflamatórios. O resultado apresentado na Figura 3.13 mostrou que somente BS (50 mg.kg⁻¹, i.p.) inibiu significativamente a primeira fase do modelo do formaldeído, nas doses avaliadas. Por outro lado, 2-OHBS, em sua maior dose (110 mg.kg⁻¹, i.p), inibiu apenas a segunda fase deste protocolo.

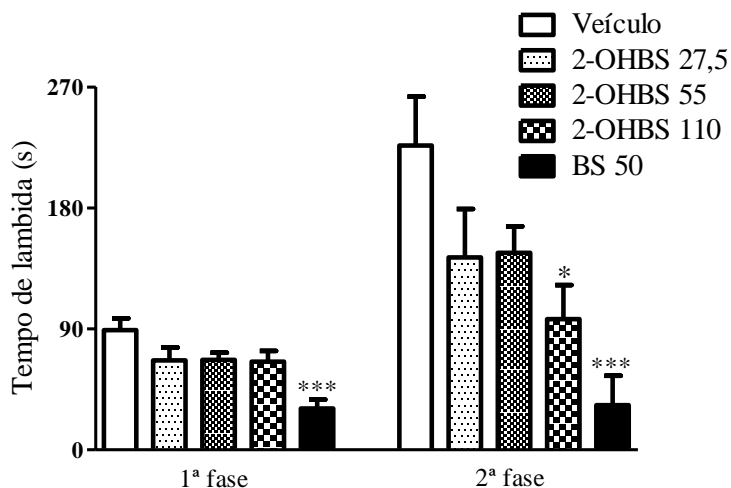


Figura 3.13. Efeitos de benzaldeído semicarbazona (BS, 50 mg.kg⁻¹) 2-hidroxibenzaldeído semicarbazona (2-OHBS; 27,5, 55 e 110 mg.kg⁻¹), i.p., -30 min, na resposta nociceptiva induzida por formaldeído (s.c., 0,34%, 20 µL) em camundongos. n=5-6. * e *** estatisticamente significativos com relação ao veículo, p<0,05 e p<0,001, respectivamente.

A influência na atividade motora dos camundongos foi investigada com a maior dose de 2-OHBS em que foram observadas atividades farmacológicas (110 mg.kg⁻¹, i.p.). O resultado, apresentado na Figura 3.14, mostra que não houve perda da coordenação após administração do composto, quando comparado ao veículo (controle negativo) e fenobarbital (controle positivo). Este resultado valida aqueles anteriormente obtidos nos experimentos comportamentais do *Zymosan A* e formaldeído, descartando a possibilidade de a atividade de 2-OHBS estar relacionada a ataxia e relaxamento muscular do animal.

¹¹ S. Puig, L. S. Sorkin, Pain, 64 (1996) 345.

¹² C. R. McNamara, J. Mandel-Brehm, D. M. Bautista, J. Siemens, K. L. Deranian, M. Zhao, N. J. Hayward, J. A. Chong, D. Julius, M. M. Moran, C. M. Fanger, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 104 (2007) 13525.

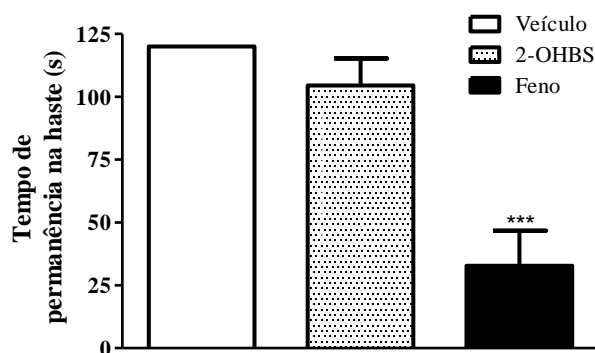


Figura 3.14. Efeitos de 2-hidroxibenzaldeído semicarbazona (2-OHBS, 110 mg.kg⁻¹), i.p., -30 min e fenobarbital (Feno, 40 mg.kg⁻¹) i.p., -30 min, no tempo de permanência dos camundongos na haste girante (14 r.p.m.), n = 6. *** estatisticamente significativo com relação ao veículo, p<0,001.

Desta forma, os resultados anteriormente apresentados permitiram concluir que 2-OHBS caracteriza-se como um protótipo de fármaco com atividades anti-inflamatórias e analgésicas, provavelmente relacionadas a mecanismos periféricos, uma vez que sua atividade, nas doses avaliadas, não foi verificada em fases neurogênicas da dor, ao contrário de BS.

Na inflamação, dentre os vários processos bioquímicos associados, a migração de linfócitos é mediada pela ativação de células endoteliais por biomoléculas conhecidas e bem caracterizadas, tais como a proteína de adesão vascular-1 (VAP-1).¹³ A clonagem da VAP-1 mostrou que ela pertence à família das amino-oxidases, sendo idêntica a uma amino-oxidase contendo cobre e associada à membrana celular também chamada amino-oxidase semicarbazida-sensível (SSAO).^{14,15} Esta enzima converte exclusivamente aminas primárias em aldeídos, liberando amônia e peróxido de hidrogênio.¹⁶ Esta oxidase é expressa principalmente nas células da musculatura lisa vascular, células endoteliais de órgãos linfáticos, fígado, microcirculação cerebral e adipócitos.¹⁷ A expressão na superfície celular da SSAO é significativamente aumentada em sítios inflamatórios^{18,19,20}. Estudos recentes demonstraram que a SSAO é um dos mais importantes fatores para a evolução do processo inflamatório e

¹³ M. Salmi, S. Jalkanen, *Science*, 257 (1992) 1407.

¹⁴ X. Zhang, W. S. McIntire, *Gene*, 179 (1996) 279.

¹⁵ D.J. Smith, M. Salmi, P. Bono, J. Hellman, T. Leu, S. Jalkanen, *J. Exp. Med.*, 188 (1998) 17.

¹⁶ F. Buffoni, G. Ignesti, *Mol. Genet. Metab.* 71 (2000) 559.

¹⁷ L. M. Salter-Cid, E. Wang, A.M. O'Rourke, A. Miller, H. Gao, L. Huang, A. Garcia, M. D. Linnik, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 315 (2005) 553.

¹⁸ K. Jaakkola, T. Nikula, R. Holopainen, T. Vähäsilta, M. T. Matikainen, M. L. Laukkanen, R. Huupponen, L. Halkola, L. Nieminen, J. Hiltunen, S. Parviainen, M. R. Clark, J. Knuuti, T. Savunen, P. Käähä, L. M. Voipio-Pulkki, S. Jalkanen, *Am. J. Pathol.* 157 (2000) 463.

¹⁹ M. Salmi, G. G. Yegutkin, R. Lehvonen, K. Koskinen, T. Salminen, S. Jalkanen, *Immunity*, 14 (2001) 265.

²⁰ M. Salmi, S. Jalkanen, *Trends Immunol.* 22 (2001) 211.

inibidores específicos desta amino-oxidase são ferramentas promissoras no desenvolvimento de novos agentes anti-inflamatórios.^{17,21}

Como a SSAO pode ser inibida por aminas primárias como a semicarbazida²² e esta inibição pode resultar em efeitos anti-inflamatórios, sugeriu-se que 2-OHBS apresentou a mais significativa atividade anti-inflamatória nos modelos testados entre os isômeros avaliados devido à sua maior suscetibilidade à hidrólise, como indicado pelos estudos teóricos. Um processo hidrolítico em maior magnitude para 2-OHBS geraria mais alta concentração de semicarbazida no sítio inflamatório.

Evidências do envolvimento da semicarbazida liberada a partir da hidrólise das semicarbazonas encontram-se principalmente nos resultados dos protocolos de constrições induzidas por *Zymosan A*. O envolvimento de macrófagos e mastócitos residentes na resposta nociceptiva induzida por *Zymosan A* por meio da liberação de TNF- α , interleucina 1 β e interleucina 8 é bem descrito na literatura.²³ Estas células residentes também exercem uma importante função de sinais e sintomas locais e sistêmicos da inflamação, tais como migração celular.^{24,25,26} Considerando que a semicarbazida inibe a SSAO e, conseqüentemente, a migração de neutrófilos, sugeriu-se que uma das formas de ação de 2-OHBS no modelo de constrições foi a inibição da migração local de células após a liberação de semicarbazida por hidrólise.

Com o objetivo de esclarecer se as atividades periféricas de BS e 2-OHBS e a atividade neurogênica de BS estariam relacionadas à hidrólise das semicarbazonas e à conseqüente liberação de semicarbazida, ensaios *in vivo* foram realizados com benzaldeído e cloridrato de semicarbazida, produtos de partida na síntese de BS, mas também metabólitos produzidos imediatamente após sua hidrólise. A escolha de realizar os protocolos experimentais com os metabólitos de BS está relacionada à avaliação de uma molécula com atividade farmacológica mais complexa, quando comparada a 2-OHBS. Os resultados do efeito de benzaldeído e cloridrato de semicarbazida na resposta nociceptiva induzida por formaldeído estão representados na Figura 3.15A.

²¹ P. H. Yu, L. X. Lu, H. Fan, M. Kazachkov, Z. J. Jiang, S. Jalkanen, C. Stolen, *Am. J. Pathol.* 168 (2006) 718.

²² P. H. Yu, S. Wright, E. H. Fan, Z. R. Lun, D. Gubisne-Harberle, *Biochim. Biophys. Acta.* 1647 (2003) 193.

²³ R. A. Ribeiro, M. L. Vale, S. M. Thomazzi, A. B. Paschoalato, S. Poole, S. H. Ferreira, F. Q. Cunha, *Eur. J. Pharmacol.* 387 (2000) 111.

²⁴ W. de Souza, M. Benchimol, *Microsc. Electron. Biol. Celular*, 9 (1985) 177.

²⁵ G. E. Souza, F. Q. Cunha, R. Mello, S. H. Ferreira, *Agents Actions.* 24 (1988) 377.

²⁶ R. Malaviya, T. Ikeda, E. Ross, S. N. Abraham, *Nature*, 381(1996) 77.

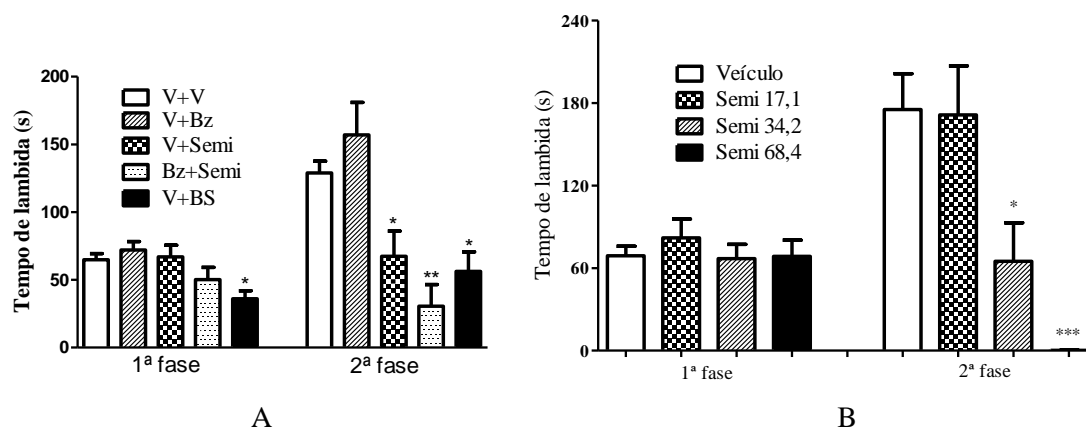


Figura 3.15. **A)** Efeitos de benzaldeído semicarbazona (BS, 50 mg.kg⁻¹), benzaldeído (Bz, 32,5 mg.kg⁻¹), cloridrato de semicarbazida (Semi, 34,2 mg.kg⁻¹) e veículo (V), i.p., isolados ou em combinação, -30 min, na resposta nociceptiva induzida por formaldeído (s.c., 0,34%, 20 µL) em camundongos. n=10. **B)** Efeitos de cloridrato de semicarbazida (Semi, 17,1; 34,2 e 68,4 mg.kg⁻¹), i.p., -30 min, na resposta nociceptiva induzida por formaldeído (s.c., 0,34%, 20 µL) em camundongos. n=7-8. *, ** e *** estatisticamente significativos com relação ao veículo, p<0,05, p<0,01 e p<0,001, respectivamente.

Conforme a Figura 3.15A, observou-se que o cloridrato de semicarbazida, na dose equimolar a BS 50 mg.kg⁻¹, apresentou atividade estatisticamente significativa com relação ao veículo na segunda fase do modelo, isoladamente ou em associação com a dose equimolar de benzaldeído. Este, por sua vez, não apresentou atividade isoladamente. O conjunto de resultados permitiu sugerir que a atividade periférica de BS em modelos de dor aguda está relacionada à hidrólise parcial do composto, formando semicarbazida. Sugeriu-se hidrólise parcial diante da ausência de atividade de benzaldeído e semicarbazida na fase neurogênica do modelo. Portanto, a atividade de BS na primeira fase pode ser atribuída à atividade intrínseca desta molécula ou de um de seus metabólitos não relacionados ao processo de hidrólise, diferenciando-a das demais arilsemicarbazonas avaliadas.

A fim de determinar a relação dose-resposta do cloridrato de semicarbazida, a substância foi novamente avaliada na resposta nociceptiva induzida por formaldeído (Figura 3.15B), utilizando a mesma dose anteriormente avaliada (34,2 mg.kg⁻¹), a dose duas vezes inferior (17,1 mg.kg⁻¹) e outra duas vezes superior à primeira (68,4 mg.kg⁻¹). Os resultados mostram que o efeito antinociceptivo do cloridrato de semicarbazida possui uma relação dose-resposta, em que a diminuição da dose para 17,1 mg.kg⁻¹ aborta os efeitos anteriormente observados, enquanto o aumento para 68,4 mg.kg⁻¹ exacerba a atividade farmacológica. Ao mesmo tempo, o protocolo reforça a ausência de atividade do cloridrato de semicarbazida na fase neurogênica do modelo, estando de acordo com os experimentos anteriores e reforçando a

hipótese de a atividade de BS na primeira fase estar associada a um mecanismo não relacionado à hidrólise da semicarbazona.

Como para 2-OHBS, a influência na atividade motora dos camundongos foi investigada com a maior dose de cloridrato de semicarbazida em que foram observadas atividades farmacológicas ($68,4 \text{ mg.kg}^{-1}$). O resultado, apresentado na Figura 3.16, mostra que não houve perda da coordenação após administração da dose, quando comparado ao veículo (controle negativo) e fenobarbital (controle positivo), validando a atividade antinociceptiva do composto avaliado.

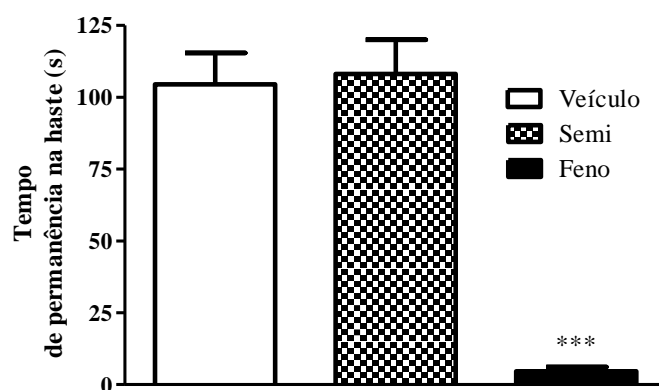


Figura 3.16. Efeitos de cloridrato de semicarbazida (Semi, $68,4 \text{ mg.kg}^{-1}$), i.p., -30 min e fenobarbital (Feno, 40 mg.kg^{-1}) i.p., -30 min, no tempo de permanência dos camundongos na haste girante (14 r.p.m.), $n = 6-7$. *** estatisticamente significativo com relação ao veículo, $p < 0,001$.

De forma complementar à caracterização da atividade antinociceptiva, foi realizada a caracterização da atividade anti-inflamatória do cloridrato de semicarbazida no edema induzido por carragenina em ratos (Figura 3.17). Duas horas após a administração de carragenina, as doses de $34,2$ e $68,4 \text{ mg.kg}^{-1}$ apresentaram atividades equivalentes a BS 50 mg.kg^{-1} , diminuindo significativamente o edema na pata dos animais, quando comparado ao controle negativo. Ao contrário do observado para 2-OHBS, ambas as doses de cloridrato de semicarbazida prolongaram seu efeito até quatro horas após a administração de carragenina, efeito não observado para BS. A manutenção do efeito da semicarbazida, não observada para as semicarbazonas, pode estar relacionada a particularidades de sua biotransformação. Dessa forma, evidencia-se novamente a relação entre a hidrólise das semicarbazonas e a atividade anti-inflamatória.

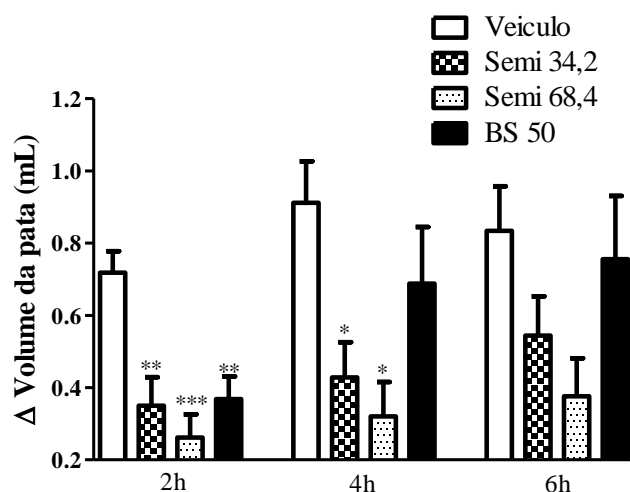


Figura 3.17. Efeitos de benzaldeído semicarbazona (BS, 50 mg.kg⁻¹) e cloridrato de semicarbazida (Semi, 34,2 e 68,4 mg.kg⁻¹), i.p., -30 min, no edema em pata de rato induzido por carragenina (1%, 50 µl, i.pl.). O volume da pata foi medido 2, 4 e 6 horas após a injeção da carragenina. n = 5. *, ** e *** estatisticamente significativos com relação ao veículo; p<0,05, p<0,01 e p<0,001, respectivamente.

Baseando-se nos resultados dos estudos teóricos, da determinação dos coeficientes de partição octanol-água e dos ensaios *in vivo* em modelos de dor e inflamação aguda, a atividade de BS na primeira fase pôde ser atribuída ao seu maior caráter lipofílico quando comparado a 3-OHBS e 4-OHBS e menor suscetibilidade à hidrólise quando comparado a 2-OHBS. Desta forma, sugere-se que BS, em maior magnitude que as demais arilsemicarbazonas testadas, alcançaria sítios biológicos onde, de forma íntegra ou na forma de um metabólito não relacionado ao processo de hidrólise, exerceria sua ação central. Em estudos posteriores, deverá ser elucidado se haveria receptores associados à ação central de BS ou de um metabólito de BS ou se BS agiria através de mecanismos bem estabelecidos na literatura, tais como inibição de canais de sódio.²⁷

Os resultados aqui apresentados deram origem a um artigo publicado no periódico *European Journal of Medicinal Chemistry*.

²⁷ V. I. Ilyin, D. D. Hodges, E. R. Whittemore, R. B. Carter, S. X. Cai, R. M. Woodward, Br. J. Pharmacol. 144 (2005) 80.

Capítulo 4. Estudos de estabilidade de benzaldeído semicarbazona (BS), 2-hidroxibenzaldeído semicarbazona (2-OHBS), composto de inclusão BS: β -ciclodextrina (BS: β CD) e mistura BS+ β CD em meio gástrico simulado.

A administração de fármacos e candidatos a fármacos, em testes *in vivo* ou na terapêutica, é realizada por meio de vias de administração enterais ou parenterais. Vias de administração enterais, como oral (*per os*), sublingual e retal, estão diretamente relacionadas à passagem no sistema gastrointestinal. No caso das administrações parenterais, como intraperitoneal (i.p.), intravenosa, subcutânea e intramuscular, não há contato direto dos compostos ou formulações com o trato gastrointestinal.

O estudo de estabilidade é uma etapa importante no desenvolvimento de fármacos e candidatos a fármacos. Prazos de validade e as vias ideais de administração dos princípios ativos e formulações podem ser estabelecidos por meio da avaliação das propriedades físicas, químicas e físico-químicas. Viscosidade, cor e valor de pH podem ser citados como parâmetros avaliados para formulações.¹ Alterações de temperatura, umidade, luminosidade e a suscetibilidade aos processos de oxi-redução ou hidrólise devem ser consideradas para os princípios ativos isoladamente ou quando estes compõem formulações farmacêuticas.² Além disso, a comparação de dados obtidos em estudos de estabilidade e estudos de metabolismo *in vivo* permite sugerir vias de biotransformação das moléculas.

A administração oral possui inconvenientes relacionados à farmacocinética, apesar de ser considerada a via mais segura, conveniente, econômica e, conseqüentemente, usual. Dificuldades de absorção, metabolização por meio de enzimas gastrointestinais e hidrólise ácida em função do baixo valor do pH estomacal estão entre as principais limitações.³

Apesar de estudos sugerirem a hidrólise de semicarbazonas por meio de ataque nucleofílico à ligação imínica (C=N),⁴ não há relatos na literatura da avaliação da cinética de reação de hidrólise de semicarbazonas.

O mecanismo de obtenção das arilsemicarbazonas BS, 2-OHBS, 3-OHBS e 4-OHBS a partir dos seus respectivos aldeídos e semicarbazida está descrito na Figura 4.1.

¹ B. Kommanaboyina, C. T. Rhodes, *Drug Develop. Ind. Pharm.* 25 (1999) 857.

² International Conference on Harmonisation (ICH) of requirements for registration of pharmaceuticals for human use. **Stability Testing of New Drugs Substances and Products Q1A(R2)**. Disponível em: <http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA419.pdf>.

³ Goodman & Gilman, *As bases farmacológicas da terapêutica*. 11 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, c2006.

⁴ K. Ramu, G.N. Lam, H. Hughes, *Drug Metab. Dispos.* 28 (2000) 1153.

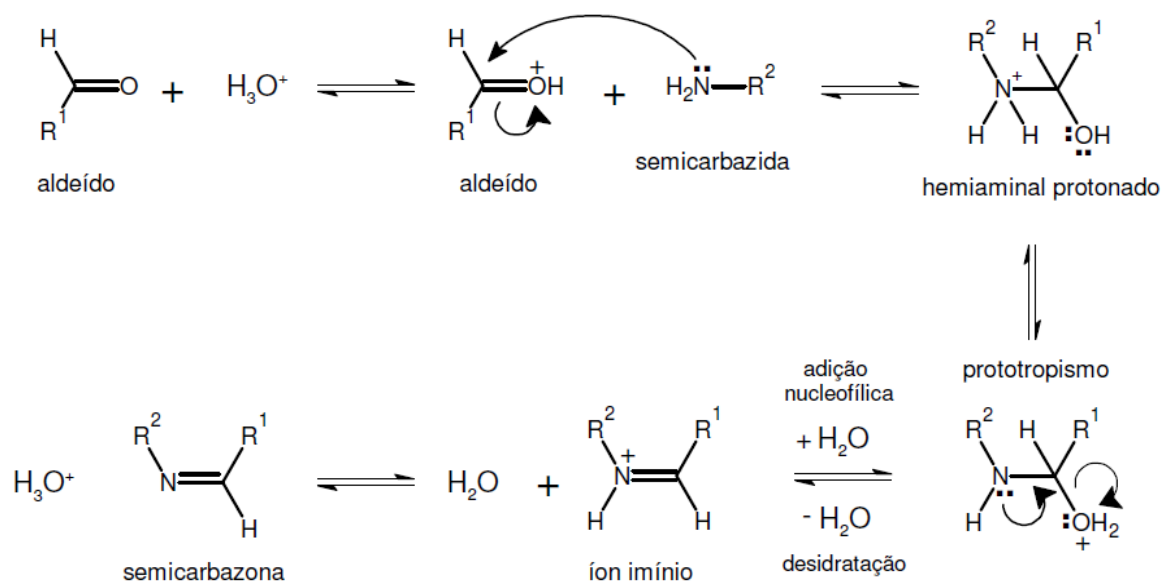


Figura 4.1. Mecanismo de obtenção de semicarbazona a partir semicarbazida e aldeído.⁵

Aldeídos e semicarbazida regenerados a partir das semicarbazonas são obtidos a partir do ataque nucleofílico da água ao carbono imínico. A hidrólise pode ser catalisada pela protonação do nitrogênio imínico em meio ácido ou formação de complexos com íons metálicos.^{6,7}

Nesta etapa do trabalho, avaliamos a cinética de hidrólise das arilsemicarbazonas em meio gástrico simulado com o objetivo de relacionar os aspectos cinéticos aos termodinâmicos (cálculos teóricos) e, posteriormente, aos resultados da administração *per os*.

4.1. Espectro eletrônico das arilsemicarbazonas em meio gástrico simulado

Em uma análise preliminar, demonstrou-se que o espectro eletrônico de BS em solução 1% DMSO em tampão pH 1,2 (meio gástrico simulado) apresentava, imediatamente após o preparo da solução, um máximo de absorvância em 280 nm. Este máximo de absorvância é condizente com o máximo encontrado para BS em experimentos em solução aquosa.⁸ Após duas horas, foi obtido o espectro eletrônico da mesma solução, que apresentou novo máximo de absorvância em 251 nm. Este valor é correspondente ao encontrado para benzaldeído, na literatura.⁹ O experimento, descrito na Figura 4.2, evidencia que a semicarbazona foi hidrolisada, dando origem inicialmente a semicarbazida

⁵ P. Costa, R. Pilli, S. Pinheiro, M. Vasconcellos, *Substâncias Carboniladas e Derivados*. Porto Alegre: Bookman, 2003.

⁶ M. Vieites, P. Buccino, L. Otero, M. González, O. E. Piro, R. S. Delgado, C. M. R. Sant'Anna, E. J. Barreiro, H. Cerecetto, D. Gambino, *Inorg. Chim. Acta*, 358 (2005) 3065.

⁷ R. N. Ram, K. Varsha, *Tetrahedron Lett.*, 32 (1991) 5829.

⁸ L. R. Teixeira, R. D. Sinisterra, R. P. Vieira, M. C. Doretto, H. Beraldo, *J. Incl. Phenom. Macro.*, 47 (2003) 77.

⁹ R. Silverstein, *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, 3 ed. New York: John Wiley, c.1979.

e benzaldeído, sendo que apenas o último pôde ser detectado fotometricamente, por possuir absorção na região do ultravioleta.

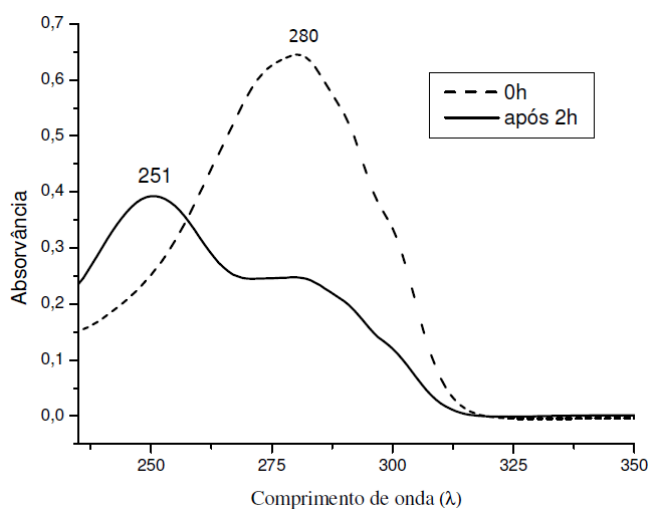


Figura 4.2. Espectro eletrônico de benzaldeído semicarbazona em 0 e 120 minutos após o preparo de solução $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, 1% DMSO em meio gástrico simulado (tampão pH 1,2) a 25°C .

Com o objetivo de demonstrar que a hidrólise poderia ocorrer com todas as arilsemicarbazonas e que a reação poderia ser acompanhada pela diminuição dos máximos de absorvância das respectivas semicarbazonas, os espectros eletrônicos de BS, 2-OHBS, 3-OHBS e 4-OHBS foram obtidos em meio gástrico simulado durante 40 minutos, com leituras a cada 10 minutos. Os resultados estão representados na Figura 4.3.

Os gráficos mostram a presença de pontos isobésticos em todos os casos, sugerindo a presença de mais de um cromóforo em solução, tais como as semicarbazonas e seus respectivos aldeídos. Observou-se também que BS, 3-OHBS e 4-OHBS apresentam cinéticas de hidrólise qualitativamente semelhantes, sob as mesmas condições experimentais. Em contrapartida, 2-OHBS apresentou uma velocidade de hidrólise significativamente maior quando comparada às demais arilsemicarbazonas. Estes resultados estão condizentes com os resultados teóricos descritos no Capítulo 3 e sugerem que o processo de hidrólise de 2-OHBS seria o processo cinética e termodinamicamente mais favorável dentre as semicarbazonas avaliadas.

Considerando-se que 3-OHBS e 4-OHBS não apresentaram atividade em modelos de dor e inflamação utilizando-se administração i.p. (Capítulo 3), apenas BS e 2-OHBS poderiam ser alvos de estudos de atividade farmacológica por meio de administração *per os*. A seguir, são apresentados os cálculos de velocidade inicial de hidrólise para BS e 2-OHBS em meio gástrico simulado, visando estabelecer seus perfis de estabilidade em condições simuladas do trato gastrintestinal.

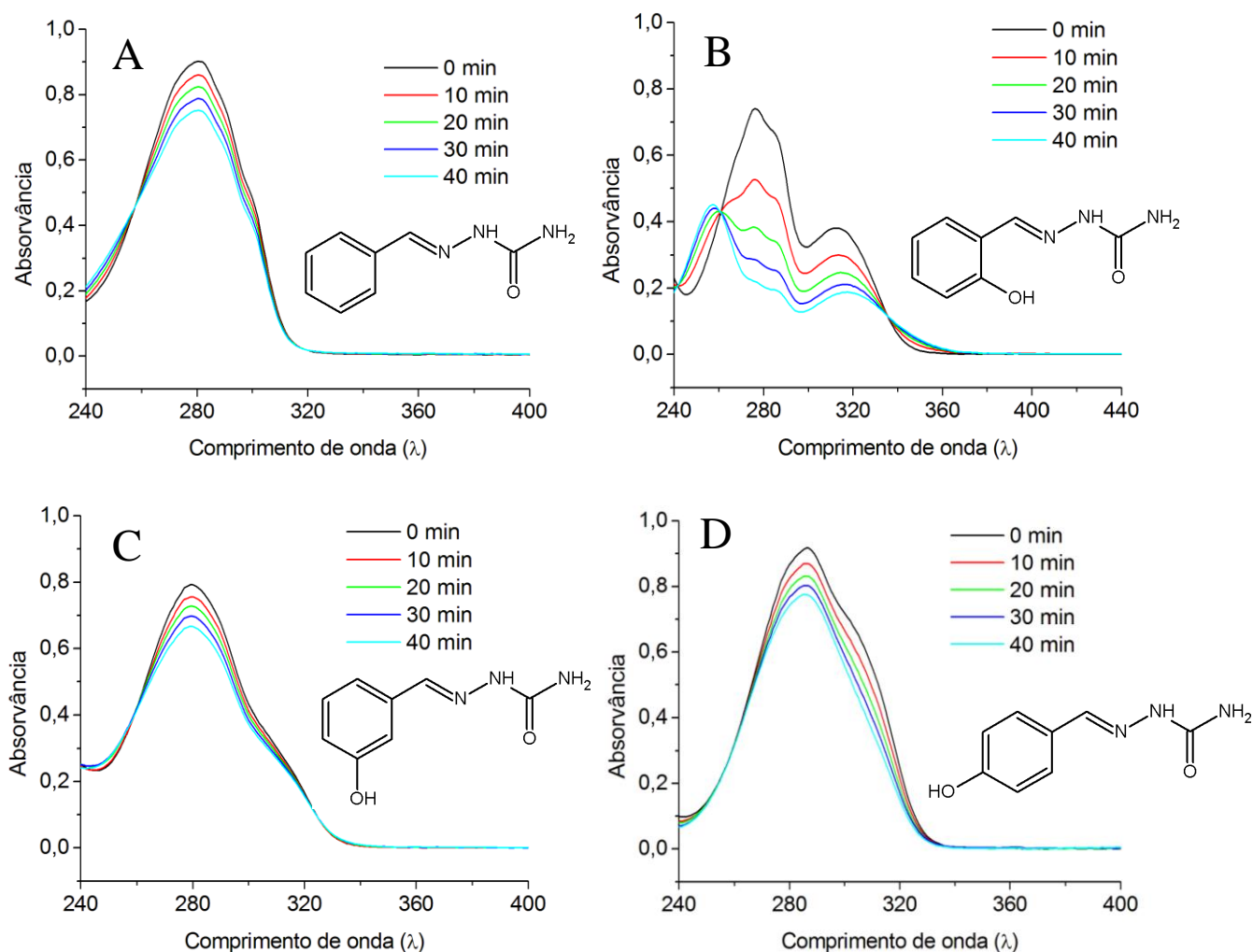


Figura 4.3 Espectros eletrônicos de benzaldeído semicarbazona (BS, A) e 2-, 3- e 4-hidroxibenzaldeído semicarbazonas (2-OHBS, B; 3-OHBS, C; e 4-OHBS, D, respectivamente) 0, 10, 20, 30 e 40 minutos após o preparo de solução $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, 1% DMSO em meio gástrico simulado (tampão pH 1,2) a 25°C . Máximos de absorvância observados em 280, 276, 280 e 286 nm, respectivamente.

4.2. Velocidade inicial para a hidrólise de BS em meio gástrico simulado

A curva de calibração de BS em meio gástrico simulado está representada na Figura 4.4 A. Os valores médios de absorvância obtidos para as quatro concentrações intermediárias da curva de calibração estão descritos na Figura 4.4 B. A Figura evidencia, qualitativamente, que a velocidade da reação é dependente da concentração de BS, uma vez que a inclinação das curvas aumenta conforme o aumento da concentração da semicarbazona.

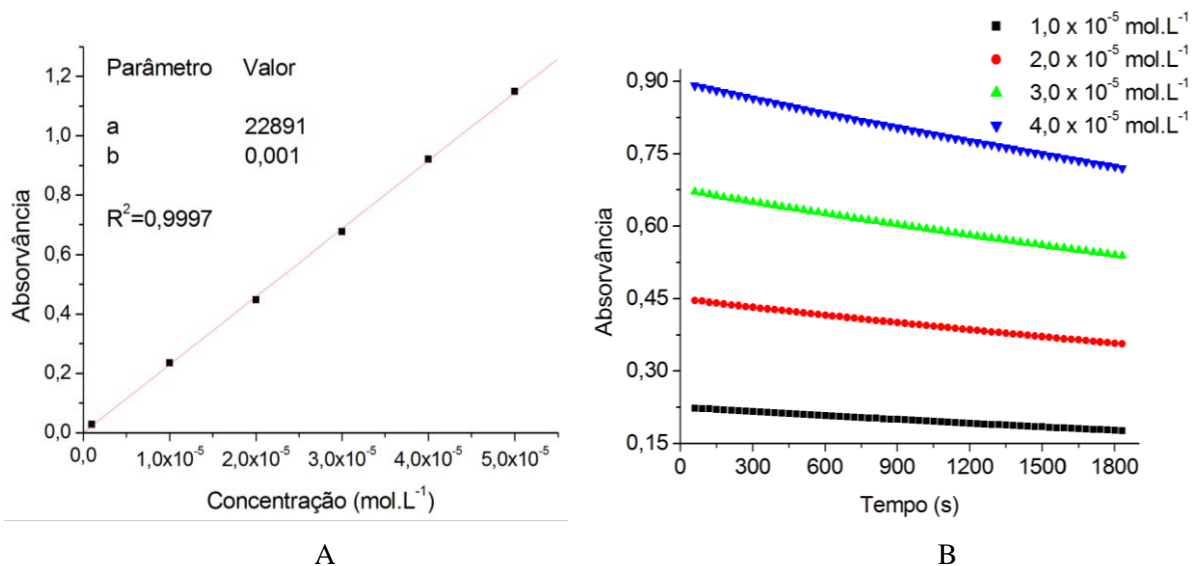


Figura 4.4. A) Curva de calibração de BS em 1% DMSO em meio gástrico simulado, pH = 1,2. B) Valores médios de absorvância *versus* tempo (segundos) para as triplicatas de quatro concentrações de BS em 1% DMSO em meio gástrico simulado.

Para expressar a variação de BS com o tempo em termos de concentração, os valores médios de absorvância apresentados na Figura 4.4 B foram convertidos em valores de concentração por meio da utilização do valor de ϵ (absortividade molar), obtido a partir dos dados da curva de calibração. Nas Figuras 4.5 e 4.6 são apresentados os primeiros pontos das curvas de concentração vs tempo. Nestas curvas, o coeficiente angular (valor a, função módulo) seria correspondente à velocidade inicial da reação em cada concentração. As velocidades iniciais foram utilizadas para fazer o gráfico da Figura 4.7 A (velocidade inicial vs concentração).

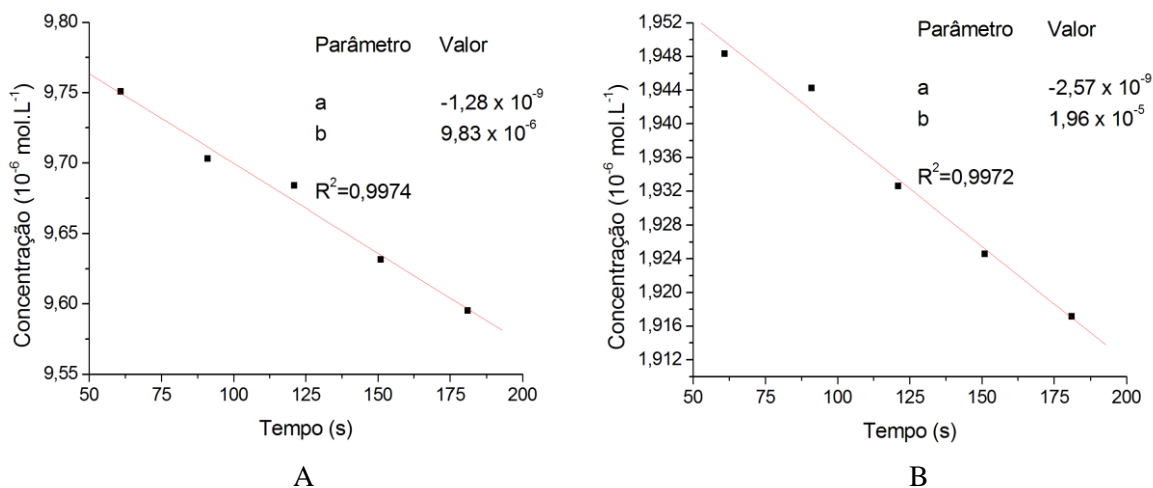


Figura 4.5. A) Valores médios de concentrações médias *versus* tempo (segundos) para a triplicata da solução de BS $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ em 1% DMSO em meio gástrico simulado. B) Valores médios de concentrações médias *versus* tempo (segundos) para a triplicata da solução de BS $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ em 1% DMSO em meio gástrico simulado, pH 1,2.

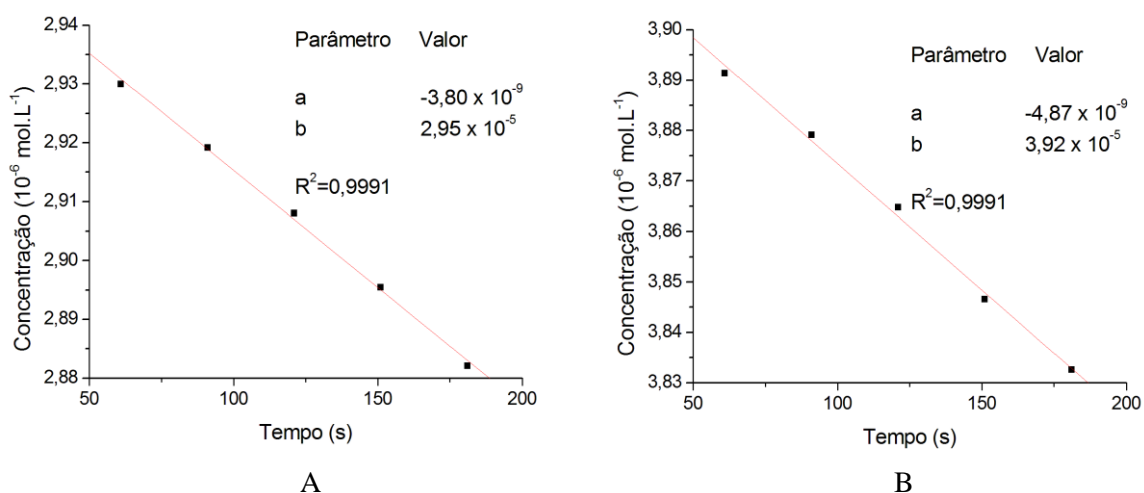


Figura 4.6. A) Valores médios de concentrações médias *versus* tempo (segundos) para a triplicata da solução de BS $3,0 \times 10^{-5}$ mol.L $^{-1}$ em 1% DMSO em meio gástrico simulado. B) Valores médios de concentrações médias *versus* tempo (segundos) para a triplicata da solução de BS $4,0 \times 10^{-5}$ mol.L $^{-1}$ em 1% DMSO em meio gástrico simulado, pH 1,2.

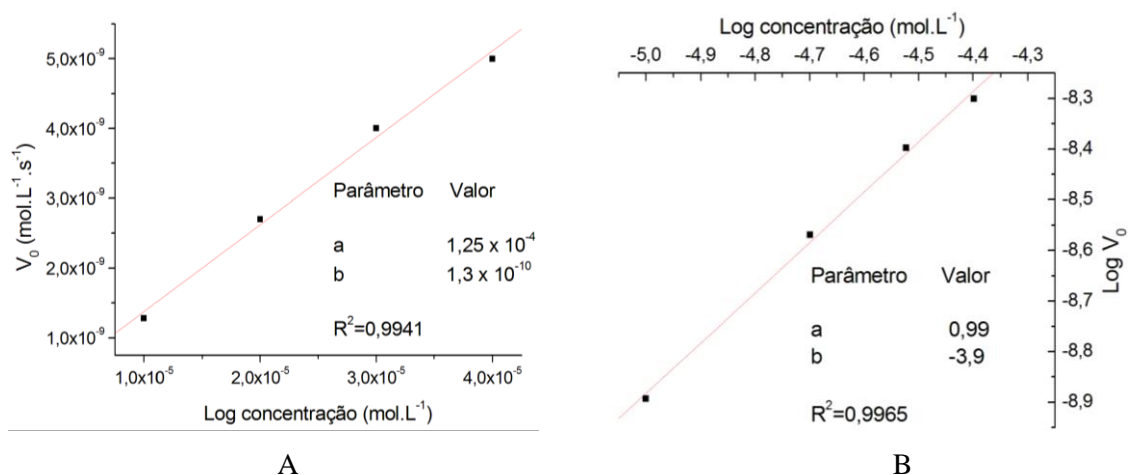


Figura 4.7. A) Velocidade inicial (V_0 , mol.L $^{-1}$.s $^{-1}$) *versus* concentração (mol.L $^{-1}$) para as triplicatas de quatro concentrações de BS em 1% DMSO em meio gástrico simulado. B) Logaritmo base 10 da velocidade inicial *versus* logaritmo base 10 concentração (mol.L $^{-1}$) para as triplicatas de quatro concentrações de BS em 1% DMSO em meio gástrico simulado, pH 1,2.

Aplicou-se log aos valores obtidos no gráfico da Figura 4.7 A para obtenção do gráfico e parâmetros descritos na Figura 4.7 B. O valor de a (coeficiente angular) é correspondente à ordem parcial da reação n com relação ao BS e, uma vez que é diferente de zero ($n = 0,99$), confirma a hipótese de a velocidade da reação ser dependente da concentração da semicarbazona.

Considerando que o valor de $\log k'$ é correspondente a $-3,9 \pm 0,2$ (coeficiente linear), o valor da constante k' foi obtido:

$$\begin{aligned}\text{Log } k' &= -3,9 \\ k' &= 1,3 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}\end{aligned}$$

Considerando-se a concentração inicial de BS igual a $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ e a equação abaixo:

$$\begin{aligned}v_0 &= k'[\text{BS}]_0^n \\ v_0 &= (1,3 \times 10^{-4})(4,0 \times 10^{-5})^{0,99} \\ v_0 &= 5,8 \times 10^{-9} \text{ mol.L}^{-1}.\text{s}^{-1}\end{aligned}$$

Considerando o intervalo de confiança da medida (limite superior e o inferior), ou seja, $\log k' = -3,7$ e $\log k' = -4,1$.

Considerando $\log k' = -3,7$:

$$\begin{aligned}\text{Log } k' &= -3,7 \\ k' &= 2,0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}\end{aligned}$$

Considerando $\log k' = -4,1$:

$$\begin{aligned}\text{Log } k' &= -4,1 \\ k' &= 7,9 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}\end{aligned}$$

Considerando-se a concentração inicial de BS igual a $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ e a equação abaixo:

$$v_0 = k'[\text{BS}]_0^n$$

Considerando $k' = 2,0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$:

$$\begin{aligned}v_0 &= (2,0 \times 10^{-4})(4,0 \times 10^{-5})^{0,99} \\ v_0 &= 8,9 \times 10^{-9} \text{ mol.L}^{-1}.\text{s}^{-1}\end{aligned}$$

Considerando $k' = 7,9 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$:

$$\begin{aligned}v_0 &= (7,9 \times 10^{-5})(4,0 \times 10^{-5})^{0,99} \\ v_0 &= 3,5 \times 10^{-9} \text{ mol.L}^{-1}.\text{s}^{-1}\end{aligned}$$

Portanto, a velocidade da reação inicial de hidrólise de BS é $5,8 \times 10^{-9} \text{ mol.L}^{-1}.\text{s}^{-1}$, com um intervalo de confiança de $3,5 \times 10^{-9}$ e $8,9 \times 10^{-9} \text{ mol.L}^{-1}.\text{s}^{-1}$ a 25°C , pH 1,2 e concentração de BS igual a $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$.

4.3. Velocidade inicial para a hidrólise de 2-OHBS em meio gástrico simulado

A curva de calibração de 2-OHBS em meio gástrico simulado está representada na Figura 4.8

A.

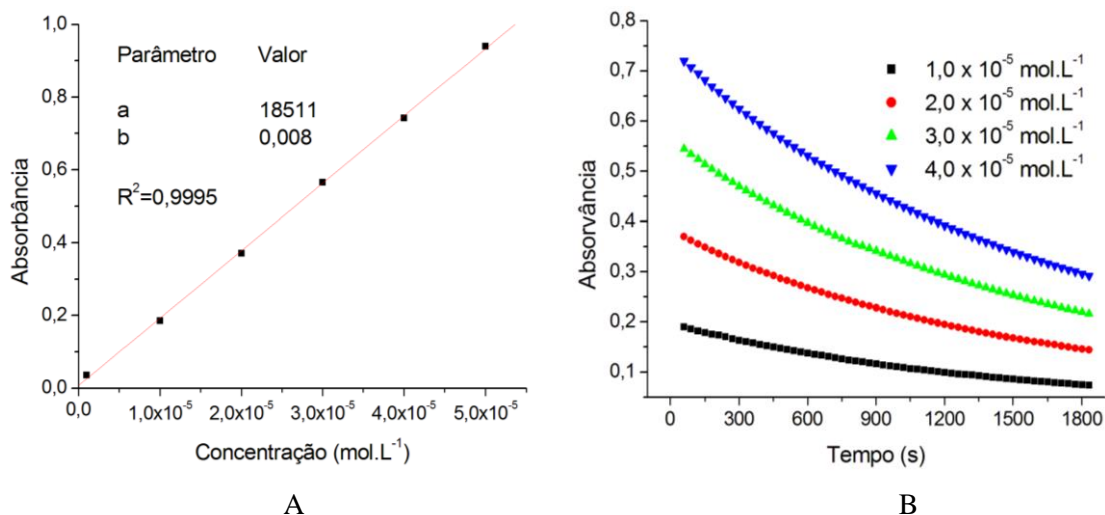


Figura 4.8. A) Curva de calibração de 2-OHBS em 1% DMSO em meio gástrico simulado. B) Valores médios de absorvância *versus* tempo (segundos) para as triplicatas de quatro concentrações de 2-OHBS em 1% DMSO em meio gástrico simulado, pH 1,2.

Os valores médios de absorvância no experimento cinético obtidos para as quatro concentrações intermediárias da curva de calibração estão descritos na Figura 4.8 B. A Figura evidencia, qualitativamente, que a velocidade da reação é dependente da concentração de 2-OHBS, uma vez que a inclinação das curvas aumenta conforme o aumento da concentração da semicarbazona. As inclinações, visualmente, são maiores que as observadas anteriormente para BS, sob as mesmas condições.

Posteriormente, como para BS, foram obtidos as velocidades iniciais e os logaritmos utilizados para fazer o gráfico apresentado na Figura 4.9. Neste gráfico, o valor de a (coeficiente angular) é correspondente à ordem da reação n para 2-OHBS e, uma vez que é diferente de zero ($n = 0,92$), confirma a hipótese da velocidade da reação ser dependente da concentração de 2-OHBS.

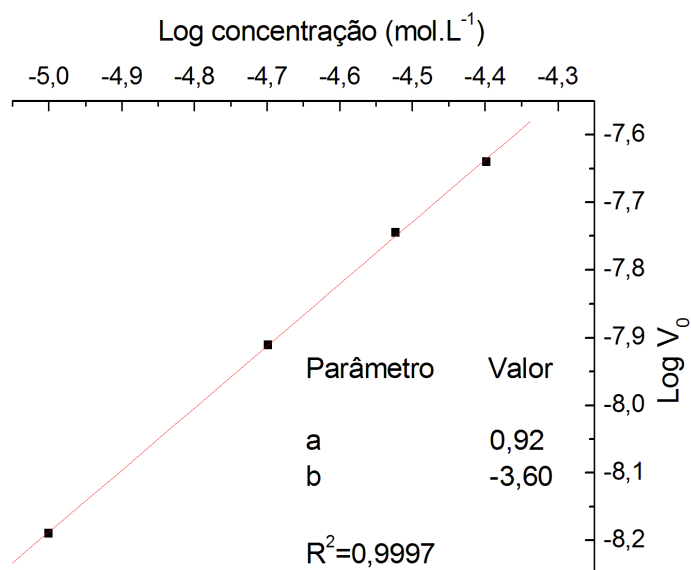


Figura 4.9. Logaritmo base 10 da velocidade inicial *versus* logaritmo base 10 concentração (mol.L⁻¹) para as triplicatas de quatro concentrações de 2-OHBS em 1% DMSO em meio gástrico simulado, pH = 1,2.

Considerando que o valor de $\log k'$ é correspondente a $-3,60 \pm 0,05$ (coeficiente linear), o valor da constante k' foi obtido:

$$\begin{aligned} \text{Log } k' &= -3,60 \\ k' &= 2,5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1} \end{aligned}$$

Considerando-se a concentração inicial de 2-OHBS igual a $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ e a equação abaixo:

$$\begin{aligned} v_0 &= k'[2\text{-OHBS}]_0^n \\ v_0 &= (2,5 \times 10^{-4})(4,0 \times 10^{-5})^{0,92} \\ v_0 &= 2,2 \times 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}.\text{s}^{-1} \end{aligned}$$

Considerando o intervalo de confiança da medida (limite superior e o inferior), ou seja, $\log k' = -3,55$ e $\log k' = -3,65$.

Considerando $\log k' = -3,55$:

$$\begin{aligned} \text{Log } k' &= -3,55 \\ k' &= 2,82 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1} \end{aligned}$$

Considerando $\log k' = -3,65$:

$$\begin{aligned} \text{Log } k' &= -3,65 \\ k' &= 2,24 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1} \end{aligned}$$

Considerando-se a concentração inicial de 2-OHBS igual a $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ e a equação abaixo:

$$v_0 = k'[2\text{-OHBS}]_0^n$$

Considerando $k' = 2,82 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$:

$$v_0 = (2,82 \times 10^{-4})(4,0 \times 10^{-5})^{0,92}$$

$$v_0 = 2,5 \times 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}.\text{s}^{-1}$$

Considerando $k' = 2,24 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$:

$$v_0 = (2,24 \times 10^{-4})(4,0 \times 10^{-5})^{0,92}$$

$$v_0 = 2,0 \times 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}.\text{s}^{-1}$$

Portanto, a velocidade da reação inicial de hidrólise de 2-OHBS é $2,2 \times 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}.\text{s}^{-1}$, com um intervalo de confiança de $2,0 \times 10^{-8}$ e $2,5 \times 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}.\text{s}^{-1}$ a 25° C , pH 1,2 e concentração de 2-OHBS igual a $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$.

A partir das velocidades iniciais de hidrólise calculadas para as semicarbazonas em meio gástrico simulado, observou-se que a velocidade média de hidrólise de 2-OHBS, igual a $2,2 \times 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}.\text{s}^{-1}$, é aproximadamente quatro vezes superior à de BS, correspondente a $5,8 \times 10^{-9} \text{ mol.L}^{-1}.\text{s}^{-1}$ (a 25° C , pH 1,2 e concentrações de BS e 2-OHBS iguais a $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$). Além disso, os intervalos de confiança calculados para ambos os composto não se sobrepõem, dando robustez à comparação dos valores médios de velocidade inicial.

Estes resultados confirmam a tendência evidenciada nos cálculos teóricos apresentados no Capítulo 3 e permitem sugerir que, termodinâmica e cineticamente, 2-OHBS é mais suscetível à hidrólise que BS.

4.3.1. Ensaios biológicos – atividade antinociceptiva e anti-inflamatória de BS e 2-OHBS *per os*

Diante das dificuldades de absorção, metabolização por meio de enzimas gastrintestinais e hidrólise ácida em função do baixo valor do pH estomacal da via de administração *per os*,¹⁰ as doses necessárias à manifestação do mesmo efeito farmacológico utilizadas por esta via são geralmente superiores às doses administradas por vias parenterais. Para a manifestação dos mesmos efeitos anti-

¹⁰ Goodman & Gilman, As bases farmacológicas da terapêutica. 11 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, c2006.

inflamatórios e antinociceptivos de BS, estabeleceu-se experimentalmente que a dose *per os* (100 mg.kg⁻¹) era duas vezes maior que a dose administrada por via intraperitoneal.¹¹

Com o objetivo de definir se haveria aumento na dose de 2-OHBS necessária para manifestação dos mesmos efeitos farmacológicos observados após administração i.p. (capítulo 3), a semicarbazona foi avaliada no modelo do edema em pata de rato induzido por carragenina (Figura 4.10 A) e no modelo de constrições induzidas por *Zymosan A* em camundongo (Figura 4.10 B). Utilizou-se BS 100 mg.kg⁻¹ como controle positivo, em ambos os modelos.

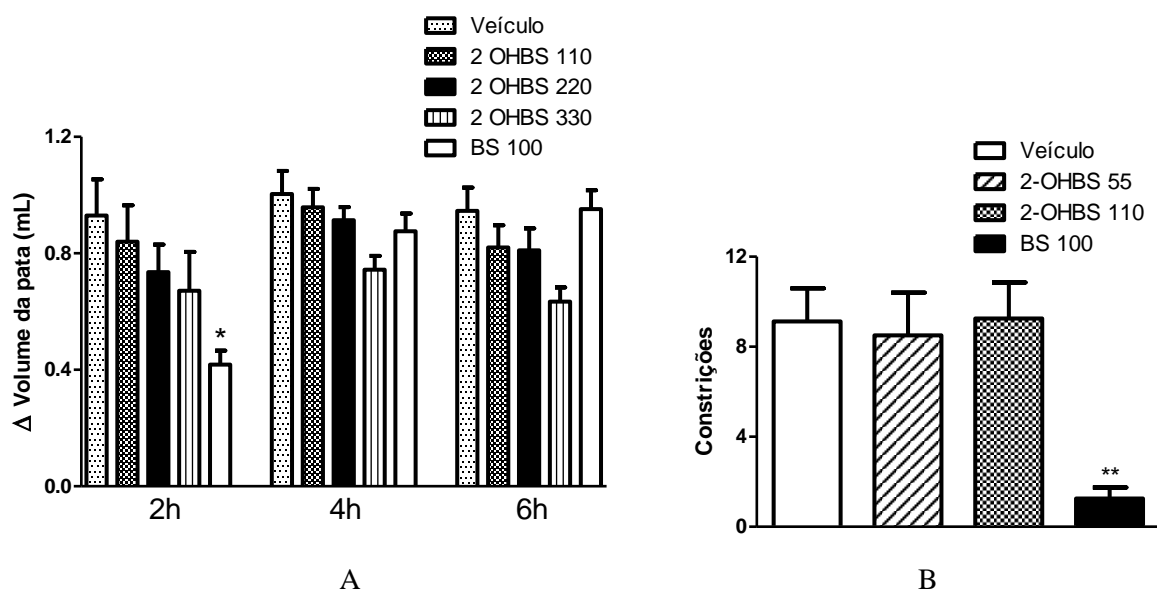


Figura 4.10. **A)** Efeitos de benzaldeído semicarbazona (BS, 100 mg.kg⁻¹) e 2-hidroxibenzaldeído semicarbazona (2-OHBS, 110, 220 e 330 mg.kg⁻¹), p.o., -60 min, no edema em pata de rato induzido por carragenina (1%, 50 µl, i.pl.). O volume da pata foi medido 2, 4 e 6 horas após a injeção da carragenina. n = 5. **B)** Efeitos de benzaldeído semicarbazona (BS, 110 mg.kg⁻¹) e 2-hidroxibenzaldeído semicarbazona (2-OHBS, 55 e 110 mg.kg⁻¹), p.o., -30 min, na resposta nociceptiva induzida por *Zymosan A* (i.p., 40 mg.kg⁻¹) em camundongos, n = 7-8. * e ** estatisticamente significativos com relação ao veículo, p<0,05 e p<0,01, respectivamente.

Em ambos os modelos, BS novamente apresentou atividade estatisticamente significativa com relação ao veículo e 2-OHBS não manifestou atividade em nenhuma das doses avaliadas. Os experimentos sugerem que as doses *per os* de 2-OHBS necessárias à observação dos efeitos farmacológicos são superiores às doses de BS eficazes nos mesmos modelos, reafirmando a possibilidade de maior biotransformação de 2-OHBS no meio estomacal quando comparado a BS, como elucidado pelos estudos cinéticos e termodinâmicos.

¹¹ L. T. S. Rocha, K. A. Costa, A. C. P. Oliveira, E. B. Nascimento Jr, C. M. Bertollo, F. Araújo, L. R. Teixeira, S. P. Andrade, H. Beraldo, M. M. Coelho, *Life Sci.*, 79 (2006) 499.

4.4. Velocidade inicial para a hidrólise do composto de inclusão BS β CD e da mistura BS+ β CD em meio gástrico simulado

Estudos anteriores do nosso grupo mostraram que o composto de inclusão BS β CD diminuiu em 75% a dose de BS necessária para manifestação de seus efeitos anticonvulsivantes.¹² Além disso, estudos farmacocinéticos demonstraram que a concentração de BS no plasma e no cérebro, administrado por via *per os* e na forma de BS β CD, era superior às mesmas concentrações obtidas para BS livre.¹³ Estes resultados evidenciam a influência do composto de inclusão na biodisponibilidade de BS.

Administradas por via *per os*, as ciclodextrinas são pouco absorvidas e são metabolizadas pela microbiota intestinal, principalmente nas porções distais.¹⁴ Assim, caso a β -CD interfira na biodisponibilidade de BS, este processo provavelmente ocorre no tubo digestivo.

Com o objetivo de verificar se o composto de inclusão ou a simples presença da ciclodextrina interferiria em um provável processo de hidrólise ácida estomacal, foram determinadas as velocidades parciais de hidrólise do BS, em meio gástrico simulado, na forma de composto de inclusão BS β CD ou simplesmente misturado à ciclodextrina (BS+ β CD).

4.4.1 Velocidade inicial para a hidrólise do composto de inclusão BS β CD em meio gástrico simulado

A curva de calibração de BS β CD em meio gástrico simulado está representada na Figura 4.11 A.

Os valores médios de absorvância no experimento cinético para as quatro concentrações intermediárias da curva de calibração estão descritos na Figura 4.11 B. A Figura evidencia, qualitativamente, que a velocidade da reação é dependente da concentração de BS β CD, uma vez que a inclinação das curvas aumenta conforme o aumento da concentração da semicarbazona. As inclinações, visualmente, são menores que as observadas anteriormente para BS isoladamente, sob as mesmas condições.

¹² L. R. Teixeira, R. D. Sinisterra, R. P. Vieira, M. C. Doretto, H. Beraldo, J. Incl. Phenom. Macro., 47 (2003) 77.

¹³ M. Kaiser, F. J. Azeredo, F.T. Uchoa, H. Beraldo, T. Dalla Costa, Eur. J. Pharm. Sci., 18 (2010) 355.

¹⁴ K. Uekama, F. Hirayama, T. Irie, Chem. Rev. 98 (1998) 2045.

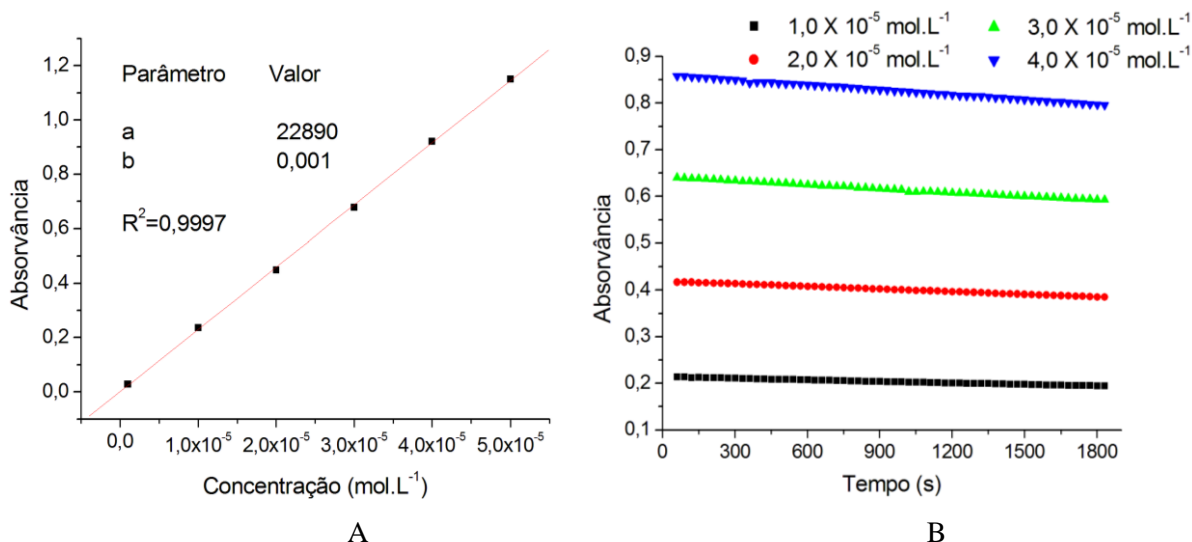


Figura 4.11 A) Curva de calibração de BSβCD em 1% DMSO em meio gástrico simulado. B) Valores médios de absorbância *versus* tempo (segundos) para as triplicatas de quatro concentrações de BSβCD em 1% DMSO em meio gástrico simulado, pH = 1,2.

Posteriormente, como para BS e 2-OHBS, foram obtidos as velocidades iniciais e os logaritmos utilizados para fazer o gráfico apresentado na Figura 4.12. Neste gráfico, o valor de a (coeficiente angular) é correspondente à ordem da reação *n* com relação ao composto de inclusão e, uma vez que é diferente de zero ($n = 1,02$), confirma a hipótese de a velocidade da reação ser dependente da concentração de BS no composto de inclusão.

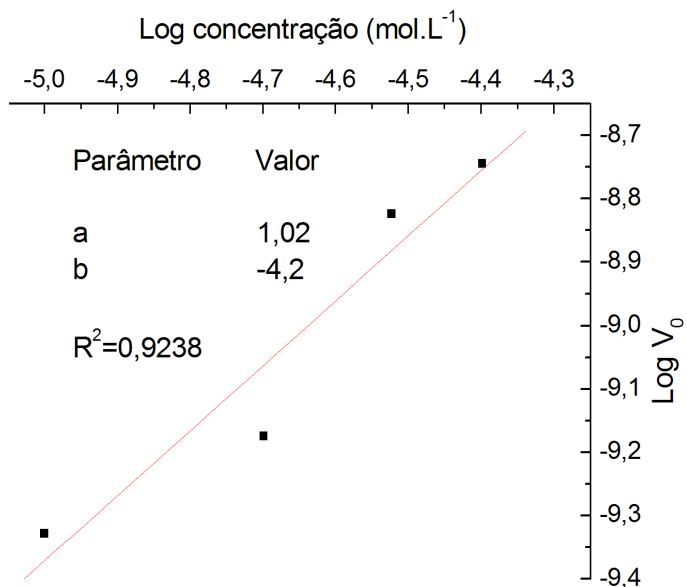


Figura 4.12. Logaritmo base 10 da velocidade inicial *versus* logaritmo base 10 concentração (mol.L⁻¹) para as triplicatas de quatro concentrações de BSβCD em 1% DMSO em meio gástrico simulado, pH = 1,2.

Considerando que o valor de $\log k'$ é correspondente a $-4,2 \pm 1,0$ (coeficiente linear), o valor da velocidade inicial foi obtido:

$$\begin{aligned}\text{Log } k' &= -4,2 \\ k' &= 6,3 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}\end{aligned}$$

Considerando-se a concentração inicial de BS β CD igual a $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ e a equação abaixo:

$$\begin{aligned}v_0 &= k'[\text{BS}\beta\text{CD}]_0^n \\ v_0 &= (6,3 \times 10^{-5})(4,0 \times 10^{-5})^{1,02} \\ v_0 &= 2,1 \times 10^{-9} \text{ mol.L}^{-1}.\text{s}^{-1}\end{aligned}$$

Considerando o intervalo de confiança da medida (limite superior e o inferior), ou seja, $\log k' = -3,2$ e $\log k' = -5,2$.

Considerando $\log k' = -3,2$:

$$\begin{aligned}\text{Log } k' &= -3,2 \\ k' &= 6,3 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}\end{aligned}$$

Considerando $\log k' = -5,2$:

$$\begin{aligned}\text{Log } k' &= -5,2 \\ k' &= 6,3 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}\end{aligned}$$

Considerando-se a concentração inicial de BS β CD igual a $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ e a equação abaixo:

$$v_0 = k'[\text{BS}\beta\text{CD}]_0^n$$

Considerando $k' = 6,3 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$:

$$\begin{aligned}v_0 &= (6,3 \times 10^{-4})(4,0 \times 10^{-5})^{1,02} \\ v_0 &= 2,1 \times 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}.\text{s}^{-1}\end{aligned}$$

Considerando $k' = 6,3 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$:

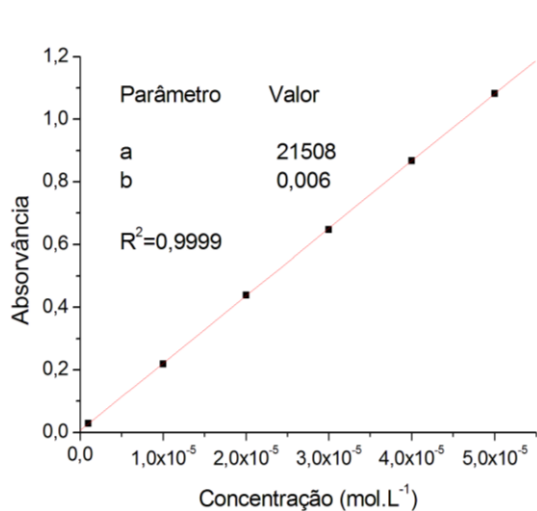
$$\begin{aligned}v_0 &= (6,3 \times 10^{-6})(4,0 \times 10^{-5})^{1,02} \\ v_0 &= 2,1 \times 10^{-10} \text{ mol.L}^{-1}.\text{s}^{-1}\end{aligned}$$

Portanto, a velocidade da reação inicial de hidrólise de BS no composto de inclusão é $2,1 \times 10^{-9} \text{ mol.L}^{-1}.\text{s}^{-1}$, com um intervalo de confiança de $2,1 \times 10^{-8}$ e $2,1 \times 10^{-10} \text{ mol.L}^{-1}.\text{s}^{-1}$ a 25°C , pH 1,2 e concentração de BS no composto de inclusão igual a $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$.

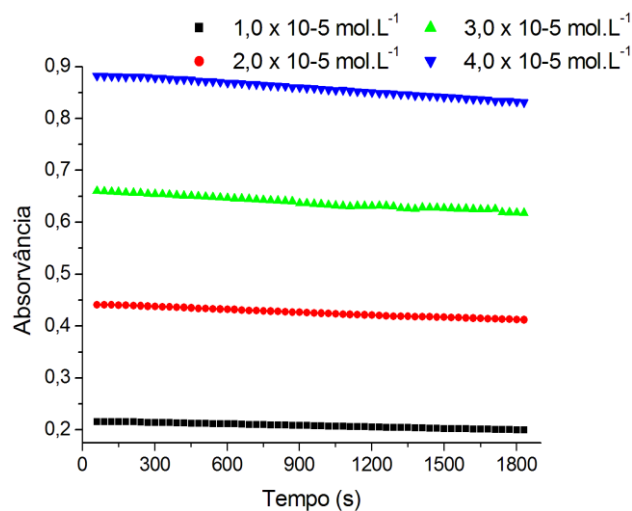
4.4.2. Velocidade inicial para a hidrólise da mistura BS+ β CD em meio gástrico simulado

A curva de calibração de BS+ β CD em meio gástrico simulado está representada na Figura 4.13

A.



A



B

Figura 4.13. A) Curva de calibração de BS+ β CD em 1% DMSO em meio gástrico simulado. B) Valores médios de absorvância *versus* tempo (segundos) para as triplicatas de quatro concentrações de BS+ β CD em 1% DMSO em meio gástrico simulado, pH = 1,2.

Os valores médios de absorvância no experimento cinético para as quatro concentrações intermediárias da curva de calibração estão descritos na Figura 4.13 B. A Figura evidencia, qualitativamente, que a velocidade da reação é dependente da concentração de BS+ β CD, uma vez que a inclinação das curvas aumenta conforme o aumento da concentração da semicarbazona. As inclinações, visualmente, são menores que as observadas anteriormente para BS e similares às de BS β CD, sob as mesmas condições.

Posteriormente, como para BS β CD, foram obtidos as velocidades iniciais e os logaritmos utilizados para fazer o gráfico apresentado na Figura 4.14. Neste gráfico, o valor de a (coeficiente angular) é correspondente à ordem da reação n com relação ao BS na mistura e, uma vez que é diferente de zero ($n = 1,7$), confirma a hipótese de a velocidade da reação ser dependente da concentração de BS, mesmo na presença de ciclodextrina. A diferença significativa desse valor de n com relação ao valor ideal ($n = 1$) pode ser atribuída aos desvios inerentes ao procedimento.

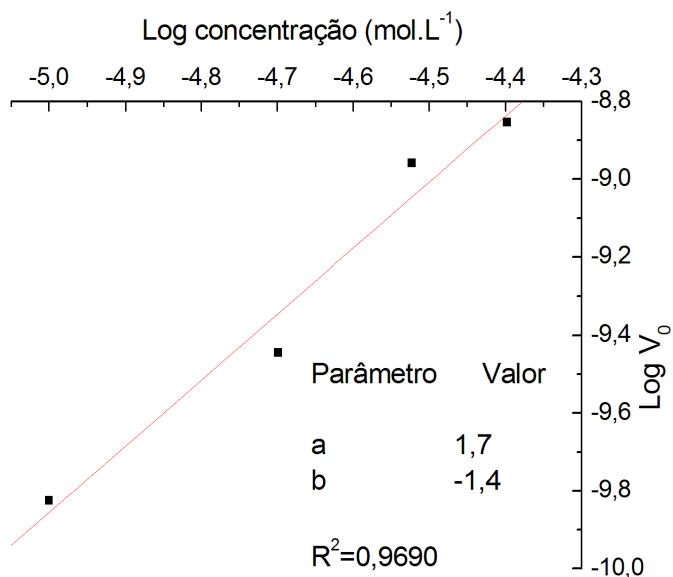


Figura 4.14. Logaritmo base 10 da velocidade inicial *versus* logaritmo base 10 concentração (mol.L⁻¹) para as triplicatas de quatro concentrações de BS+βCD em 1% DMSO em meio gástrico simulado, pH = 1,2.

Considerando que o valor de $\log k'$ é correspondente a $-1,4 \pm 1,0$ (coeficiente linear), o valor da velocidade inicial foi obtido:

$$\begin{aligned}\log k' &= -1,4 \\ k' &= 4,0 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}\end{aligned}$$

Considerando-se a concentração inicial de BS+βCD igual a $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ e a equação abaixo:

$$\begin{aligned}v_0 &= k'[\text{BS}+\beta\text{CD}]_0^n \\ v_0 &= (4,0 \times 10^{-2})(4,0 \times 10^{-5})^{1,69} \\ v_0 &= 1,5 \times 10^{-9} \text{ mol.L}^{-1}.\text{s}^{-1}\end{aligned}$$

Considerando o intervalo de confiança da medida (limite superior e o inferior), ou seja, $\log k' = -0,4$ e $\log k' = -2,4$.

Considerando $\log k' = -0,4$:

$$\begin{aligned}\log k' &= -0,4 \\ k' &= 4,0 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}\end{aligned}$$

Considerando $\log k' = -2,4$:

$$\text{Log } k' = -2,4$$

$$k' = 4,0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$$

Considerando-se a concentração inicial de BS+βCD igual a $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ e a equação abaixo:

$$v_0 = k'[\text{BS}+\beta\text{CD}]_0^n$$

Considerando $k' = 4,0 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$:

$$v_0 = (4,0 \times 10^{-1})(4,0 \times 10^{-5})^{1,69}$$

$$v_0 = 1,5 \times 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}.\text{s}^{-1}$$

Considerando $k' = 4,0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$:

$$v_0 = (4,0 \times 10^{-3})(4,0 \times 10^{-5})^{1,69}$$

$$v_0 = 1,5 \times 10^{-10} \text{ mol.L}^{-1}.\text{s}^{-1}$$

Portanto, a velocidade da reação inicial de hidrólise de BS na solução BS+βCD é $1,5 \times 10^{-9} \text{ mol.L}^{-1}.\text{s}^{-1}$, com um intervalo de confiança de $1,5 \times 10^{-8}$ e $1,5 \times 10^{-10} \text{ mol.L}^{-1}.\text{s}^{-1}$ a 25° C, pH 1,2 e concentração de BS na solução BS+βCD igual a $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$.

Os experimentos com o composto de inclusão (BSβCD) e com a solução (BS+βCD) apresentaram desvios significativos, refletindo em intervalos mais amplos de confiança da velocidade inicial que aqueles encontrados para as semicarbazonas isoladamente. Estes intervalos estão sobrepostos ao intervalo de confiança de BS. Ao mesmo tempo, os valores médios da velocidade inicial para BS, BSβCD e BS+βCD ($5,8 \times 10^{-9}$, $2,1 \times 10^{-9}$ e $1,5 \times 10^{-9} \text{ mol.L}^{-1}.\text{s}^{-1}$) são bastante semelhantes e, dentro de intervalos sobrepostos, impossibilitam comparações diretas.

A alta concentração de íons H_3O^+ em solução sugere que, mesmo na presença da ciclodextrina, o valor médio da velocidade inicial de hidrólise de BS tende a sofrer pequenas variações. No entanto, o alargamento dos intervalos de confiança nos experimentos envolvendo a ciclodextrina sugere que a presença do excipiente pode interferir, mesmo que apenas fisicamente, no processo de hidrólise da semicarbazona e, conseqüentemente, na distribuição das replicatas com relação ao valor médio. O equilíbrio existente em meio aquoso entre a forma livre e a forma incluída do fármaco, representado na Figura 4.15, pode ser a causa desta interferência¹⁵.

¹⁵ M.E. Davis, M.E. Brewster, Nat. Ver. Drug. Discov. 3 (2004) 1023.

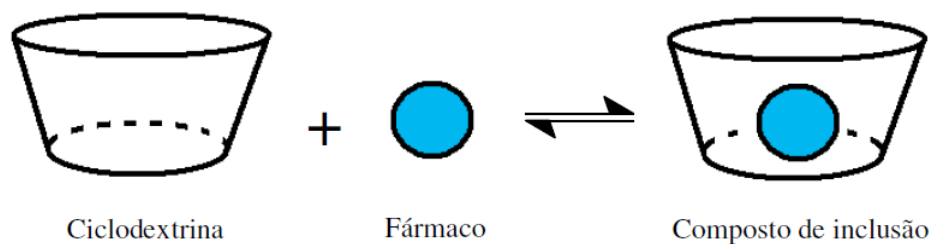


Figura 4.15. Representação esquemática do equilíbrio de associação/dissociação entre fármaco (BS) e ciclodextrina¹⁶.

Após administração *per os*, esta interferência pode ser um fator crucial na diminuição da dose do fármaco necessária à atividade farmacológica¹² e no conseqüente aumento da biodisponibilidade do composto.¹³ Mesmo que não provoque diretamente uma diminuição na velocidade de hidrólise de BS, a ciclodextrina pode impedir fisicamente a hidrólise da semicarbazona pelo ácido estomacal, permitindo o esvaziamento gástrico antes mesmo que a maior parte do composto seja hidrolisada e conseqüentemente, a absorção de maior quantidade de BS.

Estudos adicionais são necessários para confirmar a hipótese sugerida.

¹⁶ R. P. Vieira, L. T.S. Rocha, L. R. Teixeira, R. D. Sinisterra, M. M. Coelho, H. Beraldo, *Revista Virtual de Química*, 2 (2010) 2.

Capítulo 5. Complexos de gálio(III) e zinco(II) de 2-hidroxibenzaldeído semicarbazona. Investigação do papel do metal na atividade antifúngica do complexo de gálio(III)

Os íons ferro(III) e gálio(III) apresentam semelhanças de carga, raio do cátion e número de coordenação. Ambos são transportados pela transferrina. Assim, gálio(III) pode substituir ferro(III) em meios biológicos. Portanto, a atividade antimicrobiana do gálio(III) é atribuída à sua capacidade de mimetizar o ferro(III) e perturbar o metabolismo do ferro em bactérias.¹ Há relatos na literatura do aumento da atividade antibacteriana e antifúngica de compostos orgânicos após complexação ao gálio(III).^{2,3,4} Além das atividades antimicrobianas, sabe-se que o gálio(III) está envolvido na modulação de processos inflamatórios através da inibição da produção de citocinas,⁵ e que a coordenação de ligantes orgânicos ao gálio(III) faz aumentar sua atividade citotóxica contra células tumorais.^{6,7} Desse modo, torna-se interessante a investigação de novos complexos de gálio(III) com potenciais atividades antinociceptivas, anti-inflamatórias, antimicrobianas e antitumorais .

Complexos metálicos de zinco(II) têm sido também amplamente estudados devido às suas atividades antimicrobianas e anti-inflamatórias. O aumento da atividade antibacteriana de compostos orgânicos após sua complexação ao zinco(II) está descrito na literatura.⁸ Por sua vez, com relação à atividade anti-inflamatória, DILLON *et al* (2003) demonstraram que um complexo de zinco(II) de indometacina, anti-inflamatório não-esteroidal utilizado no tratamento de artrite, apresentou atividade anti-inflamatória *in vivo* equivalente à do fármaco, mas reduziu em cerca de 15 vezes seus efeitos adversos, como ulcerações intestinais.⁹

Considerando-se o perfil antimicrobiano e anti-inflamatório dos complexos de gálio(III) e zinco(II), foram preparados complexos desses metais com arilsemicarbazonas, visando investigar o efeitos da complexação nas atividades biológicas desses compostos.

¹ Y. Kaneko, M. Thoendel, O. Olakanmi, B.E. Britigan, P.K. Singh, J. Clin. Invest. 117 (2007) 877.

² J.G. Da Silva, L.S. Azzolini, S.M.S.V. Wardell, J.L. Wardell; H. Beraldo, Polyhedron. 28 (2009) 2301.

³ T.O. Bastos, B.M. Soares, P.S. Cisalpino, I.C. Mendes, R.G. dos Santos, H. Beraldo, Microbiol. Res. 165 (2010) 573.

⁴ E. Banin, A. Lozinski, K. M. Brady, E. Berenshtein, P. W. Butterfield, M. Moshe, M. Chevion, E. P. Greenberg, E. Banin, Proc Natl Acad Sci U S A. 43 (2008) 16761.

⁵ F.S. Panagakos, E. Kumar, C. Venescar, P. Guidon, Biochimie, 82 (2000) 147.

⁶ I. C. Mendes, M. A. Soares, R. G. Dos Santos, C. Pinheiro, H. Beraldo, Eur. J. Med. Chem. 44 (2009) 1870.

⁷ P. Collery, B. Keppler, C. Madoulet, B. Desoize, Crit Rev Oncol Hematol. 3 (2002) 283.

⁸ J.G. Da Silva, S.M.S.V. Wardell, J.L. Wardell; H. Beraldo, J. Coord. Chem. 62 (2009) 1400.

⁹ C.T. Dillon, T.W. Hambley, B.J. Kennedy, P.A. Lay, Q. Zhou, N.M. Davies, J.R. Biffin, H.L. Regtop, Chem. Res. Toxicol. 16 (2003) 28.

5.1. Caracterização dos complexos de gálio(III) e zinco(II) de 2-hidroxibenzaldeído semicarbazona (2-OHBS)

As sínteses foram realizadas de acordo com o procedimento descrito na seção 2.1.1.5. A literatura descreve a formação de complexos metálicos de semicarbazonas e análogos, como hidrazonas, através dos sistemas $\text{NNO}^{10,11}$, ONO^{12} ou simplesmente NO^{13} . A alcalinização do meio reacional pode favorecer a formação do complexo por meio da desprotonação dos ligantes.⁹ As arilsemicarbazonas 2-, 3- e 4-OHBS possuem estruturas condizentes com a formação de complexos metálicos através dos sistemas ONO (2-OHBS) e NO (3- e 4-OHBS). A Figura 5.1 mostra os valores teóricos de pK_a dos principais átomos de hidrogênio das arilsemicarbazonas utilizadas. Estes valores foram calculados utilizando-se o programa ACD/ChemSketch 2002.

Os resultados preliminares da caracterização sugeriram a formação de complexo metálico apenas com 2-OHBS, uma vez que as microanálises e faixas de fusão dos sólidos obtidos a partir de 3- e 4-OHBS evidenciaram apenas a presença da mistura dos reagentes. Este fato foi atribuído à maior estabilidade de complexos com o ligante tridentado.

Os compostos obtidos nas sínteses com 2-OHBS foram caracterizados por análise elementar, medidas de condutividade (Tabela 5.1), por seus espectros eletrônicos, no infravermelho (Tabela 5.2), ressonância magnética nuclear de ^1H , ^{13}C , DEPT e mapas de contorno HMQC (Tabelas 5.3 e 5.4) e espectrometria de massas.

Os resultados de microanálises foram compatíveis com a formação dos complexos $[\text{Ga}_2(\text{OBS})_3]$ e $[\text{Zn}(\text{OBS})\text{AcO}]$.

¹⁰ A. A. R. Despaigne, L. F. Vieira, I. C. Mendes, F. B. da Costa, N. L. Speziali, H. Beraldo, J. Braz. Chem. Soc., 21 (2010) 1247.

¹¹ A. A. R. Despaigne, J. G. da Silva, A. C. M. do Carmo, O. E Piro, Inorg. Chim. Acta 362 (2009) 2117.

¹² J. Rivadeneira, D.A. Barrio, G. Arrambide, D. Gambino, L. Bruzzone, S.B. Etcheverry, J Inorg Biochem, 103 (2009) 633

¹³ K. Sharma, R. Singh, N.Fahmi, R. Singh, Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc. 75 (2010) 422.

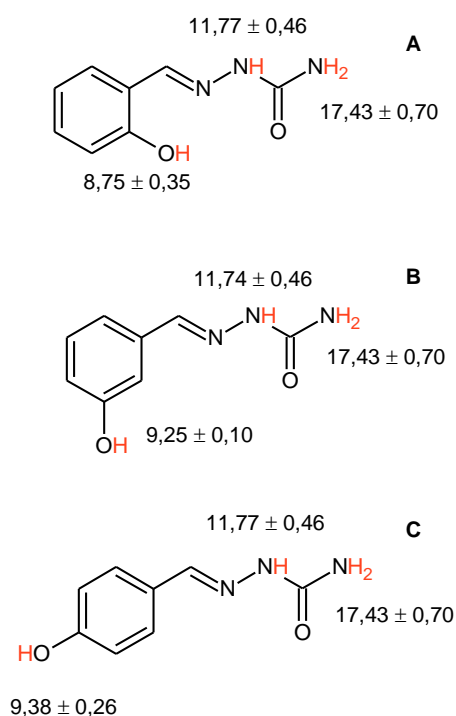


Figura 5.1. Valores de pKa teóricos de 2-, 3- e 4-OHBS (A, B e C, respectivamente).

Tabela 5.1. Análise elementar (valores teóricos entre parêntesis), massa molar, faixa de fusão e condutividade molar (Λ_M) dos complexos de gálio(III) e zinco(II) de 2-hidroxibenzaldeído semicarbazona (2-OHBS).

Composto	Rendimento (%)	% C	% H	% N	MM (g mol ⁻¹)	Faixa de fusão (°C)	Λ_M (Ω ⁻¹ cm ² mol ⁻¹)
[Ga ₂ (OBS) ₃]	80	43,69 (42,96)	3,10 (3,15)	18,71 (18,79)	670,93	> 300	5,95 (DMF)
[Zn(OBS)AcO]	54	39,35 (39,69)	3,79 (3,66)	13,48 (13,89)	302,60	> 300	52,8 (MeOH) 35,9 (DMSO)

Nota: DMF (dimetilformamida), MeOH (metanol) e DMSO (dimetilsulfóxido).

5.1.1 Espectroscopia na região do infravermelho (IV)

As principais bandas nos espectros de infravermelho de 2-hidroxibenzaldeído semicarbazona e seus complexos de gálio(III) e zinco(II) encontram-se na Tabela 5.2.

Verificou-se que a coordenação ao gálio(III) provocou mudanças significativas no espectro de infravermelho quando comparado com o da semicarbazona livre. No complexo de gálio(III), a banda referente ao modo $\nu(\text{C}=\text{O})$ presente em 1676 cm^{-1} em 2-OHBS diminuiu de intensidade e foi deslocada para uma região de menor energia (1652 cm^{-1}), sugerindo a ligação do oxigênio ao metal. A complexação ao gálio(III) também provocou o deslocamento do modo $\nu(\text{C}=\text{N})$, de 1599 cm^{-1} para $1602\text{-}1617\text{ cm}^{-1}$, de acordo com a coordenação do ligante ao gálio(III) por meio do nitrogênio imínico.¹⁴ As vibrações atribuídas a $\nu(\text{N-H})$, em 3152 cm^{-1} , e $\nu(\text{O-H})$, em 3468 cm^{-1} no espectro da semicarbazona livre, desapareceram no espectro do complexo, indicando a desprotonação em ambos os grupos para formação do complexo de gálio(III). Novas bandas observadas para o complexo em 477 cm^{-1} e 361 cm^{-1} foram relacionadas aos modos $\nu(\text{Ga-N})$ e $\nu(\text{Ga-O})$, respectivamente.¹⁵ Dessa forma, os espectros de infravermelho sugeriram que o ligante coordenou-se ao gálio(III) de modo tridentado, pelo sistema ONO.

Para o complexo de zinco(II), a banda referente ao modo $\nu(\text{C}=\text{O})$ presente em 1676 cm^{-1} no espectro de 2-OHBS diminuiu de intensidade e sofreu um pequeno deslocamento para uma região de menor energia (1674 cm^{-1}), sugerindo a ligação do oxigênio ao metal. A complexação ao zinco(II) também provocou o deslocamento do modo $\nu(\text{C}=\text{N})$ de 1599 cm^{-1} para 1619 cm^{-1} , de acordo com a coordenação do ligante ao zinco por meio do nitrogênio imínico.¹⁴

A vibração atribuída a $\nu(\text{O-H})$, que se encontra em 3468 cm^{-1} no espectro da semicarbazona livre, desapareceu no espectro do complexo, indicando a desprotonação do grupo para formação do complexo de zinco(II). A vibração atribuída a $\nu(\text{N-H})$, que se encontra em 3152 cm^{-1} , deslocou-se no complexo para 3120 cm^{-1} . Estes resultados indicam a presença de uma ligação metal-oxigênio carbonílico, sem haver desprotonação de NH.

Novas bandas observadas para o complexo em 465 cm^{-1} e 334 cm^{-1} foram relacionadas aos modos $\nu(\text{Zn-N})$ e $\nu(\text{Zn-O})$, respectivamente.¹⁵ Além disso, uma nova banda relacionada ao estiramento assimétrico $\nu(\text{CO}_2)$ foi observada em 1568 cm^{-1} , sugerindo a presença de um grupo acetato ligado de modo monodentado ao centro metálico. Desta forma, os espectros de infravermelho sugeriram que o ligante coordenou-se ao zinco(II) de modo tridentado, pelo sistema ONO. Os espectros sugerem ainda a presença de um ligante acetato coordenado ao zinco(II).¹⁶

¹⁴ A. P. Rebolledo, M. Vieites, D. Gambino, O. E. Piro, E. E. Castellano, C. L. Zani, E. M. Souza-Fagundes, L. R. Teixeira, A. A. Batista, H. Beraldo, *J. Inorg. Biochem.* 99 (2005) 698.

¹⁵ K. Nakamoto, *Infrared and Raman spectra of inorganic and coordination compounds*. 4th ed. New York: Wiley, c1986.

¹⁶ G. B. Deacon, R. J. Phillips, *Coord. Chem. Rev.*, 33 (1980) 227.

Tabela 5.2. Bandas nos espectros de infravermelho (cm^{-1}) de 2-hidroxibenzaldeído semicarbazona (2OHBS) e seus complexos $[\text{Ga}_2(2\text{OBS})_3]$ e $[\text{Zn}(2\text{OBS})\text{AcO}]$ – suportes: KBr ($4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$); CsI ($400\text{-}200\text{cm}^{-1}$).

Composto	$\nu(\text{NH})$	$\nu(\text{CN})$	$\nu(\text{CO})$	$\nu(\text{OH})$	$\nu(\text{MN})$	$\nu(\text{MO})$
2OHBS	3152F	1599F	1676F	3468m	-	-
$[\text{Ga}_2(2\text{OBS})_3]$	-	1602F 1617F	1652F	-	477m	361m
$[\text{Zn}(2\text{OBS})\text{AcO}]$	3120m	1619F	1674F	-	465m	334m

F= forte; m= média

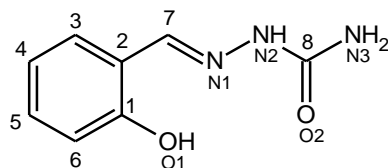
5.1.2 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os sinais nos espectros de RMN de ^1H dos complexos de gálio(III) e zinco(II) e seus respectivos deslocamentos químicos encontram-se Tabela 5.3.

No espectro do complexo de gálio(III), observou-se que os sinais referentes a O1H e N2H desapareceram, de acordo com a desprotonação da semicarbazona para formação do complexo. Os demais sinais sofreram deslocamentos com relação ao ligante, mas as integrações confirmaram suas presenças no complexo. O espectro de RMN de ^1H em $\text{DMSO-}d_6$ de $[\text{Ga}_2(2\text{OBS})_3]$ está representado na Figura 5.2.

No espectro do complexo de zinco(II), observou-se que os sinais referentes a O1H e N2H também desapareceram, novamente de acordo com a desprotonação nessas posições. Os demais sinais sofreram deslocamentos com relação ao ligante, mas as integrações confirmaram suas presenças no complexo. Além disso, percebeu-se o aparecimento de um simpleto cuja integração indica a presença de três hidrogênios. Estes são atribuídos ao acetato proveniente do sal utilizado na síntese, que atuaria como ligante do complexo obtido. O espectro de RMN de ^1H em $\text{DMSO-}d_6$ de $[\text{Zn}(2\text{OBS})\text{AcO}]$ está representado na Figura 5.3.

Tabela 5.3. Atribuições, multiplicidade (M), número de hidrogênios (n°) e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de ^1H em DMSO-d_6 de 2-OHBS (ver Figura 3.1, capítulo 3) e seus complexos de gálio(III) e zinco(II).

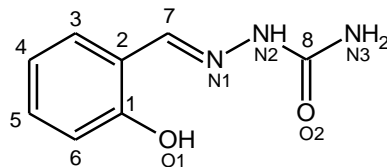


Atribuições	Compostos								
	2-OHBS δ (ppm)	n°	M	$[\text{Ga}_2(2\text{OBS})_3]$ δ (ppm)	N°	M	$[\text{Zn}(2\text{OBS})\text{AcO}]$ δ (ppm)	n°	M
H(3)	6,83	2	m	6,51	1	ss	6,71	1	ss
H(4)				6,61	1		6,44	1	
H(5)	7,17	1	t	7,07	1	ss	7,05	1	
H(6)	7,77 – 7,73	1	d	7,19	1		6,95	1	
H(7)	8,12	1	s	8,19	1	s	8,13	1	S
N(2)-H	10,20	1	s	-	-	-	-	-	-
N(3)-2H	6,42	2	s	6,62 – 6,44	2	ss	7,07 – 6,90	2	Ss
O1-H	9,99	1	s	-	-	-	-	-	-
AcO-CH3	-	-	-	-	-	-	1,81	3	S

s=simpleto; d=dupleto, t=tripleto, m=multiplero, ss=sobreposição de sinais, AcO = acetato.

Os sinais nos espectros de RMN de ^{13}C e DEPT 135 dos complexos de gálio(III) e zinco(II) e seus respectivos deslocamentos químicos encontram-se Tabela 5.4. Os espectros de ^{13}C e DEPT 135 dos complexos estão representados nas Figuras 5.4 e 5.5.

Tabela 5.4. Atribuições e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de ^{13}C e DEPT 135 em DMSO-d_6 de 2-OHBS (ver Figura 3.2, capítulo 3) e seus complexos de gálio(III) e zinco(II).



Atribuições	Compostos					
	2-OHBS δ (ppm)		[Ga ₂ (2OBS) ₃] δ (ppm)		[Zn(2OBS)AcO] δ (ppm)	
	^{13}C	DEPT 135	^{13}C	DEPT 135	^{13}C	DEPT 135
C1	155,77	-	161,72	-	175,74	-
C2	120,58	-	117,28	-	118,17	-
C3	119,20	119,20	120,77	120,77	121,52	121,54
C4	115,92	115,92	114,49	114,49	113,86	113,90
C5	130,16	130,16	132,39	132,39	131,35	131,38
C6	126,62	126,62	131,84	131,84	133,06	133,07
C7	137,39	137,39	147,90	147,89	149,18	149,21
C8	156,59	-	164,81	-	166,65	-
AcCO	-	-	-	-	-	-
AcCH ₃	-	-	-	-	22,88	22,88

Para ambos os complexos, os mapas de contorno HMQC foram utilizados na definição dos deslocamentos químicos dos hidrogênios cujos sinais encontravam-se sobrepostos.

Apesar de o espectro de RMN de ^1H evidenciar a desprotonação do ligante em O1H e N2H para formação do complexo [Zn(2OBS)AcO], este resultado não é condizente com o valor determinado de condutividade molar em metanol, que é característico de um composto neutro. A desprotonação do ligante em O1H e N2H e concomitante participação do acetato na coordenação resultariam em um composto aniônico. Paralelamente, o espectro no infravermelho indicou a presença de N2-H no complexo, no estado sólido.

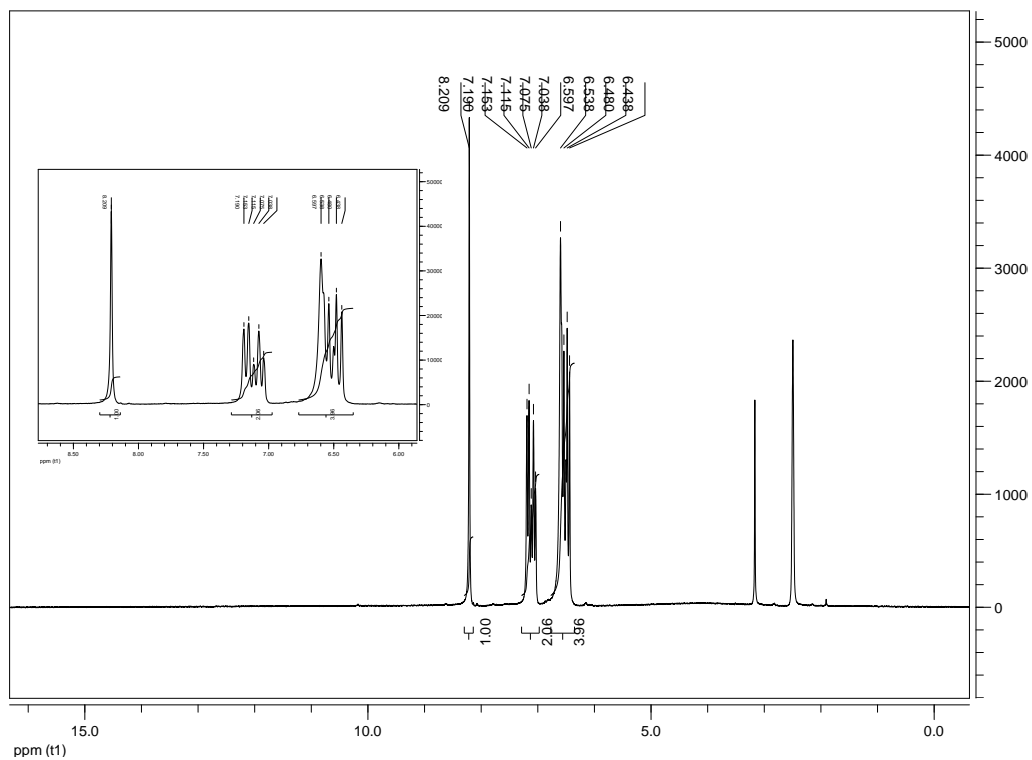


Figura 5.2. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$ de $[\text{Ga}_2(\text{2OBS})_3]$

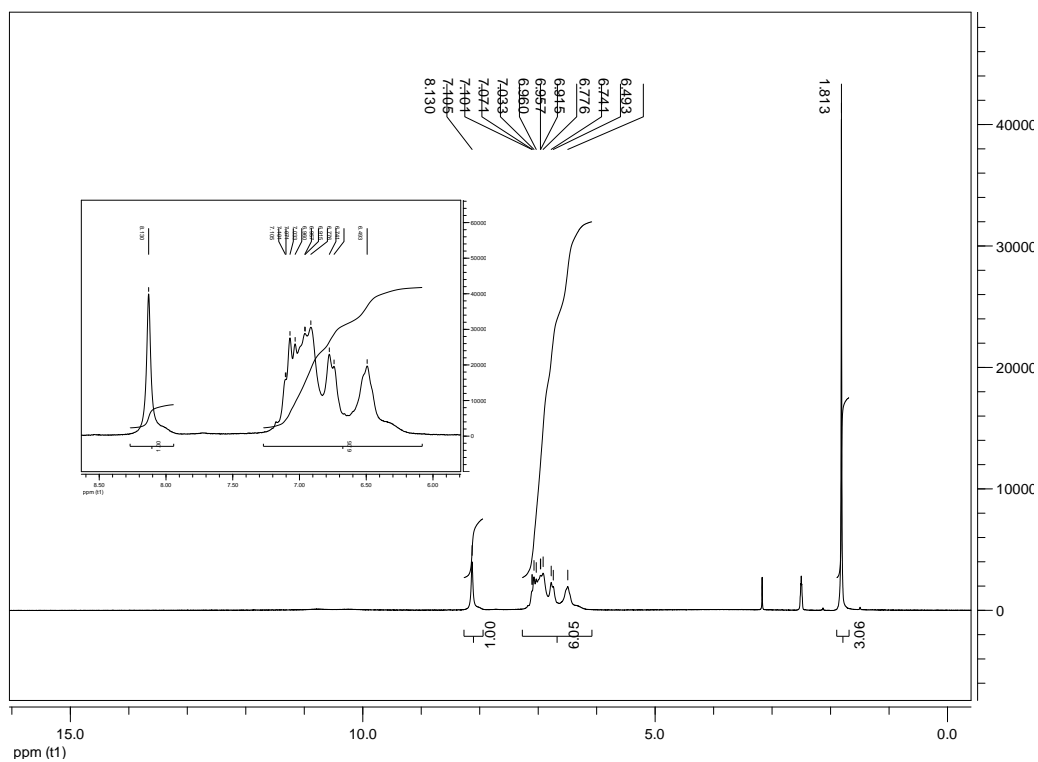


Figura 5.3. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$ de $[\text{Zn}(\text{2OBS})\text{AcO}]$

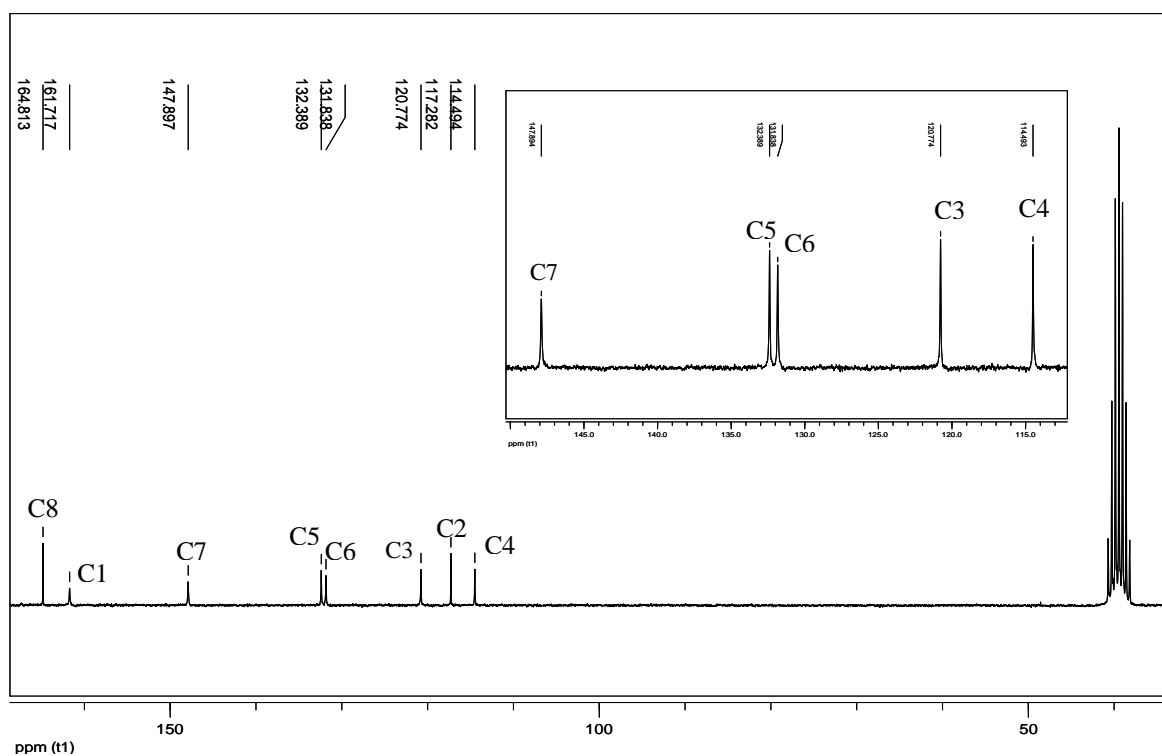


Figura 5.4. Espectros de RMN de ^{13}C e DEPT (50 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$ de $[\text{Ga}_2(\text{2OBS})_3]$

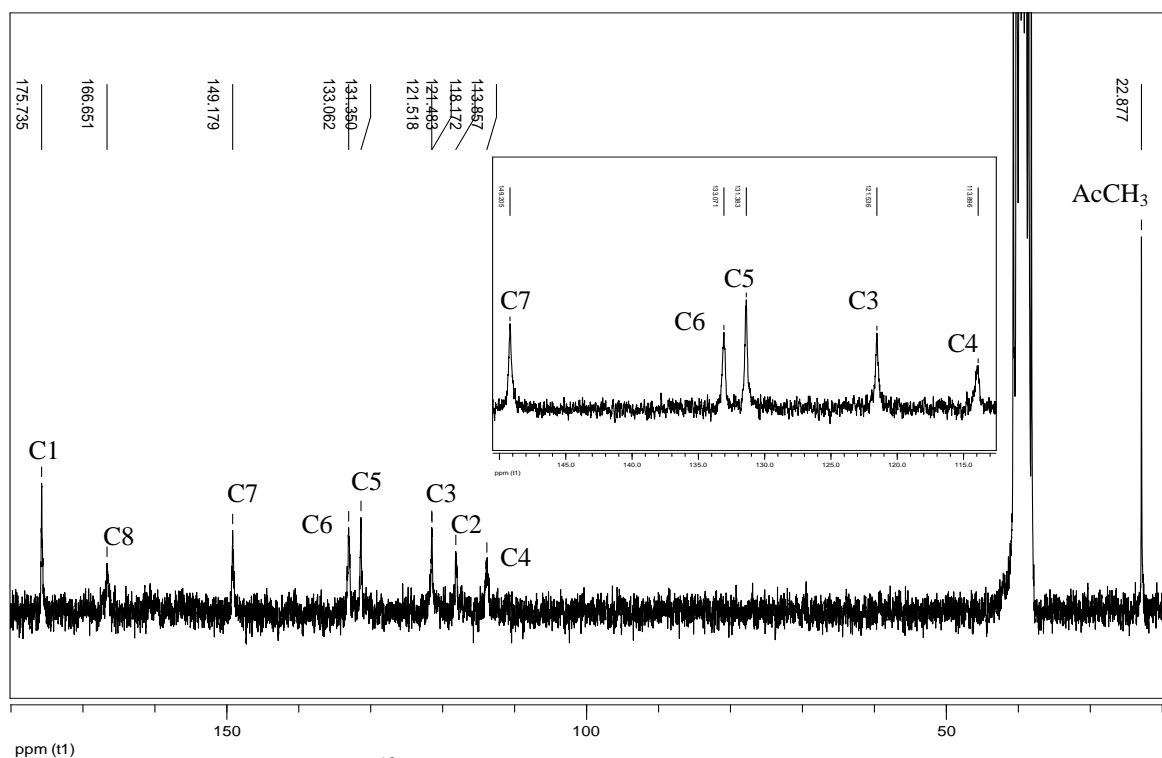


Figura 5.5 Espectros de RMN de ^{13}C e DEPT (50 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$ de $[\text{Zn}(\text{2OBS})\text{AcO}]$

O valor de condutividade molar e os espectros de RMN e no IV suportaram a ocorrência da reação proposta abaixo, na Figura 5.6. Durante a solubilização do complexo (sólido branco) em DMSO, forma-se solução amarela, que pode ser resultante da extensão da conjugação na estrutura do composto, promovida pela dissociação do acetato do complexo e consequente desprotonação de N2H.

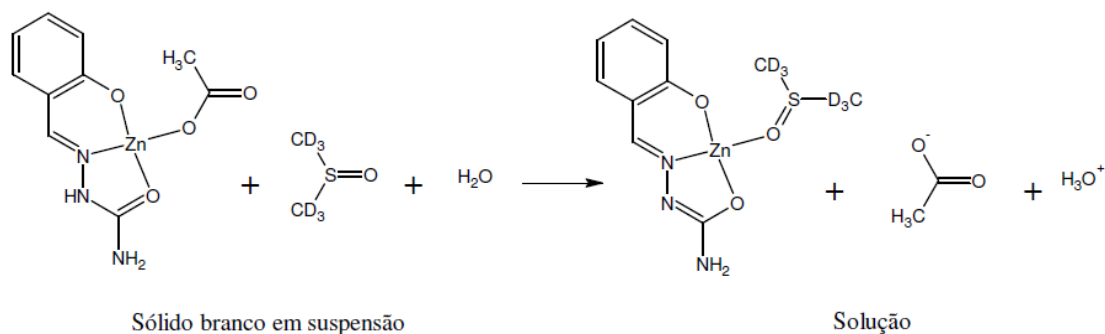


Figura 5.6. Proposta de formação de novo complexo em solução de DMSO a partir de $[\text{Zn}(\text{2OBS})\text{AcO}]$. Evidencia-se o deslocamento do acetato pelo DMSO.

5.1.3 Estrutura cristalográfica do complexo $[\text{Zn}(\text{2OBS})\text{AcO}]_2$

A estrutura cristalográfica do complexo de zinco(II) de 2-hidroxibenzaldeído semicarbazona está representada na Figura 5.7. Os cristais foram obtidos após precipitação na água-mãe. O composto é um dímero de fórmula mínima $[\text{Zn}(\text{2OBS})\text{AcO}]_2$, em que cada átomo de zinco encontra-se pentacoordenado, ligando-se a uma molécula de acetato monodentado, além de uma molécula da semicarbazona. Na semicarbazona, a coordenação é realizada através do oxigênio da carbonila, do nitrogênio imínico e do oxigênio de fenolato – sistema ONO. No dímero, ambos os oxigênios fenólicos formam pontes ligando os centros metálicos. A cristalização ocorreu em um grupo de simetria ortorrômbica, com parâmetros $a = 12,1734(10)$; $b = 12,8476(8)$; $c = 15,1288(7)$ e ângulos $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$. A célula unitária possui oito unidades da estrutura monomérica, ou seja, quatro unidades do complexo.

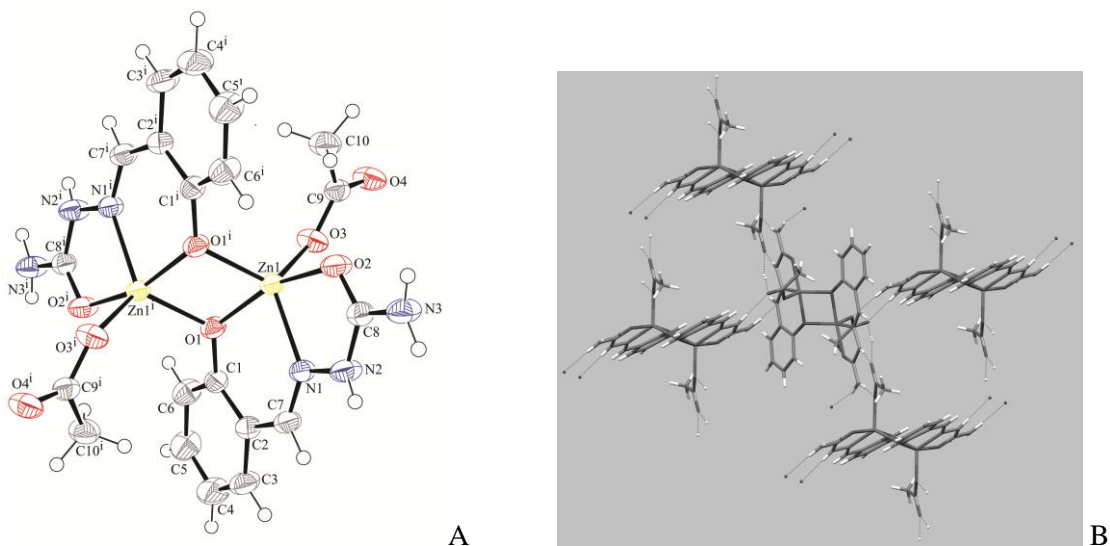


Figura 5.7. Diagrama ORTEP para $[\text{Zn}(\text{2OBS})\text{AcO}]_2$ (A) e diagrama de empacotamento (B).

Na Tabela 5.5, estão listados os dados cristalográficos e o refinamento da estrutura de $[\text{Zn}(\text{SAS})\text{AcO}]_2$. As distâncias de ligação para o complexo estão listadas na Tabela 5.6.

Comparando-se com as distâncias de ligação para a semicarbazona livre,¹⁷ observaram-se mudanças significativas nas distâncias das ligações C(8)-O(2), C(8)-N(3) e C(8)-N(2). Estas modificações foram atribuídas à mudança de conformação de *EE* em 2-OHBS complexo dimérico com relação às ligações C2-C7 e N2-C8, respectivamente. As ligações C(2)-C(7), C(1)-O(1), C(1)-C(6), C(3)-C(4) e C(2)-C(3) também sofreram alteração após a formação do complexo. É importante observar, também, que a ligação C(7)-N(1) permaneceu, no complexo, com o mesmo comprimento de ligação observado no cristal do ligante.

¹⁷ J. Valdés-Martínez, R. A. Toscano, R. Salcedo, R. Cea-Olivares, A. Meléndez, *Monatsh. Chem. Chem. Mon.* 121 (1990) 641.

Tabela 5.5. Dados do cristal e refinamento da estrutura do [Zn(2OBS)(OAc)]₂.

[Zn(2OBS)(OAc)] ₂	
Fórmula empírica	C ₁₀ H ₁₁ N ₃ O ₄ Zn
Sistema cristalino	Ortorrômbico
Grupo espacial	P b a c
Tamanho do cristal (mm)	0.15 x 0.12 x 0.10
Dimensões da célula unitária	
a (Å)	12,1734(10)
b (Å)	12,8476(8)
c (Å)	15,1288(7)
α (°)	90
β (°)	90
γ (°)	90
Volume (Å ³)	2366,1(3)
Z	8
MM (g/mol)	302,59
Densidade calculada (g/cm ³)	1,699

Os ângulos de ligação estão listados na Tabela 5.7. Comparando-se com os ângulos de ligação obtidos para o ligante,¹⁷ observaram-se alterações superiores a um grau nos ângulos diretamente relacionados às ligações metal-ligante. Estas ligações estão representadas na Figura 5.8. As maiores alterações nos ângulos de ligação foram observadas em O(2)-C(8)-N(2) e C(8)-N(2)-N(1).

Tabela 5.6. Distância das ligações na estrutura do [Zn(2OBS)(OAc)]₂.

Ligação	2OHBS ¹⁷	[Zn(2OBS)(OAc)] ₂
	Distância (Å)	Distância (Å)
C(8)-O(2)	1.243(2)	1.249(2)
C(8)-N(3)	1.328(3)	1.320(2)
C(8)-N(2)	1.358(3)	1.348(2)
N(1)-N(2)	1.371(2)	1.376(2)
C(7)-N(1)	1.284(3)	1.283(2)
C(2)-C(7)	1.446(3)	1.443(3)
C(1)-O(1)	1.353(3)	1.345(2)
C(1)-C(6)	1.388(3)	1.393(3)
C(5)-C(6)	1.371(4)	1.375(3)
C(4)-C(5)	1.365(4)	1.377(3)
C(3)-C(4)	1.380(3)	1.366(3)
C(2)-C(3)	1.401(3)	1.399(3)
C(1)-C(2)	1.394(3)	1.403(2)
O(1)-Zn(1)#1	-	1.9895(11)
O(1)-Zn(1)	-	2.0541(12)
O(2)-Zn(1)	-	2.0582(12)
O(3)-Zn(1)	-	1.9561(12)
Zn(1)-O(1)#1	-	1.9895(11)
Zn(1)-N(1)	-	2.0735(15)
Zn(1)-Zn(1)#1	-	3.0560(4)

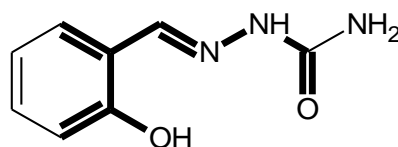


Figura 5.8. Destaque das ligações de 2-OHBS diretamente relacionadas aos ângulos com maior distorção após complexação com o zinco(II).

Tabela 5.7. Ângulos de ligação na estrutura do [Zn(2OBS)(OAc)]₂.

Ligação	2OHBS ¹⁷	[Zn(2OBS)(OAc)] ₂
	Ângulo (°)	Ângulo(°)
O(1)-C(1)-C(6)	118,2(2)	119,6(2)
O(1)-C(1)-C(2)	121,7(2)	122,2(2)
C(6)-C(1)-C(2)	120,1(2)	118,4(2)
C(3)-C(2)-C(1)	117,9(2)	118,7(2)
C(3)-C(2)-C(7)	119,3(2)	116,8(2)
C(1)-C(2)-C(7)	122,8(2)	124,5(2)
C(4)-C(3)-C(2)	121,4(2)	122,0(2)
C(3)-C(4)-C(5)	119,4(2)	118,8(2)
C(6)-C(5)-C(4)	120,9(2)	120,8(2)
C(5)-C(6)-C(1)	120,3(2)	121,1(2)
N(1)-C(7)-C(2)	122,5(2)	124,2(2)
O(2)-C(8)-N(3)	123,1(2)	122,0(2)
O(2)-C(8)-N(2)	118,4(2)	120,6(2)
N(3)-C(8)-N(2)	118,5(2)	117,4(2)
C(7)-N(1)-N(2)	116,4(2)	118,1(2)
C(8)-N(2)-N(1)	121,4(2)	116,0(2)
C(1)-O(1)-Zn(1)#1	-	123,74(11)
C(1)-O(1)-Zn(1)	-	129,45(11)
Zn(1)#1-O(1)-Zn(1)	-	98,17(5)
C(8)-O(2)-Zn(1)	-	114,29(12)
C(9)-O(3)-Zn(1)	-	132,96(12)
O(3)-Zn(1)-O(1)#1	-	115,29(5)
O(3)-Zn(1)-O(1)	-	97,11(5)
O(1)#1-Zn(1)-O(1)	-	81,83(5)
O(3)-Zn(1)-O(2)	-	96,76(5)
O(1)#1-Zn(1)-O(2)	-	102,95(5)
O(1)-Zn(1)-O(2)	-	161,63(5)
O(3)-Zn(1)-N(1)	-	119,71(6)
O(1)#1-Zn(1)-N(1)	-	124,53(5)
O(1)-Zn(1)-N(1)	-	84,96(5)
O(2)-Zn(1)-N(1)	-	77,72(5)
O(3)-Zn(1)-Zn(1)#1	-	111,18(4)
O(1)#1-Zn(1)-Zn(1)#1	-	41,71(3)
O(1)-Zn(1)-Zn(1)#1	-	40,12(3)
O(2)-Zn(1)-Zn(1)#1	-	141,60(4)
N(1)-Zn(1)-Zn(1)#1	-	108,06(4)
C(7)-N(1)-Zn(1)	-	130,64(13)
N(2)-N(1)-Zn(1)	-	111,28(11)

Operações de simetria utilizadas para gerar os átomos equivalentes #1 -x,-y,-z+1

A Tabela 5.8 relaciona as principais ligações de hidrogênio para o complexo $[\text{Zn}(\text{2OBS})(\text{OAc})_2]$ em sua estrutura de empacotamento (Ver Figura 5.7 B).

Tabela 5.8 Ligações de hidrogênio na estrutura do $[\text{Zn}(\text{2OBS})(\text{OAc})_2]$.

D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	D(D...A)	<(DHA)
N(2)-H(2 ^a)...O(4)#2	0.79(2)	1.94(2)	2.729(2)	177(2)
N(3)-H(3 ^a)...O(3)#2	0.91(2)	1.98(2)	2.885(2)	172(2)
N(3)-H(3B)...O(4)#3	0.84(2)	2.03(2)	2.840(2)	162(2)

Operações de simetria utilizadas para gerar átomos equivalentes:

#1 -x,-y,-z+1

#2 -x,y+1/2,-z+3/2

#3 -x+1/2,y+1/2,z

Os resultados aqui apresentados deram origem a um artigo publicado no periódico *Polyhedron*.

5.1.4 Espectroscopia eletrônica dos complexos $[\text{Ga}_2(\text{2OBS})_3]$ e $[\text{Zn}(\text{2OBS})\text{AcO}]$

Os espectros eletrônicos de 2OHBS, $[\text{Ga}_2(\text{2OBS})_3]$ e $[\text{Zn}(\text{2OBS})\text{AcO}]$ em DMSO estão representados na Figura 5.9. O composto 2-OHBS (Figura 5.10A) apresentou bandas em 282, 292 e 322 nm, atribuídas às transições $\pi-\pi^*$ do anel aromático e $n-\pi^*$ dos grupos C=N e C=O. No complexo $[\text{Zn}(\text{2OBS})\text{AcO}]$, são observadas absorções em 283, 293 e 321 e o aparecimento de uma absorção em 378 nm (Figura 5.9 B). Para o complexo $[\text{Ga}_2(\text{2OBS})_3]$ são observadas absorções em 309 nm e 321 nm e o aparecimento absorções em 370 nm e 385 nm (Figura 5.9 C). As novas bandas observadas foram atribuídas à transição $\pi-\pi^*$, devido à extensão da conjugação promovida pela desprotonação de O1H e de N2H na estrutura da semicarbazona. Apesar de evidenciar a formação dos complexos, a extensão da conjugação e consequente sobreposição de bandas não permitiram a atribuição de bandas de transferência de carga metal-ligante.

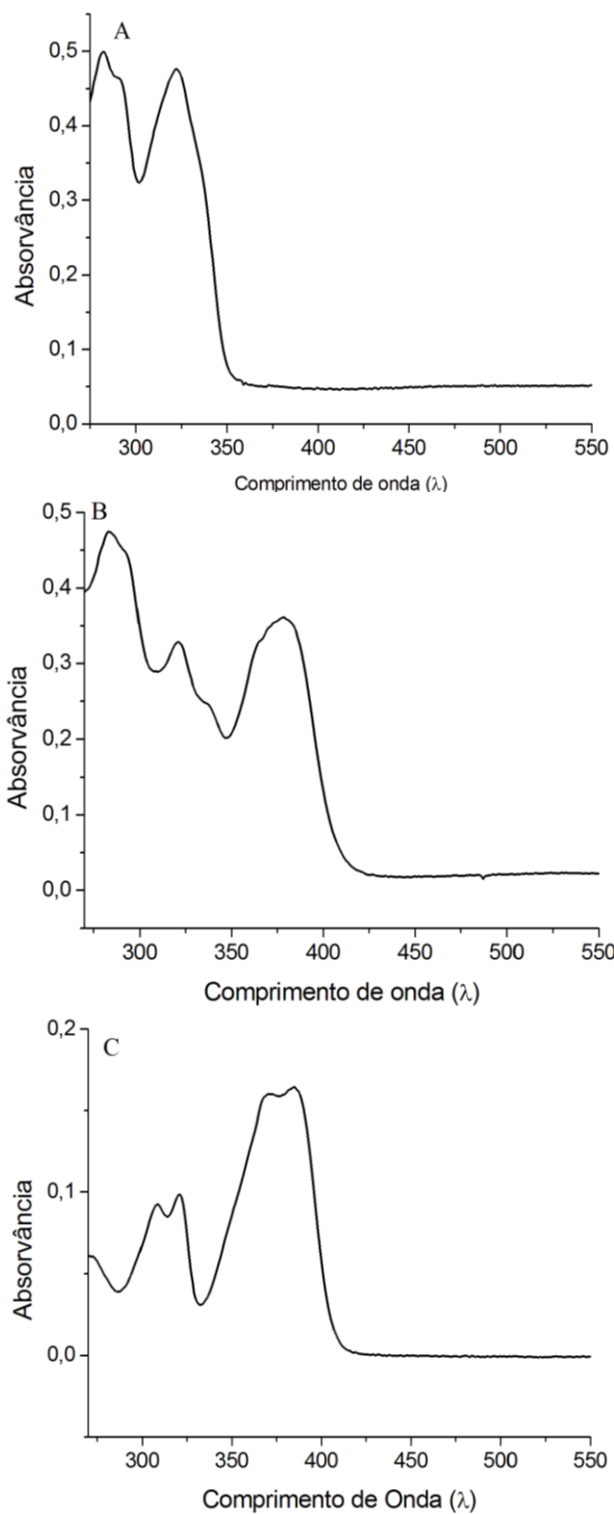


Figura 5.9. Espectros eletrônicos de 2OHBS (10^{-8} mol.L⁻¹, **A**), [Zn(2OBS)AcO] (10^{-8} mol.L⁻¹, **B**) e [Ga₂(2OBS)₃] (10^{-9} mol.L⁻¹, **C**) em DMSO.

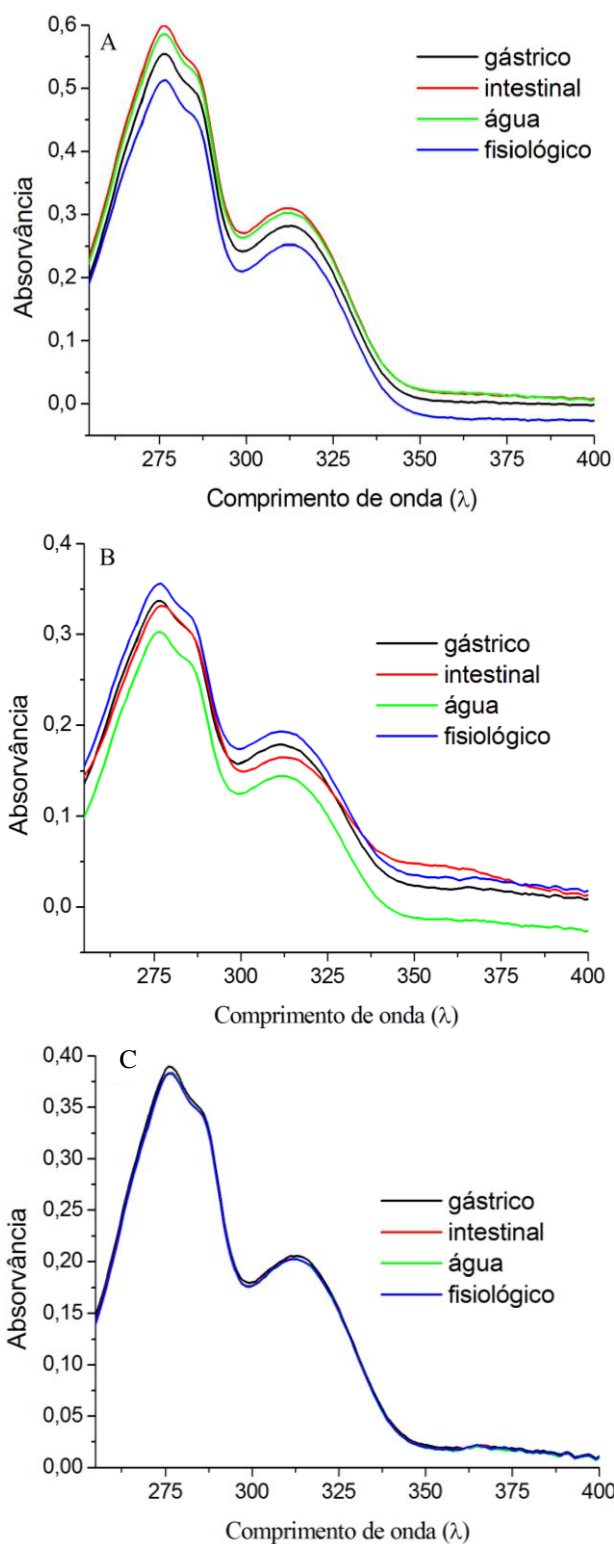


Figura 5.10. Espectros eletrônicos de 2OHBS (10^{-5} mol.L $^{-1}$, **A**), [Zn(2OBS)AcO] (10^{-5} mol.L $^{-1}$, **B**) e [Ga $_2$ (2OBS) $_3$] (10^{-6} mol.L $^{-1}$, **C**) 1% DMSO em meio gástrico simulado (pH 1,2), meio intestinal simulado (pH 6,8), água destilada (pH 7,0) e meio fisiológico (pH 7,4).

Considerando-se o objetivo de submeter os complexos a ensaios biológicos, foram obtidos espectros eletrônicos dos compostos em meio aquoso (1% DMSO), variando-se o pH do meio conforme os valores normalmente encontrados em estudos *in vitro* e *in vivo*. Foram então utilizados meio gástrico simulado (tampão pH 1,2), meio intestinal simulado (tampão pH 6,8) e tampão meio fisiológico (pH 7,4) importantes na previsão da estabilidade de compostos administrados *per os* e por via intraperitoneal em testes *in vivo*.^{18,19} Além disso, foi determinada a estabilidade dos compostos em água destilada (pH 7,0), meio e valor de pH utilizados em testes de triagem da atividade biológica dos compostos *in vitro*. Os resultados estão representados na Figura 5.10.

Os espectros eletrônicos do ligante apresentaram o mesmo perfil nos quatro valores de pH avaliados. Três principais bandas foram observadas em 276, 285 e 312 nm (Figura 5.10 A). Os espectros eletrônicos dos complexos [Zn(2OBS)AcO] e [Ga₂(2OBS)₃], obtidos imediatamente após o preparo das soluções, apresentaram perfis idênticos aos do ligante, em todos os meios avaliados (Figura 5.10 B e C, respectivamente). Este resultado evidenciou a dissociação dos complexos em água, independente do pH utilizado.

A obtenção dos compostos [Ga₂(2OBS)₃] e [Zn(2OBS)AcO] foi realizada por meio da alcalinização dos meios reacionais com acetato de sódio ou zinco, o que promoveria a desprotonação do ligante e consequente formação dos complexos pelo sistema ONO, como descrito anteriormente. Em água, a presença de íons H₃O⁺, ainda que em baixas concentrações, promoveria a dissociação dos compostos por meio da protonação do ligante.

5.1.5. Espectrometria de massas por *elétron spray* do complexo [Ga₂(2OBS)₃]

Espectros de massa por *elétron spray* no modo positivo foram obtidos para o complexo [Ga₂(2OBS)₃], identificado como **C** (ver Figura 5.11). Em uma solução metanólica, foi detectado o pico-base de relação massa/carga $m/z = 671,88$, atribuído a [C - H]⁺, de abundância relativa igual a 4,84 %. O pico mais abundante (100%) aparece com relação massa/carga $m/z = 425,01$, atribuído ao fragmento correspondente a [Ga(2OBS)₂]+[2H]⁺. Estes picos estão representados na Figura 5.11.

Para confirmação dos resultados obtidos em solução metanólica, foi obtido o espectro no modo positivo para solução metanólica acidificada. Neste modo, foi detectado o pico-base de relação massa/carga $m/z = 671,88$, também atribuído a [C - H]⁺, de abundância relativa igual a

¹⁸ M. Lemieux, P. Gosselin, M. A. Mateescu, Int. J. Pharm. 382 (2009) 172.

¹⁹ US Pharmacopeia XXXI 2008. US Pharmacopeial Convention. Rockville, MD.

8,33%. O pico mais abundante (100%) aparece com relação massa/carga $m/z = 425,01$, atribuído novamente ao fragmento correspondente a $[\text{Ga}(\text{2OBS})_2 - 2\text{H}]^+$. Estes picos estão representados na Figura 5.12

Detectou-se a presença do complexo $[\text{Ga}_2(\text{2OBS})_3]$ nas condições de estresse às quais o composto foi submetido para obtenção dos espectros de massa, ainda que em pequena concentração. Este resultado confirma a instabilidade do composto, evidenciada anteriormente pelos espectros eletrônicos em diferentes valores de pH, mas reforça a validade da realização dos testes *in vitro* de atividade biológica do complexo que, em pequenas concentrações, pode estar presente em solução, apresentando atividade biológica intrínseca ou até mesmo alterando a biodisponibilidade do ligante e do metal após dissociação.

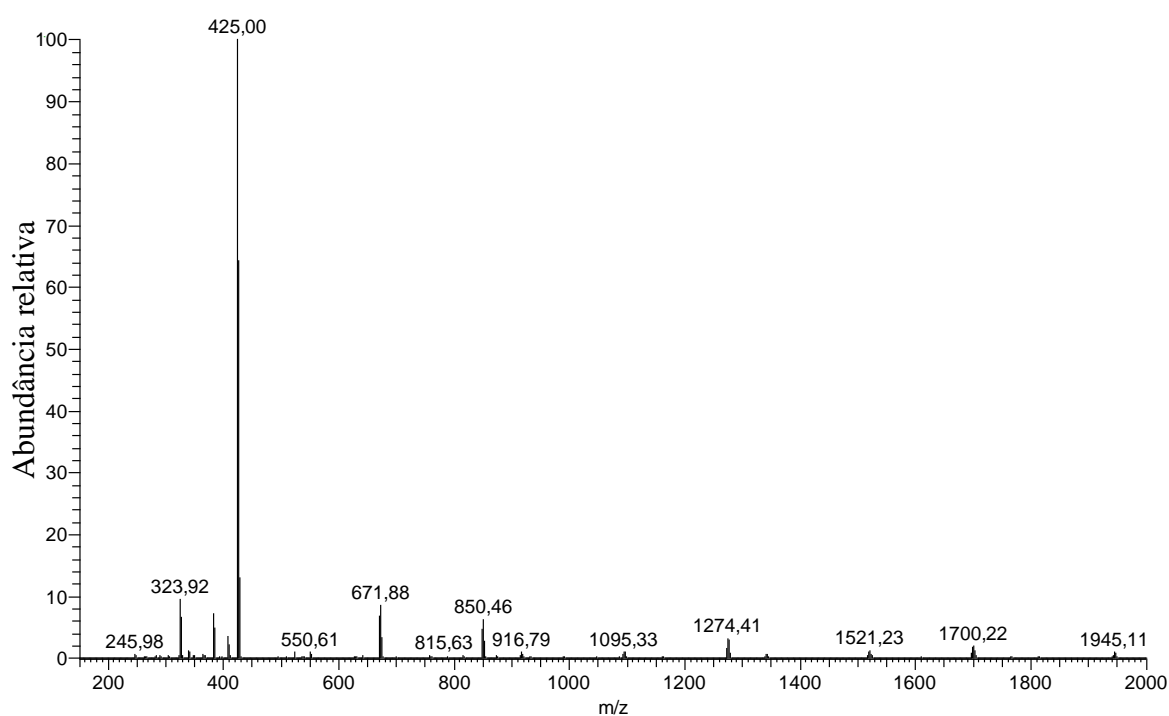


Figura 5.11. Espectro de massa do complexo $[\text{Ga}_2(\text{2OBS})_3]$ em solução metanólica.

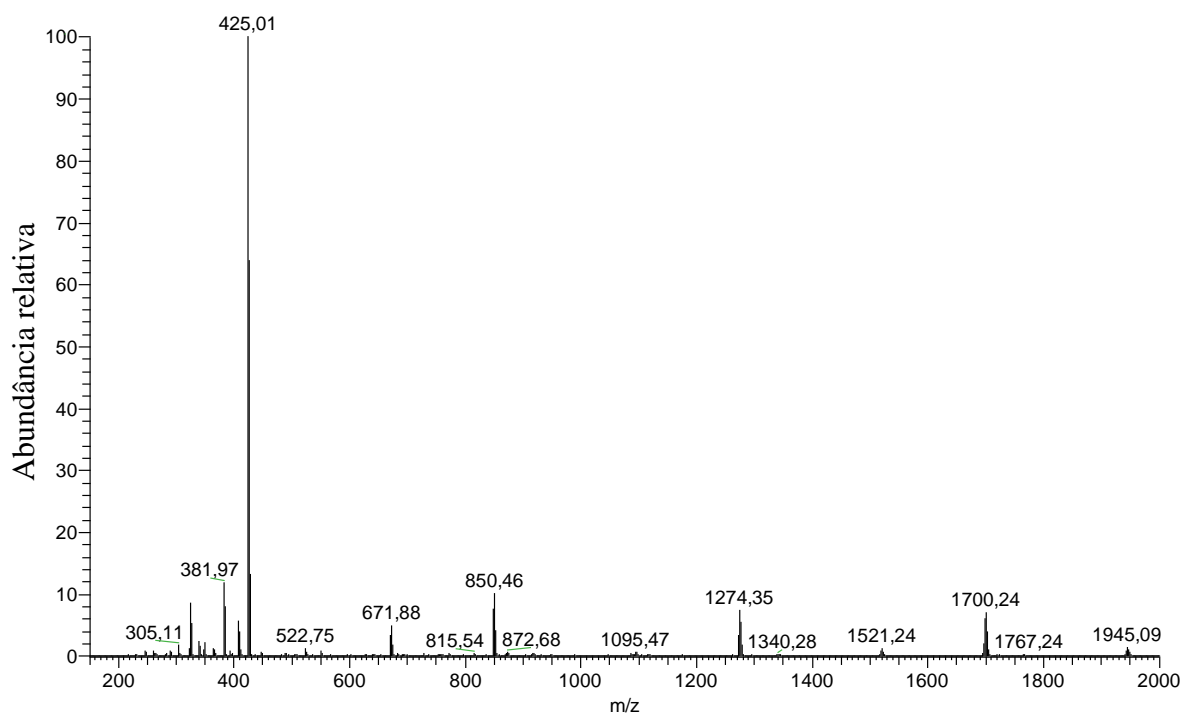


Figura 5.12. Espectro de massa do complexo $[Ga_2(2OBS)_3]$ em solução metanólica acidificada.

A estrutura cristalográfica do complexo $[Ga_2(2OBS)_3]$ não foi determinada. Várias tentativas de cristalização do composto foram realizadas, a partir da água-mãe ou da solubilização de $[Ga_2(2OBS)_3]$ em diferentes solventes, como DMF e DMSO, mas não foram obtidos cristais. No entanto, um trabalho recente descreveu a obtenção de um complexo de gálio(III) de 2-OHBS,²⁰ conforme estrutura representada na Figura 5.13.

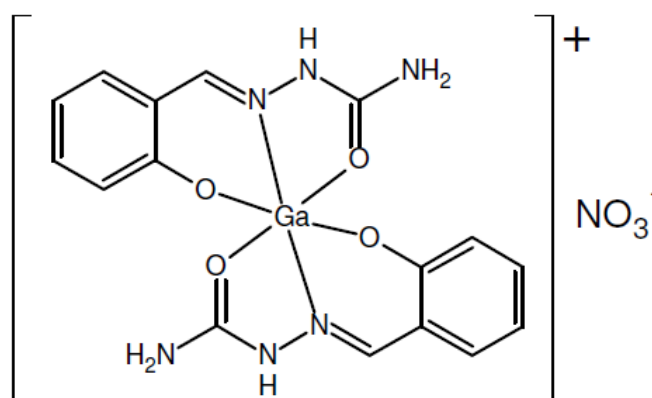


Figura 5.13. Representação esquemática de GaL_2 , complexo de gálio(III) descrito na literatura.²⁰

²⁰ D. Gambino, M. Fernández, D. Santos, G. A. Etcheverría, O. E. Piro, F. Pavan, C. Q. F. Leite, I. Tomaz, F. Marques, *Polyhedron* 30 (2011) 1360.

O complexo GaL_2 difere do composto aqui descrito em vários aspectos. Os sinais de RMN em $\text{DMSO-}d_6$ apresentam significativas diferenças nos deslocamentos químicos dos átomos de carbono e hidrogênio. Destaca-se a presença do hidrogênio N(2)-H no complexo GaL_2 (δ 12,30), ausente no complexo $[\text{Ga}_2(2\text{OBS})_3]$. Além disso, os resultados das medidas de condutividade sugerem a presença de um eletrólito 1:1 para o composto GaL_2 ($64,4 \text{ cm}^2 \cdot \Omega^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$) e de um não-eletrólito para o composto $[\text{Ga}_2(2\text{OBS})_3]$ ($5,95 \text{ cm}^2 \cdot \Omega^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$). Os resultados da análise elementar, principalmente referentes ao teor de nitrogênio na amostra (18,9% para GaL_2 e 13,5% para $[\text{Ga}_2(2\text{OBS})_3]$), reforçam a diferença entre os compostos.

Portanto, na ausência de dados cristalográficos e diante dos dados relatados na literatura para GaL_2 , foi proposta a reação com DMSO em solução para o composto $[\text{Ga}_2(2\text{OBS})_3]$ descrita na Figura 5.14. Complexos de gálio(III) com números de coordenação diferente de 6 (NC = 4 ou 5, por exemplo) são descritos na literatura^{21,22}. As reações são condizentes com os resultados da caracterização obtidos no estado sólido e em diferentes soluções.

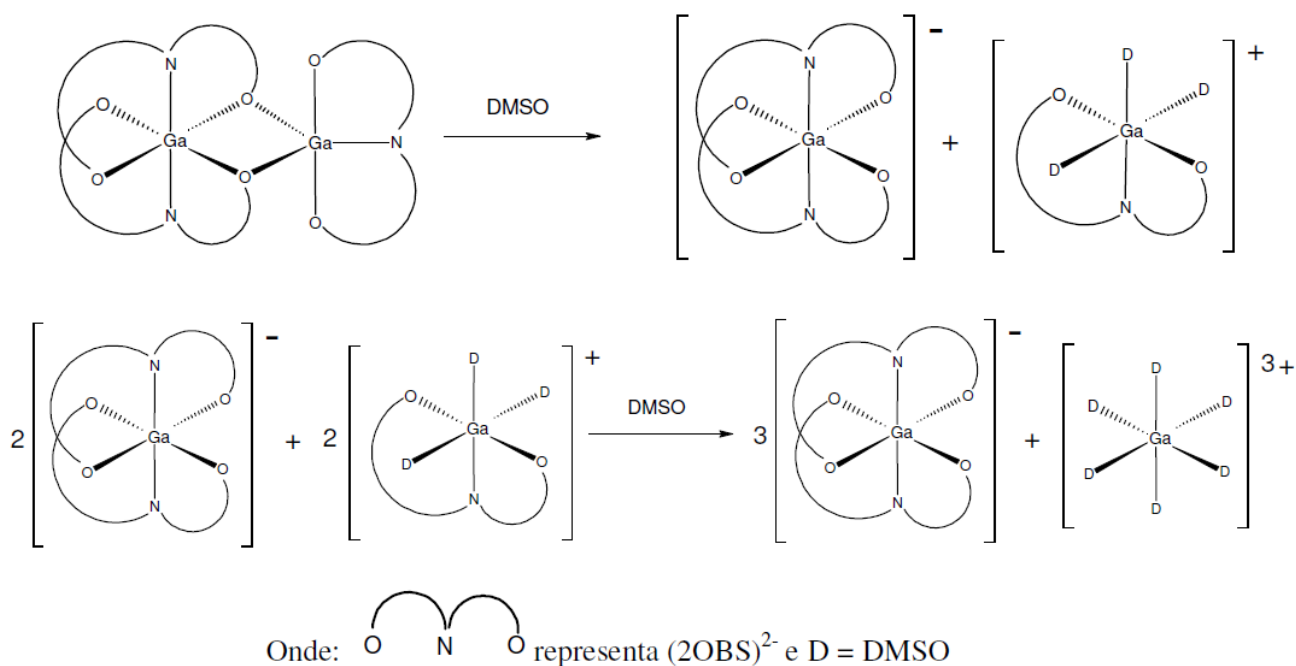


Figura 5.14. Representação esquemática das reações de formação dos complexos $[\text{Ga}(2\text{OBS})_2]^-$ e $[\text{Ga}(\text{DMSO})_6]^{3+}$ após solubilização de $[\text{Ga}_2(2\text{OBS})_3]$ em DMSO.

²¹ L. Kalita, M. G. Walawalkar, R. Murugavel, Inorganica Chim Acta 377 (2011) 105.

²² T. J. Wadas, E. H. Wong, G. R. Weisman, C. J. Anderson, Chem Rev 110 (2010) 2858.

5.2. Ensaios biológicos dos complexos de gálio(III) e zinco(II) de 2-hidroxibenzaldeído semicarbazona

Os testes da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória *in vivo* de $[\text{Zn}(\text{2OBS})\text{AcO}]_2$ e $[\text{Ga}_2(\text{2OBS})_3]$ não foram realizados, diante da extensa instabilidade dos complexos em meio aquoso, em diferentes valores de pH, evidenciada pelos espectros eletrônicos obtidos.

5.2.1 Atividade antifúngica de $[\text{Ga}_2(\text{2OBS})_3]$ e $[\text{Zn}(\text{2OBS})\text{AcO}]$

Os compostos aqui estudados foram avaliados quanto às suas atividades antifúngicas em diferentes cepas de *Candida* e *Trichophyton rubrum*. Os valores obtidos das concentrações inibitórias mínimas (CIM) dos complexos estão listados nas Tabelas 5.9 e 5.10. O ligante, os sais de Ga(III) e Zn(II) utilizados nas sínteses dos complexos e os reagentes utilizados na síntese do ligante – 2-hidroxibenzaldeído e cloridrato de semicarbazida – também foram avaliados quanto às suas atividades antifúngicas.

Conforme os resultados, o complexo $[\text{Ga}_2(\text{2OBS})_3]$ apresentou atividade significativa – com concentrações inibitórias mínimas (CIM) inferiores a $256 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ou $386 \mu\text{mol.L}^{-1}$ – em três das dez cepas de *Candida sp* avaliadas e em cinco dos treze isolados clínicos/cepas de *Trychophyton rubrum* avaliados. Por sua vez, o nitrato de gálio(III) apresentou atividade significativa – CIM inferior a $256 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ou $1001 \mu\text{mol.L}^{-1}$ – em nove das dez cepas de *Candida sp* e em seis dos treze isolados clínicos/cepas de *Trychophyton rubrum* avaliados.

Tabela 5.9. Valores de CIM ($\mu\text{mol.L}^{-1}$) para 2-hidroxibenzaldeído semicarbazona (2-OHBS), seus complexos de gálio(III) e zinco(II), 2-hidroxibenzaldeído cloridrato de semicarbazida, $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$, $\text{Zn}(\text{OAc})_2$. CIM para Itraconazol (controle positivo) igual a 0,25 - 0,50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (0,35 - 0,70 $\mu\text{mol.L}^{-1}$).

Cepas de <i>Candida</i>	Concentração inibitória mínima (CIM, $\mu\text{mol.L}^{-1}$) dos compostos						
	2-hidróxi-benzaldeído	Cloridrato de semicarbazida	2OHBS	$\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$	$\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$	$[\text{Zn}(\text{2OBS})\text{AcO}]_2$	$[\text{Ga}_2(\text{2OBS})_3]$
<i>C. glabrata</i>	>2096	>2295	>1429	>1166	125	>423	>382
<i>C. krusei</i>	>2096	>2295	>1429	>1166	250	>423	>382
<i>C. dubliniensis</i>	>2096	>2295	>1429	>1166	1001	>423	>382
<i>C. parapsilosis</i>	>2096	>2295	>1429	>1166	250	>423	>382
<i>C. gattii</i>	>2096	2295	>1429	1166	>1001	>423	>382
<i>C. neoformans</i>	>2096	>2295	>1429	>1166	1001	>423	>382
<i>C. krusei</i>	>2096	>2295	>1429	>1166	250	>423	191
<i>C. albicans</i>	>2096	>2295	>1429	>1166	501	>423	382
<i>C. tropicalis</i>	>2096	>2295	>1429	>1166	250	>423	>382
<i>C. albicans IC</i>	>2096	>2295	>1429	>1166	250	>423	191

Tabela 5.10. Valores de CIM ($\mu\text{mol.L}^{-1}$) para 2-hidroxibenzaldeído semicarbazona (2-OHBS), seus complexos de gálio(III) e zinco(II), reagentes utilizados na obtenção do ligante e sais utilizados na obtenção dos complexos. CIM para Itraconazol (controle positivo) igual a 0,25 - 0,50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (0,35 - 0,70 $\mu\text{mol.L}^{-1}$).

Cepas e isolados clínicos de <i>Trychophyton rubrum</i>	Concentração inibitória mínima (CIM, $\mu\text{mol.L}^{-1}$) dos compostos						
	2-hidróxi-benzaldeído	Cloridrato de semicarbazida	2OHBS	$\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$	$[\text{Ga}_2(2\text{OBS})_3]$	$\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$	$[\text{Zn}(2\text{OBS})\text{AcO}]$
833	>2096	>2295	>1429	>1001	>382	>1166	>846
TR 665	>2096	>2295	>1429	1001	382	>1166	>846
TR 916	>2096	>2295	>1429	1001	382	>1166	>846
P 50 (2)	>2096	2295	>1429	1001	382	>1166	>846
891	>2096	>2295	>1429	>1001	>382	>1166	>846
812	>2096	>2295	>1429	>1001	>382	>1166	>846
774	>2096	>2295	>1429	>1001	>382	>1166	>846
TR III	>2096	>2295	>1429	>1001	>382	>1166	>846
TR 691	>2096	>2295	>1429	>1001	>382	>1166	>846
TR 01	>2096	>2295	>1429	>1001	>382	>1166	>846
TR 892	>2096	>2295	>1429	1001	382	>1166	>846
TR	>2096	>2295	>1429	1001	>382	>1166	>846
ATCC 40051	>2096	>2295	>1429	1001	382	>1166	>846

2-Hidroxibenzaldeído, cloridrato de semicarbazida e acetato de zinco(II) não apresentaram atividade antifúngica. Nas cepas em que houve inibição do crescimento microbiano, observou-se que os valores das CIM em $\mu\text{mol.L}^{-1}$ para complexo de gálio(III) são cerca de 50 a 60% do valor CIM em $\mu\text{mol.L}^{-1}$ para o nitrato de gálio. Considerando que um mol complexo possui uma massa de gálio(III) duas vezes superior à massa do metal existente em um mol nitrato de gálio(III), sugeriu-se que a atividade antifúngica dos compostos está relacionada exclusivamente ao metal.

Para confirmar esta hipótese e verificar se os compostos considerados ativos poderiam atuar como antifúngicos de forma sinérgica com itraconazol, princípio ativo já utilizado na clínica, foram determinadas as concentrações inibitórias fracionárias (CIF) para o complexo $[\text{Ga}_2(2\text{OBS})_3]$ e para $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$. Os resultados das combinações estão descritos na Tabela 5.11 e Figuras 5.14 e 5.15.

Os valores apresentados na Tabela 5.11 mostram que a combinação entre $\text{Ga}_2(\text{NO}_3)_3$ e itraconazol apresentou efeitos de adição (interação com valor CIF $> 0,5$ e $\leq 1,0$) em 12 das 13 cepas/isolados clínicos e a combinação entre $[\text{Ga}_2(2\text{OBS})_3]$ e itraconazol apresentou efeitos de adição em 9 das 13 cepas/isolados clínicos avaliados.

Nas 13 cepas avaliadas o valor médio de CIF foi igual a 0,9 para $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ e itraconazol e igual a 1,0 no caso da combinação $[\text{Ga}_2(2\text{OBS})_3]$ e itraconazol. Portanto, os valores médios caracterizaram efeitos de adição para ambas as interações. Os valores médios das combinações estão representados nas Figuras 5.15 e 5.16.

Os resultados obtidos na triagem e nos testes de combinação com itraconazol evidenciaram a atividade antifúngica do gálio(III). O complexo $[\text{Ga}_2(2\text{OBS})_3]$ mostrou atividade equivalente ao nitrato de gálio(III), fato provavelmente relacionado à dissociação do metal da estrutura do complexo em meio aquoso, como sugerido pela variação do espectro eletrônico do complexo em meio aquoso.

Tabela 5.11. Concentração inibitória mínima (CIM) de Ga(NO₃)₃, [Ga₂(2OBS)₃] e itraconazol e concentração inibitória fracionária média (CIF) das combinações [Ga₂(2OBS)₃] + itraconazol e Ga(NO₃)₃ + itraconazol frente a 13 isolados clínicos/ cepas de *Trychophyton rubrum*.

Cepas e isolados clínicos de <i>Trychophyton rubrum</i>	Concentração inibitória mínima (CIM, µmol.L ⁻¹) dos compostos e combinações			Concentração inibitória fracionária (CIF) das combinações	
	Ga(NO ₃) ₃	[Ga ₂ (2OBS) ₃]	itraconazol	Ga(NO ₃) ₃ + itraconazol	[Ga ₂ (2OBS) ₃] + itraconazol
833	2002	764	0,70	1,0	1,0
TR 665	1001	382	0,70	1,0	1,0
TR 916	1001	382	0,70	0,8	0,9
P(50)2	1001	382	0,70	0,9	1,0
891	2002	764	0,70	1,0	1,1
812	2002	764	0,70	0,9	1,1
774	2002	764	0,70	1,0	1,2
TR III	2002	764	0,35	1,1	1,2
TR 691	2002	764	0,70	0,8	1,0
TR 01	2002	764	0,70	1,0	0,8
TR 892	1001	382	0,70	0,9	1,0
TR	1001	764	0,70	0,9	0,8
ATCC 40051	1001	382	0,70	0,8	0,9

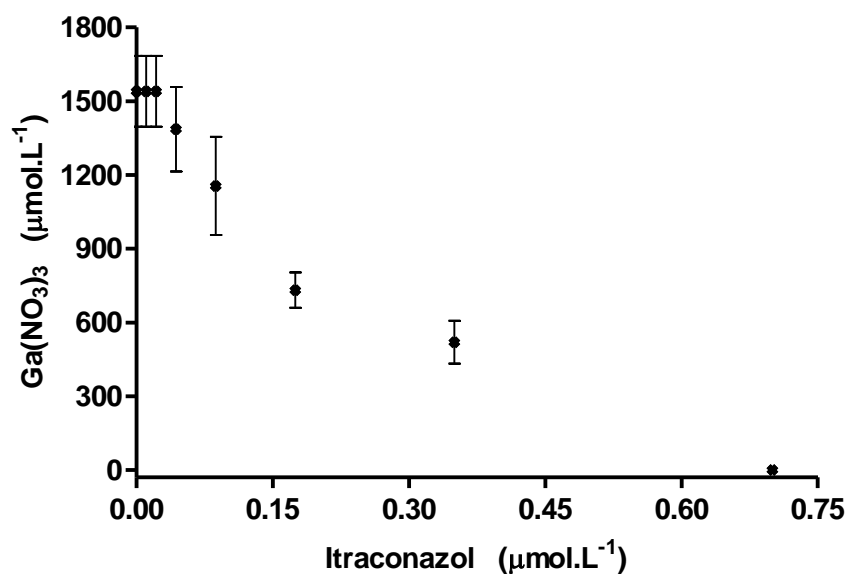


Figura 5.15. Valores médios da combinação de $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ e itraconazol frente a 13 cepas/isolados clínicos diferentes de *Trychophyton rubrum*. O valor médio de concentração inibitória fracionária (CIF) foi 0,9, caracterizando a interação entre os dois compostos como adição. Os pontos indicam a combinação onde houve inibição do crescimento.

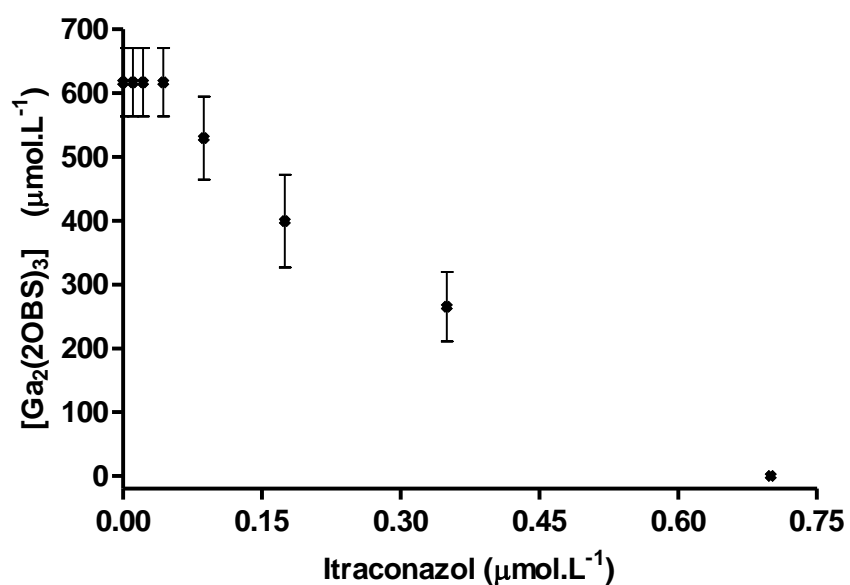


Figura 5.16. Valores médios da combinação de $[\text{Ga}_2(2\text{OBS})_3]$ e itraconazol frente a 13 cepas/isolados clínicos diferentes de *Trychophyton rubrum*. O valor médio de concentração inibitória fracionária (CIF) foi 1,0, caracterizando a interação entre os dois compostos como adição. Os pontos indicam a combinação onde houve inibição do crescimento.

A atividade antifúngica de complexos de gálio(III) com tiossemicarbazonas já havia sido descrita anteriormente em cepas de *Cryptococcus sp*, um fungo patogênico.²³ À essa atividade, atribuiu-se o mecanismo de seqüestro de íons ferro(III), essenciais ao metabolismo da célula do fungo, pelas tiossemicarbazonas, após dissociação dos complexos em meio intracelular. Simultaneamente ao seqüestro dos íons ferro(III), a liberação de íons gálio(III) atuaria de forma sinérgica por meio da inibição do metabolismo do fungo, substituindo íons ferro(III) em processos biológicos e interrompendo processos vitais de oxi-redução^{24,25}.

A atividade antimicrobiana de gálio(III) relacionada ao deslocamento de ferro(III) dos microorganismos já foi relatada para *Pseudomonas aeruginosa*²⁶ e *Candida albicans*.²⁷ Esse mecanismo, no entanto, ainda não havia sido descrito para fungos patogênicos causadores de dermatofitose, tais como *Trychophyton rubrum*. Com o objetivo de investigar o mecanismo de ação do gálio(III) em *Trychophyton rubrum*, avaliou-se a atividade antifúngica do metal frente a quatro cepas/isolados clínicos de *Trychophyton rubrum* na presença de concentrações crescentes de nitrato de ferro(III). Como pode ser observado na Figura 5.17, houve reversão da atividade do gálio(III) na presença de ferro(III).

²³ T. O. Bastos, B. M. Soares, P. S. Cisalpino, I. C. Mendes, R. G. dos Santos, H. Beraldo, Microbiol. Res. (2009) 573.

²⁴ K. DeLeon, F. Balldin, C. Watters, A. Hamood, J. Griswold, S. Sreedharan, K. P. Rumbaugh, Antimicrob. Agents. Chemother. 53 (2009) 1331.

²⁵ L. R. Bernstein, Pharmacol. Rev. 50 (1998) 665.

²⁶ Y. Kaneko, M. Thoendel, O. Olakanmi, B. E. Britigan, P. K. Singh, J. Clin. Invest. 117 (2007) 877.

²⁷ O. Ardon, H. Bussey, C. Philpott, D. McVey Ward, S. Davis-Kaplan, S. Verroneau, B. Jiang, J. Kaplan, J. Biol. Chem. 276 (2001) 43049.

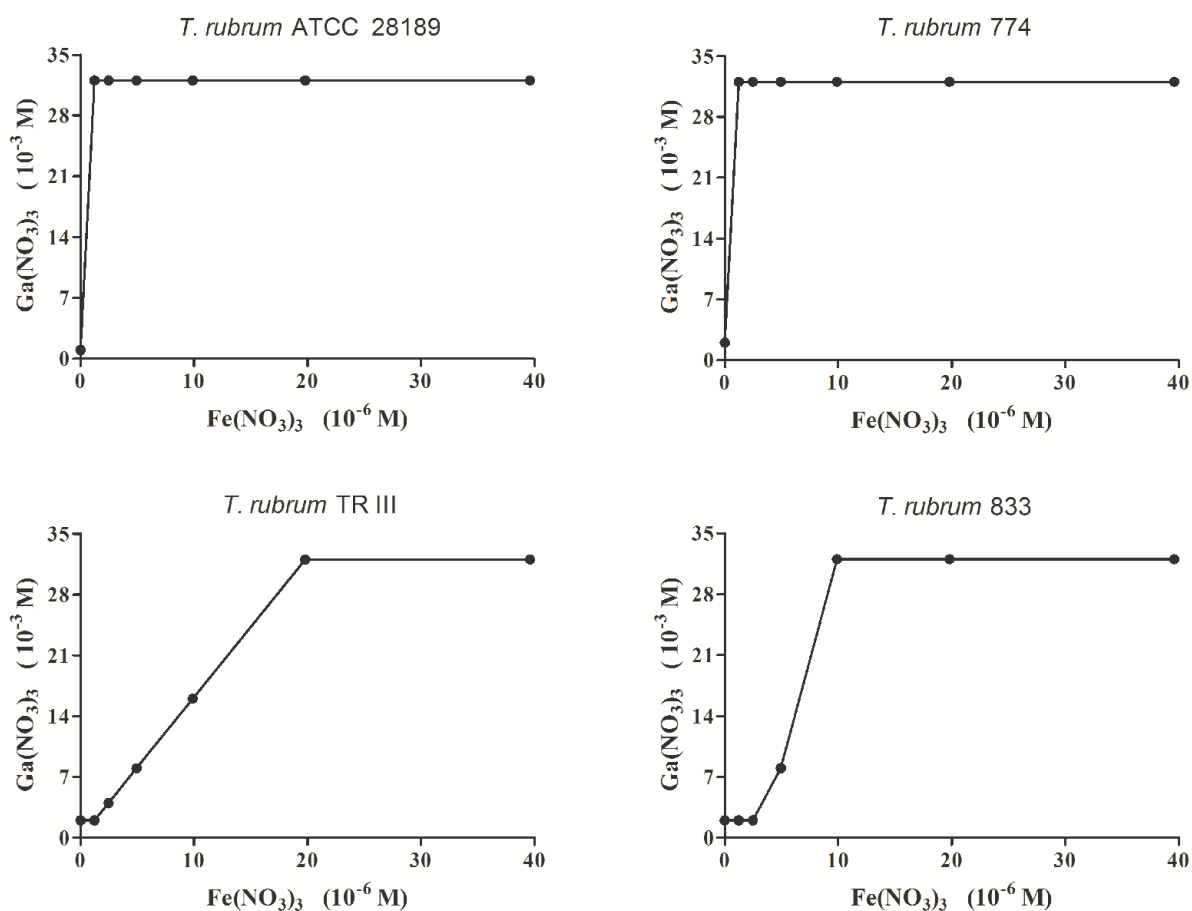


Figura 5.17. Combinação de $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ e $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ frente a 4 cepas/isolados clínicos diferentes de *Trychophyton rubrum*. Os pontos indicam a combinação onde houve inibição do crescimento.

Esses resultados demonstram, pela primeira vez, a atividade antifúngica do gálio(III) em *Trychophyton rubrum*, sugerindo que seu mecanismo de ação pode estar relacionado à substituição de ferro(III) por gálio(III) ou ao bloqueio de mecanismos de oxi-redução ferro-dependentes.

A baixa biodisponibilidade do nitrato de gálio poderia ser contornada pela coordenação do gálio(III) a ligantes orgânicos, modificando as características físico-químicas após a complexação, como o coeficiente de partição óleo/água. Complexos estáveis de gálio(III) poderiam ser capazes de fornecer quantidades suficientes de gálio(III) à célula do patógeno para manifestação da atividade antifúngica. Portanto, esses resultados fornecem valiosas informações para trabalhos futuros. O preparo de complexos estáveis de gálio(III), associados ou não aos antifúngicos disponíveis na clínica, como itraconazol, é uma importante estratégia para o desenvolvimento de novos protótipos para o tratamento de infecções causadas por fungos.

Capítulo 6. Bases de Schiff derivadas de 2,6 diacetilpiridina: avaliação da atividade em modelos *in vitro* da Doença de Alzheimer

Uma das hipóteses para o desenvolvimento da doença de Alzheimer (DA) baseia-se no desequilíbrio entre a produção e eliminação do peptídeo β -amilóide (β A) no metabolismo celular.¹ Como citado anteriormente, foi observado que íons metálicos tais como cobre(II) e zinco(II) promovem a agregação de β A *in vitro*.^{2,3} Em razão dos efeitos deletérios dos íons metálicos sobre o peptídeo β A, um grande número de trabalhos tem sido dirigido para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos que modulem as interações metal-proteína (*metal-protein attenuating compound*, MPAC). A estratégia seria a de introduzir um quelante MPAC capaz de romper interações metal-proteína anormais específicas.⁴ A terapia quelante, apesar dos recentes e significativos avanços, apresenta limitações, principalmente quanto à toxicidade e à dificuldade de penetração dos compostos avaliados no sistema nervoso central,⁵ motivando a busca por novos protótipos.

Neste trabalho, obtivemos os compostos 2,6 diacetilpiridina *bis*(tiossemicarbazona), 2,6 diacetilpiridina *bis*(semicarbazona) e 2,6 diacetilpiridina *bis*(hidrazona) (DAPT, DAPS e DAPH, respectivamente, Figura 6.1), e os caracterizamos quanto às suas propriedades físico-químicas, no estado sólido e em solução. Esses compostos agem como quelantes pentadentados, tendo, portanto, grande afinidade por íons metálicos. Posteriormente, a capacidade dos compostos de inibir a agregação do peptídeo β A em um modelo *in vitro* da DA foi avaliada. O conjunto de resultados permitiu avaliar o potencial dos compostos como novos protótipos de fármacos para o tratamento da DA.

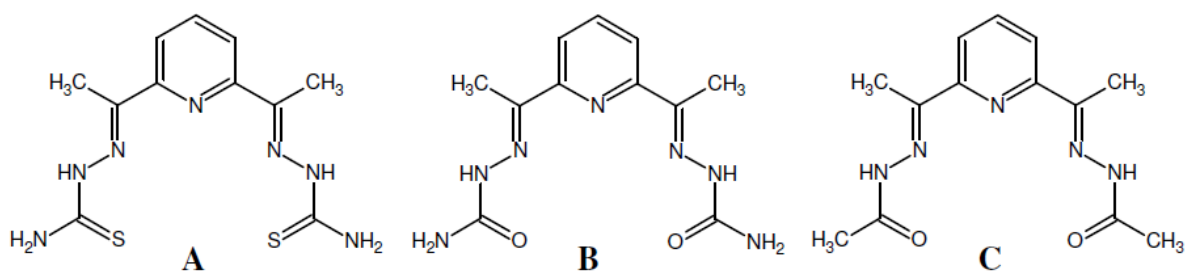


Figura 6.1. 2,6 diacetilpiridina *bis*(tiossemicarbazona) (**DAPT, A**), 2,6 diacetilpiridina *bis*(semicarbazona) (**DAPS, B**) e 2,6 diacetilpiridina *bis*(hidrazona) (**DAPH, C**).

¹ J. Hardy, D. J. Selkoe, *Science* 297 (2002) 353.

² C. S. Atwood, R. D. Moir, X. Huang, R. C. Scarpa, N. M. Bacarra, D. M. Romano, M. A. Hartshorn, R. E. Tanzi, A. I. Bush, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 12817.

³ A. I. Bush, W. H. Pettingell, G. Multhaup, M. d Paradis, J. P. Vonsattel, J. F. Gusella, K. Beyreuther, C. L. Masters, R. E. Tanzi, *Science* 265 (1994) 1464.

⁴ L. E. Scott, C. Orvig, *Chemical Rev.* 109 (2009) 4885.

⁵ A. Budimir, *Acta Pharmaceut.* 61 (2011) 1.

6.1. Obtenção dos compostos

Os compostos foram obtidos conforme já descrito na literatura.⁶ A confirmação da sua obtenção e pureza foi realizada por espectroscopia no IV, massas e RMN de ^1H , ^{13}C e mapas de contorno HMQC (correlação heteronuclear múltiplo-quântica, ^{13}C - ^1H ^1J).

6.1.1 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

No espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6) de DAPS, representado na Figura 6.3, o sinal dos hidrogênios N3H é um simpleto observado em δ 9,46. Os hidrogênios ligados a N4 apresentam-se como um simpleto em δ 6,61. O sinal dos hidrogênios H2 apresentam-se como um duplete centrado em δ 8,23. O sinal de H3 apresenta-se como um tripleto centrado em δ 7,73. Finalmente, os sinais dos hidrogênios ligados aos carbonos C6 encontram-se como um simpleto em δ 2,31. Os valores das integrações e o número de sinais estão de acordo com o número de hidrogênios da molécula e evidenciam a presença de apenas um isômero configuracional em solução. O espectro de RMN de ^{13}C e os mapas de contorno HMQC confirmaram as atribuições do espectro de ^1H .

No espectro de RMN de ^1H de DAPT, representado nas Figuras 6.4, 6.5 e 6.6, o sinal dos hidrogênios N3H é um simpleto observado em δ 10,31. Os hidrogênios ligados a N4 apresentam-se como um duplete em δ 8,41 – δ 8,42. O sinal dos hidrogênios H2 apresenta-se em δ 8,15. O sinal de H3 mostra-se como um tripleto centrado em δ 7,77. Finalmente, os sinais dos hidrogênios ligados aos carbonos C6 encontram-se sobrepostos, como um simpleto em δ 2,43.⁷ Os valores das integrações e o número de sinais estão de acordo com o número de hidrogênios da molécula. Verificou-se a presença de sinais duplicados referentes a todos os sinais de hidrogênio da molécula, evidenciando a presença de mais de um isômero configuracional em solução. O desdobramento do sinal dos hidrogênios de N4 em um duplete foi atribuído ao impedimento da rotação das ligações C5-N4 na porção tioamida, devido ao seu caráter de dupla ligação provocado pela ressonância representada na Figura 6.7.^{8,9} O espectro de RMN de ^{13}C e os mapas de contorno HMQC confirmaram as atribuições do espectro de ^1H .

Para DAPH, a obtenção de um espectro RMN de ^1H satisfatório foi possível apenas em clorofórmio- d_1 (Figura 6.8), uma vez que o composto apresentou-se praticamente insolúvel nos demais solventes deuterados disponíveis. Apesar de o espectro de RMN de ^1H sugerir que os valores das integrações e o número de sinais estejam de acordo com o número de hidrogênios da

⁶ A. A. Abu-Hussen, W. Linert, Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc., 74 (2009) 214.

⁷ J. S. Casas, A. Castiñeras, A. Sánchez, J. Sordo, A. Vázquez-López, M. C. Rodríguez-Argüelles, U. Russo, Inorg. Chim. Acta, 221 (1994) 61.

⁸ O.E. Offiong, Spectrochim. Acta A, 50 (1994) 2167.

⁹ K. R. Koch, Inorg. Chim. Acta, 147 (1988) 227.

molécula, não foi possível obter o espectro de RMN de ^{13}C satisfatório e fazer as atribuições dos sinais.

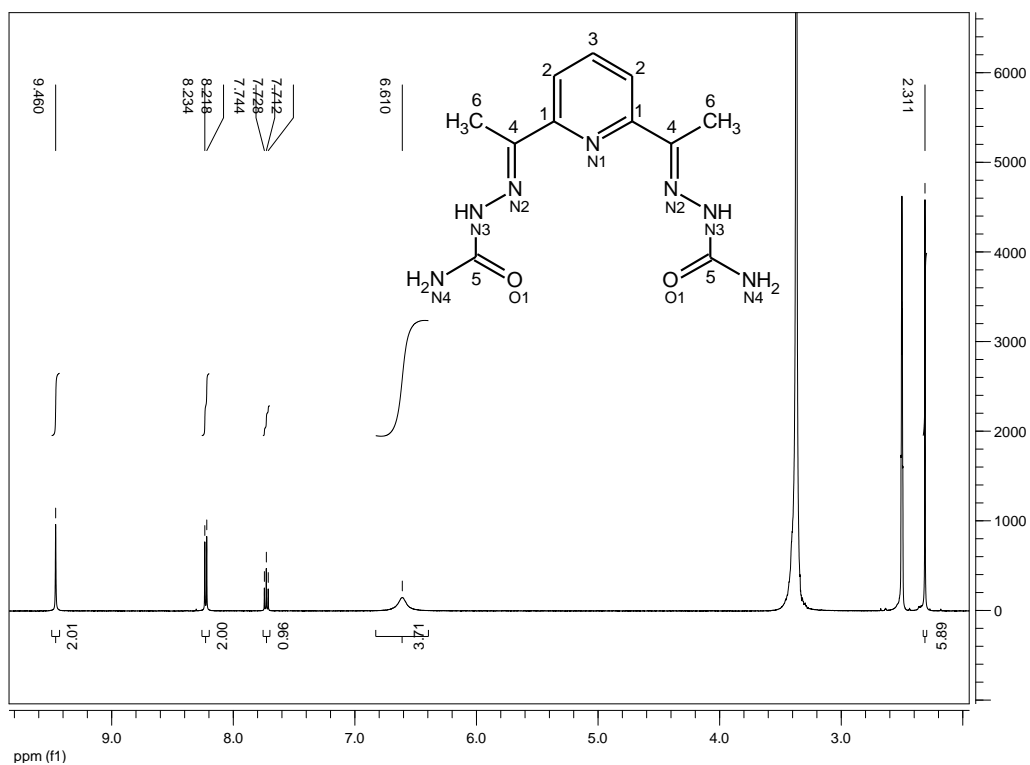


Figura 6.3. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz) de DAPS em $\text{DMSO-}d_6$.

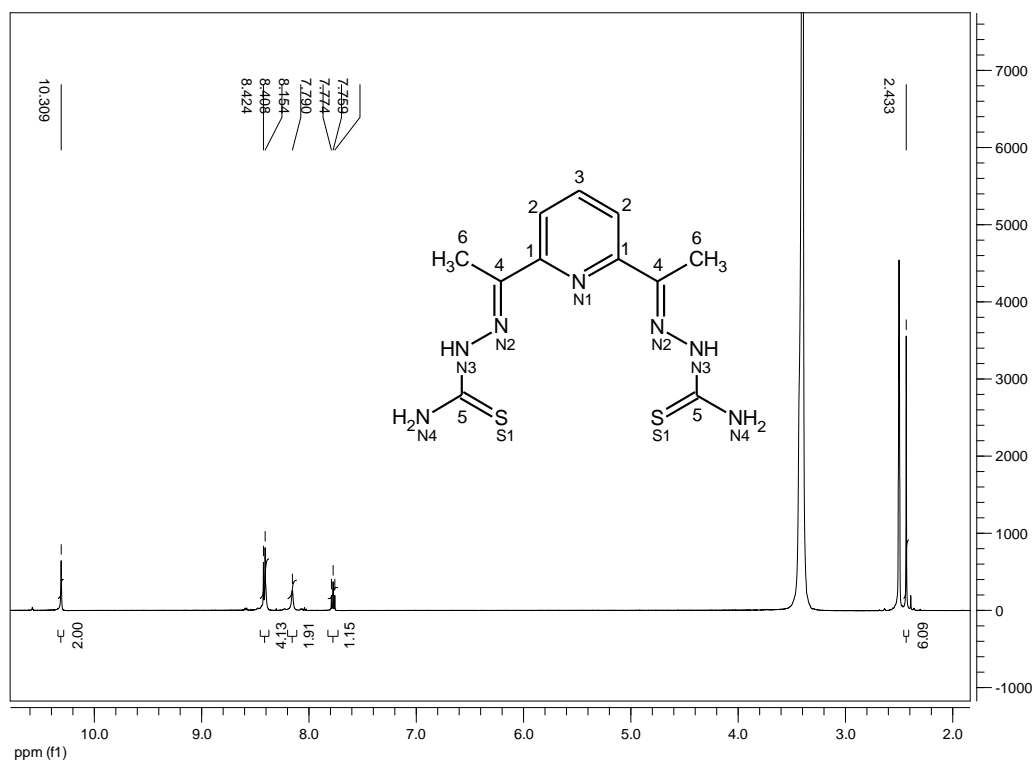


Figura 6.4. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz) de DAPT em $\text{DMSO-}d_6$.

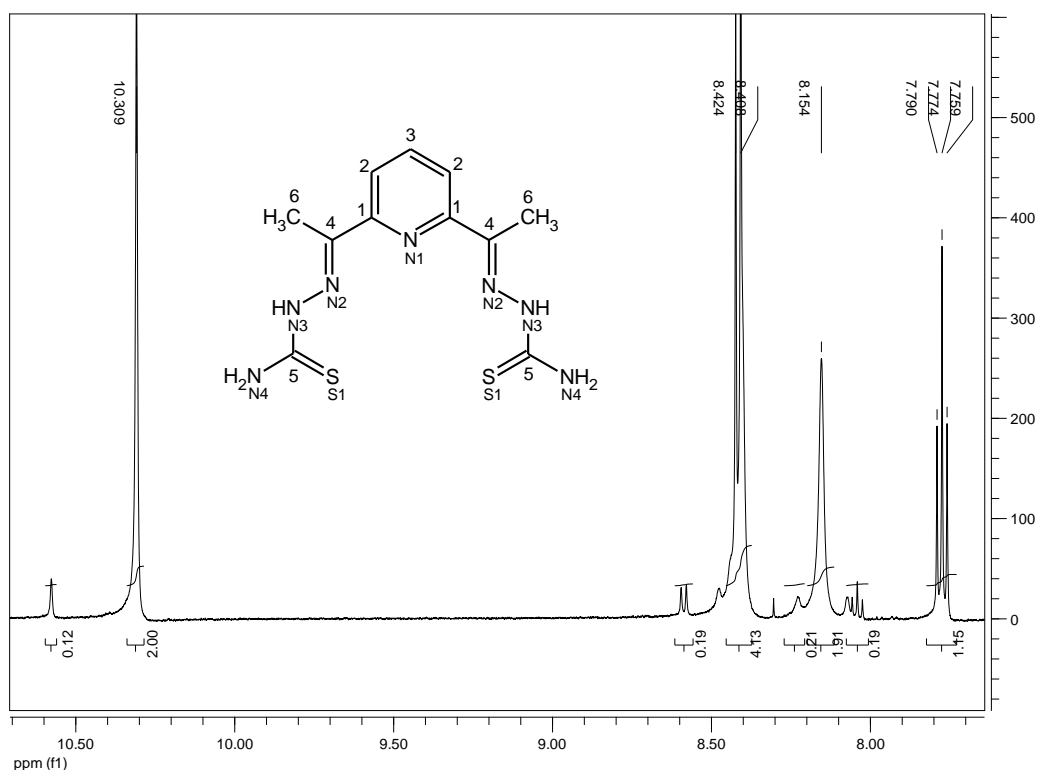


Figura 6.5. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz) de DAPT em $\text{DMSO-}d_6$, com ampliação na região entre 7,60 e 10,70 ppm.

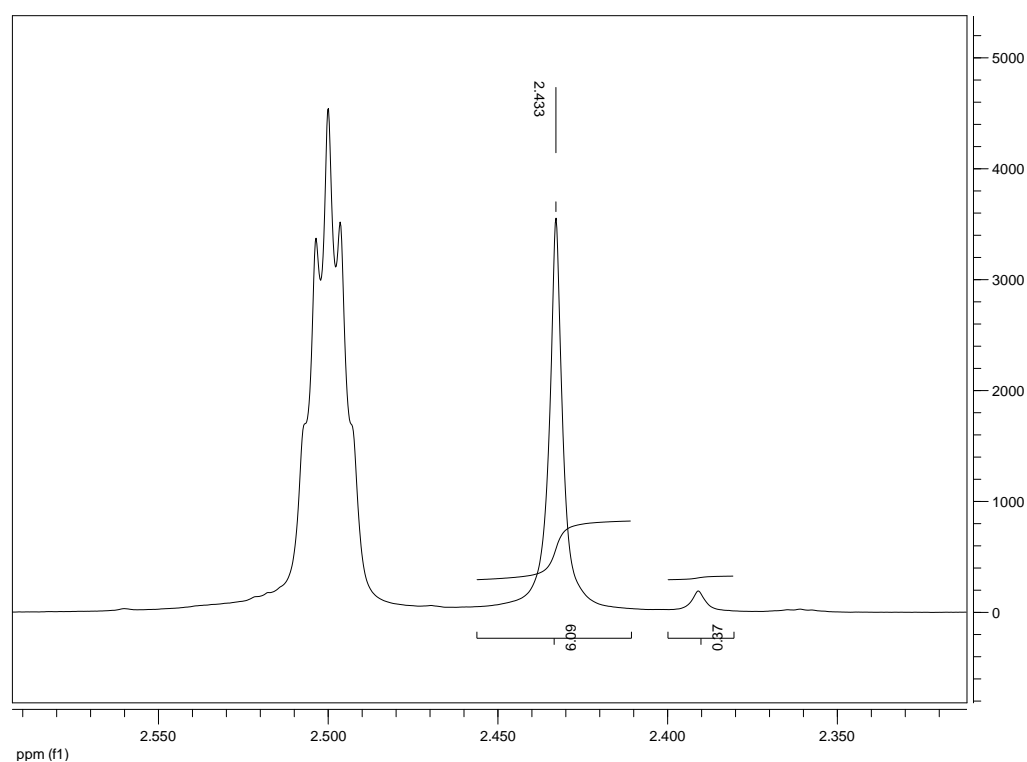


Figura 6.6. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz) de DAPT em $\text{DMSO-}d_6$, com ampliação na região entre 2,30 e 2,60 ppm.

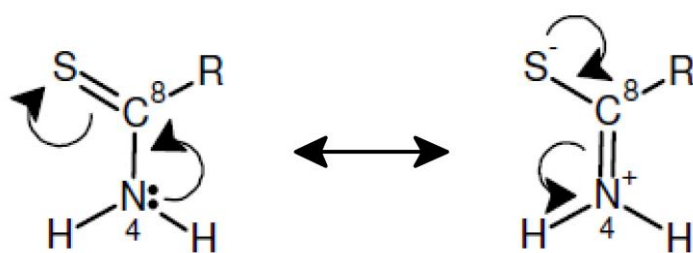


Figura 6.7. Ressonância na porção tioamida de DAPT.

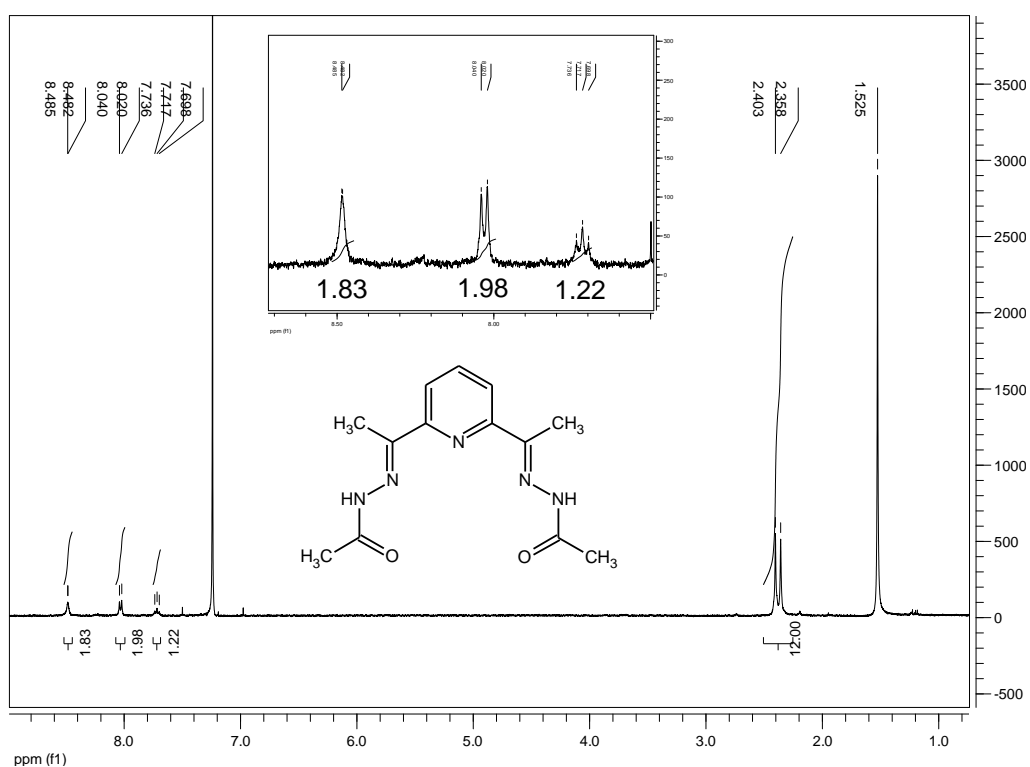


Figura 6.8. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz) de DAPH em $\text{CDCl}_3\text{-}d_1$, com ampliação na região entre 7,20 e 8,50 ppm.

6.1.2 Espectroscopia na região do infravermelho (IV)

As principais bandas nos espectros no infravermelho de DAPH, DAPS e DAPT encontram-se na Tabela 6.1.

A presença de bandas atribuídas ao modo $\nu(\text{C}=\text{N})$, entre 1573 cm^{-1} e 1619 cm^{-1} , para as três bases de Schiff sugeriu a formação dos compostos por meio da reação de condensação. Absorções referentes ao modo $\nu(\text{N}-\text{H})$ entre 3099 e 3484 cm^{-1} nos três compostos sugerem que estes estão presentes na forma cetona ou tiona no estado sólido. As vibrações referentes ao

modo $\nu(\text{C}=\text{O})$, observadas em 1679 e 1711 cm^{-1} nos espectros de DAPH e DAPS, respectivamente, e a vibração $\nu(\text{C}=\text{S})$, observada em 814-863 cm^{-1} para DAPT, confirmam a obtenção dos compostos.

Tabela 6.1. Bandas nos espectros de infravermelho (cm^{-1}) de DAPH, DAPS e DAPT.

Composto	$\nu(\text{NH})$	$\nu(\text{CN})$	$\nu(\text{CO})$	$\nu(\text{CS})$
DAPH	3192m	1619m	1679F	-
DAPS	3484m	1592m	1711F	-
DAPT	3384m 3099m	1573m	-	863m 814m

F= forte; m= média

6.1.3 Espectrometria de massas por elétron spray

Espectros de massa por elétron spray no modo positivo foram obtidos para DAPH, DAPS e DAPT. Os compostos foram solubilizados ou dispersos em DMSO e, posteriormente, solubilizados em acetonitrila. Os picos mais abundantes aparecem com relação massa/carga $m/z = 298,30$; $m/z = 300,27$ e $m/z = 332,40$, atribuídos aos fragmentos correspondentes a $[\text{DAPH} - \text{Na}^+]$, $[\text{DAPS} - \text{Na}^+]$ e $[\text{DAPT} - \text{Na}^+]$, respectivamente. O íon Na^+ é um componente comumente encontrado nas câmaras de ionização e, geralmente, associa-se aos compostos analisados. Estes resultados confirmam aqueles obtidos por espectroscopia de RMN e no infravermelho e, conseqüentemente, a obtenção dos compostos.

6.2 Determinação das constantes de acidez (pKa) por UV-vis

O estudo de especiação e a determinação das constantes de acidez (pKa) foram realizados para DAPS e DAPT, uma vez que DAPH não se mostrou solúvel nas condições do experimento - 5% DMSO em NaCl 0,1M. Os experimentos foram realizados na faixa de pH 2-12.

As Figuras 6.9 e 6.10 apresentam os diagramas de especiação de DAPS e DAPT, respectivamente. De acordo com os diagramas, há três espécies possíveis para os compostos na faixa de pH avaliada. Em valores de pH próximos a 2 os compostos encontram-se em sua maior parte protonados no nitrogênio do anel da piridina. Em valores de pH próximos a 12, a concentração dos compostos desprotonados nos nitrogênios aumenta, sendo possível a existência da espécie desprotonada simultaneamente nos dois átomos de nitrogênio. O dado

mais importante fornecido pelos diagramas é o fato de DAPS e DAPT apresentarem-se neutros em pH 7,4 (pH fisiológico). Isso é importante para os processos de absorção *in vivo*, uma vez que compostos neutros são capazes de atravessar membranas biológicas. No caso de protótipos de fármacos destinados à terapia da doença de Alzheimer, isso se torna ainda mais relevante, uma vez que é necessário atravessar a barreira hematoencefálica para atingir o local de ação.

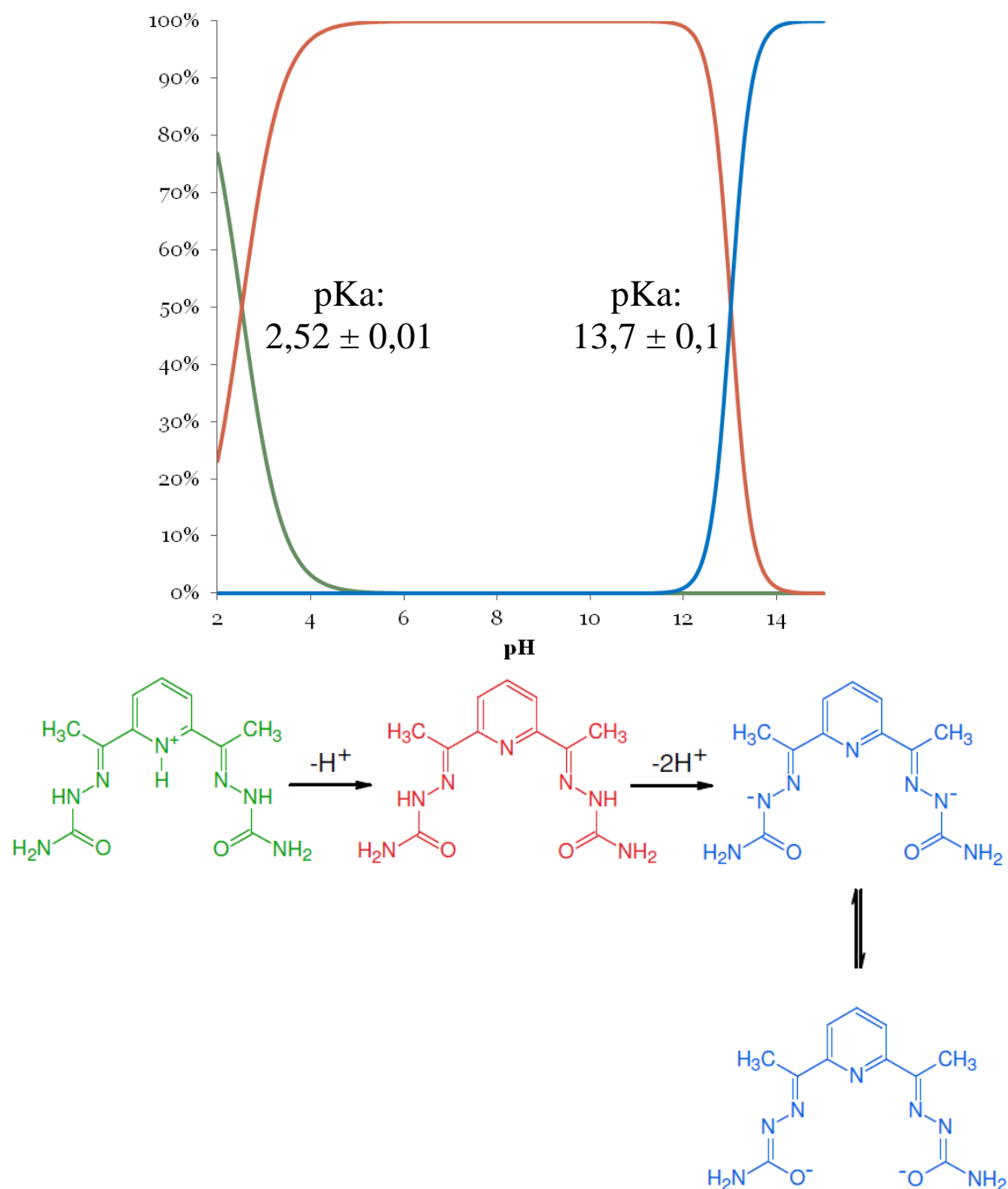


Figura 6.9. Estudo de especiação em solução para DAPS na faixa de pH = 2-12, [DAPS] = 40mM. Diagrama de especiação e valores de pKa obtidos por meio dos programas HySS2009 (Protonic Software, UK) e HypSpec (Protonic Software, UK), respectivamente.^{10,11}

¹⁰ M. R. Jones, E. L. Service, J. R. Thompson, M. C. P. Wang, I. J. Kinsey, A. S. DeToma, A. Ramamoorthy, M. H. Lim, T. Storr, *Metallomics*, 9 (2012) 210.

¹¹ X. He, H. M. Park, S. J. Hyung, A. S. DeToma, C. Kim, B. T. Ruotolo, M. H. Lim, *Dalton Trans.*, 21 (2012), 6558.

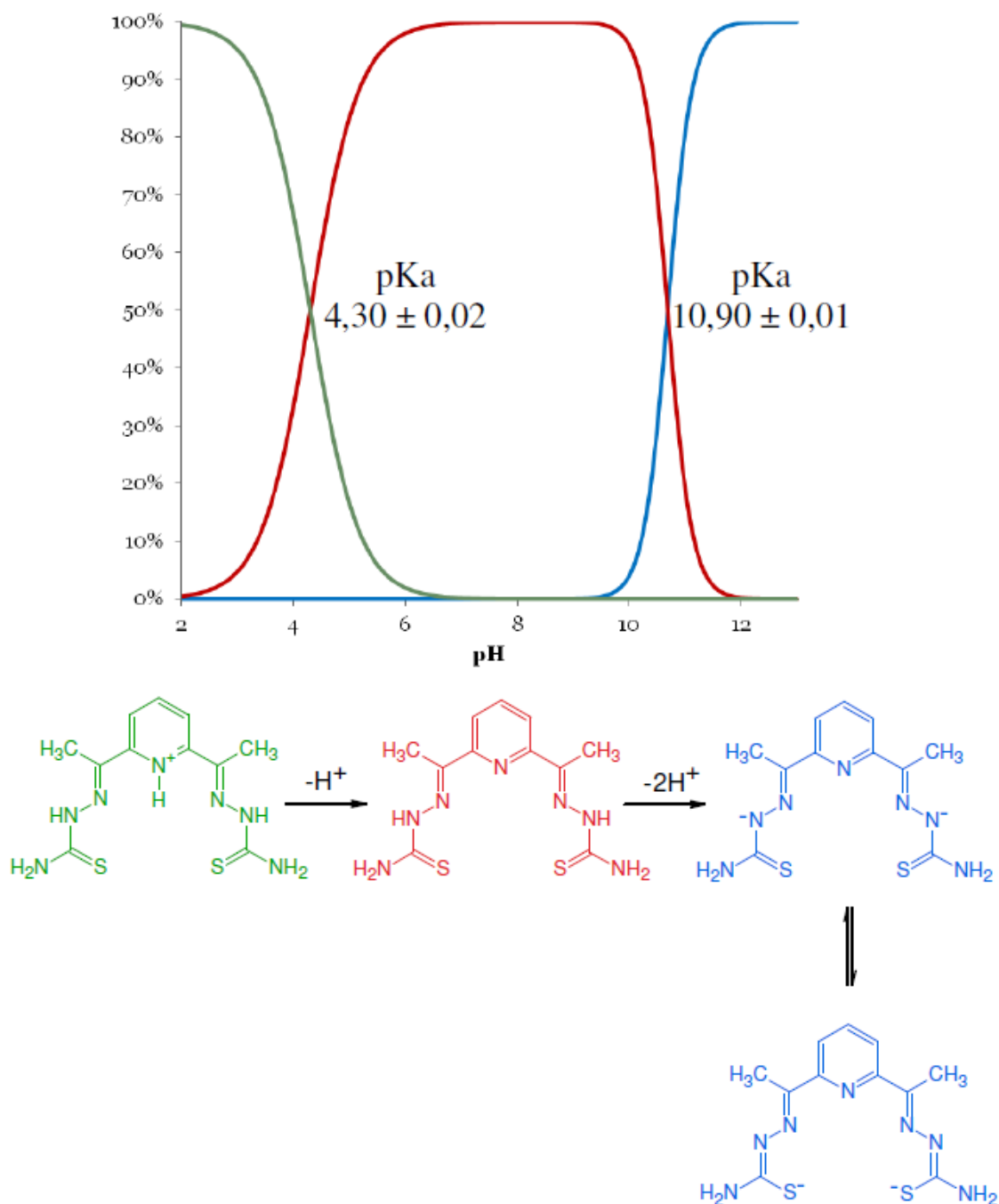


Figura 6.10. Estudo de especiação em solução para DAPT realizado na faixa de pH compreendida entre 2 e 12, [DAPT] = 40mM. Diagrama de especiação e valores de pKa obtidos por meio dos programas HySS2009 (Protonic Software, UK) e HypSpec (Protonic Software, UK), respectivamente.^{10,11}

6.3. Teste de turbidez (modelo *in vitro* da Doença de Alzheimer)

Um teste de turbidez por meio de medidas do espalhamento da luz a 405 nm foi utilizado para avaliar a capacidade dos derivados de 2,6 diacetil piridina de regular a agregação

de peptídeo βA_{1-40} induzida por metais. O teste foi feito apenas com DAPS, uma vez que DAPH e DAPT não foram solúveis nas condições do teste (5% v/v DMSO em tampão HEPES). Este teste fornece informações a respeito do grau de agregação do peptídeo em solução. O valor de pH do tampão utilizado para solubilizar o Cu(II) foi ajustado uma vez que a agregação induzida por cobre é otimizada em pH 6,6.² A Figura 6.11 mostra que DAPS inibiu significativamente a agregação induzida por Cu(II) e Zn(II) com relação ao controle negativo (peptídeo + metais). Além disso, não houve diferença significativa entre DAPS e o ácido dietilenotriamino pentacético (ADTP, controle positivo) com relação à agregação, sugerindo que ambos os compostos têm atividade inibitória equivalente nas condições do teste.

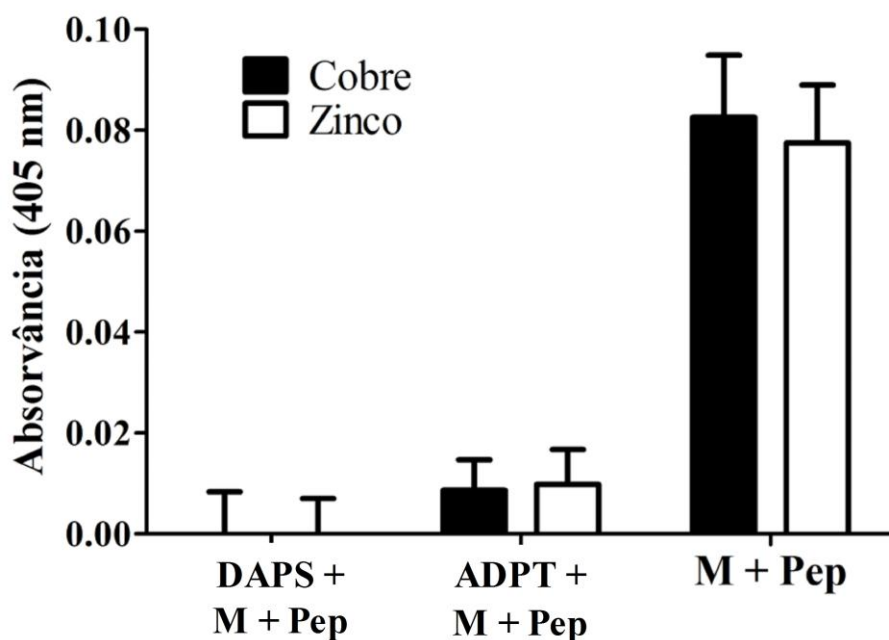


Figura 6.11. Grau de agregação do peptídeo $A\beta_{1-40}$ determinado por meio de espectroscopia UV-vis - Solução peptídica na presença de íons metálicos e ligantes. Os dados representam a média de absorvância de amostras em quadruplicata medidas a 405 nm. Valor de pH igual a 6,6 e 7,4 para Cu(II) e Zn(II), respectivamente. As barras de erro representam o desvio padrão do valor médio de absorvância. DAPS = 2,6 diacetilpiridina *bis*(semicarbazona), ADTP = ácido dietilenotriamino pentacético, controle positivo) e M + Pep = metal (Cu(II) ou Zn(II)) + peptídeo $A\beta_{1-40}$, controle negativo.

6.4. Microscopia eletrônica de transmissão (MET) - modelo *in vitro* da Doença de Alzheimer

Imagens de MET foram obtidas a fim de demonstrar visualmente a influência de DAPS na agregação do peptídeo induzida por metais, anteriormente demonstrada no teste de turbidez. As imagens estão mostradas nas Figuras 6.12 e 6.13.

Conforme a Figura 6.12, observou-se que a agregação do peptídeo na presença de Cu(II) (B) foi significativamente maior que para o peptídeo isolado (A), confirmando a influência de metais como Cu(II) na aceleração do processo de agregação de β A. O padrão de agregação do peptídeo na presença de DAPS (C) é similar ao do peptídeo isolado (A). Finalmente, agregação promovida pelo Cu(II) é claramente reduzida na presença de DAPS, sugerindo que DAPS, ao coordenar-se ao metal, evita a agregação *in vitro* do peptídeo.

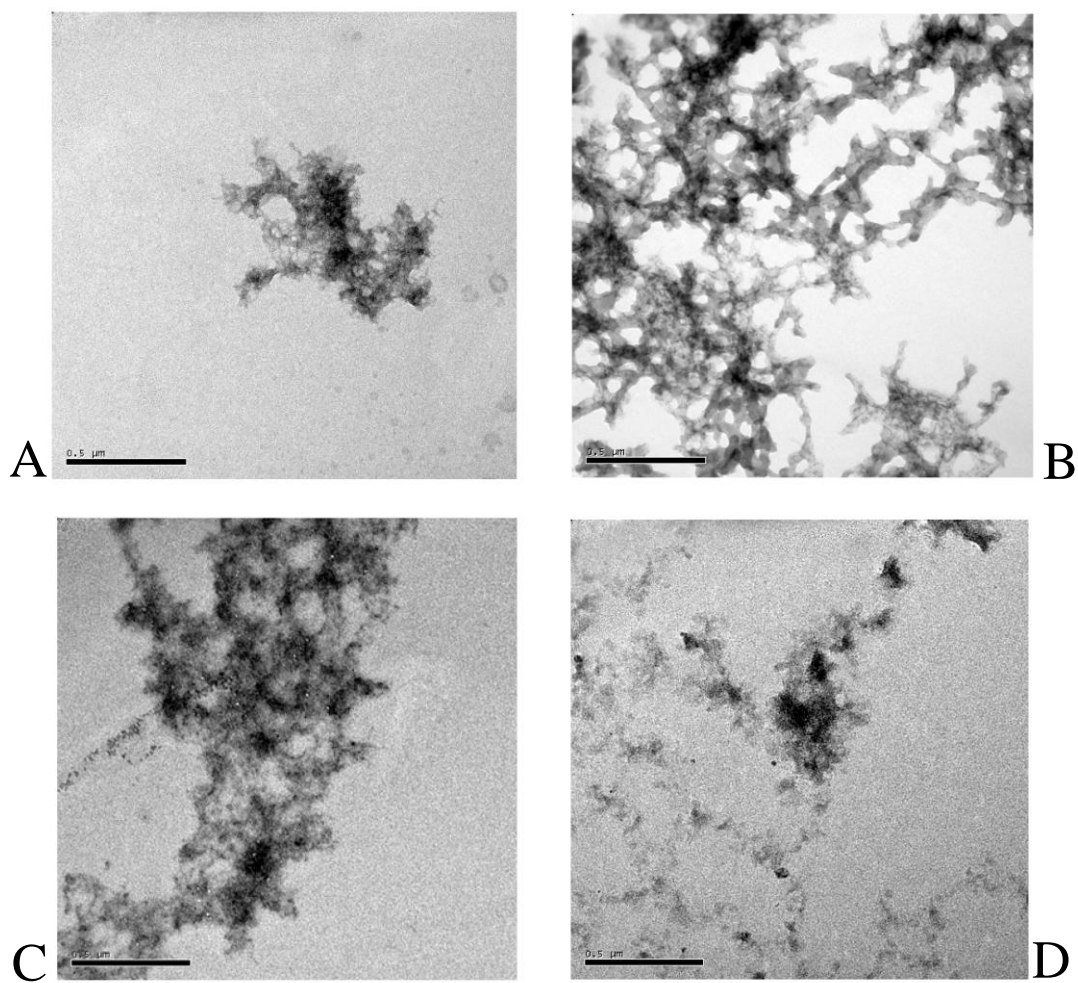


Figura 6.12. Imagens MET de amostras incubadas com 25 mM de β A₁₋₄₀, 25 mM de CuCl₂ e 50 mM de DAPS. As amostras foram incubadas por 24 horas a 37 °C. Peptídeo (A), Peptídeo+Cu(II) (B), Peptídeo+DAPS (C) e Peptídeo+DAPS+Cu(II) (D).

Simultaneamente, conforme a Figura 6.12, observou-se baixa influência de DAPS no processo de agregação do peptídeo promovido pelo Zn(II), não havendo diferença visualmente significativa entre as amostras Peptídeo+Zn(II) (B) e Peptídeo+DAPS+Zn(II) (D), sob as condições avaliadas. Estes resultados sugerem maior afinidade do agente quelante pelo Cu(II) quando comparado ao Zn(II).

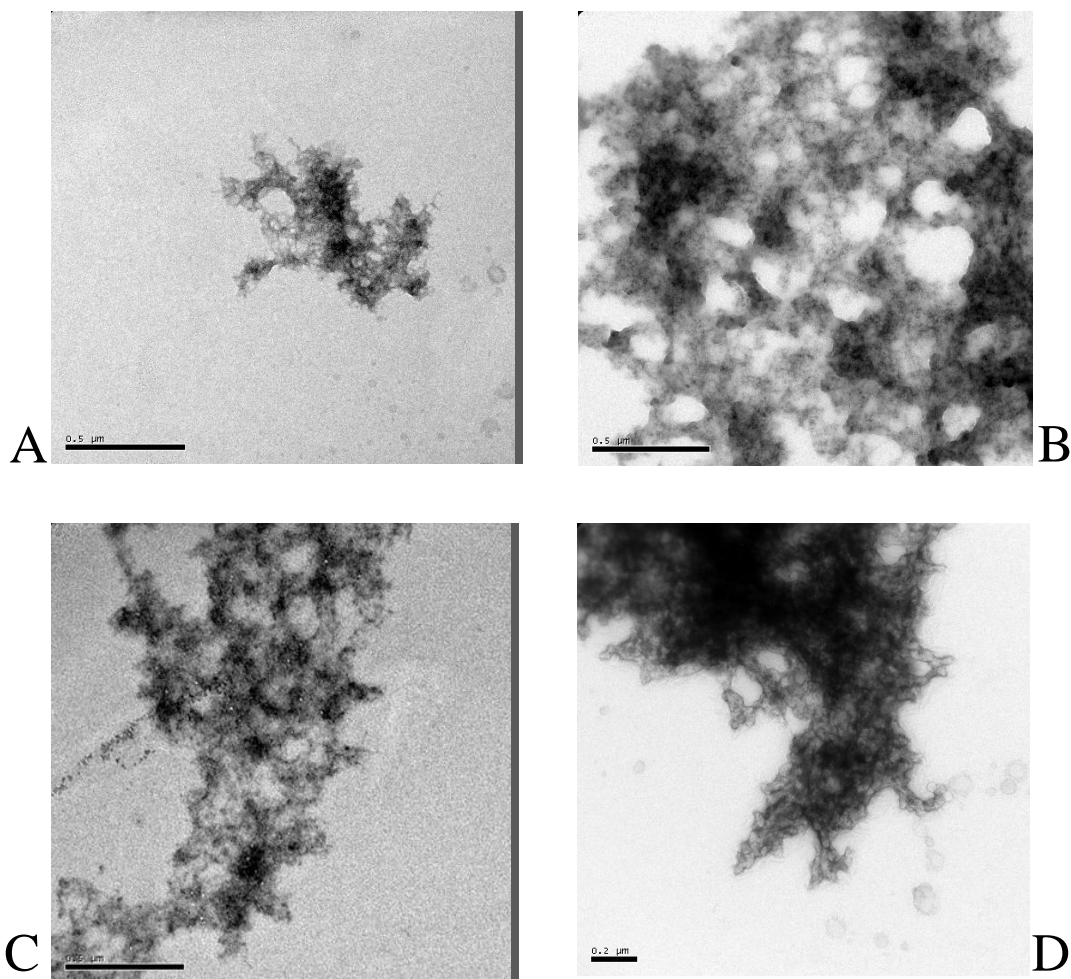


Figura 6.13. Imagens MET de amostras incubadas com 25 mM de βA_{1-40} , 25 mM de $ZnCl_2$ e 50 mM de DAPS. As amostras foram incubadas por 24 horas a 37 °C. Peptídeo (A), Peptídeo+Zn(II) (B), Peptídeo+DAPS (C) e Peptídeo+DAPS+Zn(II) (D).

Este trabalho, realizado em conjunto com a aluna de graduação Erika Ng, foi selecionado e premiado entre os trabalhos de graduação do Departamento de Química da Simon Fraser University, Canadá (08/2012), como descrito nos Anexos.

Os resultados aqui apresentados sugerem que DAPS é um promissor protótipo de fármaco para o tratamento da DA. Como mencionado anteriormente, os outros dois compostos, DAPH e DAPT, mostraram-se insolúveis nas condições do teste de turbidez. Desse modo, a avaliação das características físico-químicas dos protótipos, tais como solubilidade, é importante para o planejamento de novos compostos para a terapia da DA. Modificações nas estruturas de DAPH e DAPT visando um aumento de solubilidade poderiam constituir estratégia interessante.

Capítulo 7. Discussão e Conclusões

O presente trabalho consistiu no preparo, caracterização das propriedades físico-químicas e avaliação da atividade biológica de novos protótipos de fármacos para o tratamento de dor, inflamação, doença de Alzheimer e infecções causadas por fungos.

As seguintes semicarbazonas, análogas a benzaldeído semicarbazona (BS) foram obtidas: 2-, 3- e 4-hidroxibenzaldeído semicarbazona (2-, 3- e 4-OHBS). As propriedades físico-químicas desses isômeros de posição, obtidas por meio de resultados *in silico* e resultados experimentais, como o coeficiente de partição n-octanol/água, foram correlacionadas aos resultados experimentais e *in vivo*.

Os resultados da espectroscopia de RMN, dados cristalográficos disponíveis e os resultados do cálculo das energias dos isômeros conformacionais mais estáveis para BS, 2-OHBS, 3-OHBS e 4-OHBS nas configurações *Z* e *E*, empregando-se os métodos MMFF, DFT e MP2, estavam em conformidade com a proposta de que a configuração *E* era a mais estável para todos os compostos estudados. A partir dos descritores calculados para as configurações *E* dos compostos, 2-OHBS apresentou a mais baixa energia de LUMO, a mais alta contribuição do carbono imínico (C=N) ao LUMO total da molécula, a mais alta carga positiva no carbono imínico e a maior densidade eletrônica sobre N1, sendo a arilsemicarbazona mais suscetível ao ataque nucleofílico entre as moléculas avaliadas. A forma enamina, presente nos isômeros 2-OHBS e 4-OHBS em função dos equilíbrios tautoméricos, poderia interferir de forma significativa na susceptibilidade à hidrólise, permitindo sugerir que ambos compostos eram mais instáveis que os demais sob aspectos termodinâmicos. Simultaneamente, os valores de logP experimentais e calculados permitiram afirmar que BS e 2-OHBS são compostos mais hidrofóbicos que 3-OHBS e 4-OHBS, mais hidrofílicos. Estes resultados são condizentes com os cálculos teóricos das energias livres de Gibbs (ΔG) em meio aquoso.

Os isômeros 2-OHBS, 3-OHBS e 4-OHBS foram avaliados em protocolos *in vivo* de caracterização das atividades antinociceptivas e anti-inflamatórias, utilizando BS como controle positivo. No modelo de avaliação da resposta nociceptiva induzida por *Zymosan A* em camundongos, evidenciou-se que 2-OHBS foi o único composto entre os isômeros de posição a induzir efeito antinociceptivo estatisticamente significativo quanto comparado a BS. O resultado evidenciou ainda que 2-OHBS, em doses equimolares a BS, apresentou-se mais eficaz neste modelo de dor inflamatória. Paralelamente, o teste de atividade anti-inflamatória por meio da avaliação do edema em pata de rato induzido por carragenina mostrou novamente que 2-OHBS era o único dos três isômeros a apresentar efeitos anti-inflamatórios nas doses testadas, evitando a progressão do edema por meio de uma dose duas vezes superior à dose equimolar de BS.

Portanto, 2-OHBS apresentou-se como a única arilsemicarbazona ativa em ambos os modelos dentre os três isômeros avaliados.

Na avaliação da atividade antinociceptiva no modelo do formaldeído, o 2-OHBS inibiu apenas a segunda fase deste protocolo em sua maior dose (110 mg.kg⁻¹, i.p), caracterizando-o como um protótipo de fármaco com atividades anti-inflamatórias e analgésicas relacionadas a mecanismos periféricos, diferentemente de BS, ativo na primeira fase do modelo, ou seja, a fase neurogênica da dor.

Posteriormente, com o objetivo de correlacionar as atividades biológicas de BS e 2-OHBS à suscetibilidade de hidrólise dos compostos e às suas propriedades físico-químicas, avaliou-se a atividade da semicarbazida, um dos principais produtos de hidrólise das arilsemicarbazonas, nos modelos do edema em pata de rato e no modelo do formaldeído. A semicarbazida é um conhecido inibidor da proteína de adesão vascular-1 (VAP-1), expressa de forma significativamente aumentada em sítios inflamatórios.^{1,2,3} Assim, a administração de arilsemicarbazonas suscetíveis à hidrólise poderia resultar em efeitos anti-inflamatórios em função da liberação *in vivo* de semicarbazida.

O conjunto de resultados permitiu sugerir que a atividade periférica de BS, principalmente em modelos de dor aguda, estava relacionada à hidrólise parcial do composto, formando semicarbazida. Paralelamente, a semicarbazida não apresentou atividade na fase neurogênica do modelo, estando de acordo com os experimentos anteriores e reforçando a hipótese de que a atividade de BS na primeira fase estaria associada a um mecanismo não relacionado à hidrólise da semicarbazona. A atividade de BS na primeira fase foi atribuída à atividade intrínseca desta molécula ou de um de seus metabólitos não relacionados ao processo de hidrólise, diferenciando-a das demais arilsemicarbazonas avaliadas.

Portanto, de acordo com os resultados dos estudos teóricos, da determinação dos coeficientes de partição octanol-água e dos ensaios *in vivo* em modelos de dor e inflamação aguda, a atividade de BS na primeira fase pôde ser atribuída ao seu maior caráter lipofílico quando comparado a 3-OHBS e 4-OHBS e menor suscetibilidade à hidrólise quando comparado a 2-OHBS. Desta forma, BS caracterizou-se como o mais promissor candidato a fármaco dentre as semicarbazonas estudadas, em função das suas características físico-químicas e ação central. Ainda assim, suas propriedades devem ser aprimoradas a fim de se tornar um modelo ideal de fármaco entre compostos destinados ao tratamento da dor e inflamação.

¹ K. Jaakkola, T. Nikula, R. Holopainen, T. Vähäsilta, M. T. Matikainen, M. L. Laukkanen, R. Huupponen, L. Halkola, L. Nieminen, J. Hiltunen, S. Parviainen, M. R. Clark, J. Knuuti, T. Savunen, P. Kääpä, L. M. Voipio-Pulkki, S. Jalkanen, *Am. J. Pathol.* 157 (2000) 463.

² M. Salmi, G. G. Yegutkin, R. Lehvonen, K. Koskinen, T. Salminen, S. Jalkanen, *Immunity*, 14 (2001) 265.

³ M. Salmi, S. Jalkanen, *Trends Immunol.* 22 (2001) 211.

Em uma segunda etapa, foi avaliada a cinética de hidrólise de BS e 2-OHBS em meio gástrico simulado com o objetivo de relacionar os aspectos cinéticos aos termodinâmicos (cálculos teóricos) anteriormente discutidos. Além disso, avaliou-se a influência de um composto de inclusão utilizando β -ciclodextrina (β CD) na biodisponibilidade de BS após administração *per os*, na tentativa de elucidar resultados obtidos em estudos farmacocinéticos, que demonstraram anteriormente que a concentração de BS no plasma e no cérebro, administrado por via *per os* e na forma de BS β CD, era superior às mesmas concentrações obtidas para BS livre.⁴

A partir das velocidades iniciais de hidrólise calculadas para as BS e 2-OHBS em meio gástrico simulado, observou-se que a velocidade média de hidrólise de 2-OHBS foi aproximadamente quatro vezes superior à de BS, confirmando a tendência evidenciada nos cálculos teóricos apresentados no Capítulo 3 e permitiram sugerir que, termodinâmica e cineticamente, 2-OHBS era mais suscetível à hidrólise que BS.

Na avaliação da influência da β CD no processo de hidrólise de BS, observou-se que o polímero, na forma de composto de inclusão ou simplesmente misturado à solução da semicarbazona, expandiu o intervalo de confiança da velocidade da reação inicial de hidrólise de BS, sugerindo uma interferência no processo de hidrólise da semicarbazona, mesmo que apenas fisicamente. Conseqüentemente, após administração *per os*, esta interferência foi descrita como um fator crucial na diminuição da dose do fármaco necessária à atividade farmacológica⁵ e no conseqüente aumento da biodisponibilidade do composto.⁴

Uma terceira abordagem da atividade biológica de 2-, 3- e 4-OHBS envolveu o preparo, caracterização e avaliação da atividade biológica de complexos inéditos dos compostos com zinco(II) e gálio(III), considerando-se o potencial perfil antimicrobiano e anti-inflamatório de tais complexos metálicos. Apenas os complexos de 2-OHBS foram obtidos e caracterizados, sugerindo fórmulas mínimas equivalentes a $[\text{Zn}(\text{2OBS})\text{AcO}]$ e $[\text{Ga}_2(\text{2OBS})_3]$. Por meio de resultados de espectros eletrônicos, evidenciou-se a instabilidade dos compostos em meio aquoso em diferentes valores de pH.

Mesmo diante da aparente instabilidade em meio aquoso, os compostos foram avaliados quanto às suas atividades antifúngicas em diferentes cepas e isolados clínicos de *Candida* e *Trychophyton rubrum*. O composto $[\text{Zn}(\text{2OBS})\text{AcO}]$ não apresentou atividade significativa, ao passo que os resultados para $[\text{Ga}_2(\text{2OBS})_3]$ sugeriram que a atividade antifúngica do composto estava relacionada exclusivamente ao metal. Os resultados obtidos nas triagens e em testes de combinação com itraconazol confirmaram a atividade antifúngica do gálio(III). A investigação do mecanismo de ação gálio(III) em *Trychophyton rubrum*, frente a quatro cepas/isolados

⁴ M. Kaiser, F. J. Azeredo, F.T. Uchoa, H. Beraldo, T. Dalla Costa, Eur. J. Pharm. Sci., 18 (2010) 355.

⁵ L. R. Teixeira, R. D. Sinisterra, R. P. Vieira, M. C. Doretto, H. Beraldo, J. Incl. Phenom. Macro., 47 (2003) 77.

clínicos de *Trychophyton rubrum* na presença de concentrações crescentes de nitrato de ferro(III), evidenciou que o mecanismo de ação antifúngica do metal poderia estar relacionado à substituição de ferro(III) por gálio(III) ou ao bloqueio de mecanismos de oxi-redução ferro-dependentes. Esses resultados demonstraram, pela primeira vez na literatura, a atividade antifúngica do gálio(III) em *Trychophyton rubrum*, fungo responsável por cerca de 80-90% dos casos clínicos de dermatofitoses em todo o mundo.⁶

Finalmente, foram avaliadas as atividades de derivados de 2,6 diacetilpiridina em modelos *in vitro* da doença de Alzheimer (DA), em uma inédita abordagem da atividade biológica de tiossemicarbazonas, semicarbazons e hidrazonas em nosso grupo. Os compostos foram caracterizados quanto às suas propriedades físico-químicas, no estado sólido e em solução. Posteriormente, foi avaliada a capacidade dos compostos selecionados de inibir a agregação do peptídeo β A induzida por cobre(II) e zinco(II), um modelo *in vitro* da DA.

Os resultados dos testes de caracterização das propriedades físico-químicas demonstraram que 2,6 acetilpiridina semicarbazona (DAPS) e TSCv possuíam características satisfatórias à realização dos testes, tais como solubilidade nas condições do teste, capacidade quelante e perfil de especiação favorável à absorção. Os resultados dos testes de inibição da agregação do peptídeo β A₁₋₄₀ induzida pelos metais mostraram que ambos os compostos possuíam atividade inibitória nas condições do teste. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET) foram obtidas a fim de demonstrar visualmente a influência de DAPS e TSCv na agregação do peptídeo. Os resultados confirmaram a atividade anteriormente evidenciada pelo teste de turbidez.

Estes resultados demonstraram o potencial das semicarbazonas como agentes quelantes úteis na terapêutica da doença de Alzheimer. O mesmo potencial pode ser explorado no caso das tiossemicarbazonas e hidrazonas. Para isso, é necessário o aprimoramento de características dos compostos, tais como solubilidade e estabilidade, é parte importante do processo de estudo subsequente destes compostos como potenciais protótipos de fármacos.

Este trabalho é uma importante contribuição no estudo de bases de Schiff como ferramentas da Química Medicinal, ou seja, compostos potencialmente úteis no tratamento da dor, inflamação, doença de Alzheimer e infecções causadas por fungos.

⁶ C. Seebacher, J. P. Bouchara, B. Mignon, Mycopathologia, 166 (2008) 335

ANEXOS

Anexo 1 – Carta/certificado – premiação de graduação SFU



DR. TIM STORR
Assistant Professor
TEL: 778.782.8657
FAX: 778.782.3765
tim_storr@sfu.ca

September 17th, 2012

To whom it may concern,

I am writing this letter in support of Rafael Pinto Vicira, who has spent the last six months in my laboratory at Simon Fraser University pursuing the development of new therapeutic treatments for Alzheimer's disease. During this time Rafael has developed a series of molecules designed to bind metal ions, and in addition, interact with the amyloid-beta peptide. Rafael is a very hardworking graduate student and easily integrated into my group. As a part of his research Rafael also supervised a summer undergraduate research student. This student, Erika Ng, worked very well under Rafael's direction, and Erika won the undergraduate research prize at the end of the term for her project entitled "Multi-dentate Schiff-base Ligands for AD Therapy." Rafael was a very patient supervisor who took the time to explain concepts and experimental protocols, and I am very pleased to see him mentor in such a successful fashion. I have no doubt that Rafael will continue to succeed in a research environment, and he has shown considerable maturity as a scientist in my laboratory.

Sincerely,

Tim Storr

Anexo 2 – Artigos relacionados à tese



Original article

Influence of susceptibility to hydrolysis and hydrophobicity of arylsemicarbazones on their anti-nociceptive and anti-inflammatory activities

Rafael P. Vieira^a, Josane A. Lessa^a, Wallace C. Ferreira^a, Fernanda B. Costa^a, Leandro F.S. Bastos^b, Willian R. Rocha^a, Márcio M. Coelho^b, Heloisa Beraldo^{a,*}

^a Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil

^b Departamento de Produtos Farmacêuticos, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 July 2011

Received in revised form

18 January 2012

Accepted 24 January 2012

Available online 1 February 2012

Keywords:

Arylsemicarbazones

Benzaldehyde semicarbazone

Semicarbazide

Hydrolysis

Nociception

Inflammation

ABSTRACT

Benzaldehyde semicarbazone (BS) inhibited zymosan writhing response, carrageenan paw edema and both phases of formaldehyde nociceptive response. 2-hydroxybenzaldehyde semicarbazone (2-OHBS) and semicarbazide inhibited carrageenan paw edema and the second phase of formaldehyde nociceptive response. 2-OHBS inhibited zymosan writhing response. 3- and 4-OHBS did not show such activities. 2-OHBS showed the lowest LUMO energy, the highest contribution of the iminic carbon to LUMO energy, the highest positive charge on the iminic carbon, the highest negative charge on the iminic nitrogen and the highest susceptibility to hydrolysis. Hence semicarbazide may play important roles in 2-OHBS's activities. Inhibition of the first phase of formaldehyde response by BS could be attributed to its higher hydrophobicity and lower susceptibility to hydrolysis in comparison to 2-OHBS.

© 2012 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Arylsemicarbazones present a wide range of pharmacological activities as anticonvulsant [1–4], anti-nociceptive, anti-inflammatory [5] and anti-trypanosomal [6,7] agents. However, few studies report on their putative mechanisms of action and also on how the different physicochemical properties and pharmacological activities of arylsemicarbazones are correlated.

Since hydrolysis of semicarbazones through nucleophilic attack on the iminic bond (C=N) is well-known [8,9], formation of semicarbazide is highly expected. Primary amines such as semicarbazide have been shown to inhibit vascular adhesion protein-1, also called semicarbazide-sensitive amino-oxidase (SSAO), an enzyme involved in inflammatory processes, mostly in lymphocyte migration [10].

We have previously demonstrated the activities of benzaldehyde semicarbazone (BS) in experimental models of pain and inflammation [5]. In the present study we extended this investigation to 2- (2-OHBS), 3- (3-OHBS) and 4-hydroxybenzaldehyde semicarbazone (4-

OHBS) as well as to the immediate product of their hydrolysis, semicarbazide (see Fig. 1), aiming to determine how susceptibility to hydrolysis and hydrophobicity of the arylsemicarbazones influence their anti-nociceptive and anti-inflammatory activities. Theoretical calculations were carried out to determine the arylsemicarbazones' physicochemical and electronic properties which contribute to their susceptibility to nucleophilic attack.

2. Results and discussion

2.1. Formation of arylsemicarbazones

Microanalyses were compatible with the formation of BS, 2-OHBS, 3-OHBS and 4-OHBS. Determined melting ranges for compounds were 216.4–218.0 (BS), 222.2–223.1 (2-OHBS), 197.0–197.8 (3-OHBS) and 225.4–225.9 (4-OHBS).

2.2. Spectroscopic characterization

The ¹H NMR spectra of all arylsemicarbazones (DMSO-*d*₆) showed the presence of only one signal for each hydrogen. Correlations between *H*₇ and *N*₂*H* were found in the NOESY (Nuclear Overhauser Spectroscopy) spectra of the studied compounds (see Figs. 2 and 3). Since this correlation is only possible for the *E* isomer,

Abbreviation: LUMO, Lowest Unoccupied Molecular Orbital.

* Corresponding author. Tel.: +55 31 3409 5740; fax: +55 31 3409 5700.

E-mail address: hberaldo@ufmg.br (H. Beraldo).

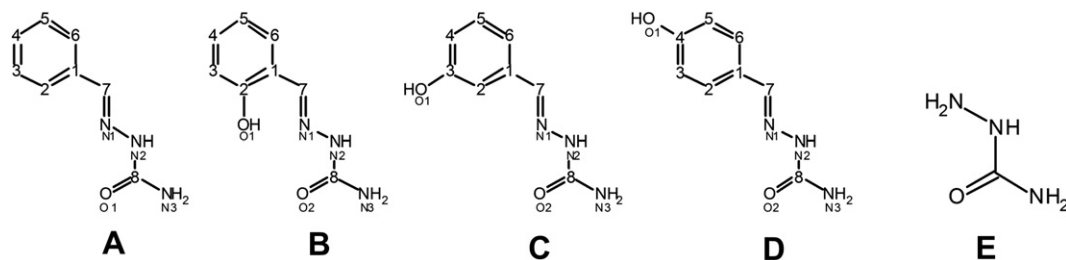


Fig. 1. A (BS), B (2-OHBS), C (3-OHBS), D (4-OHBS) and (E) Semicarbazide.

the presence of only the *E* form was suggested for all arylsemicarbazones in the DMSO- d_6 solution.

2.3. Structural results

Crystal structures of BS [3], 2-OHBS [11] and 4-OHBS [12] revealed that the compounds are in the *E* configuration. In order to analyze the most stable conformations arising from the *E* and *Z* configurations, a conformational analysis of BS, 2-OHBS, 3-OHBS and 4-OHBS was performed by means of the Merck Molecular Force Field (MMFF). The calculated energies are shown in Table 1. As it can be seen, in all cases the *E* isomer is more stable (in some cases more than 8 kcal mol⁻¹) than the *Z* isomer. These results suggest that the *E* configuration of the arylsemicarbazones is the most probable, which is in line with the NMR and crystallographic data, and provide support to the use of only the *E* isomers in the calculation of the physicochemical and electronic properties of the compounds.

2.4. Theoretical calculations of physicochemical and electronic properties

Calculated physicochemical and electronic properties in vacuum and in aqueous solution for the *E* isomers of BS, 2-OHBS, 3-OHBS and 4-OHBS are reported in Tables 2 and 3. These properties did

not change markedly from gas phase to aqueous solution. According to the results, 2-OHBS showed the lowest LUMO energy and the highest contribution of the iminic carbon (C=N) to the LUMO orbital in comparison with the other arylsemicarbazones. Additionally, 2-OHBS exhibited the highest positive charge (qC) on the iminic carbon (C7) and the highest negative charge (qN) on the iminic nitrogen (N1). Thus, among the arylsemicarbazones, 2-OHBS is in principle the most susceptible to nucleophilic attack.

2-OHBS and 4-OHBS show an enamine-imine tautomeric equilibrium (Fig. 4) which is absent in the other arylsemicarbazones [9]. Although the imine form predominates, small amounts of the enamine form in solution could be sufficient to promote increased hydrolysis of 2-OHBS and 4-OHBS. The calculated physicochemical and electronic properties of the arylsemicarbazones reported in Tables 2 and 3 reveal that the enamine form of both semicarbazones exhibited lower LUMO energy than the imine form and that the contribution of the carbon (C7) to the total LUMO orbital was higher in the enamine form than in its tautomer for both arylsemicarbazones. Moreover, the enamine form has a higher positive charge on the carbon (C7) and a higher electronic density at the nitrogen (N1) in comparison with the imine form. Hence, the contribution of the enamine tautomer to the hydrolysis of 2-OHBS and 4-OHBS might be significant in spite of its lower concentration in comparison with the imine form.

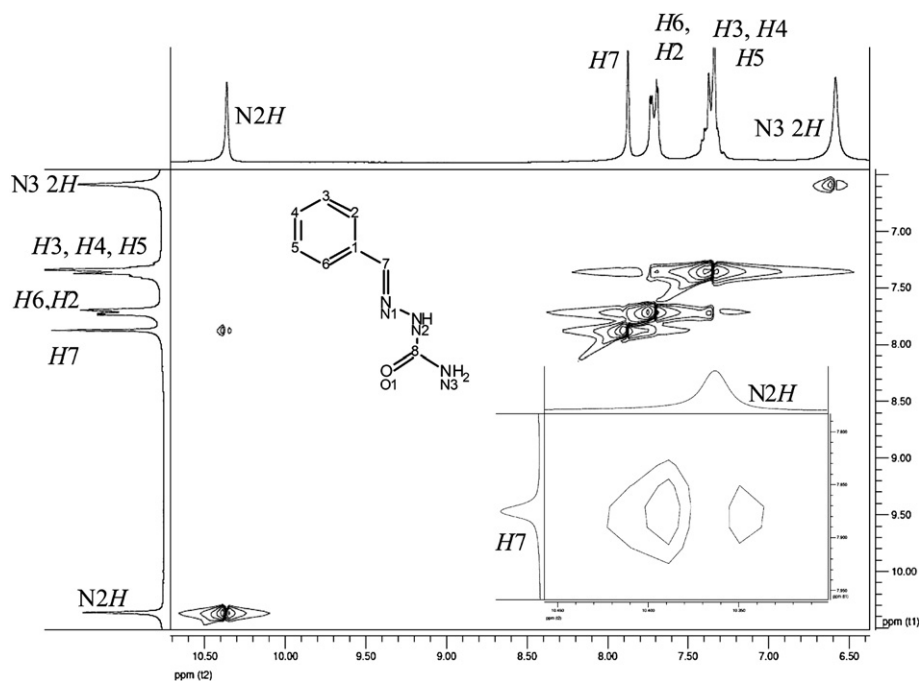


Fig. 2. NOESY spectrum (200 MHz) of BS in DMSO- d_6 . Inset: correlation between N2H and H7.

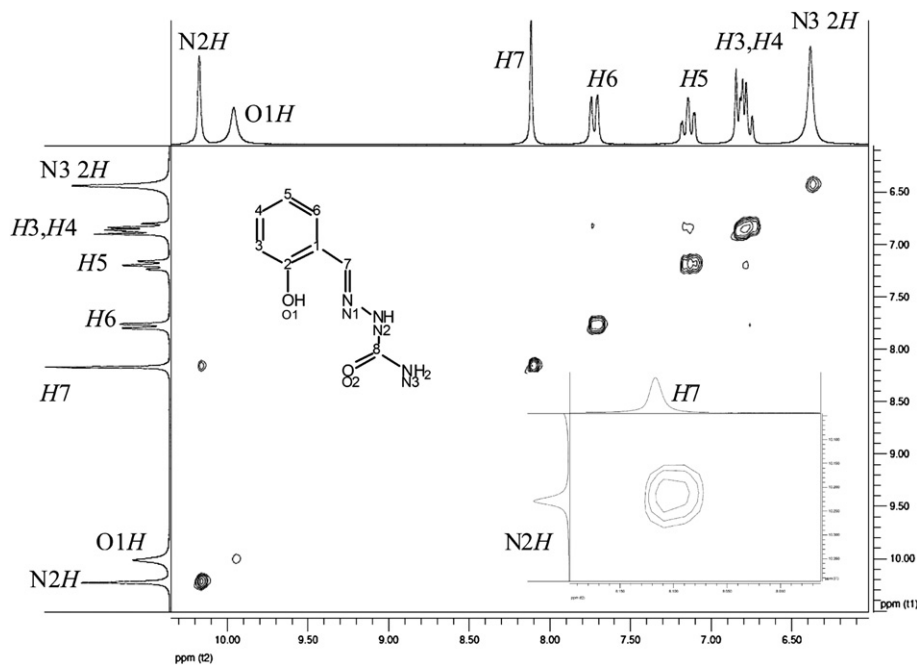


Fig. 3. NOESY spectrum (200 MHz) of 2-OHBS in DMSO- d_6 . Inset: correlation between N2H and H7.

The equilibrium constant K for the imine-enamine interconversion in aqueous solution was calculated for both 2-OHBS and 4-OHBS (see Fig. 4). We found $K = 4.84 \times 10^{-11}$ for 2-OHBS and $K = 1.24 \times 10^{-15}$ for 4-OHBS, indicating that formation of the enamine tautomer is preferred in 2-OHBS in comparison to 4-OHBS. This difference can be due to the O(1)-H...N(1) intramolecular hydrogen bond which occurs in 2-OHBS [12] but not in 4-OHBS. This hydrogen bond also accounts for the higher positive charge on the iminic carbon of 2-OHBS in comparison to the other arylsemicarbazones and, consequently, for the higher susceptibility of 2-OHBS to nucleophilic attack.

3-OHBS and 4-OHBS presented more favorable Gibbs free energy of solvation (Table 3) than BS and 2-OHBS, implying that these compounds have higher affinity for the aqueous medium in comparison with BS and 2-OHBS. However, it is noteworthy that the enamine forms of 2-OHBS and 4-OHBS showed more favorable free energy of solvation in comparison with their tautomers. Hence the enamine form of 2-OHBS contributes to an increased susceptibility of the compound to the nucleophilic attack.

Fig. 5 shows the LUMO density distributions in aqueous medium for BS, 2-OHBS, 3-OHBS and 4-OHBS (imine and enamine forms). In all cases, the LUMO densities on carbon C7 were clearly higher in comparison with the other atoms, in accordance with higher susceptibility of this carbon to nucleophilic attack in water. In the enamine forms of 2-OHBS and 4-OHBS the LUMO density on C7 is

not shared with the adjacent aromatic carbon, supporting again the higher susceptibility of this tautomeric form to nucleophilic attack.

From the calculated values of $\log K$ n-octanol/water (ALOGPS 2.1 software, Table 4) the order of hydrophobicity was BS > 2-OHBS > 3-OHBS > 4-OHBS, which corresponds to the order of Gibbs free energies of solvation.

The same order was obtained from the experimental values of $\log K_{ow}$. Theoretical calculations of $\log K_{ow}$ were also performed for semicarbazide, a product of the hydrolysis of the arylsemicarbazones. Semicarbazide does not exhibit absorbance in the UV range. In addition, this compound is too hydrophilic, as inferred from the theoretical value of $\log K_{ow}$ (-1.98 ± 0.31) for the compound. Therefore, the experimental determination of its $\log K_{ow}$ by the shake flask method was not carried out [13].

2.5. Pharmacological activities

Since BS (0.31 mmol/kg, i.p.) had its pharmacological activities characterized in experimental models of pain, inflammation and angiogenesis [5], it was established as positive control in the

Table 2

Calculated electronic properties in vacuum for the *E* isomers of BS, 2-OHBS, 3-OHBS and 4-OHBS and the enamine forms of 2-OHBS and 4-OHBS.

Compound	E_{LUMO} (eV) ^a	LUMO atomic contribution (%) ^b	Atomic charge (a.u.)	
			q C	q N
BS	2.15	11.95	0.055	-0.263
2-OHBS	2.01	16.61	0.071	-0.310
2-OHBS enamine	1.37	32.42	0.156	-0.419
3-OHBS	2.14	11.81	0.061	-0.267
4-OHBS	2.38	13.98	0.055	-0.267
4-OHBS enamine	1.36	34.09	0.108	-0.461

^a Calculated energies of the LUMO orbital.

^b Contributions of the iminic carbon (C=N) in LUMO. The percentage was calculated as $(\sum c^2(\text{C electrophilic})/\sum c^2(\text{all atoms})) \times 100$, being c the coefficients of the LUMO orbital.

Table 1

MMFF calculated energies for the most stable conformers of BS, 2-OHBS, 3-OHBS and 4-OHBS.

Compound	Energy (kcal mol ⁻¹)	
	Configuration	
	<i>E</i>	<i>Z</i>
BS	-11.19	-3.19
2-OHBS	-14.53	-5.32
3-OHBS	-26.11	-17.79
4-OHBS	-25.09	-16.38

Table 3Calculated physicochemical and electronic properties in aqueous solution for the *E* isomers of BS, 2-OHBS, 3-OHBS and 4-OHBS and the enamine forms of 2-OHBS and 4-OHBS.^a

Compound	$E_{\text{LUMO}}(\text{eV})^b$	LUMO atomic contribution (%) ^c	Atomic charge (u.a.)		$\Delta G_{\text{solvation}}(\text{kcal.mol}^{-1})$
			q C	q N	
BS	2.33	12.04	0.048	-0.263	-13.63
2-OHBS	2.24	14.93	0.063	-0.310	-14.67
2-OHBS enamine	1.63	29.83	0.176	-0.419	-19.84
3-OHBS	2.32	12.06	0.055	-0.280	-19.69
4-OHBS	2.59	14.50	0.050	-0.281	-20.29
4-OHBS enamine	1.68	32.99	0.139	-0.438	-32.10

^a All values were obtained using the Polarizable Continuum Model (PCM).^b Calculated energies of the LUMO orbital.^c Contributions of the iminic carbon (C=N) in LUMO. The percentage was calculated as $([\sum c^2(\text{C electrophilic})/\sum c^2(\text{all atoms})] \times 100)$, being c the coefficients of the LUMO orbital.

protocols to evaluate the anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of 2-OHBS, 3-OHBS and 4-OHBS. Initially, arylsemicarbazones were injected at two different doses (0.31 or 0.62 mmol/kg, i.p.).

Zymosan A induced a nociceptive response in mice that started a few minutes after injection and was characterized by abdominal and hind limb stretching (Fig. 6). There was a partial inhibition of the nociceptive response in animals treated with 3-OHBS and 4-OHBS at 0.31 or 0.62 mmol/kg, i.p., but the differences did not reach statistical significance. On the other hand, either 0.31 or 0.62 mmol/kg, i.p. doses of 2-OHBS markedly inhibited zymosan writhing response (Fig. 6). As there was a tendency to a greater activity of 2-OHBS compared with BS at 0.31 mmol/kg, i.p., in the next experiment the effects induced by a lower dose of BS and 2-OHBS (0.16 mmol/kg, i.p.) was investigated. The dose of 0.12 mmol/kg of 2-OHBS, corresponding to 75% of 0.16 mmol/kg, was included in this experiment to determine the lowest dose necessary to induce the effect. The results showed that 0.16 mmol/kg of 2-OHBS is the lowest effective dose of the compound to inhibit the nociceptive response induced by zymosan, whereas the corresponding dose of BS was inefficacious (Fig. 7). Concluding, 2-OHBS showed greater activity in this inflammatory pain model compared to BS.

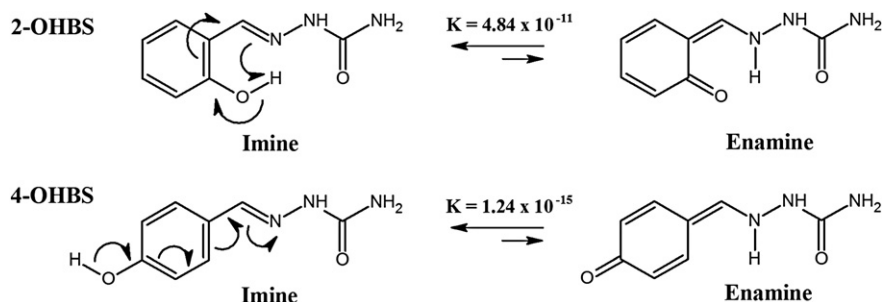
Since 2-OHBS exhibited activity in an experimental model of inflammatory pain, the compound was also evaluated in a model that presents both a nociceptive and an inflammatory profile. The nociceptive response induced by formaldehyde exhibits two distinct phases. The first phase is associated with direct activation by formaldehyde of transient receptor potential ankyrin-1 receptors which are present in nociceptors [14]. The second phase of this nociceptive response, markedly inhibited by anti-inflammatory drugs [15], is associated with the development of an

inflammatory response triggered by many mediators such as interleukin (IL)-1 β , IL-6, IL-8, tumor-necrosis factor (TNF)- α [16], eicosanoids and nitric oxide [17,18].

Fig. 8 shows that BS (0.31 mmol/kg, i.p.) inhibited both the first and second phases of the nociceptive response induced by formaldehyde whereas 2-OHBS (0.62 mmol/kg, i.p.) inhibited only the second phase. These results indicate 2-OHBS as an anti-inflammatory drug prototype, inhibiting mainly the peripheral nociceptive processing. On the other hand, BS, as already demonstrated [5], presented a wider profile inhibiting both the peripheral and central nociceptive processing.

In addition to investigating the activity of the arylsemicarbazones in experimental models of pain, we also investigated their effects in a well-known experimental model of inflammation, carrageenan paw edema in rats. Carrageenan induced a marked edema that was evident 2 h after injection and lasted for at least 6 h. Among the arylsemicarbazones, only BS (0.31 mmol/kg, i.p.) and 2-OHBS (0.62 mmol/kg) inhibited carrageenan paw edema. The effect induced by BS and 2-OHBS was observed at 2 h after injection of the inflammatory stimulus, but did not last the whole period of evaluation (Fig. 9). The highest dose of 2-OHBS (0.62 mmol/kg) exhibited activity equivalent to BS 0.31 mmol/kg. Contrary to what was observed in the model of zymosan writhing response, the activity of 2-OHBS was not superior to that of BS in the model of carrageenan paw edema. This difference may be attributed to pharmacokinetic differences between mice and rats and also to intrinsic factors associated with each model. The inhibitory effect of 2-OHBS on edema corresponds to the inhibition of the second phase of the nociceptive response induced by formaldehyde, thus providing further support to its anti-inflammatory profile.

The effect induced by the highest dose of 2-OHBS (0.62 mmol/kg, i.p.) on the motor coordination of mice was also investigated.

**Fig. 4.** Tautomeric equilibrium of compounds 2-OHBS and 4-OHBS.

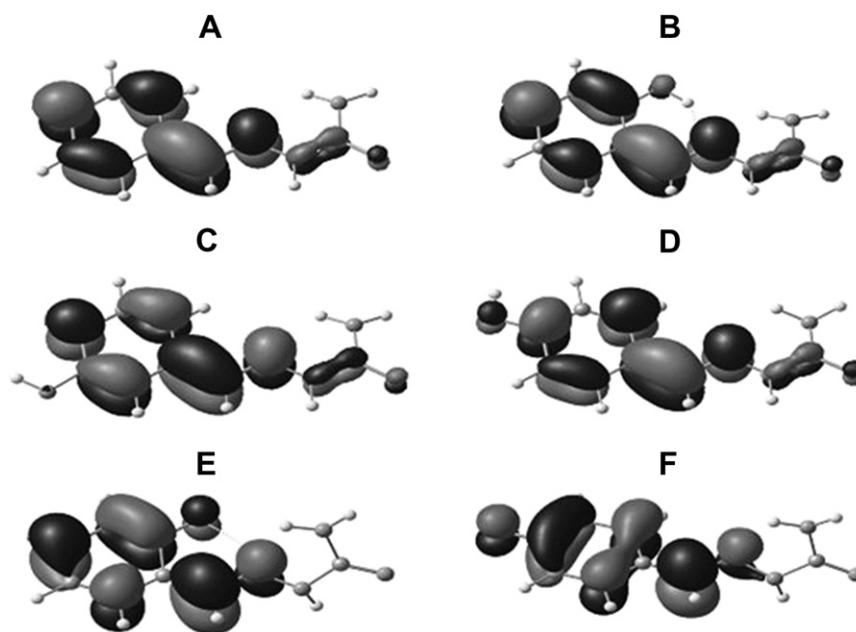


Fig. 5. LUMO densities distribution for BS (A), 2-OHBS (B), 3-OHBS (C), 4-OHBS (D), 2-OHBS enamine (E) and 4-OHBS enamine (F) in aqueous medium. Positive (dark gray) and negative (light gray).

Fig. 10 shows that 2-OHBS did not affect the time mice spent in the rota-rod. This result is important to demonstrate that the effect induced by 2-OHBS in the experimental models of pain represents a genuine anti-nociceptive effect without confounding effect on motor coordination or muscle tone.

During inflammation, lymphocyte migration plays an important role and is mediated by endothelial cells activation by well-characterized biomolecules, such as SSAO [10]. SSAO cloning showed that it belongs to amino-oxidases family, identical to a copper-containing amino-oxidase associated to cell membrane [19,20]. This enzyme converts primary amines to aldehydes, releasing ammonia and hydrogen peroxide [21]. SSAO is mainly expressed in vascular smooth muscle, endothelial cells of lymphatic organs, liver, cerebral microcirculation and adipocytes [22]. Cell surface expression of SSAO is significantly increased in inflammatory sites [23–25]. It has been recently shown that SSAO plays an important role in the inflammatory response and specific inhibitors of this enzyme are promising tools in the development of new anti-inflammatory agents [22,26]. Since SSAO can be inhibited by primary amines such as semicarbazide [27], it is suggested that 2-OHBS presented the highest anti-inflammatory activity among the isomers due to its higher susceptibility to hydrolysis and thus increased generation of semicarbazide.

Aldehydes and semicarbazide are probably immediate metabolites produced after hydrolysis of arylsemicarbazones [8]. To investigate whether the activities of BS and 2-OHBS could be related to the products of arylsemicarbazones' hydrolysis, we evaluated the activities of benzaldehyde (an immediate metabolite of BS) and semicarbazide in experimental models of pain and inflammation.

Semicarbazide and benzaldehyde were tested in doses equimolar to BS (0.31 mmol/kg). Fig. 11A shows that semicarbazide, but not benzaldehyde, inhibited the second phase of formaldehyde nociceptive response. The second phase of this response was also inhibited by the association of equimolar doses of semicarbazide and benzaldehyde. A higher dose of semicarbazide (0.62 mmol/kg) abolished the second phase of the formaldehyde nociceptive response, but did not change the first phase (Fig. 11B). These results suggest that the peripheral activity of BS may be related to partial hydrolysis of the compound with production of semicarbazide. As BS, but not semicarbazide, inhibited the first phase of the formaldehyde nociceptive response, it is suggested that inhibition of the first phase is due to the intrinsic activity of BS or other metabolites not related to the hydrolysis process. Similarly to what was observed for BS and 2-OHBS, the activity of semicarbazide was not associated with effect on motor coordination (Fig. 10).

Semicarbazide also inhibited the carrageenan paw edema (Fig. 12). The effect induced by semicarbazide (0.31 and 0.62 mmol/kg) was equivalent to that induced by BS 0.31 mmol/kg 2 h after injection of carrageenan. However, the effect induced by semicarbazide lasted longer than that induced by BS. To our knowledge, information about semicarbazide's pharmacokinetics is unknown. However, the sustained effect induced by semicarbazide may be associated with a longer elimination half-life when compared with that of BS. Altogether, the effects induced by semicarbazide in the experimental models of pain and inflammation suggest that this compound may contribute to the anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of arylsemicarbazones.

Table 4
Calculated (ALOGPS 2.1 software) and experimental logK n-octanol/water for BS, 2-OHBS, 3-OHBS and 4-OHBS and calculated logK n-octanol/water for semicarbazide.

Method	log K_{ow}				
	BS	2-OHBS	3-OHBS	4-OHBS	Semicarbazide
ALOGPS 2.1	1.14 ± 0.19	0.88 ± 0.36	0.78 ± 0.20	0.75 ± 0.28	-1.98 ± 0.31
Experimental	0.91 ± 0.06	0.85 ± 0.02	0.43 ± 0.06	0.31 ± 0.06	–

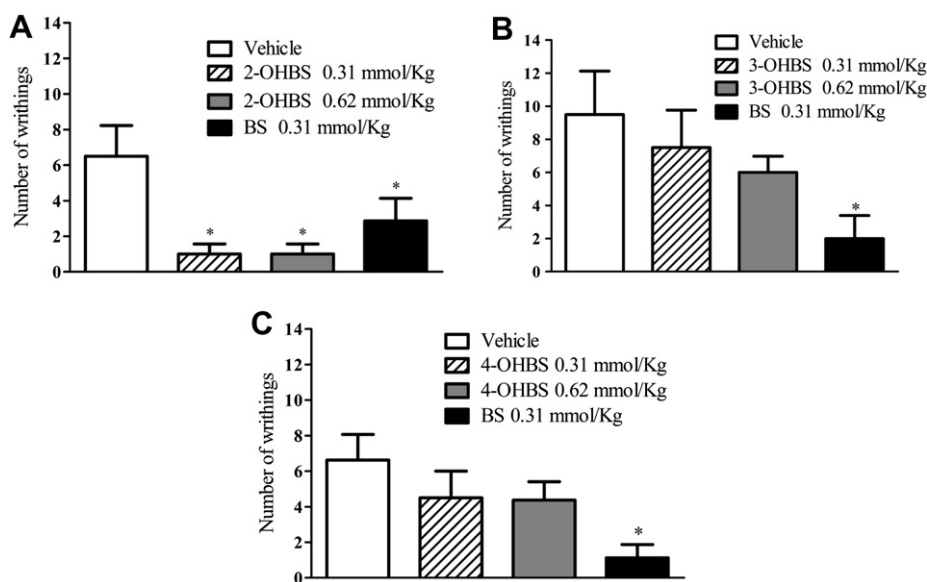


Fig. 6. Effects of BS (0.31 mmol/kg) and 2-OHBS, 3-OHBS and 4-OHBS (A, B and C, respectively; 0.31 and 0.62 mg/kg), i.p., –30 min, on the nociceptive response induced by zymosan (i.p., 40 mg/kg) in mice. $n = 8$. * indicates statistically significant difference in comparison with vehicle, $p < 0.05$.

3. Conclusion

BS inhibited the zymosan writhing response, the carrageenan paw edema and both phases of the formaldehyde nociceptive response. 2-OHBS and semicarbazide inhibited the carrageenan paw edema and only the second phase of formaldehyde nociceptive response. 2-OHBS also inhibited zymosan writhing response. Neither 3-OHBS nor 4-OHBS exhibited such activities.

2-OHBS showed the lowest LUMO energy and the highest contribution of the iminic carbon (C=N) to the LUMO orbital in comparison with the other arylsemicarbazones. Additionally, 2-OHBS exhibited the highest positive charge (qC) on the iminic carbon (C7) and the highest negative charge (qN) on the iminic nitrogen (N1). The enamine forms of both 2-OHBS and 4-OHBS also presented these same properties. The equilibrium constant for the imine–enamine inter-conversion in aqueous solution for 2-OHBS was much higher than that of 4-OHBS, indicating that among all arylsemicarbazones, 2-OHBS is in principle the most susceptible to nucleophilic attack.

As 2-OHBS is the arylsemicarbazone most susceptible to hydrolysis, semicarbazide may play an important role in the observed activities of this compound. Inhibition of the first phase of formaldehyde nociceptive response by BS could be attributed to its higher hydrophobicity and lower susceptibility to hydrolysis in comparison

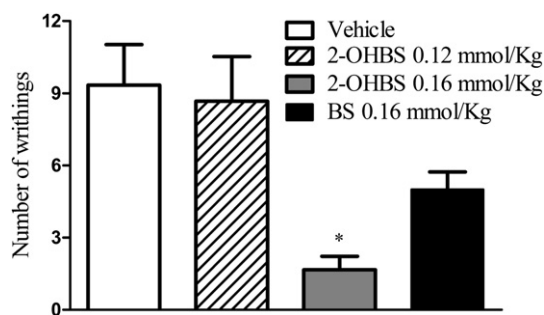


Fig. 7. Effects of BS (0.16 mmol/kg), and 2-OHBS (0.12 and 0.16 mmol/kg), i.p., –30 min, on the nociceptive response induced by zymosan (i.p., 40 mg/kg) in mice. $n = 6$. * indicates statistically significant difference in comparison with vehicle, $p < 0.05$.

to 2-OHBS. The higher hydrophobic profile of BS in comparison to that of 2-OHBS could contribute to a wider distribution of the compound in the central nervous system. Moreover, lower susceptibility of BS to hydrolysis in comparison to 2-OHBS could result in higher concentrations of the compound reaching the central sites. Thus, it is suggested that BS or one of its metabolites not related to hydrolysis could reach biological sites more significantly than the other studied arylsemicarbazones and consequently exert a greater effect on the central nociceptive processing.

4. Experimental

4.1. Chemistry

All reagents were purchased from Sigma–Aldrich and used without further purification. All other chemicals and solvents were of analytical grade. NMR spectra were obtained with a Bruker DPX-200 Avance (200 MHz) spectrometer using DMSO- d_6 as the solvent and TMS as internal reference.

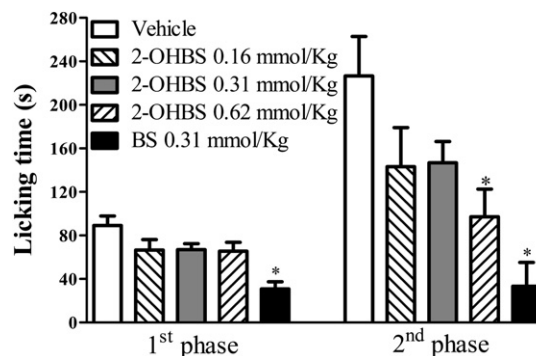


Fig. 8. Effects of BS (0.31 mmol/kg) and 2-OHBS (0.16, 0.31 and 0.62 mmol/kg), i.p., –30 min, on the formaldehyde-induced nociceptive response (s.c., 1%, 20 μ L) in mice. $n = 5–6$. * indicates statistically significant difference in comparison with vehicle, $p < 0.05$.

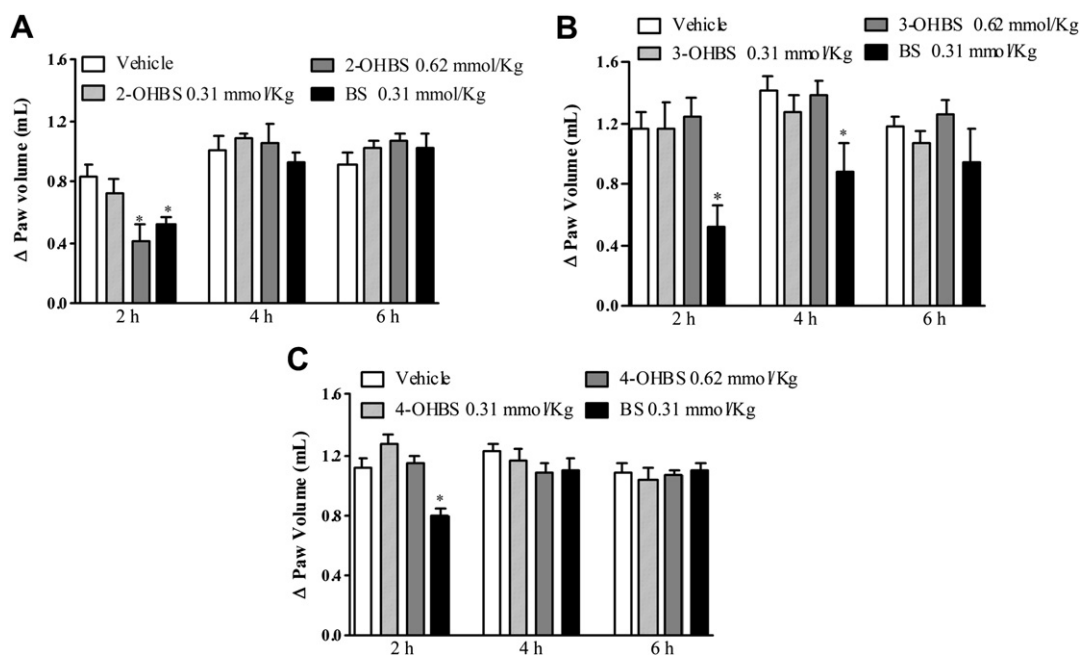


Fig. 9. Effects of BS (0.31 mmol/kg) and 2-OHBS, 3-OHBS and 4-OHBS (A, B and C, respectively; 0.31 and 0.62 mmol/kg), i.p., –30 min, on the carrageenan-induced paw edema in rats (1%, 50 μ l, i.p.). Paw volumes were measured 2, 4 and 6 h after stimulus injection. $n = 5$. * indicates statistically significant difference in comparison with vehicle, $p < 0.05$.

4.1.1. Preparation of the arylsemicarbazones

Arylsemicarbazones were prepared as described in the literature [28]. Their purities were confirmed by their melting range and NMR spectra.

4.1.2. Theoretical calculations

Conformational analysis of the arylsemicarbazones were performed using the Merck Molecular Force Field (MMFF) [29] implemented in the Tinker Molecular Modeling Program [30]. For all the compounds the *E* and *Z* isomers were analyzed. The minimum energy structures of the isomers of the compounds obtained in the conformational analysis step were further optimized at the Density Functional Theory [31] level, employing the hybrid B3LYP [32,33] exchange-correlation functional and using the 6-31G(d) all electron basis set [34,35] for all atoms. The optimized geometries were compared with the crystal data available in the literature [3,11,12]. In order to have better properties and energetic results, single point energy calculations at the second order Møller-Plesset perturbation theory level [36,37] were then performed on the optimized B3LYP/6-31G(d) structures, using the same basis set (MP2/6-31G(d)//B3LYP/6-31G(d)). The charge distribution on the most stable

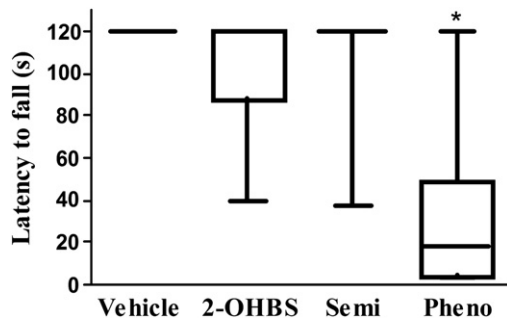


Fig. 10. Effects induced by 2-OHBS (0.62 mmol/kg), semicarbazide (Semi, 0.62 mmol/kg) and phenobarbital (Pheno, 0.16 mmol/kg), on the time mice spent on the rotating rod (14 r.p.m.; 120 s cutoff time; drugs were given via i.p. route 30 min before test), $n = 7-8$. * statistically significant in comparison with vehicle and remaining groups. $p < 0.05$.

conformers was computed using the Natural Bonding Orbital (NBO) formalism [38,39]. Properties in aqueous solution and Gibbs free energy of solvation were computed using the Polarizable Continuum Model (PCM) [40,41], at 298 K. All quantum mechanical

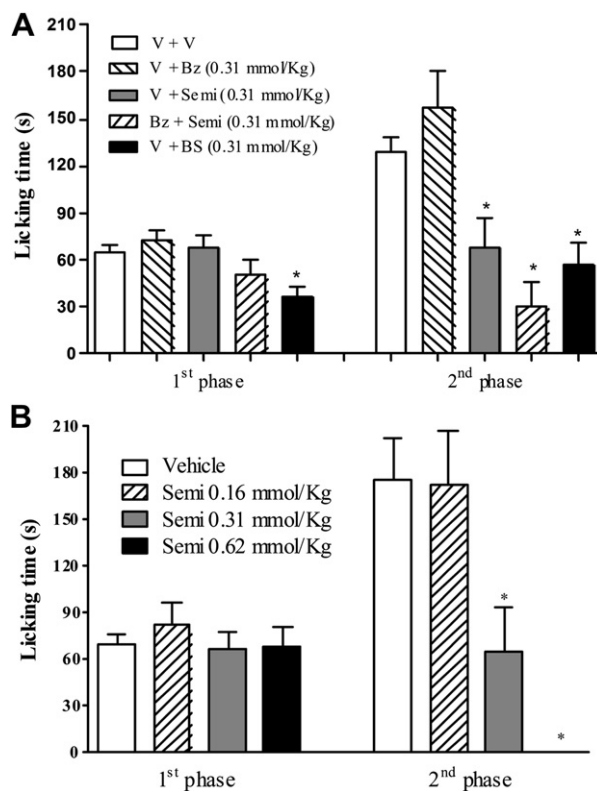


Fig. 11. A) Effects of BS (0.31 mmol/kg), benzaldehyde (Bz, 0.31 mmol/kg), semicarbazide (Semi, 0.31 mmol/kg), associated or not, and vehicle (V), i.p., –30 min, on the formaldehyde-induced nociceptive response (s.c., 1%, 20 μ l) in mice. $n = 10$. B) Effects of semicarbazide (Semi, 0.16, 0.31 and 0.62 mmol/kg), i.p., –30 min, on the formaldehyde-induced nociceptive response (s.c., 1%, 20 μ l) in mice. $n = 7-8$. * indicates statistically significant difference in comparison with vehicle, $p < 0.05$.

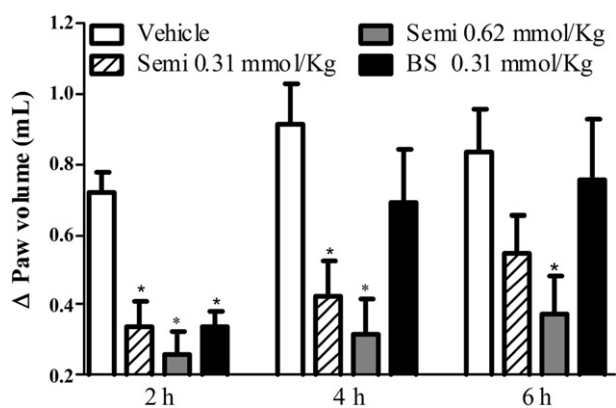


Fig. 12. Effects of BS (0.31 mmol/kg) and semicarbazide (Semi, 0.31 and 0.62 mmol/kg), i.p., –30 min, on the carrageenan-induced paw edema in rats (1%, 50 μ l, i.pl.). The paw volumes were measured 2, 4 and 6 h after stimulus injection. $n = 5$. * indicates statistically significant difference in comparison with vehicle; $p < 0.05$.

calculations were performed using the Gaussian 03 program [42]. Theoretical octanol-water partition coefficients of the semicarbazones were performed using ALOGPS 2.1 software [43].

4.1.3. Experimental octanol-water partition coefficient (K_{ow}) of arylsemicarbazones

The K_{ow} was determined by following the OECD guideline 107 (shake-flask method) at constant temperature, 20 °C [13]. Arylsemicarbazones were dissolved in n-octanol to make 4.0×10^{-3} mol L⁻¹ solutions. The n-octanol:water volume ratios were 1:1, 1:2 and 2:1. The K_{ow} values were obtained from average results ($n = 2$) for each ratio. Altogether six values were obtained for three duplicate runs. The determined Log K_{ow} values were within a range of ± 0.3 units. Phosphate buffer pH 7.4 was used as aqueous phase in order to simulate biological fluids and to keep compounds in their neutral form. Concentrations of compounds in each solvent were obtained from the maximum absorbance in the electronic spectrum.

4.2. Pharmacology

4.2.1. Experimental animals

Male Swiss mice (25–35 g) and Wistar rats (200–250 g) were used. The animals had free access to food and water and were maintained in a room with a 12 h light–dark cycle. The experiments were carried out at a room temperature of 27 °C, which corresponds to the thermo-neutral zone for rodents. All experiments were conducted according to the ethical guidelines for investigation of experimental pain in conscious animals [44] and approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation (CETEA) of the Federal University of Minas Gerais.

4.2.2. Effects induced by arylsemicarbazones on zymosan writhing response in mice

Intraperitoneal (i.p.) injection of zymosan A (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.; 40 mg/kg) was performed and the number of abdominal writhings was determined during 30 min after stimulus injection. BS (0.31 mmol/kg, i.p.), 2-OHBS, 3-OHBS, 4-OHBS (0.31 or 0.62 mmol/kg, i.p.) or vehicle (tween 80 6% in saline) were administered 30 min before zymosan.

4.2.3. Effects induced by arylsemicarbazones, semicarbazide or benzaldehyde on formaldehyde nociceptive response in mice

A subcutaneous (s.c.) injection of formaldehyde (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.; 1% in saline, 20 μ L) was made into the dorsum of

the right hind paw. The time the animals spent licking intermittently the injected paw was determined between 0 and 5 min (first phase) and 15 and 30 min (second phase) after the injection of formaldehyde. BS (0.31 mmol/kg, i.p.), 2-OHBS (0.16, 0.31 or 0.62 mmol/kg, i.p.), semicarbazide hydrochloride (0.16, 0.31 or 0.62 mmol/kg, i.p.), benzaldehyde (0.31 mmol/kg, i.p.) or vehicle (tween 80 6% in saline) were administered 30 min before the injection of formaldehyde.

4.2.4. Effects induced by arylsemicarbazones or semicarbazide on carrageenan edema in mice

Paw edema was measured with a plethysmometer (Model 7140, UgoBasile, Comerio, Italy). The basal volume of the right hind paw was measured before treatment with BS (0.31 mmol/kg, i.p.), 2-OHBS, 3-OHBS, 4-OHBS (0.31 or 0.62 mmol/kg, i.p.), semicarbazide (0.31 or 0.62 mmol/kg, i.p.) or vehicle (tween 80 6% in saline). Thirty minutes after treatment, carrageenan λ type IV (Sigma–Aldrich; 500 μ g, 50 μ L, intra-plantar – i.pl.) was injected and the paw volume was measured again 2, 4 and 6 h later.

4.2.5. Evaluation of the effects induced by 2-OHBS or semicarbazide on motor coordination of mice

The motor coordination of the animals was evaluated in a rotarod apparatus. During three days before the experiment the animals were trained on different occasions in the apparatus. On the experiment day, the animals were placed on a rotating rod (14 r.p.m.) and the time they spent on the apparatus was determined. The cutoff time was 120 s. After determination of the baseline values, the animals were treated with phenobarbital (Aventis Pharma, Brazil; 0.16 mmol/kg, i.p.), 2-OHBS (0.62 mmol/kg, i.p.), semicarbazide hydrochloride (0.62 mmol/kg, i.p.) or vehicle (tween 80 6% in saline) and 30 min later they were again tested in the apparatus.

4.2.6. Statistical analysis

Results in the formaldehyde nociception, zymosan writhing and carrageenan edema models were presented as mean \pm standard error of mean (S.E.M.). These results were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Newman–Keuls post hoc test (formaldehyde nociception and zymosan writhing) or repeated measures by two-way ANOVA (time and treatment as the main effects) followed by Bonferroni test (edema test). When data did not display normal distribution, tested by Kolmogorov–Smirnov test, Kruskal–Wallis followed by Dunn’s multiple comparison test were applied (rota-rod test). A $P < 0.05$ was considered significant. The software GraphPad Prism® 5.0 (San Diego, CA, USA) was used for such analyzes.

Acknowledgements

This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES, Brazil), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fármacos e Medicamentos (INCT-INOFAR), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Catálise INCT-CATÁLISE and Fapemig.

References

- [1] H. Beraldo, R.D. Sinisterra, L.R. Teixeira, R.P. Vieira, M.C. Doretto, An effective anticonvulsant prepared following a host-guest strategy that uses hydroxypropyl-beta-cyclodextrin and benzaldehyde semicarbazone, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 296 (2002) 241–246.
- [2] J.R. Dimmock, S.N. Pandeya, J.W. Quail, U. Pugazhenthii, T.M. Allen, G.Y. Kao, J. Balzarini, E. Declercq, Evaluation of the semicarbazones, thiosemicarbazones and bis-carbohydrazones of some aryl alicyclic ketones for anticonvulsant and other biological properties, *Eur. J. Med. Chem.* 30 (1995) 303–314.

- [3] J.R. Dimmock, K.K. Sidhu, R.S. Thayer, P. Mack, M.J. Duffy, R.S. Reid, J.W. Quail, U. Pugazhenthii, A. Ong, J.A. Bikker, D.F. Weaver, Anticonvulsant activities of some arylsemicarbazones displaying potent oral activity in the maximal electroshock screen in rats accompanied by high protection indices, *J. Med. Chem.* 36 (1993) 2243–2252.
- [4] L.R. Teixeira, R.D. Sinisterra, R.P. Vieira, M.C. Doretto, H. Beraldo, Inclusion of benzaldehyde semicarbazone into beta-cyclodextrin produces a very effective anticonvulsant formulation, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 47 (2003) 77–82.
- [5] L.T. Rocha, K.A. Costa, A.C. Oliveira, E.B. Nascimento Jr., C.M. Bertollo, F. Araujo, L.R. Teixeira, S.P. Andrade, H. Beraldo, M.M. Coelho, Antinociceptive, anti-edematogenic and antiangiogenic effects of benzaldehyde semicarbazone, *Life Sci.* 79 (2006) 499–505.
- [6] H. Cerecetto, R. Di Maio, G. Ibarriuri, G. Seoane, A. Denicola, G. Peluffo, C. Quijano, M. Paulino, Synthesis and anti-trypanosomal activity of novel 5-nitro-2-furaldehyde and 5-nitrothiophene-2-carboxaldehyde semicarbazone derivatives, *Fármaco* 53 (1998) 89–94.
- [7] H. Cerecetto, R. Di Maio, M. Gonzalez, M. Risso, G. Sagraera, G. Seoane, A. Denicola, G. Peluffo, C. Quijano, A.O. Stoppani, M. Paulino, C. Olea-Azar, M.A. Basombrio, Synthesis and 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 (2000) 343–350.
- [8] K. Ramu, G.N. Lam, H. Hughes, *In vivo* metabolism and mass balance of 4-[4-fluorophenoxy] benzaldehyde semicarbazone in rats, *Drug Metab. Dispos.* 28 (2000) 1153–1161.
- [9] M. Vieites, P. Buccino, L. Otero, M. Gonzalez, O.E. Piro, R.S. Delgado, C.M.R.S. Anna, E.J. Barreiro, H. Cerecetto, D. Gambino, Chemo-selective hydrolysis of the iminic moiety in salicylaldehyde semicarbazone promoted by ruthenium, *Inorg. Chim. Acta* 358 (2005) 3065–3074.
- [10] M. Salmi, S. Jalkanen, A 90-kilodalton endothelial cell molecule mediating lymphocyte binding in humans, *Science* 257 (1992) 1407–1409.
- [11] X.S. Tai, M.Y. Hao, J. Yin, Z.P. Liang, (E)-1-(4-Hydroxybenzylidene) semicarbazide hemihydrate, *Acta Crystallogr. Sect. E Struct. Rep. Online* 63 (2007) o1725–o1726.
- [12] J. Valdés-Martinez, R.A. Toscano, R. Salcedo, R. Cealivares, A. Melendez, Semicarbazones and thiosemicarbazones. 12. Crystal-structure of salicylaldehyde semicarbazone, *Monatsh. Chem.* 121 (1990) 641–647.
- [13] OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Organisation For Economic Co-Operation and Development, Paris, 1995, p. 107.
- [14] C.R. McNamara, J. Mandel-Brehm, D.M. Bautista, J. Siemenst, K.L. Deranian, M. Zhao, N.J. Hayward, J.A. Chong, D. Julius, M.M. Moran, C.M. Fanger, TRPA1 mediates formalin-induced pain, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104 (2007) 13525–13530.
- [15] A. Tjolsen, O.G. Berge, S. Hunskaar, J.H. Rosland, K. Hole, The formalin test: an evaluation of the method, *Pain* 51 (1992) 5–17.
- [16] J.G. Chichorro, B.B. Lorenzetti, A.R. Zampronio, Involvement of bradykinin, cytokines, sympathetic amines and prostaglandins in formalin-induced orofacial nociception in rats, *Br. J. Pharmacol.* 141 (2004) 1175–1184.
- [17] S. Hunskaar, K. Hole, The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain, *Pain* 30 (1987) 103–114.
- [18] P.K. Moore, A.O. Oluyomi, R.C. Babbedge, P. Wallace, S.L. Hart, L-NG-nitro arginine methyl ester exhibits antinociceptive activity in the mouse, *Br. J. Pharmacol.* 102 (1991) 198–202.
- [19] D.J. Smith, M. Salmi, P. Bono, J. Hellman, T. Leu, S. Jalkanen, Cloning of vascular adhesion protein 1 reveals a novel multifunctional adhesion molecule, *J. Exp. Med.* 188 (1998) 17–27.
- [20] X. Zhang, W.S. McIntire, Cloning and sequencing of a copper-containing, topa quinone-containing monoamine oxidase from human placenta, *Gene* 179 (1996) 279–286.
- [21] F. Buffoni, G. Ignesti, The copper-containing amine oxidases: biochemical aspects and functional role, *Mol. Genet. Metab.* 71 (2000) 559–564.
- [22] L.M. Salter-Cid, E. Wang, A.M. O'Rourke, A. Miller, H. Gao, L. Huang, A. Garcia, M.D. Linnik, Anti-inflammatory effects of inhibiting the amine oxidase activity of semicarbazide-sensitive amine oxidase, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 315 (2005) 553–562.
- [23] K. Jaakkola, T. Nikula, R. Holopainen, T. Vahasilta, M.T. Matikainen, M.L. Laukkanen, R. Huupponen, L. Halkola, L. Nieminen, J. Hiltunen, S. Parviainen, M.R. Clark, J. Knuuti, T. Savunen, P. Kaapa, L.M. Voipio-Pulkki, S. Jalkanen, *In vivo* detection of vascular adhesion protein-1 in experimental inflammation, *Am. J. Pathol.* 157 (2000) 463–471.
- [24] M. Salmi, G.G. Yegutkin, R. Lehvonen, K. Koskinen, T. Salminen, S. Jalkanen, A cell surface amine oxidase directly controls lymphocyte migration, *Immunity* 14 (2001) 265–276.
- [25] M. Salmi, S. Jalkanen, VAP-1: an adhesin and an enzyme, *Trends Immunol.* 22 (2001) 211–216.
- [26] P.H. Yu, L.X. Lu, H. Fan, M. Kazachkov, Z.J. Jiang, S. Jalkanen, C. Stolen, Involvement of semicarbazide-sensitive amine oxidase-mediated deamination in lipopolysaccharide-induced pulmonary inflammation, *Am. J. Pathol.* 168 (2006) 718–726.
- [27] P.H. Yu, S. Wright, E.H. Fan, Z.R. Lun, D. Gubisne-Harberle, Physiological and pathological implications of semicarbazide-sensitive amine oxidase, *Biochim. Biophys. Acta* 1647 (2003) 193–199.
- [28] P.F. Lee, C.T. Yang, D.M. Fan, J.J. Vittal, J.D. Ranford, Synthesis, characterization and physicochemical properties of copper(II) complexes containing salicylaldehyde semicarbazone, *Polyhedron* 22 (2003) 2781–2786.
- [29] M.J.S. Dewar, E.G. Zoebisch, E.F. Healy, J.J.P. Stewart, The development and use of quantum-mechanical molecular-models .76. Am1-a new general-purpose quantum-mechanical molecular-model, *J. Am. Chem. Soc.* 107 (1985) 3902–3909.
- [30] J.W. Ponder, TINKER Software Tools for Molecular Design, Version 5.0 (2009).
- [31] R.G. Parr, W. Young, Density-functional Theory of Atoms and Molecules, Oxford University Press, New York, 1989.
- [32] A.D. Becke, Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange, *J. Chem. Phys.* 98 (1993) 5648–5652.
- [33] C.T. Lee, W.T. Yang, R.G. Parr, Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron-density, *Phys. Rev. B* 37 (1988) 785–789.
- [34] R. Ditchfie, W.J. Hehre, J.A. Pople, Self-consistent molecular-orbital methods .9. Extended Gaussian-type basis for molecular-orbital studies of organic molecules, *J. Chem. Phys.* 54 (1971) 724–728.
- [35] W.J. Hehre, R. Ditchfie, J.A. Pople, Self-consistent molecular-orbital methods .12. Further extensions of Gaussian-type basis sets for use in molecular-orbital studies of organic-molecules, *J. Chem. Phys.* 56 (1972) 2257–2261.
- [36] C. Moller, M.S. Plesset, *Phys. Rev.* 46 (1934) 618–622.
- [37] A. Szabo, N.S. Ostlund, *Modern Quantum Chemistry: Introduction to Advanced Electronic Structure Theory*, Dover Publication, New York, 1996.
- [38] A.E. Reed, F. Weinhold, Natural bond orbital analysis of near-Hartree-Fock water dimer, *J. Chem. Phys.* 78 (1983) 4066–4073.
- [39] A.E. Reed, R.B. Weinstock, F. Weinhold, Natural-population analysis, *J. Chem. Phys.* 83 (1985) 735–746.
- [40] J. Tomasi, M. Persico, Molecular-interactions in solution - an overview of methods based on continuous distributions of the solvent, *Chem. Rev.* 94 (1994) 2027–2094.
- [41] J. Tomasi, B. Mennucci, R. Cammi, Quantum mechanical continuum solvation models, *Chem. Rev.* 105 (2005) 2999–3093.
- [42] M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, J.A. Montgomery Jr., T. Vreven, K.N. Kudin, J.C. Burant, J.M. Millam, S.S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J.E. Knox, H.P. Hratchian, J.B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R.E. Stratmann, O. Yazyev, A.J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J.W. Ochterski, P.Y. Ayala, K. Morokuma, G.A. Voth, P. Salvador, J.J. Dannenberg, V.G. Zakrzewski, S. Dapprich, A.D. Daniels, M.C. Strain, O. Farkas, D.K. Malick, A.D. Rabuck, K. Raghavachari, J.B. Foresman, J.V. Ortiz, Q. Cui, A.G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B.B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R.L. Martin, D.J. Fox, T. Keith, M.A. Al-Laham, C.Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P.M.W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M.W. Wong, C. Gonzalez, J.A. Pople, Gaussian 03, Revision C.02, Gaussian, Inc., Wallingford, CT, 2004.
- [43] ALOGPS is available free on-line at <http://www.vclab.org>.
- [44] M. Zimmermann, Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals, *Pain* 16 (1983) 109–110.



Binuclear zinc(II) complexes with the anti-inflammatory compounds salicylaldehyde semicarbazone and salicylaldehyde-4-chlorobenzoyl hydrazone (H₂LASSBio-1064)

Gabrieli L. Parrilha^a, Rafael P. Vieira^a, Anayive P. Rebolledo^a, Isolda C. Mendes^b, Lidia M. Lima^c, Eliezer J. Barreiro^c, Oscar E. Piro^d, Eduardo E. Castellano^e, Heloisa Beraldo^{a,*}

^a Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

^b Escola de Belas Artes, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

^c LASSBio Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio)¹, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, P.O. Box 68024, 21944-971 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^d Departamento de Física, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata and Instituto IFLP (CONICET – CCT La Plata), C.C. 67, 1900 La Plata, Argentina

^e Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 13560-970 São Carlos, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 February 2011

Accepted 19 April 2011

Available online 27 April 2011

Keywords:

Hydrazones

Semicarbazones

Crystal structures

Binuclear Zn(II) complexes

ABSTRACT

Complexes [Zn₂(HL¹)₂(CH₃COO)₂] (**1**) and [Zn₂(L²)₂] (**2**) were synthesized with salicylaldehyde semicarbazone (H₂L¹) and salicylaldehyde-4-chlorobenzoyl hydrazone (H₂LASSBio-1064, H₂L²), respectively. The crystal structure of (**1**) was determined. Upon recrystallization of previously prepared [Zn₂(HL²)₂(Cl)₂] (**3**) in 1:9 DMSO:acetone crystals of [Zn₂(L²)₂(H₂O)₂].[Zn₂(L²)₂(DMSO)₄] (**3a**) were obtained. The crystal structure of **3a** was also determined. All crystal structures revealed the presence of phenoxo-bridged binuclear zinc(II) complexes.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Semicarbazones constitute an interesting class of compounds with versatile structural features and several pharmacological applications as anticonvulsant [1–7], antiproliferative [8], antimalarial [9], antimicrobial [10], antiprotozoal [11], antinociceptive [12], and antiangiogenic agents [12]. Semicarbazones and their metal complexes also show antitumor [13], antimicrobial [10,14,15], and antioxidant [16] activities, among others.

Hydrazones present chemical as well as pharmacological applications. Aromatic hydrazones dispersed in a binder polymer possess hole-transporting properties and are used in electro-photographic photoreceptors of laser printers [17]. Hydrazones are also used as analytical reagents for the determination of trace amounts of metal ions [18]. In addition, these compounds exhibit antimicrobial, anticonvulsant, analgesic [19], anti-inflammatory [20], and antitumoral [21] properties. Hydrazones are used for controlling agricultural and horticultural insect pests [22]. Isonicoti-

noyl hydrazone derivatives were shown to possess anti-tubercular activity [23]. Acyl hydrazones have shown to possess analgesic [24,25], anti-inflammatory [25], vasodilator [26] and trypanocidal activities [27].

Metal complexes of hydrazones proved to have potential applications as catalysts [28], luminescent probes [29], and molecular sensors [30]. Moreover, it has been recently shown that hydrazones such as pyridoxal isonicotinoyl hydrazone derivatives are effective iron chelators *in vivo* and *in vitro*, and could be used in the treatment of iron overload [31]. Metal complexes with hydrazones also show antimicrobial [32], anticancer [33], and DNA-binding [34] activities.

In another work we reported an evaluation of the analgesic and anti-nociceptive activities of salicylaldehyde 2-chlorobenzoyl hydrazone (H₂LASSBio-466), its regioisomer salicylaldehyde 4-chlorobenzoyl hydrazone (H₂LASSBio-1064), and their zinc(II)-complexes [Zn(LASSBio-466)H₂O] and [Zn(HLASSBio-1064)Cl] [35]. In the present work we report a study on binuclear zinc(II) complexes with salicylaldehyde semicarbazone (hereafter named H₂L¹) and with H₂LASSBio-1064 hereafter named H₂L² (Fig. 1). Both ligands were shown to possess analgesic and antinociceptive activities [36,37].

* Corresponding author. Tel.: +55 31 34095740, fax: +55 31 34095700.

E-mail address: hberaldo@ufmg.br (H. Beraldo).

¹ <http://www.farmacia.ufrj.br/labbio>.

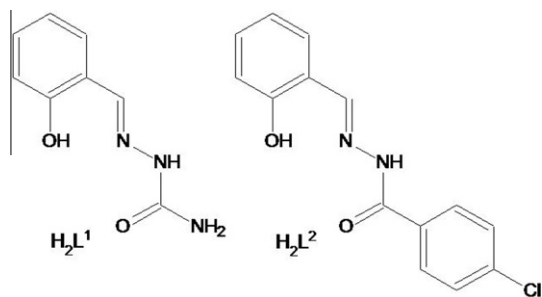


Fig. 1. Structural representation of salicylaldehyde semicarbazone (H_2L^1) and salicylaldehyde-4-chlorobenzoylhydrazone ($H_2LASSBio-1064$, H_2L^2).

2. Experimental

2.1. Physical measurements

All common chemicals were purchased from Aldrich and used without further purification. Partial elemental analyses were performed on a Perkin Elmer CHN 2400 analyzer. An YSI model 31 conductivity bridge was employed for molar conductivity measurements. Infrared spectra were recorded on a Perkin Elmer FT-IR Spectrum GX spectrometer using KBr plates ($4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$) and nujol mulls between CsI plates ($400\text{--}200\text{ cm}^{-1}$). NMR spectra were obtained with a Bruker DPX-200 Avance (200 MHz) spectrometer using $DMSO-d_6$ as the solvent and TMS as internal reference.

2.2. X-ray crystallography

Crystals of $[Zn_2(HL^1)_2(CH_3COO)_2]$ (**1**) were obtained from a methanol solution. Upon recrystallization of previously prepared $[Zn_2(HL^2)_2Cl_2]$ (**3**) [35] in 1:9 DMSO:acetone, crystals of $[Zn_2(L^2)_2(H_2O)_2] \cdot [Zn_2(L^2)_2(DMSO)_4]$ (**3a**) were obtained. Single crystals of $[Zn_2(HL^1)_2(CH_3COO)_2]$ (**1**) and $[Zn_2(L^2)_2(H_2O)_2] \cdot [Zn_2(L^2)_2(DMSO)_4]$ (**3a**) were mounted on a glass fiber and examined by structural X-ray diffraction methods.

X-ray diffraction data for **1** were collected on an Oxford-Diffraction GEMINI diffractometer (LabCri) using graphite-Enhance Source Mo $K\alpha$ radiation ($\lambda = 0.71069\text{ \AA}$) at 293(2) K. Data collection, integration and scaling of the reflections were performed with the CrySAlis suite programs [38].

X-ray diffraction measurements of **3a** were performed on an Enraf-Nonius Kappa-CCD diffractometer employing graphite-monochromated Mo $K\alpha$ ($\lambda = 0.71073\text{ \AA}$) radiation. Diffraction data were gathered (φ and ω scans with κ -offsets) with COLLECT [39]. Integration and scaling of the reflections were performed with HKL DENZO-SCALEPACK [40] suite of programs. The unit cell parameters were obtained by least-squares refinement based on the angular settings for all collected reflections using HKL SCALEPACK [40]. Data were corrected empirically for absorption with PLATON [41].

Final unit cell parameters were based on the fitting of all reflections positions. The structures were solved by direct methods using the program SHELXS-97 [42] and refined by full-matrix least-squares techniques against F^2 using SHELXL-97 [43].

Positional and anisotropic atomic displacement parameters of **1** were refined for non-hydrogen atoms. Although all hydrogen atoms could be identified in a Fourier difference map, in the final model only nitrogen H-atoms were refined positionally and isotropically. The other hydrogen atoms of HL^1 were included in the molecular model at stereo-chemical positions and refined with the riding method.

The hydrogen atoms of H_2L^2 in **3a** were included in the molecular model at stereo-chemical positions and refined with the riding method. The methyl H-atoms of both DMSO ligands were

Table 1
Crystal data and structure refinement.

Compound	$[Zn_2(HL^1)_2(CH_3COO)_2]$ (1)	$[Zn_2(L^2)_2(H_2O)_2] \cdot [Zn_2(L^2)_2(DMSO)_4]$ (3a)
Empirical formula	$C_{10}H_{11}N_3O_4Zn$	$C_{64}H_{62}Cl_4N_8O_{14}S_4Zn_4$
Formula weight ($g\text{ mol}^{-1}$)	302.59	1700.75
T (K)	298(2)	294(2)
Crystal system	orthorhombic	triclinic
Space group	<i>Pbac</i>	<i>P</i> $\bar{1}$
Crystal size (mm)	$0.15 \times 0.12 \times 0.10$	$0.12 \times 0.14 \times 0.22$
Unit cell dimensions		
a (\AA)	12.1734(10)	8.914(1)
b (\AA)	12.8476(8)	14.808(1)
c (\AA)	15.1288(7)	15.598(1)
α ($^\circ$)	90	61.933(4)
β ($^\circ$)	90	77.560(4)
γ ($^\circ$)	90	80.875(5)
V (\AA^3)	2366.1(3)	1770.2(3)
Z	8	1
D_{calc} ($Mg\text{ m}^{-3}$)	1.699	1.595
Absorption coefficient (mm^{-1})	2.086	1.676
$F(0\ 0\ 0)$	1232	868
θ Range for data collection ($^\circ$)	2.69–26.37	3.42–26.00
Limiting indices	$-9 \leq h \leq 15$ $-14 \leq k \leq 16$ $-18 \leq l \leq 15$	$-10 \leq h \leq 10$ $-18 \leq k \leq 18$ $-19 \leq l \leq 19$
Reflections collected/ unique (R_{int})	7600/2411 (0.0208)	12 607/6595 (0.083)
Completeness	$\theta = 26.37^\circ$ 100.0%	$\theta = 26.00^\circ$ 95.0%
Refinement method	full-matrix least-squares on F^2	full-matrix least-squares on F^2
Data/restraints/ parameters	2411/0/173	6595/0/448
Goodness-of-fit on F^2	0.941	1.092
Final R indices [$I > 2\sigma(I)$]	$R_1 = 0.0222$ $wR_2 = 0.0547$	$R_1 = 0.0845$ $wR_2 = 0.2328$
R indices (all data)	$R_1 = 0.0321$ $wR_2 = 0.0560$	$R_1 = 0.1030$ $wR_2 = 0.2536$
Largest difference in peak and hole ($e\text{ \AA}^{-3}$)	0.228 and -0.330	2.588 and -1.433

optimized by treating them as a rigid group which was allowed to rotate around the corresponding C–S bond. The water H-atoms could not be located reliably in the final residual electron density map. Their presumed positions were obtained by a procedure based on combined geometrical and force-field (Coulomb and van der Waals) calculations as reported in the literature [44] and implemented in the WINGX suit of programs [45]. A final difference Fourier map showed a residual electron density of about 2.6 e \AA^{-3} near the less bonded to the metal DMSO molecule that can be attributed to disorder of this ligand in the lattice.

In both complexes, molecular graphics were obtained from ORTEP [45–47]. Crystal data and structure refinement results for both compounds are summarized in Table 1.

2.3. Synthesis

2.3.1. Synthesis of salicylaldehyde semicarbazone (H_2L^1) and salicylaldehyde 4-chlorobenzoyl hydrazone (H_2L^2)

Salicylaldehyde semicarbazone and salicylaldehyde 4-chlorobenzoyl hydrazone were prepared as previously described [35,48].

2.3.2. Synthesis of $[Zn_2(HL^1)_2(CH_3COO)_2]$ (**1**), $[Zn_2(L^2)_2]$ (**2**) and $[Zn_2(HL^2)_2Cl_2]$ (**3**)

Complex (**1**) was obtained by refluxing a methanol suspension of H_2L^1 with zinc acetate, in 1:4 ligand-to-metal molar ratio, while

complex (**2**) was obtained by refluxing a methanol solution of H_2L^2 with zinc acetate in 1:1 ligand-to-metal molar ratio. The resulting solids were filtered off and washed with methanol followed by diethylether and then dried *in vacuo*. Complex (**3**) was obtained as previously described [35].

2.3.2.1. $[\text{Zn}_2(\text{HL}^1)_2(\text{CH}_3\text{COO})_2]$ (**1**). White solid. *Anal.* Calc. for $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_4\text{Zn}$ (302.60): C, 39.69; H, 3.66; N, 13.89. Found: C, 39.35; H, 3.79; N, 13.48%. Molar conductivity (1×10^{-4} mol L^{-1} , methanol): $52.8 \Omega^{-1} \text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$. Molar conductivity (1×10^{-3} mol L^{-1} , DMSO): $35.9 \Omega^{-1} \text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$. IR (KBr or CsI/nujol, cm^{-1}): $\nu(\text{C}=\text{O})$ 1674, $\nu(\text{C}=\text{N})$ 1619, $\nu(\text{Zn}-\text{N})$ 465, $\nu(\text{Zn}-\text{O})$ 334. The main signals in ^1H NMR (DMSO- d_6): δ (ppm) = 8.13 (1H, H7), 7.07–6.90 (2H, N(3)–H), 7.05 (1H, H5), 6.95 (1H, H6), 6.71 (1H, H3), 6.44 (1H, H4), 1.81 (3H, s, CH_3 acetate). ^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ (ppm) = 175.74 (C1), 166.65 (C8), 149.18 (C7), 133.06 (C6), 131.35 (C5), 121.52 (C3), 118.17 (C2), 113.86 (C4), 22.88 (CH_3 acetate). Yield 54%.

2.3.2.2. $[\text{Zn}_2(\text{L}^2)_2]$ (**2**). Yellow solid. *Anal.* Calc. for $\text{C}_{28}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_4\text{Cl}_2\text{Zn}_2$ (676.15): C, 49.74; H, 2.68; N, 8.29. Found: C, 49.50; H, 2.35; N, 8.40%. Molar conductivity (0.5×10^{-3} mol L^{-1} DMF): $13.75 \Omega^{-1} \text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$. IR (KBr or CsI/nujol, cm^{-1}): $\nu(\text{C}=\text{N})$ 1601, $\nu(\text{Zn}-\text{N})$ 473, $\nu(\text{Zn}-\text{O})$ 311. ^1H NMR (DMSO- d_6): δ (ppm) = 8.61 (1H, H7), 8.09 (2H, H11, H13), 7.47 (2H, H10, H14), 7.28 (1H, H3), 7.15–7.25 (2H, H5, H6), 6.59 (1H, H4). Yield 91%.

3. Results and discussion

3.1. Formation of the zinc(II) complexes

Microanalyses and molar conductivity data are compatible with the formation of $[\text{Zn}(\text{HL}^1)(\text{CH}_3\text{COO})]_n$ (**1**) and $[\text{Zn}(\text{L}^2)]_n$ (**2**). In **1** a mono-anionic semicarbazone is attached to the metal center together with an acetate ligand. Crystal structure determination of complex (**1**) revealed that it is a dimer (see Section 3.3). In complex (**2**) the metal center is coordinated only by the di-anionic tridentate hydrazone, suggesting that **2** could as well be a dimer. In fact, coordination number three is very unlikely for zinc(II).

3.2. Spectroscopic characterization

The absorptions attributed to the $\nu(\text{O}-\text{H})$ stretching vibration at 3468 and 3436 cm^{-1} in the infrared spectra of H_2L^1 and H_2L^2 disappear in those of the complexes, in accordance with deprotonation of the phenol group [35,49].

The absorption attributed to $\nu(\text{C}=\text{O})$ at 1674 cm^{-1} in the spectrum of H_2L^1 shifts to 1676 cm^{-1} in the spectrum of **1** indicating coordination through the carbonyl oxygen [50–52]. The absorption assigned to $\nu(\text{C}=\text{O})$ at 1676 cm^{-1} in the spectrum of H_2L^2 was not found in the spectrum of **2**, in accordance with coordination of the enolate oxygen [32,52]. The absorption attributed to the $\nu(\text{C}=\text{N})$ vibration mode at 1599 and 1624 cm^{-1} in the spectra of H_2L^1

and H_2L^2 , respectively, shifts to 1601 and 1611 cm^{-1} in those of complexes (**1**) and (**2**), in agreement with coordination through the azomethine nitrogen [32,50–52].

New absorptions at 334 and 311 cm^{-1} in the spectra of **1** and **2**, respectively, were attributed to the $\nu(\text{M}-\text{O})$ vibration mode while absorptions at 465 and 473 cm^{-1} were attributed to the $\nu(\text{M}-\text{N})$ mode [53].

The NMR spectra of the ligands and their zinc(II) complexes were recorded in DMSO- d_6 . The ^1H resonances were assigned on the basis of chemical shifts and multiplicities. The carbon type (C, CH) was determined by using distortionless enhancement by polarization transfer (DEPT 135) experiments. The assignments of the protonated carbons were made by 2D hetero-nuclear multiple quantum coherence experiments (HMQC).

The signal of O(1)–H was absent in the spectra of complexes (**1**) and (**2**), in agreement with deprotonation and formation of a phenolate group. In addition, the signals of N(2)–H disappear in the spectra of both complexes, suggesting deprotonation. Hence dissolution of complex (**1**) occurs with deprotonation at N(2)–H and dissociation of the acetate ligand, probably promoted by DMSO- d_6 as described in Fig. 2. In fact, in the spectrum of **1** the signal of the hydrogens from the acetate group (δ 1.81 ppm) is characteristic of free acetate (δ 1.79 ppm).

The molar conductivity of complex (**1**) in non-coordinating methanol is characteristic of a non-electrolyte while in DMSO it reveals the presence of a 1:1 electrolyte, which is compatible with formation of acetic acid. Hence complex (**1**) is protonated at N(2) in the solid (as confirmed by its crystal structure, see Section 3.3) as well as in non-coordinating solvents such as methanol. However, coordination of DMSO- d_6 to the zinc(II) center results in release of the acetate group as acetic acid with deprotonation at N(2)–H. In previous works we demonstrated that coordination of DMSO to zinc(II) complexes with hydrazones results in release of a co-ligand [51,52].

In the ^1H NMR spectra of complexes (**1**) and (**2**) the signals of all hydrogen atoms undergo significant shifts in relation to their positions in the free ligands. In the ^{13}C NMR spectrum of **1** the signals of C(7)=N, C(8)=O and the aromatic carbons undergo significant shifts, indicating coordination through the O–N–O chelating system. The ^{13}C NMR spectrum of **2** was not obtained due to its low solubility. The significant shifts of all hydrogens upon complexation and the absence of the N(2)–H and O(1)–H signals in **2** suggest O–N–O coordination. Hence in **1** and **2** the ligands adopt the *E* configuration [35].

3.3. X-ray diffraction analysis

Fig. 3 contains perspective views of complexes (**1**) and (**3a**). Crystal data and refinement results are listed in Table 1. The crystal structures of H_2L^1 and H_2L^2 have been previously determined [48,54]. Tables 2 and 3 present selected intra-molecular bond distances and angles for H_2L^1 [48] and H_2L^2 [54] and their zinc(II) complexes (**1**) and (**3a**).

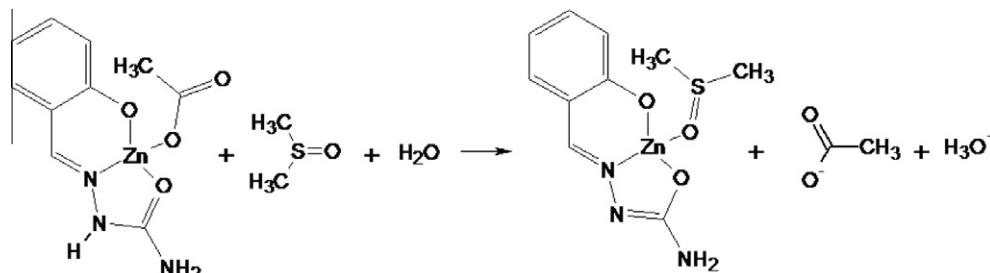


Fig. 2. Interaction of complex (**1**) with DMSO.

In $[\text{Zn}_2(\text{HL}^1)_2(\text{CH}_3\text{COO})_2]$ (**1**) the zinc(II) centers of the binuclear complex are in a five-fold trigonal bipyramidal environment. Each trigonal plane is occupied by an anionic semicarbazone coordinated through the imine nitrogen, N(1) and the carbonyl oxygen O(8), together with a phenolate O(1¹) atom of the second semicarbazone [$d(\text{Zn}-\text{N}1) = 2.074(2)$ Å, $d(\text{Zn}-\text{O}) = 2.058(1)$ and $1.990(1)$ Å, respectively]. O(2) from acetate and O(1) from phenolate occupy the apical sites [$\text{Zn}-\text{O}$ distances of $1.956(1)$ and $2.054(1)$ Å, respectively]. The metal ion departs from the trigonal plane in $0.0793(8)$ Å toward the O(8) atom. The metal–metal distance within the dimer is $3.0560(4)$ Å. Two phenoxo bridges connect the metal centers in the bimetallic complex. The ligand is nearly planar (rms deviation of atoms C7–N1–N2–C8–O8–N3 from the least-squares plane of 0.012 Å) and the metal ion departs from this plane in $0.078(2)$ Å.

Considering that complex (**1**) crystallizes as a dimer, we may suggest that it might be binuclear in the powder. Since acetate is monodentately coordinated, it is easily released upon dissolution of complex (**1**) in DMSO. Moreover, release of acetate (as acetic acid) was probably induced by the bulkiness of the DMSO ligand, and was probably favored by the basicity of acetate together with its mono-dentate character.

A twisting of approximately 180° in the N(2)–C(8) bond of the H_2L^1 to match the requirements of tridentate coordination was evidenced. Therefore, the semicarbazone conformation varies from *EE* when free [48] to *EZ* in complex (**1**).

Upon coordination some angles undergo significant changes. The N(1)–N(2)–C(8) angle goes from $121.4(2)^\circ$ in H_2L^1 [48] to $116.1(2)^\circ$ in **1**. In addition, C(7)–N(1)–N(2) varies from $116.4(2)^\circ$ in H_2L^1 [48] to $118.1(2)^\circ$ in **1**. In complex (**1**) the O(1)–Zn–O(8)

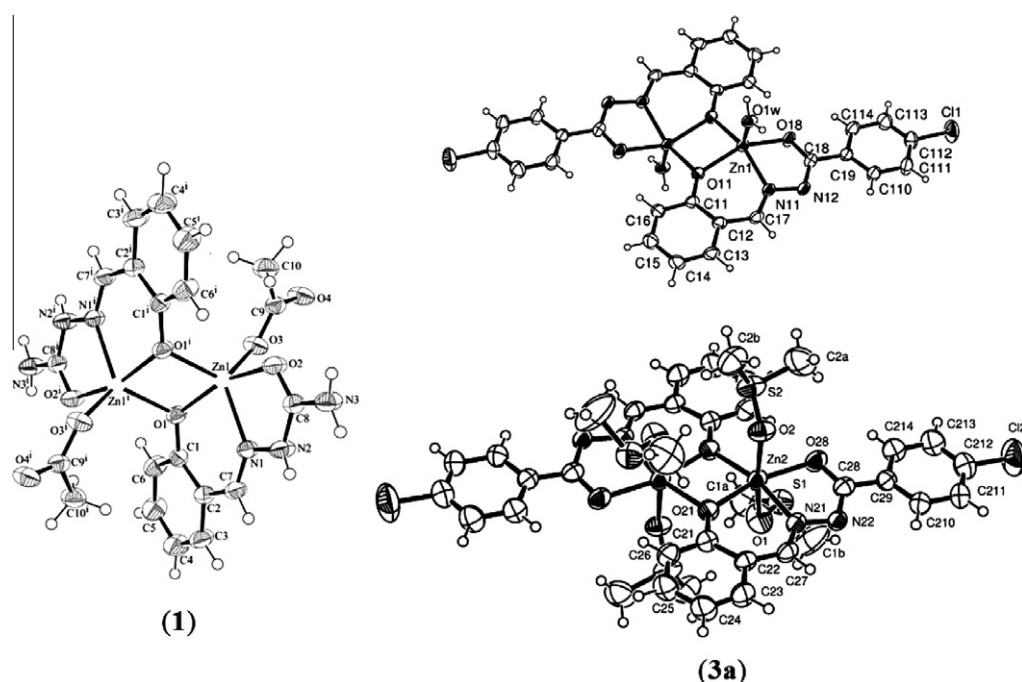


Fig. 3. Molecular plot of $[\text{Zn}_2(\text{HL}^1)_2(\text{CH}_3\text{COO})_2]$ (**1**) and $[\text{Zn}_2(\text{L}^2)_2(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot [\text{Zn}_2(\text{L}^2)_2(\text{DMSO})_4]$ (**3a**) binuclear complexes, showing the labeling of the non-H atoms and their displacement ellipsoids at the 50% probability level.

Table 2
Selected bond distances (Å) and angles ($^\circ$) of H_1L^1 [48] and $[\text{Zn}_2(\text{HL}^1)_2(\text{CH}_3\text{COO})_2]$ (**1**).

Atom	H_1L^1 [48]	(1)	Atom	H_1L^1 [48]	(1)
C(1)–O(1)	1.353(3)	1.345(2)	N(2)–C(8)–O(2)	118.4(2)	120.55(16)
C(2)–C(7)	1.446(3)	1.443(3)	N(2)–C(8)–N(3)	118.5(2)	117.37(17)
C(7)–N(1)	1.284(3)	1.283(2)	N(3)–C(8)–O(8)	123.1(2)	122.04(18)
N(1)–N(2)	1.371(2)	1.376(2)	O(3)–Zn(1)–O(1)#1		115.29(5)
N(2)–C(8)	1.358(3)	1.348(2)	O(3)–Zn(1)–O(1)		97.11(5)
C(8)–O(8)	1.243(2)	1.249(2)	O(1)#1–Zn(1)–O(1)		81.83(5)
C(8)–O(3)	1.327(3)	1.320(2)	O(3)–Zn(1)–O(8)		96.76(5)
O(1)–Zn(1)#1		1.9895(11)	O(1)#1–Zn(1)–O(8)		102.95(5)
O(1)–Zn(1)		2.0541(12)	O(1)–Zn(1)–O(8)		161.63(5)
O(8)–Zn(1)		2.0582(12)	O(3)–Zn(1)–N(1)		119.71(6)
O(3)–Zn(1)		1.9561(12)	O(1)#1–Zn(1)–N(1)		124.53(5)
Zn(1)–O(1)#1		1.9895(11)	O(1)–Zn(1)–N(1)		84.96(5)
Zn(1)–N(1)		2.0735(15)	O(8)–Zn(1)–N(1)		77.72(5)
Zn(1)–Zn(1)#1		3.0560(4)	O(3)–Zn(1)–Zn(1)#1		111.18(4)
			O(1)#1–Zn(1)–Zn(1)#1		41.71(3)
C(2)–C(7)–N(1)	122.5(2)	124.21(17)	O(1)–Zn(1)–Zn(1)#1		40.12(3)
C(7)–N(1)–N(2)	116.4(2)	118.07(16)	O(2)–Zn(1)–Zn(1)#1		141.60(4)
N(1)–N(2)–C(8)	121.4(2)	115.99(15)	N(1)–Zn(1)–Zn(1)#1		108.06(4)

Table 3
Selected bond distances (Å) and angles (°) of H_2L^2 [54] and $[\text{Zn}_2(\text{L}^2)_2(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot [\text{Zn}_2(\text{L}^2)_2(\text{DMSO})_4]$ (**3a**).

Atom	H_2L^2 [54]	Atom	$[\text{Zn}_2(\text{L}^2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$	Atom	$[\text{Zn}_2(\text{L}^2)_2(\text{DMSO})_4]$
C(1)–O(1)	1.340(5)	C(11)–O(11)	1.343(8)	C(21)–O(21)	1.336(8)
C(2)–C(7)	1.426(6)	C(12)–C(17)	1.462(11)	C(22)–C(27)	1.438(10)
C(7)–N(1)	1.280(5)	C(17)–N(11)	1.285(9)	C(27)–N(21)	1.287(9)
N(1)–N(2)	1.391(5)	N(11)–N(12)	1.378(8)	N(21)–N(22)	1.382(8)
N(2)–C(8)	1.330(5)	N(12)–C(18)	1.328(9)	N(22)–C(28)	1.325(9)
C(8)–O(8)	1.245(5)	C(18)–O(18)	1.266(8)	C(28)–O(28)	1.278(8)
C(8)–C(9)	1.481(6)	C(18)–C(19)	1.486(10)	C(28)–C(29)	1.466(10)
		O(11)–Zn(1)#1	1.994(4)	O(21)–Zn(2)#2	2.024(5)
		O(11)–Zn(1)	2.066(5)	O(21)–Zn(2)	2.070(5)
		O(18)–Zn(1)	2.022(5)	O(28)–Zn(2)	2.098(5)
		Zn(1)–O(1W)	1.982(5)	O(1)–Zn(2)	2.258(6)
		Zn(1)–O(11) #1	1.993(5)	O(2)–Zn(2)	2.137(5)
		Zn(1)–N(11)	2.060(5)	Zn(2)–O(21)#2	2.024(5)
		Zn(1)–Zn(1) #1	3.1218(15)	Zn(2)–N(21)	2.056(5)
				Zn(2)–Zn(2)#2	3.1178(16)
C(2)–C(7)–N(1)	123.0(4)	C(12)–C(17)–N(11)	123.9(6)	C(22)–C(27)–N(21)	126.0(6)
C(7)–N(1)–N(2)	115.6(3)	C(17)–N(11)–N(12)	117.3(6)	C(27)–N(21)–N(22)	116.6(5)
N(1)–N(2)–C(8)	120.0(3)	N(11)–N(12)–C(18)	109.2(5)	N(21)–N(22)–C(28)	112.1(5)
N(2)–C(8)–O(8)	121.7(4)	N(12)–C(18)–O(18)	125.2(7)	N(22)–C(28)–O(28)	124.6(7)
N(2)–C(8)–C(9)	117.8(4)	N(12)–C(18)–C(19)	118.7(6)	N(22)–C(28)–C(29)	116.2(6)
C(9)–C(8)–O(8)	120.5(4)	C(19)–C(18)–O(18)	116.1(6)	C(29)–C(28)–O(28)	119.1(6)
		O(18)–Zn(1)–N(11)	76.5(2)	O(28)–Zn(2)–N(21)	76.9(2)
		O(11)#1–Zn(1)–O(18)	105.3(2)	O(21)#2–Zn(2)–O(28)	116.32(19)
		O(11)#1–Zn(1)–O(11)	79.5(2)	O(21)#2–Zn(2)–O(21)	80.9(2)
		O(11)–Zn(1)–O(18)	148.6(2)	O(21)–Zn(2)–O(28)	162.94(18)
		N(11)–Zn(1)–O(11)	86.9(2)	N(21)–Zn(2)–O(21)	86.2(2)
		O(11)#1–Zn(1)–N(11)	155.5(2)	O(21)#2–Zn(2)–N(21)	165.5(2)
		O(11)#1–Zn(1)–Zn(1)#1	40.59(14)	O(21)#2–Zn(2)–Zn(2)#2	40.89(13)
		O(18)–Zn(1)–Zn(1)#1	137.20(16)	O(28)–Zn(2)–Zn(2)#2	157.21(13)
		N(11)–Zn(1)–Zn(1)#1	123.05(17)	N(21)–Zn(2)–Zn(2)#2	125.75(17)
		O(11)–Zn(1)–Zn(1)#1	38.90(12)	O(21)–Zn(2)–Zn(2)#2	39.84(12)
		O(1W)–Zn(1)–O(11)#1	107.0(2)	O(21)#2–Zn(2)–O(2)	89.2(2)
		O(1W)–Zn(1)–O(18)	101.2(2)	N(21)–Zn(2)–O(2)	97.9(2)
		O(1W)–Zn(1)–N(11)	96.4(2)	O(21)–Zn(2)–O(2)	93.9(2)
		O(1W)–Zn(1)–O(11)	107.0(2)	O(28)–Zn(2)–O(2)	86.3(2)
		O(1W)–Zn(1)–Zn(1)#1	112.43(16)	O(21)#2–Zn(2)–O(1)	87.8(2)
				N(21)–Zn(2)–O(1)	87.8(2)
				O(21)–Zn(2)–O(1)	97.6(2)
				O(28)–Zn(2)–O(1)	84.1(2)
				O(2)–Zn(2)–O(1)	167.5(2)

Primed and double primed atoms are obtained from the unprimed ones through the inversion symmetry operations $-x, -y + 2, -z + 1$ (#1) and $-x + 1, -y + 1, -z$ (#2), respectively.

angle of $161.63(5)^\circ$ deviates markedly from the ideal value of 180° , probably due to the spatial requirements of the ligand chelating system. In H_2L^1 the C(8)–O(8) bond distance is $1.243(2)$ Å, while in complex (**1**) this distance is $1.249(2)$ Å due to the formation of the Zn–O bond which makes the C–O bond weaker.

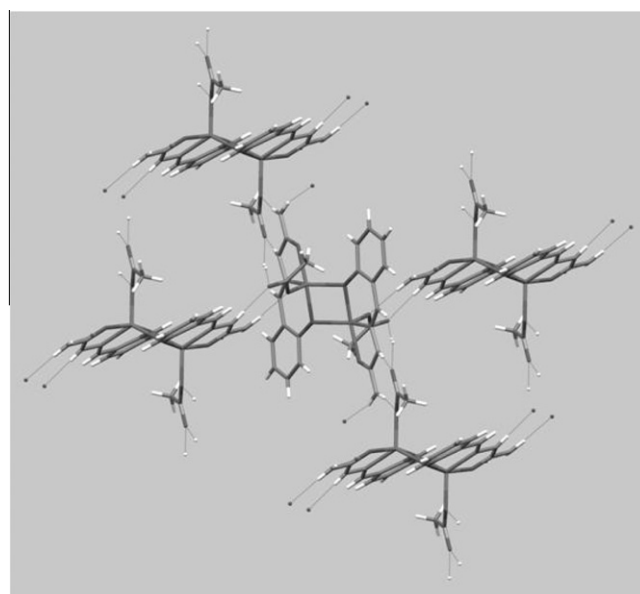
The molecular packing of complex (**1**) shows hydrogen bonding interactions of considerable strength involving N, H and O atoms (Table 4) with formation of tridimensional molecular chains as shown in Fig. 4.

As already mentioned, upon recrystallization of previously prepared $[\text{Zn}_2(\text{HL}^2)_2\text{Cl}_2]$ (**3**) [35] in 1:9 DMSO:acetone, crystals of $[\text{Zn}_2(\text{L}^2)_2(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot [\text{Zn}_2(\text{L}^2)_2(\text{DMSO})_4]$ (**3a**) were obtained (see Fig. 3). In **3a** two center symmetric binuclear zinc(II) complexes are hosted in the same lattice. In $[\text{Zn}_2(\text{L}^2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ a coordination water molecule, probably from DMSO, is attached to each zinc(II) center.

Table 4
Hydrogen bonds [Å and °] in the structure of $[\text{Zn}_2(\text{HL}^1)_2(\text{CH}_3\text{COO})_2]$ (**1**).

D–H...A	d(D–H)	d(H...A)	d(D...A)	$\angle(\text{DHA})$
N(2)–H(2A)...O(4)#1	0.79(2)	1.94(2)	2.729(2)	177(2)
N(3)–H(3A)...O(3)#1	0.91(2)	1.98(2)	2.885(2)	172(2)
N(3)–H(3B)...O(4)#2	0.84(2)	2.03(2)	2.840(2)	162(2)

Symmetry transformations used to generate equivalent atoms: #1: $-x, y + 1/2, -z + 3/2$; #2: $-x + 1/2, y + 1/2, z$.

**Fig. 4.** Molecular packing of $[\text{Zn}_2(\text{HL}^1)_2(\text{CH}_3\text{COO})_2]$ (**1**).

The compound crystallizes with two different zinc(II) center symmetric binuclear complexes in the crystal asymmetric unit, namely $[\text{Zn}_2(\text{L}^2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ and $[\text{Zn}_2(\text{L}^2)_2(\text{DMSO})_4]$, where L^2 is the di-anionic ligand that results from deprotonation of the acylhydrazone at O(1)–H and N(2)–H. Thus once again coordination of DMSO to the zinc(II) center results in deprotonation at N(2)–H with release of the chloride co-ligand as HCl. In addition, coordination of water also resulted in deprotonation with release of HCl (see Fig. 3).

In both complexes the ligands are nearly planar (rms deviation of atoms from the least-squares plane of 0.074 Å for $[\text{Zn}_2(\text{L}^2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ and 0.082 Å for $[\text{Zn}_2(\text{L}^2)_2(\text{DMSO})_4]$) and close to perpendicularity [dihedral angle of 86.3(1)°]. The expected lengthening of the C(8)–O(8) bond from 1.245(5) Å in H_2L^2 [54] to 1.266(8) and 1.277(8) Å in the two dimers of **3a** was observed, indicating that C(8)–O(8) bond changes from a double to a predominantly single bond due to deprotonation at N(2) and formation of N(2)=C(8) bond. H_2L^2 [54] and all ligands in (**3a**) present EZ conformation.

In the $[\text{Zn}_2(\text{L}^2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ binuclear complex, the zinc(II) center is in a five-fold square pyramidal environment, coordinated at the pyramid basis to the dianionic hydrazone which binds to the metal through the phenolate and carbonyl oxygen atoms (Zn–O distances of 2.066(5) and 2.022(5) Å, respectively), and the imine nitrogen (Zn–N distances of 2.060(5) Å). The fourth coordination position is occupied by the phenolate oxygen of the dimer inverted-related L molecule [$d(\text{Zn}–\text{Oph}') = 1.993(4)$ Å]. A water molecule is at the pyramid axis [$d(\text{Zn}–\text{Ow}) = 1.982(5)$ Å]. The metal ion departs from the pyramid basis in 0.597(4) Å toward the water ligand. The metal–metal distance within the dimer is 3.122(2) Å.

In the $[\text{Zn}_2(\text{L}^2)_2(\text{DMSO})_4]$ binuclear complex, the zinc(II) center is similarly coordinated to two inversion-related L ligands conforming an equatorial plane [$d(\text{Zn}–\text{Oph}) = 2.070(5)$ Å, $d(\text{Zn}–\text{Ocarb}) = 2.098(5)$ Å, $d(\text{Zn}–\text{N}) = 2.056(5)$ Å, and $d(\text{Zn}–\text{Oph}') = 2.024(5)$ Å], but now two DMSO molecules complete the axial positions of a distorted octahedral coordination around the metal (Zn–O distances of 2.137(5) and 2.258(6) Å). Here, the zinc ions lie nearly onto the equatorial coordination plane (at 0.024(4) Å). Intra-dimer Zn–Zn distance is 3.118(2) Å.

The **3a** crystal is further stabilized by a pair of $\text{Ow}–\text{H} \cdots \text{N}$ bonds of $[\text{Zn}_2(\text{L}^2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ with a neighboring symmetry related molecule [$d(\text{O}1\text{w} \cdots \text{N}12') = 2.66$ Å, $\angle(\text{O}1\text{w}–\text{H}1\text{w} \cdots \text{N}12') = 175^\circ$] and with a $[\text{Zn}_2(\text{L}^2)_2(\text{DMSO})_4]$ complex [$d(\text{O}1\text{w} \cdots \text{N}22'') = 2.81$ Å, $\angle(\text{O}1\text{w}–\text{H}2\text{w} \cdots \text{N}22'') = 175^\circ$].

Since **3a** consists of two binuclear phenoxo-bridged zinc(II) complexes, we may suggest that complex (**3**) could also be a dimer in the powder, $[\text{Zn}_2(\text{HL}^2)_2(\text{Cl})_2]$. Moreover, since coordination number three is very unlikely for zinc(II), and considering that complexes (**2**) and (**3**) were formed with the same acylhydrazone, it is reasonable to assume that **2** is also a phenoxo-bridged binuclear zinc(II) complex. In fact, the geometry of the O–N–O chelating system of L^2 would disfavor adoption of coordination number three by the zinc(II) center.

4. Conclusion

The above mentioned results indicate that the presence of the phenol group favors the formation of phenoxo-bridged-binuclear zinc(II) complexes. The literature reports other examples of phenoxo-bridged core dimers [55–57]. In addition, as previously observed by some of us for zinc(II) complexes with hydrazones [51,52], coordination of DMSO to the zinc(II) center may lead to deprotonation at N–H with release of a co-ligand. Coordination of water also resulted in deprotonation at N(2)–H with release of a co-ligand.

Acknowledgements

The authors are grateful to CNPq, INCT-INOVAR/CNPq (proc.573.364/2008-6) and FAPESP (Brazil) and to CONICET (Argentina) for financial support. O.E.P. is a Research Fellow of CONICET, Argentina.

Appendix A. Supplementary data

CCDC 808099 and 808944 contain the supplementary crystallographic data for $[\text{Zn}_2(\text{HL}^1)_2(\text{CH}_3\text{COO})_2]$ (**1**) and $[\text{Zn}_2(\text{L}^2)_2(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot [\text{Zn}_2(\text{L}^2)_2(\text{DMSO})_4]$ (**3a**). These data can be obtained free of charge via <http://www.ccdc.cam.ac.uk/conts/retrieving.html>, or from the Cambridge Crystallographic Data Centre, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK; fax: (+44) 1223-336-033; or e-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk.

References

- [1] H. Beraldo, D. Gambino, *Mini-Rev. Med. Chem.* 4 (2004) 159.
- [2] H. Beraldo, R.D. Sinisterra, L.R. Teixeira, R.P. Vieira, M.C. Doretto, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 296 (2002) 241.
- [3] L.R. Teixeira, R.D. Sinisterra, R.P. Vieira, A. Scarlatelli-Lima, M.F.D. Moraes, M.C. Doretto, A.M. Denadai, H. Beraldo, *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* 54 (2006) 133.
- [4] M. Kaiser, F.J. Azeredo, F.T. Uchôa, H.O. Beraldo, T.D. Costa, *Eur. J. Pharm. Sci.* 39 (2010) 355.
- [5] J.R. Dimmock, K.K. Sidhu, R.S. Thayer, P. Mack, M.J. Duffy, R.S. Reid, J.W. Quail, U. Pugazhenthai, A. Ong, J.A. Bikker, D.F. Weaver, *J. Med. Chem.* 36 (1993) 2243.
- [6] J.R. Dimmock, K.K. Sidhu, S.D. Tumber, S.K. Basran, M. Chen, J.W. Quail, J. Yang, I. Rozas, D.F. Weaver, *Eur. J. Med. Chem.* 30 (1995) 287.
- [7] J.R. Dimmock, S.C. Vashishtha, J.P. Stables, *Eur. J. Med. Chem.* 35 (2000) 241.
- [8] S. Dutta, S. Padhye, K.I. Priyadarshini, C. Newton, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15 (2005) 2738.
- [9] R.B. de Oliveira, E.M. de Souza-Fagundes, R.P.P. Soares, A.A. Andrade, A.U. Krettli, C.L. Zani, *Eur. J. Med. Chem.* 43 (2008) 1983.
- [10] V.L. Siji, M.R.S. Kumar, S. Suma, M.R.P. Kurup, *Spectrochim. Acta, Part A* 76 (2010) 22.
- [11] H. Cerecetto, R. Di Maio, M. González, M. Risso, G. Sagraera, G. Seoane, A. Denicola, G. Peluffo, C. Quijano, A.O.M. Stoppani, M. Paulino, C. Olea-Azar, M.A. Basombrio, *Eur. J. Med. Chem.* 35 (2000) 343.
- [12] L.T.S. Rocha, K.A. Costa, A.C.P. Oliveira, E.B. Nascimento, C.M. Bertollo, F. Araujo, L.R. Teixeira, S.P. Andrade, H. Beraldo, M.M. Coelho, *Life Sci.* 79 (2006) 499.
- [13] P. Nobliá, M. Vieites, B.S. Parajón-Costa, E.J. Baran, H. Cerecetto, P. Draper, M. González, O.E. Piro, E.E. Castellano, A. Azqueta, A.L. de Ceráin, A. Monge-Veja, D. Gambino, *J. Inorg. Biochem.* 99 (2005) 443.
- [14] N.C. Kasuga, K. Sekino, C. Koumo, N. Shimada, M. Ishikawa, K. Nomiya, *J. Inorg. Biochem.* 84 (2001) 55.
- [15] N.C. Kasuga, K. Sekino, M. Ishikawa, A. Honda, M. Yokoyama, S. Nakano, N. Shimada, C. Koumo, K. Nomiya, *J. Inorg. Biochem.* 96 (2003) 298.
- [16] Y. Li, Z.-Y. Yang, Z.-C. Liao, Z.-C. Han, Z.-C. Liu, *Inorg. Chem. Commun.* 13 (2010) 1213.
- [17] V. Getautis, M. Daskeviciene, T. Malinauskas, V. Jankauskas, J. Sidaravicius, *Thin Solid Films* 516 (2008) 8979.
- [18] J.J. Pinto, C. Moreno, M. Garcia-Vargas, *Talanta* 64 (2004) 562.
- [19] S. Rollas, Ş.G. Küçükgül, *Molecules* 12 (2007) 1910, and references therein.
- [20] P. Vicini, M. Incerti, I.A. Doytchinova, P. La Colla, B. Busonera, R. Loddò, *Eur. J. Med. Chem.* 41 (2006) 624, and references therein.
- [21] L. Savini, L. Chiasserini, V. Travagli, C. Pellerano, E. Novellino, S. Cosentino, M.B. Pisano, *Eur. J. Med. Chem.* 39 (2004) 113.
- [22] N. Aggarwal, R. Kumar, C. Srivastava, P. Dureja, J.M. Khurana, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 3056.
- [23] R.S. Hunoor, B.R. Patil, D.S. Badiger, R.S. Vadavi, K.B. Gudasi, V.M. Chandrashekar, I.S. Muchchandi, *Spectrochim. Acta, Part A* 77 (2010) 838.
- [24] H.J.C. Bezerra-Netto, D.I. Lacerda, A.L.P. Miranda, H.M. Alves, E.J. Barreiro, C.A.M. Fraga, *Bioorg. Med. Chem.* 14 (2006) 7924, and references therein.
- [25] Y.K.C. Da Silva, C.V. Augusto, M.L.C. Barbosa, G.M.A. Melo, A.C. De queiroz, T.L.M.F. Dias, W. Bispo Jr., E.J. Barreiro, L.M. Lima, M.S. Alexandre-Moreira, *Bioorg. Med. Chem.* 18 (2010) 5007.
- [26] A.E. Kümmerle, J.M. Raimundo, C.M. Leal, G.S. Da Silva, T.L. Balliano, M.A. Pereira, C.A. De Simone, R.T. Sudo, G. Zapata-Sudo, C.A.M. Fraga, E.J. Barreiro, *Eur. J. Med. Chem.* 44 (2009) 4004.
- [27] N.C. Romeiro, G. Aguirre, P. Hernández, M. González, H. Cerecetto, I. Aldana, S. Pérez-Silanes, A. Monge, E.J. Barreiro, L.M. Lima, *Bioorg. Med. Chem.* 17 (2009) 641.
- [28] O. Pournalimardan, A.-C. Chamayou, C. Janiak, H. Hosseini-Monfared, *Inorg. Chim. Acta* 360 (2007) 1599.
- [29] C. Basu, S. Chowdhury, R. Banerjee, H.S. Evans, S. Mukherjee, *Polyhedron* 26 (2007) 3617.

- [30] M. Bakir, O. Green, W.H. Mulder, *J. Mol. Struct.* 873 (2008) 17.
- [31] J.L. Buss, J. Neuzil, P. Ponka, *Biochem. Soc. Trans.* 30 (2002) 755.
- [32] A.A.R. Despaigne, L.F. Vieira, I.C. Mendes, F.B. Da Costa, N.L. Speziali, H. Beraldo, *J. Braz. Chem. Soc.* 21 (2010) 1247.
- [33] V. Mahalingam, N. Chitrapriva, F.R. Fronczek, K. Natarajan, *Polyhedron* 27 (2008) 1917.
- [34] Q. Wang, Z.-Y. Yang, G.-F. Qi, D.-D. Qin, *Eur. J. Med. Chem.* 44 (2009) 2425.
- [35] W. Bispo Jr., M.S. Alexandre-Moreira, M.A. Alves, A. Perez-Rebolledo, G.L. Parrilha, E.E. Castellano, O.E. Piro, E.J. Barreiro, L.M. Lima, H. Beraldo, *Eur. J. Med. Chem.*, submitted for publication.
- [36] C.A.M. Fraga, E.J. Barreiro, *Curr. Med. Chem.* 13 (2006) 167.
- [37] R.P. Vieira, J.A. Lessa, W.C. Ferreira, F.B. da Costa, L.F.S. Bastos, W.R. Rocha, M.M. Coelho, H. Beraldo, Unpublished results.
- [38] CrysAlis RED, Oxford Diffraction Ltd., Version 1.171.32.38.SCALE3 ABSPACK Scaling Algorithm, CrysAlis RED, Oxford Diffraction Ltd., Version 1.171.32.38.
- [39] Enraf-Nonius (1997–2000), COLLECT, Nonius BV, Delft, The Netherlands.
- [40] Z. Otwinowski, W. Minor, in: C.W. Carter Jr., R.M. Sweet (Eds.), *Methods in Enzymology*, vol. 276, Academic Press, New York, 1997, pp. 307–326.
- [41] A.L. Spek, PLATON, A Multipurpose Crystallographic Tool, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands, 1998.
- [42] G.M. Sheldrick, SHELXS-97; Program for Solution of Crystal Structures, University of Göttingen, Göttingen, Germany, 1997.
- [43] G.M. Sheldrick, SHELXL-97; Program for Crystal Structures Analysis, University of Göttingen, Germany, 1997.
- [44] M. Nardelli, *J. Appl. Crystallogr.* 32 (1999) 563.
- [45] L.J. Farrugia, *J. Appl. Crystallogr.* 32 (1999) 837.
- [46] L.J. Farrugia, *J. Appl. Crystallogr.* 30 (1997) 565.
- [47] C.K. Johnson, ORTEP, Report ORNL-3794, Oak Ridge, TN, 1965.
- [48] J. Valdés-Martínez, R.A. Toscano, R. Salcedo, R. Cea-Olivares, A. Meléndez, *Monatsh. Chem.* 121 (1990) 641.
- [49] M. Salavati-Niasari, A. Amiri, *Appl. Catal. A – Gen.* 290 (2005) 46.
- [50] A.A.R. Despaigne, J.G. da Silva, A.C.M. do Carmo, O.E. Piro, E.E. Castellano, H. Beraldo, *J. Mol. Struct.* 920 (2009) 97.
- [51] A.A.R. Despaigne, J.G. da Silva, A.C.M. do Carmo, O.E. Piro, E.E. Castellano, H. Beraldo, *Inorg. Chim. Acta* 362 (2009) 2117.
- [52] A.A.R. Despaigne, J.G. da Silva, A.C.M. do Carmo, F. Sives, O.E. Piro, E.E. Castellano, H. Beraldo, *Polyhedron* 28 (2009) 3797.
- [53] K. Nakamoto, *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*, fourth ed., Wiley, New York, 1986.
- [54] J.-L. Lu, S.-T. Min, X.-H. Ji, Z.-H. Dang, *Acta Crystallogr., Sect. E: Struct. Rep. Online* 64 (2008) O1694.
- [55] N.V. Kulkarni, G.S. Kurdekar, S. Budagumpi, V.K. Revankar, *J. Coord. Chem.* 63 (2010) 3301.
- [56] S. Ay, R.E. Ziegert, H. Zhang, M. Nieger, K. Rissanen, K. Fink, A. Kubas, R.M. Gschwind, S. Bräse, *J. Am. Chem. Soc.* 132 (2010) 12899.
- [57] J.-H. Wang, P.-F. Yan, G.-M. Li, J.-W. Zhang, P. Chen, M. Suda, Y. Einaga, *Inorg. Chim. Acta* 363 (2010) 3706.



Gabrieli Lessa Parrilha received her B.Sc degree in Chemistry from Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Rio de Janeiro (2005). She earned her Master's Degree in Natural Sciences from the same institution (2008). She is currently a PhD student in Chemistry at Universidade Federal de Minas Gerais. Her experiences involve Coordination Chemistry and Medicinal Inorganic Chemistry with emphasis in the syntheses and investigation of pharmacological activities of bioactive organic molecules and their metal complexes.



Rafael Pinto Vieira received his B.Sc degree in Pharmacy from Universidade Federal de Minas Gerais (2003). He worked for five years in Brazilian Pharmaceutical companies. He earned his Master's Degree in Pharmaceutical Sciences from Universidade de São Paulo (2008). He is currently a PhD student in Chemistry at Universidade Federal de Minas Gerais. His experiences involve Pharmacology, Pharmaceutical Technology, Coordination Chemistry and Medicinal Inorganic Chemistry with emphasis in the syntheses and investigation of pharmacological activities of bioactive organic molecules and their metal complexes.



Anayive Perez-Rebolledo received her B.Sc degree in Chemistry from Universidad del Valle (1988). She earned her Master's Degree in Chemistry from the same institution (2000) and her PhD degree from Universidade Federal de Minas Gerais (2004). She is currently doing a pos doctoral stage at Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN), Brazil. Her experiences involve Coordination Chemistry and Medicinal Inorganic Chemistry with emphasis in the syntheses and investigation of pharmacological activities of bioactive organic molecules and their metal complexes. She is also involved with nuclear medicinal chemistry.



Minas Gerais, Brazil, as conservation scientist.

Isolda Maria Castro Mendes received her B.Sc. (1998) and PhD (2007) in Chemistry from Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil. She has experience in Inorganic Chemistry, Bio-Inorganic Chemistry and Scientific Conservation of Art Objects, Archaeological Sites, and Monuments. She carries on research in X-rays diffraction and fluorescence, crystal structure determination, coordination chemistry, and deterioration mechanisms of art objects. Member of the Brazilian Chemical Society, The Brazilian Association of Crystallography and The International Council of Museums – ICOM. Now working at the School of Fine Arts of Universidade Federal de



new drugs candidates.

Lídia Moreira Lima Earned a B.Sc degree in Pharmacy from Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ, Brazil, 1994). M.Sc in Organic Chemistry (UFRJ, 1997) and PhD in Medicinal Chemistry (UFRJ, 2001). Post-Doctorate in Medicinal Chemistry from University of Navarra (UNAV) Spain. Associate Professor at Faculty of Pharmacy UFRJ. She is “Young Scientist of Rio de Janeiro State” (FAPERJ, BR). Has productivity grant of National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, BR). Is currently Secretary of the *Brazilian Chemical Society Rio de Janeiro*. Guides undergraduate and graduate students in Medicinal Chemistry projects aiming the discovery of



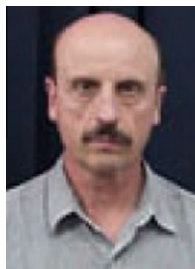
1994.

Eliezer J. Barreiro is Pharmacist and M.Sc in Chemistry of Natural Products (1973) from Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ, Brazil) and Docteur ès Sciences d'État (1978) in Medicinal Chemistry from Université Scientifique et Médicale de Grenoble (France). He is Professor of Medicinal Chemistry at UFRJ since 1986. Published over 210 articles. He is guest author of several book chapters in Medicinal Chemistry, and author of 2 books in this field. His research interests lie in the area of Medicinal Chemistry or Pharmaceutical Chemistry. Currently, is the scientific coordinator of LASSBio® (www.farmacia.ufrj.br/lassbio) which was founded in



organic, metal–organic, bioorganic and bioinorganic, and supra-molecular materials.

Oscar E. Piro received his PhD degree in Physics from the National University of La Plata (UNLP), Argentina, in 1977. He made postdoctoral research at the University of Chicago, USA, working on X-ray Crystallography of biological macromolecules (1978–1980). He is a Research Fellow of CONICET, Argentina, and Full Professor of UNLP. His research interest is grounded in Solid State Physics, particularly in Structural Crystallography by X-ray diffraction methods and also in the optical and spectroscopic (mainly infrared and Raman) properties of crystals. Currently, he works on the structure–physicochemical properties relationship of inorganic,



Eduardo Ernesto Castellano received his B.Sc (1965) and PhD (1968) degrees in Physics from Universidad Nacional de La Plata, Argentina (1965). He has a pos doc from University of Oxford (1970). He is presently Professor of Physics at Universidade de São Paulo. His interests are centered in Physics of Condensed Matter.



Heloisa Beraldo received her PhD degree (Docteur d'État ès Sciences Physiques) from Université Paris VI (1984). She is presently Professor of Chemistry at Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil. Her research interests are centered on Inorganic Medicinal Chemistry, with emphasis on metal-based drugs design, and the effects of metal coordination on the pharmacological profile of organic compounds, antimicrobials, cytotoxic/antitumoral agents and anti-inflammatory agents.

Anexo 3 – Artigos publicados durante o doutorado

Benzaldeído semicarbazona: um candidato a fármaco que alia simplicidade estrutural a um amplo perfil de atividades

Vieira, R. P.; Rocha, L. T. S.; Teixeira, L. R.; Sinisterra, R. D.; Coelho, M. M.; Beraldo, H.*

Rev. Virtual Quim., 2010, 2 (1), 2-9. Data de publicação na Web: 30 de agosto de 2010

<http://www.uff.br/rvq>

Benzaldehyde semicarbazone: a drug candidate that associates structural simplicity to a wide range of activities

Abstract: Since the efficacy and safety of many currently available analgesic, anti-inflammatory and anticonvulsant drugs are not adequate, there is a continuing search for new drug candidates. Benzaldehyde semicarbazone (BS) inhibits convulsions in experimental models of epilepsy. Upon inclusion of BS into cyclodextrins (CDs) a 75-85% reduction of the dose necessary to induce the anticonvulsant effect is observed. BS also inhibits the nociceptive response and edema induced by different stimuli, and angiogenesis in experimental animals, suggesting that the compound, like many anticonvulsant drugs, presents anti-inflammatory and analgesic properties. The wide variety of bioactivities indicates that BS and related compounds, either free or included into CDs, represent a promising group of drug candidates that may be useful in the treatment of human or veterinary diseases.

Keywords: benzaldehyde semicarbazone; cyclodextrins; inflammation, pain; convulsion

Resumo

A busca por novos fármacos analgésicos, anti-inflamatórios e anticonvulsivantes é importante, tendo em vista que a eficácia e a segurança de muitos medicamentos em uso clínico não são adequadas. Benzaldeído semicarbazona (BS) inibe convulsões em modelos experimentais de epilepsia. A inclusão de BS em ciclodextrinas (CDs) reduz em 75-85% a dose necessária para a indução do efeito anticonvulsivante. BS inibe a resposta nociceptiva e o edema induzidos por diferentes estímulos, e atenua a angiogênese em animais experimentais, o que sugere que o composto, assim como muitos anticonvulsivantes, apresenta também ação analgésica e anti-inflamatória. A variedade de atividades farmacológicas indica que BS e compostos relacionados, na forma livre ou incluídos em CDs, são promissores como candidatos a fármacos para o tratamento de condições patológicas humanas ou veterinárias.

palavras-chave: benzaldeído semicarbazona; ciclodextrinas; inflamação; dor; convulsão

* Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, CEP 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brasil.

✉ hberaldo@ufmg.br

Benzaldeído semicarbazona: um candidato a fármaco que alia simplicidade estrutural a um amplo perfil de atividades

**Rafael P. Vieira^a, Leonardo T. S. Rocha^b, Leticia R. Teixeira^a, Rubén D. Sinisterra^a,
Márcio M. Coelho^b, Heloisa Beraldo^{a,*}**

^aDepartamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brasil.

^bFaculdade de Farmácia Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brasil.
[*hberaldo@ufmg.br](mailto:hberaldo@ufmg.br)

Recebido em 30 de junho de 2009. Aceito para publicação em 30 de março de 2010

1. Introdução

2. Semicarbazonas: candidatos a fármacos analgésicos, anti-inflamatórios e anticonvulsivantes

3. Atividade de benzaldeído semicarbazona (BS) em modelos experimentais de dor, inflamação e epilepsia

4. Formulações farmacêuticas de benzaldeído semicarbazona obtidas por inclusão em ciclodextrinas

5. Conclusões

1. Introdução

A inflamação é um processo complexo, que envolve vários tipos celulares e seus mediadores, leitos capilares e fibras sensoriais, além de proteínas presentes no plasma, e tem como objetivo isolar, neutralizar e destruir um agente agressor, além de estimular a reconstituição do tecido danificado.¹ Embora a inflamação aguda seja fundamentalmente uma resposta protetora, é comum que alguns sinais e sintomas, como edema e dor, causem desconforto aos pacientes. Por sua vez, a resposta inflamatória crônica pode ser prejudicial, levando a sequelas indesejáveis, com destruição do parênquima tecidual. Nesses casos, são usados fármacos que reduzem o processo inflamatório por meio da inibição da produção, liberação ou ação de mediadores inflamatórios ou do estímulo à produção de fatores endógenos com propriedades anti-inflamatórias.

A redução de um processo inflamatório, com consequente atenuação de sinais e sintomas associados, tem sido o motivo da utilização de diversas classes de fármacos. Anti-inflamatórios não

esteróides (AINES) são fármacos que, por meio da inibição da síntese de prostaglandinas² e de outros mecanismos,^{3,4} apresentam grande eficácia como agentes analgésicos e antiedematogênicos. Além de serem importantes no sítio da inflamação, as prostaglandinas são também importantes no sistema nervoso central, o que torna os AINES uma classe de fármacos eficazes como antipiréticos e para o alívio de cefaléias. Por outro lado, os anti-inflamatórios esteróides (AIES) inibem a transcrição de genes para diversas citocinas inflamatórias, além de induzir a produção de proteínas que inibem a atividade da fosfolipase A₂. Os AIES também inibem a desgranulação de mastócitos e a produção de óxido nítrico. Dessa forma, os AIES apresentam atividade anti-inflamatória mais ampla do que aquela apresentada pelos AINES.⁵

A Figura 1 mostra de forma resumida o papel dos principais mediadores inflamatórios de natureza lipídica e que representam alvos potenciais para fármacos anti-inflamatórios. As enzimas fosfolipase A₂ e ciclooxigenases 1 e 2 representam os principais alvos dos fármacos anti-inflamatórios mais usados, a

saber: os anti-inflamatórios esteróides (AIES) e os anti-inflamatórios não-esteróides (AINES).



Figura 1. Esquema indicando vias para produção de mediadores inflamatórios de natureza lipídica, prostaglandinas e leucotrienos

Em casos de dores crônicas, notadamente aquelas associadas a neuropatias, nas quais o evento determinante é o aumento da excitabilidade neuronal, os AINES e os AIES não apresentam eficácia analgésica satisfatória. Nesses casos, geralmente usam-se alguns fármacos menos tradicionais, mas que podem apresentar atividade analgésica, como antidepressivos tricíclicos, agonistas α_2 -adrenérgicos, agonistas gabaérgicos e antiepilépticos, entre outros^{6,7}

Entre os fármacos menos tradicionais usados como analgésicos estão os antiepilépticos. Muitos antiepilépticos apresentam atividade antinociceptiva (reduzem a sensibilidade dos animais experimentais a um estímulo nocivo), inibem certas manifestações da resposta inflamatória em modelos experimentais e também são úteis para aliviar diferentes condições dolorosas em humanos. O tratamento sistêmico de ratos com lamotrigina, felbamato e gabapentina inibe a sensibilização a estímulos térmicos em um modelo de dor neuropática induzida por constrição de nervo,⁸ enquanto carbamazepina inibe a sensibilização a um estímulo nocivo e o edema induzidos por levedura.⁹ Foi demonstrado que o efeito antinociceptivo induzido por antiepilépticos em modelos experimentais pode resultar da ativação de mecanismos periféricos^{10,11} ou centrais.^{12,13} Muitos antiepilépticos que apresentam atividade antinociceptiva são bloqueadores de canais para sódio sensíveis à voltagem.^{10,14}

2. Semicarbazonas: candidatos a fármacos analgésicos, anti-inflamatórios e anticonvulsivantes

Uma classe de drogas com atividade antiepiléptica, mas que não se encontra em uso clínico, as semicarbazonas, também apresenta perfil de fármacos potencialmente analgésicos. Semicarbazonas exibem um amplo espectro de atividades,^{15,16} como as atividades anti-hipertensiva,¹⁷ hipolipidêmica,¹⁸ antineoplásica,¹⁹ hipnótica²⁰ e anticonvulsivante.²¹

Entre as bioatividades das semicarbazonas, a mais estudada é a anticonvulsivante. Essa atividade foi demonstrada nos modelos experimentais de convulsões induzidas pela injeção subcutânea de pentilenotetrazol ou por eletrochoque^{21,22} e também em um modelo que utiliza uma linhagem de animais geneticamente selecionados para apresentar convulsões induzidas por estímulo sonoro.²³

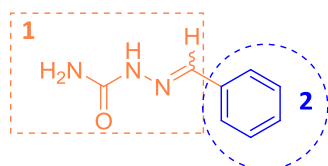
Semicarbazonas contendo grupos aril, arilideno, ariloxi(aril) têm sido investigadas.²¹⁻²⁵ De acordo com Dimmock *et al.*, a atividade anticonvulsivante das semicarbazonas resulta da presença, em sua estrutura, de pelo menos três grupos: duas unidades hidrofóbicas e um doador e receptor de ligação de hidrogênio.^{22,25} A partir desses resultados, Pandeya *et al.* fizeram modificações estruturais em moléculas de diversas semicarbazonas e sugeriram a possibilidade de mais um grupo, sendo esse um doador de elétrons,

contribuir para a atividade anticonvulsivante desses compostos.²⁶ Acredita-se que as semicarbazonas devam interagir em dois locais no alvo molecular – uma área de ligações de hidrogênio e uma região hidrofóbica.^{22,25}

Semicarbazonas aumentam a concentração de ácido gama-aminobutírico (GABA) em algumas regiões do sistema nervoso central²⁷ e também reduzem a concentração de glutamato no fluido cérebro-espinhal,²⁸ alterações que podem contribuir para a atividade anticonvulsivante desses compostos.

Benzaldeído semicarbazona (BS), a aril-semicarbazona de fórmula molecular mais simples, é uma molécula que contém os requisitos estruturais necessários à atividade anticonvulsivante (Figura 2) e apresenta baixa neurotoxicidade.²⁹ A literatura relata que 4-[4-fluorfenoxi]benzaldeído semicarbazona bloqueia canais para sódio sensíveis à voltagem,³⁰ o que sugere que BS também possa bloquear esses canais e, assim como os demais bloqueadores desse tipo de canal, possa apresentar atividade antinociceptiva. Alguns fármacos com atividade anticonvulsivante inibem certas manifestações do processo inflamatório, e BS também apresenta tal perfil.

BS é um composto de fácil obtenção, cuja síntese compreende apenas uma etapa (Figura 3), realizada à temperatura ambiente, utilizando solventes atóxicos. O produto é obtido com rendimento entre 80 e 85%. No entanto, BS possui como desvantagem a baixa solubilidade em água.



benzaldeído semicarbazona (BS)

Figura 2. Estrutura de benzaldeído semicarbazona (BS) com os possíveis sítios de ligação com o alvo molecular importantes para a atividade anticonvulsivante, a saber: 1 (sítio de ligação de hidrogênio) e 2 (sítio de interação hidrofóbica)

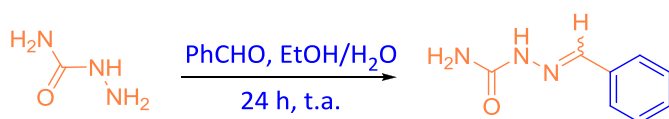


Figura 3. Síntese de benzaldeído semicarbazona (BS).

3. Atividade de benzaldeído semicarbazona (BS) em modelos

experimentais de dor, inflamação e epilepsia

BS inibe o processamento da resposta nociceptiva ou manifestações da resposta inflamatória em modelos experimentais de dor e inflamação. O tratamento com BS inibe a resposta nociceptiva induzida por formaldeído em camundongos, um modelo experimental com alto valor preditivo para fármacos analgésicos. A resposta nociceptiva induzida por formaldeído envolve duas fases distintas. A primeira começa imediatamente após a injeção e dura menos de 5 min. A resposta nociceptiva observada durante essa fase aparenta ser causada predominantemente por ativação direta de neurônios sensoriais nociceptivos, principalmente os do tipo C.³¹ A segunda fase começa em torno de 15 min após injeção de formaldeído e dura aproximadamente 15 min. A resposta nociceptiva durante essa fase depende da produção de mediadores inflamatórios locais e da facilitação da transmissão sináptica na medula espinhal, sendo esse resultado da ativação de receptores para glutamato³² e da produção de óxido nítrico.³³ Usualmente, a segunda fase da resposta nociceptiva induzida por formaldeído é inibida por anti-inflamatórios,^{34,35} enquanto a primeira e a segunda fase são inibidas por fármacos de ação predominantemente central, como os analgésicos opioides³⁴ e os antidepressivos tricíclicos.³⁶ A administração de BS inibe tanto a primeira quanto a segunda fase da resposta nociceptiva induzida por formaldeído, sendo que a segunda fase é inibida em maior extensão. A inibição mais evidente da segunda fase da resposta induzida por formaldeído indica que BS apresenta uma atividade farmacológica que se assemelha mais àquela de anti-inflamatórios.

Com o objetivo de investigar a ação de um composto sobre manifestações de uma resposta inflamatória com curso temporal mais prolongado, avalia-se o efeito induzido pelo composto sobre a sensibilização a estímulos térmicos ou mecânicos provocada pela injeção intraplantar de carragenina, um estímulo inflamatório tradicionalmente usado em modelos experimentais. A carragenina induz resposta inflamatória local caracterizada por edema e sensibilização a estímulos nocivos e não nocivos. Essas respostas estão associadas com a produção local de múltiplos mediadores inflamatórios, como a bradicinina,³⁷ as prostaglandinas³⁸ e o óxido nítrico,³⁹ que sensibilizam e ativam os neurônios sensoriais nociceptivos, e também com a facilitação de transmissão sináptica no sistema nervoso central como resultado da ativação de receptores para glutamato⁴⁰ e da produção de óxido nítrico.⁴¹ O

edema induzido por carragenina também resulta da ação local de vários mediadores inflamatórios, incluindo bradicinina,⁴² óxido nítrico,⁴³ prostaglandinas,⁴⁴ 5-hidroxitriptamina,⁴⁵ histamina⁴⁶ e citocinas diversas.^{47,48}

A administração de BS inibe a sensibilização aos estímulos térmico e mecânico e o edema induzidos pela carragenina em ratos. Esses efeitos induzidos por BS, associados à inibição marcante da segunda fase da resposta nociceptiva induzida por formaldeído, reforçam a hipótese de que o efeito induzido por BS nos modelos experimentais de dor se deve mais a uma ação periférica do que central. Além de BS inibir as manifestações agudas do processo inflamatório, o tratamento prolongado de camundongos com BS inibe a angiogênese (formação de vasos sanguíneos) induzida pelo implante subcutâneo de discos de esponja.⁴⁹

4. Formulações farmacêuticas de benzaldeído semicarbazona obtidas por inclusão em ciclodextrinas

BS, apesar de ser facilmente sintetizada e obtida com rendimento elevado, apresenta baixa solubilidade em água e veículos aquosos. Além disso, os resultados obtidos nos modelos experimentais de dor, inflamação e epilepsia também indicam que são necessárias doses elevadas para observação dos efeitos antinociceptivo⁴⁹, antiedematogênico⁴⁹ e anticonvulsivante²³. Assim, formulações em ciclodextrinas (CDs) revelam-se uma estratégia interessante para facilitar a solubilização e a administração, bem como reduzir a dose de BS necessária para a obtenção dos efeitos farmacológicos.

CDs são oligossacarídeos cíclicos que foram obtidos inicialmente como produtos de degradação do amido. Esses compostos são constituídos de unidades de glicose unidas pela ligação $\alpha(1-4)$, sendo os mais utilizados aqueles que apresentam seis, sete ou oito unidades de glicose, denominados

respectivamente α , β e γ -CD.^{50,51} A Figura 4 mostra as unidades de glicose formadoras das estruturas das CDs.

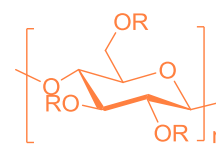


Figura 4. Unidades de glicose unidas pela ligação $\alpha(1-4)$ da estrutura de ciclodextrinas. α -CD: $n = 6$, $R = H$; β -CD: $n = 7$, $R = H$; HP- β -CD: $n = 7$, $R =$ hidroxipropil; γ -CD: $n = 8$, $R = H$

As CDs formam uma estrutura cíclica na forma de cone truncado, com uma cavidade interna apolar, cujo diâmetro varia entre 0,49 - 0,79 nm. As hidroxilas primárias ficam localizadas no lado mais estreito do cone e as secundárias no lado mais largo.

CDs são compostos quimicamente estáveis, que podem ser modificados de maneira regioseletiva. Estudos de toxicidade, mutagenicidade, teratogenicidade e carcinogenicidade indicam que as CDs são compostos que apresentam boa segurança.⁵² As CDs (hospedeiros) formam complexos com várias moléculas hidrofóbicas (hóspedes), incluindo-as em sua cavidade, de forma completa ou parcial.⁵³ A inclusão pode alterar características farmacocinéticas dos compostos e farmacotécnicas das formulações, levando a um aumento da estabilidade, solubilidade e biodisponibilidade dos fármacos.⁵² A utilização de CDs também permite a conversão de fármacos líquidos ou oleosos em pós de alta fluidez, um processo importante na fabricação de formulações farmacêuticas sólidas, como comprimidos. O emprego de CDs pode igualmente evitar possíveis incompatibilidades entre os componentes das formulações.⁵⁴

O equilíbrio de associação/dissociação entre a CD e uma molécula do fármaco está esquematizado na Figura 5.

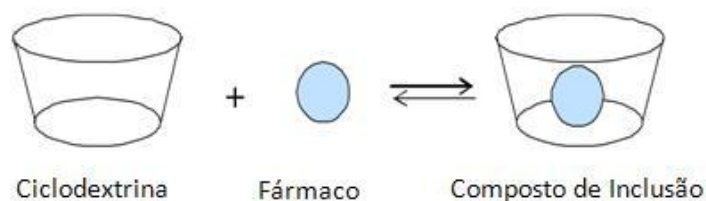


Figura 5. Representação esquemática do equilíbrio de associação/dissociação entre fármaco e ciclodextrina

No mercado há vários compostos de inclusão em CDs de fármacos de diferentes classes terapêuticas. Esses compostos envolvem anti-inflamatórios não-esteróides, anti-inflamatórios esteróides, hormônios, antifúngicos e antiulcerosos, entre outros, em formulações com diferentes CDs e destinadas à administração por diferentes vias (e.g. oral, tópica, intravenosa).⁵⁴ A caracterização de complexos com CDs, com o objetivo de evidenciar o processo de inclusão e estabelecer a proporção CD/fármaco, é realizada por meio da avaliação de suas propriedades físico-químicas. Para isto, além de estudos de equilíbrio em solução, são utilizadas técnicas como espectroscopia na região do infravermelho, análise térmica (TG, DTG e DSC), difração de raios-X de pó e ressonância magnética nuclear ¹H, ¹³C RMN, medidas de tempo de relaxação de hidrogênio (T₁) e técnicas bidimensionais de RMN.

BS forma compostos de inclusão do tipo 1:1 com β-ciclodextrina e hidroxipropil-β-ciclodextrina (BS/β-CD e BS/HP-β-CD). Para a caracterização todas as análises são feitas comparando-se quatro amostras: BS, a CD, o composto de inclusão e uma mistura física. O composto de inclusão é obtido misturando-se BS e CD em água com subsequente liofilização. A mistura física é preparada imediatamente antes da análise, colocando-se os compostos em contato no estado sólido. A inclusão é evidenciada por mudanças no comportamento térmico de BS, pelas alterações nos tempos de relaxação de hidrogênio de BS no complexo com a CD, e pelo aparecimento de correlações entre hidrogênios de BS e hidrogênios da cavidade da CD nos espectros de RMN bidimensionais.^{23,24}

Estudos dos efeitos induzidos pelos compostos de inclusão BS/β-CD e BS/HP-β-CD em vários modelos experimentais de epilepsia mostram que inclusão faz aumentar a biodisponibilidade de BS com a consequente diminuição da dose terapêutica de 100 mg/Kg, para a droga livre, para 25-15 mg/Kg, para os compostos de inclusão, o que representa 75-85% de redução da dose.^{23,55}

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq e ao INCT-INOVAR (#573.564/2008-6).

Referências Bibliográficas

¹ Tracey, K. J. *Nature* **2002**, *420*, 853. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

² Vane, J. R. *Nat. New. Biol.* **1971**, *231*, 232. [[PubMed](#)]

A demonstração de que a inclusão de BS em CDs permite uma redução acentuada da dose necessária para a indução do efeito anticonvulsivante nos modelos experimentais indica que a inclusão de fármacos em CDs de fato representa uma importante estratégia durante o processo de desenvolvimento de medicamentos. Essa estratégia pode ser particularmente importante durante o desenvolvimento de novos medicamentos anticonvulsivantes, uma vez que as doses necessárias para a obtenção da resposta terapêutica são elevadas e geralmente induzem muitas reações adversas. Além disso, considerando-se que a epilepsia é uma doença crônica, uma liberação lenta do fármaco anticonvulsivante, obtida por meio de sua inclusão em CDs, poderia permitir o uso de um esquema posológico mais flexível, aumentando a adesão do paciente à farmacoterapia e melhorando sua qualidade de vida.

5. Conclusões

As propriedades antinociceptiva, antiedematogênica e antiangiogênica de BS, sugerem que semicarbazonas são compostos que apresentam múltiplas atividades farmacológicas, provavelmente resultantes de diferentes mecanismos. Apesar de não haver uma demonstração direta dos mecanismos responsáveis pela atividade antinociceptiva de BS, é provável que esta se deva mais a uma ação periférica do que central. Contudo, BS apresenta igualmente atividade anticonvulsivante, o que indica que o composto pode interagir com múltiplos alvos moleculares. A variedade de atividades farmacológicas, associada com reduzida neurotoxicidade, indica que BS e compostos relacionados, na forma livre ou incluídos em CDs, representam um grupo promissor de candidatos a fármacos úteis no tratamento de condições patológicas humanas ou veterinárias.

³ Kopp, E.; Ghosh, S. *Science* **1994**, *265*, 956. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

⁴ Voilley, N.; De Weille, J.; Mamet, J.; Lazdunski, M. *J. Neurosci.* **2001**, *21*, 8026. [[PubMed](#)]

⁵ Brattsand, R.; Linden, M. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **1996**, *10*, 81. [[PubMed](#)]

⁶ Sindrup, S. H.; Jensen, T. S. *Neurology* **2000**, *55*, 915. [[PubMed](#)]

⁷ Jensen, T. S. *Eur. J. Pain* **2002**, *6*, 61. [[CrossRef](#)]

[PubMed]

⁸ Hunter, J. C.; Gogas, K. R.; Hedley, L. R.; Jacobson, L. O.; Kassotakis, L.; Thompson, J.; Fontana, D. J. *Eur. J. Pharmacol.* **1997**, *324*, 153. [CrossRef] [PubMed]

⁹ Bianchi, M.; Rossoni, G.; Sacerdote, P.; Panerai, A. E.; Berti, F. *Eur. J. Pharmacol.* **1995**, *294*, 71. [CrossRef] [PubMed]

¹⁰ Todorovic, S. M.; Rastogi, A. J.; Jevtovic-Todorovic, V. *Br. J. Pharmacol.* **2003**, *140*, 255. [CrossRef] [PubMed]

¹¹ Carlton, S. M.; Zhou, S. *Pain* **1998**, *76*, 201. [CrossRef] [PubMed]

¹² Foong, F. W.; Satoh, M. *Br. J. Pharmacol.* **1984**, *83*, 493. [PubMed]

¹³ Lu, Y.; Westlund, K. N. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1999**, *290*, 214. [PubMed]

¹⁴ Blackburn-Munro, G.; Ibsen, N.; Erichsen, H. K. *Eur. J. Pharmacol.* **2002**, *445*, 231. [CrossRef] [PubMed]

¹⁵ Beraldo, H. *Quím. Nova*, **2004**, *27*, 461. [CrossRef]

¹⁶ Beraldo, H.; Gambino, D. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2004**, *4*, 31. [CrossRef] [PubMed]

¹⁷ Warren, J. D.; Woodward, D. L.; Hargreaves, R. T. *J. Med. Chem.* **1977**, *20*, 1520. [CrossRef] [PubMed]

¹⁸ Wong, O. T.; Hall, I. H.; Chapman, J. M. Jr. *Pharm. Res.* **1989**, *6*, 230. [CrossRef] [PubMed]

¹⁹ Asís, S. E.; Bruno, A. M.; Molina, D. A.; Conti, G. M.; Gaozza, C. H. *Farmaco* **1996**, *51*, 419. [PubMed]

²⁰ Pandeya, S. N.; Aggarwal, N.; Jain, J. S. *Pharmazie* **1999**, *54*, 300. [PubMed]

²¹ Dimmock, J. R.; Sidhu, K. K.; Thayer, R. S.; Mack, P.; Duffy, M. J.; Reid, R. S.; Quail, J. W.; Pugazhenti, U.; Ong, A.; Bikker, J. A. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 2243. [CrossRef] [PubMed]

²² Dimmock, J. R.; Pandeya, S. N.; Quail, J. W.; Pugazhenti, U.; Allen, T. M.; Kao, G. Y.; Balzarini, J.; DeClercq, E. *Eur. J. Med. Chem.* **1995**, *30*, 303. [CrossRef]

²³ Beraldo H.; Sinisterra R. D.; Teixeira, L. R.; Vieira R. P.; Doretto M. C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *296*, 241. [CrossRef] [PubMed]

²⁴ Dimmock, J. R.; Sidhu, K. K.; Tumber, S. D.; Basran, S. K.; Chen, M.; Quail, J. W.; Yang, J.; Rozas, I.; Weaver, D. F. *Eur. J. Med. Chem.* **1995**, *30*, 287. [CrossRef]

²⁵ Dimmock, J. R.; Puthucode, R. N.; Smith, J. M.; Heltherington, M.; Quail, W. J.; Pughazenti, U.; Leshler, T.; Stables, J. P. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 3984.

[CrossRef] [PubMed]

²⁶ Pandeya, S. N.; Raja, A. S.; Stables, J. P. *J. Pharm. Pharm. Sci.* **2002**, *5*, 266. [PubMed]

²⁷ Thirumurugan, R.; Sriram, D.; Saxena, A.; Stables, J.; Yogeeswari, P. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 3106. [CrossRef]

²⁸ Mattei, C.; Molgo, J.; Joseph, X.; Israel, M.; Bloy, C. *Neurosci. Lett.* **1999**, *271*, 183. [CrossRef] [PubMed]

²⁹ Dimmock, J. R.; Puthucode, R. N. **1997**. (WO9640628)

³⁰ Ilyin, V. I.; Hodges, D. D.; Whittemore, E. R.; Carter, R. B.; Cai, S. X.; Woodward, R. M. *Br. J. Pharmacol.* **2005**, *144*, 801. [CrossRef] [PubMed]

³¹ Puig, S.; Sorkin, L. S. *Pain* **1996**, *64*, 345. [CrossRef] [PubMed]

³² Chaplan, S. R.; Malmberg, A. B.; Yaksh, T. L. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1997**, *280*, 829. [PubMed]

³³ Okuda, K.; Sakurada, C.; Takahashi, M.; Yamada, T.; Sakurada, T. *Pain* **2001**, *92*, 107. [CrossRef] [PubMed]

³⁴ Shibata, M.; Ohkubo, T.; Takahashi, H.; Inoki, R. *Pain* **1989**, *38*, 347. [CrossRef] [PubMed]

³⁵ Tjølsen, A.; Berge, O. G.; Hunskaar, S.; Rosland, J. H.; Hole, K. *Pain* **1992**, *51*, 5. [CrossRef] [PubMed]

³⁶ Sawynok, J.; Esser, M. J.; Reid, A. R. *Pain* **1999**, *82*, 149. [CrossRef] [PubMed]

³⁷ Poole, S.; Lorenzetti, B. B.; Cunha, J. M.; Cunha, F. Q.; Ferreira, S. H. *Br. J. Pharmacol.* **1999**, *126*, 649. [CrossRef] [PubMed]

³⁸ Hargreaves, K.; Dubner, R.; Brown, F.; Flores, C.; Joris, J. *Pain* **1988**, *32*, 77. [CrossRef] [PubMed]

³⁹ Handy, R. L.; Moore, P. K. *Neuropharmacology* **1998**, *37*, 37. [CrossRef] [PubMed]

⁴⁰ Sluka, K. A.; Jordan, H. H.; Westlund, K. N. *Pain* **1994**, *59*, 95. [CrossRef] [PubMed]

⁴¹ Meller, S. T.; Cummings, C. P.; Traub, R. J.; Gebhart, G. F. *Neuroscience* **1994**, *60*, 367. [CrossRef] [PubMed]

⁴² Wirth, K. J.; Alpermann, H. G.; Satoh, R.; Inazu, M. *Agents Actions Suppl.* **1992**, *38*, 428. [PubMed]

⁴³ Handy, R. L.; Moore, P. K. *Br. J. Pharmacol.* **1998**, *123*, 1119. [CrossRef] [PubMed]

⁴⁴ Salvemini, D.; Wang, Z. Q.; Wyatt, P. S.; Bourdon, D. M.; Marino, M. H.; Manning, P. T.; Currie, M. G. *Br. J. Pharmacol.* **1996**, *118*, 829. [PubMed]

⁴⁵ Holsapple, M. P.; Schnur, M.; Yim, G. K. *Agents Actions* **1980**, *10*, 368. [CrossRef] [PubMed]

- ⁴⁶ Stochla, K.; Maslinski, S. *Agents Actions* **1982**, *12*, 201. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴⁷ Chen, Y. L.; Le Vraux, V.; Giroud, J. P.; Chauvelot-Moachon, L. *Eur. J. Pharmacol.* **1994**, *271*, 319. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴⁸ Suzuki, Y.; Tanihara, M.; Nakagawa, M.; Furukawa, A.; Masuda, C.; Terasawa, K.; Ichikawa, Y.; Mizushima, Y. *J. Interferon Cytokine Res.* **1995**, *15*, 1083. [[PubMed](#)]
- ⁴⁹ Rocha, L. T.; Costa, K. A.; Oliveira, A. C.; Nascimento, E. B. Jr; Bertollo, C. M.; Araújo, F.; Teixeira, L. R.; Andrade, S. P.; Beraldo, H.; Coelho, M. *Life Sci.* **2006**, *79*, 499. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵⁰ Szejtli, J. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1743. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵¹ Silva, F. C. Ciclodextrinas como veículos para a administração de fármacos. Disponível em <http://www.portaldosfarmacos.ccs.ufrj.br/resenhas_ciclodextrinas.htm>. Acesso em 12 novembro 2009.
- ⁵² Uekama, K.; Hirayama, F.; Irie, T. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 2045. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵³ Sinisterra, R. D.; Filgueiras, C. A. L.; Alves de Carvalho, C. A.; Abras, A.; Cortés, M. E.; Menezes, C. A. *Mol. Recog. Incl.* **1998**, *1*, 507.
- ⁵⁴ Davis, M. E.; Brewster, M. E. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3*, 1023. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵⁵ Teixeira, L. R.; Sinisterra, R. D.; Vieira, R. P.; Doretto, M. C.; Beraldo, H. *J. Incl. Phenom. Macrocyclic Chem.* **2003**, *47*, 77. [[CrossRef](#)]

Coordination of lapachol to bismuth(III) improves its anti-inflammatory and anti-angiogenic activities

Gabrieli L. Parrilha · Rafael P. Vieira · Paula P. Campos ·
Grácia Divina F. Silva · Lucienir P. Duarte ·
Sílvia P. Andrade · Heloisa Beraldo

Received: 6 June 2011 / Accepted: 15 July 2011 / Published online: 6 August 2011
© Springer Science+Business Media, LLC. 2011

Abstract Complex $[\text{Bi}(\text{Lp})_2]\text{Cl}$ was obtained with 4-hydroxy-3-(3-methylbut-2-enyl)naphthalene-1,2-dione, “lapachol” (HLp). Lapachol, $[\text{Bi}(\text{Lp})_2]\text{Cl}$ and BiCl_3 were evaluated in a murine model of inflammatory angiogenesis induced by subcutaneous implantation of polyether polyurethane sponge discs. Intraperitoneal (i.p.) administration of lapachol or $[\text{Bi}(\text{Lp})_2]\text{Cl}$ reduced the hemoglobin content in the implants suggesting that reduction of neo-vascularization was caused by lapachol. In the *per os* treatment only $[\text{Bi}(\text{Lp})_2]\text{Cl}$ decreased the hemoglobin content in the implants. Likewise, *N*-acetylglucosaminidase (NAG) activity decreased in the implants of the groups i.p. treated with lapachol and $[\text{Bi}(\text{Lp})_2]\text{Cl}$ while in the *per os* treatment inhibition was observed only for $[\text{Bi}(\text{Lp})_2]\text{Cl}$. Histological analysis showed that the components of the fibro-vascular tissue (vascularization and inflammatory cell population) were decreased in lapachol- and complex-treated groups. Our results suggest that both lapachol and

$[\text{Bi}(\text{Lp})_2]\text{Cl}$ exhibit anti-angiogenic and anti-inflammatory activities which have been attributed to the presence of the lapachol ligand. However, coordination to bismuth(III) could be an interesting strategy for improvement of lapachol’s therapeutic properties.

Keywords Lapachol · Bismuth(III) complex · Sponge implants · Angiogenesis · Inflammation

Introduction

Inflammation, angiogenesis and remodeling are self-limiting processes under normal healing conditions (Mendes et al. 2009a). Angiogenesis is a fundamental process to normal and abnormal tissue growth and repair, which consists of recruiting endothelial cells toward an angiogenic stimulus. However, if one or more of those processes are maintained further injury is caused resulting in chronic inflammatory conditions (Gong and Koh 2010; Mendes et al. 2009a; Walsh and Pearson 2001). Chronic inflammatory processes such as rheumatoid arthritis, Crohn’s disease and psoriasis share these abnormal healing features. Thus, therapies that attenuate inflammatory angiogenesis and fibrotic processes are able to prevent progression and/or maintenance of chronic inflammatory conditions (Araújo et al. 2010; Xavier et al. 2010).

4-Hydroxy-3-(3-methylbut-2-enyl)naphthalene-1,2-dione, “lapachol” (Fig. 1), is a naphthoquinone

G. L. Parrilha · R. P. Vieira · G. D. F. Silva ·
L. P. Duarte · H. Beraldo (✉)
Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas,
Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte,
MG 31270-901, Brazil
e-mail: hberaldo@ufmg.br

P. P. Campos · S. P. Andrade (✉)
Departamento de Fisiologia e Biofísica Instituto de
Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas
Gerais, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brazil
e-mail: andrades@icb.ufmg.br

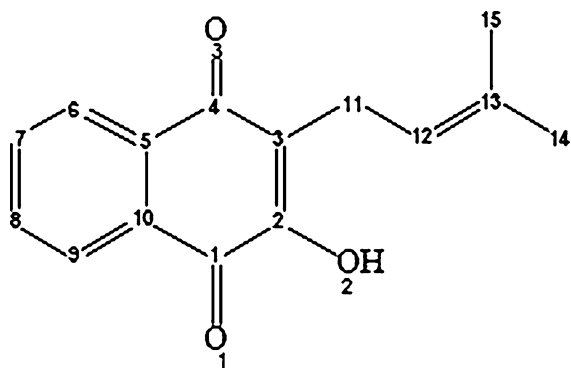


Fig. 1 Structure of 4-hydroxy-3-(3-methylbut-2-enyl)naphthalene-1,2-dione (Lapachol)

obtained from the heartwood of Brazilian *Tabebuia* trees (Bignoniaceae family) (Da Silva Júnior et al. 2011), which exhibits wide spectrum of biological activities, such as antitumoral, antimicrobial and antiprotozoal activities (Eyong et al. 2008; Oliveira et al. 2010). Anti-inflammatory activity was also demonstrated in studies with animal models (De Almeida et al. 1990; Lira et al. 2008).

Bismuth has long been associated with Medicine. The first full account of the internal administration of a bismuth compound was in 1786 by Louis Odier for the treatment of dyspepsia. Currently, the major medicinal use of bismuth compounds is for treating gastrointestinal disorders (Briand and Burford 1999; Yang and Sun 2007). The roles of these compounds in gastric and duodenal ulcer therapy and the eradication of *Helicobacter pylori*—a bacterium associated with the pathogenesis of gastro-duodenal ulcers—have been extensively investigated (Sadler et al. 1999; Severi et al. 2009). Pharmacological studies suggest that the treatment and prevention of ulcers by colloidal bismuth subcitrate (CBS) involve antimicrobial action together with fortification of gastric mucus and the stimulation of cytoprotective processes (Hall 1989; Lee 1991). Besides bismuth's activities on gastrointestinal disorders, investigations on the anti-inflammatory activity of bismuth subgallate (BSG) have been reported (Lin et al. 2004). Results suggest that BSG has an effect on suppressing nitric oxide and prostaglandin E₂, important mediators in inflammatory processes.

In the present work we studied the effects of lapachol (HLp), its bismuth(III) complex [Bi(Lp)₂]Cl and BiCl₃ in an experimental model of inflammatory

angiogenesis induced by a sponge implant in order to characterize probable synergistic effects between the metal and the naphthoquinone on murine models. The effects of the compounds on the angiogenic and inflammatory components of the fibro-vascular tissue were investigated.

Experimental

Materials and methods

Partial elemental analyses were performed on a Perkin Elmer CHN 2400 analyzer. An YSI model 31 conductivity bridge was employed for molar conductivity measurements. Infrared spectra were recorded on a Perkin Elmer FT-IR Spectrum GX spectrometer using KBr plates (4000–400 cm⁻¹) and Nujol mulls between CsI plates (400–200 cm⁻¹). NMR spectra were obtained with a Bruker DPX-200 Avance (200 MHz) spectrometer using DMSO-*d*₆ as the solvent and TMS as internal reference.

All common chemicals were purchased from Aldrich and used without further purification.

Isolation of lapachol

Lapachol was isolated from *Tabebuia* sp. using a method described by Ferreira (1996). The sawdust of *Tabebuia* sp. wood (100 g) was treated with 300 ml of 10% Na₂CO₃ aqueous solution, and maintained under stirring during 5 min. The red solution was filtered and the residue submitted to another extraction using 400 ml of sodium carbonate solution, and stirred for 10 min. The filtrate was carefully treated with concentrated HCl, drop by drop with constant agitation, until pH < 5, which is easily identified by the change of color from red to yellow. The extraction mixture was stirred for 30 min, and filtered in a Büchner funnel, under vacuum. After dried, the obtained solid material was washed with cold distilled water. The yellowish solid material (900 mg) was submitted to silica gel (70–230 Mesh, Merck) column chromatography, eluted with chloroform. The obtained yellow solid was re-crystallized with hexane to give pure yellow crystals (350 mg). The yellow crystalline material was chemically identified as lapachol through comparison with authentic sample using thin layer chromatography

and mixed melting point. Melting point: 139–141°C. IR (cm⁻¹): 3352 ν (OH), 1661 and 1639 ν (C=O), 1450–1591 ν (C=C); ¹H NMR (δ (ppm)) 1.68 and 1.79 (s, 2 Me), 3.3 (d, CH₂–CH=) and 5.2 (t, CH₂–CH=).

Synthesis of the bismuth(III) complex

The bismuth(III) complex was obtained by stirring under reflux an ethanol solution of lapachol (HLp) with bismuth chloride, BiCl₃, together with sodium acetate, NaCH₃COO, in 3:1:3 lapachol:BiCl₃:NaCH₃COO molar ratio. The obtained solid was filtered off, washed with ethanol and diethylether and then dried.

[Bi(Lp)₂]Cl

Orange solid. Anal. Calc. for C₃₀H₂₆O₆ClBi (726.96 g mol⁻¹): C 49.57%; H 3.60%. Found: C 49.01%; H 3.60%. Molar conductivity (1 × 10⁻³ mol l⁻¹ DMF): 77.35 Ω^{-1} cm² mol⁻¹. IR (KBr, cm⁻¹): ν (C=O) 1634, 1623, ω (C–H) 729. IR (CsI/Nujol, cm⁻¹): ν (M–O) 489, 472. Signals in ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 7.87 (1H, H9), 7.80 (1H, H6), 7.71 (1H, H8), 7.57 (1H, H7), 5.11 (1H, H12), 3.10 (2H, H11), 1.65 (3H, H14), 1.51 (3H, C15). Yield: 77%.

Anti-angiogenic activity

Animals

Male Swiss mice 7–8 weeks (20–30 g body weight) were used in these experiments. The mice were provided by the Central Animal Facility at the Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Brazil. The animals were housed individually and provided with chow pellets and water ad libitum. The light/dark cycle was 12:12 h with lights on at 7:00 a.m. and lights off at 7:00 p.m. Efforts were made to avoid all unnecessary distress to the animals. Housing, anaesthesia and post-operative care concurred with the guidelines established by our local Institutional Animal Welfare Committee.

Preparation of sponge discs and implantation

Polyether–polyurethane sponge (Vitafoam Ltd., Manchester, UK) was used as the implanted material. The implants were discs, 5 mm thick × 8 mm diameter and were soaked overnight in 70% v/v ethanol and

sterilized by boiling in distilled water for 15 min before implantation. For that, the animals were anaesthetized with 2,2,2-tribromoethanol (1 mg kg⁻¹; i.p. Aldrich, USA), the dorsal hair shaved and the skin wiped with 70% ethanol. The sponge discs were aseptically implanted into a subcutaneous pouch, which had been made with curved artery forceps through a 1 cm long dorsal mid-line incision. Post-operatively, the animals were monitored for any signs of infection at the operative site, discomfort or distress; any showing such signs were immediately humanely killed.

Intraperitoneal (i.p.) and per os administrations of the compounds

Suspensions of lapachol, BiCl₃ and bismuth(III) complex [Bi(Lp)₂]Cl were prepared in tween 80.6% in saline (i.p. route) and in carboxymethylcellulose (CMC) 0.5% in saline (*per os* route). Lapachol 25 mg kg⁻¹ day⁻¹ was used as positive control (Bezerra et al. 2008). Doses of BiCl₃ (16.3 mg kg⁻¹ day⁻¹) and [Bi(Lp)₂]Cl (37.7 mg kg⁻¹ day⁻¹) were equimolar to lapachol 25 mg kg⁻¹ day⁻¹. In *per os* treatment, doses of the compounds ten-fold less were also used to show dose response effects. Higher doses were not used since high doses of lapachol (80 and 100 mg kg⁻¹) administered orally present toxic effects (Maeda et al. 2008).

Treatments started on the day of sponge implantation and finished after 8 days. Control groups received vehicles in the same schedule. The treatment was well tolerated by the animals over the experimental period.

Tissue extraction and determination of myeloperoxidase and N-acetylglucosaminidase activities

The number of neutrophils in implants was measured by assaying myeloperoxidase (MPO) activity as previously described (Ferreira et al. 2004; Mendes et al. 2009a). The implants for this set of experiments were removed 9 days post-implantation after daily doses of the compounds. After excision they were weighed, homogenized in pH 4.7 buffer (0.1 mol l⁻¹ NaCl, 0.02 mol l⁻¹ NaPO₄, 0.015 mol l⁻¹ NaEDTA), centrifuged at 12,000 × g for 10 min. The pellets were then re-suspended in 0.05 mol l⁻¹ NaPO₄

buffer (pH 5.4) containing 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB) followed by three freeze–thaw cycles using liquid nitrogen. MPO activity in the supernatant samples was assayed by measuring the change in absorbance (optical density; OD) at 450 nm using tetramethylbenzidine ($1.6 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$) and H_2O_2 ($0.3 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$). The reaction was terminated by the addition of 50 μl of H_2SO_4 (4 mol l^{-1}). Results were expressed as change in OD per gram of wet tissue.

The infiltration of mononuclear cells into the implants was quantified by measuring the levels of the lysosomal enzyme *N*-acetylglucosaminidase (NAG) present in high levels in activated macrophages (Ferreira et al. 2004; Mendes et al. 2009a). The implants removed 9 days post-implantation were homogenized in NaCl solution (0.9% w/v) containing 0.1% v/v Triton X-100 (Promega) and centrifuged ($3,000 \times g$; 10 min at 4°C). Samples (100 μl) of the resulting supernatant were incubated for 10 min with 100 μl of *p*-nitrophenyl-*N*-acetyl-beta-D-glucosaminide (Sigma) prepared in citrate/phosphate buffer (0.1 mol l^{-1} citric acid, $0.1 \text{ mol l}^{-1} \text{ Na}_2\text{HPO}_4$; pH 4.5) to yield a final concentration of $2.24 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$. The reaction was stopped by the addition of 100 μl of 0.2 mol l^{-1} glycine buffer (pH 10.6). Hydrolysis of the substrate was determined by measuring the absorption at 400 nm. Results were expressed as nmol mg^{-1} wet tissue.

Hemoglobin extraction

The extent of vascularization of the sponge implants was assessed by the amount of hemoglobin (Hb) detected in the tissue using the Drabkin method (Ferreira et al. 2004; Mendes et al. 2009a). At day 9 post-implantation, the animals were killed and the sponge implants carefully removed, dissected free from adherent tissue and weighed. Each implant was homogenized (Tekmar TR-10, OH) in 5 ml of Drabkin reagent (Labtest, São Paulo, Brazil) and centrifuged at $12,000 \times g$ for 20 min. The supernatants were filtered through a 0.22 μm Millipore filter. The hemoglobin concentration in the samples was determined spectrophotometrically by measuring absorbance at 540 nm using an ELISA plate reader and compared against a standard curve of hemoglobin. The content of hemoglobin in the implant was expressed as $\mu\text{g Hb per mg}$ wet tissue.

Histological analysis and staining

The sponge implants from separate groups of mice were excised carefully, dissected free of adherent tissue and fixed in formalin (10% w/v in isotonic saline). Sections (5 μm) were stained with hematoxylin and eosin (H&E) and processed for light-microscopic studies.

Statistical analysis

All data were expressed as mean \pm SEM. Comparisons between the three groups (numbers as stated in the Figure legends; usually 5 to 13 animals) were made using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Newman–Keuls correction factor for multiple comparisons as a post-test. Differences between means were considered significant when *P* values were <0.05 .

Results and discussion

Formation of the bismuth(III) complex

Microanalyses and molar conductivity data are compatible with the formation of $[\text{Bi}(\text{L})_2]\text{Cl}$, in which two lapacholate anions are attached to the metal center.

Spectroscopic characterization

The band localized at 3352 cm^{-1} assigned to $\nu(\text{O-H})$ in the infrared spectrum of free lapachol disappears upon coordination, indicating deprotonation. The characteristic $\nu(\text{C=O})$ absorptions, found at 1661 and 1639 cm^{-1} in the spectrum of lapachol (Caruso et al. 2009; Martínez et al. 2003), shift to lower frequencies in the complex (1634 and 1623 cm^{-1}), in agreement with coordination through the oxygen atoms. The vibration attributed to an out-of-plane ring mode, $\omega(\text{C-H})$, at 724 cm^{-1} in the infrared spectrum of lapachol shifts to 729 cm^{-1} in the spectrum of the complex (Caruso et al. 2009). New bands at 489 and 472 cm^{-1} were attributed to the $\nu(\text{M-O})$ stretching vibration (Nakamoto 1970).

The ^1H NMR spectra of lapachol and its bismuth(III) complex $[\text{Bi}(\text{Lp})_2]\text{Cl}$ were recorded in $\text{DMSO-}d_6$. The ^1H resonances were assigned on the

basis of chemical shifts and multiplicities. The ^{13}C NMR spectrum of the complex was not obtained due to its low solubility.

In the ^1H NMR spectrum of the complex the signals of all hydrogen atoms undergo shifts in relation to their position in free lapachol. However, the most significant shifts were observed for the aromatic hydrogens, suggesting coordination through the O(1) and O(2) oxygen atoms.

Measurement of the anti-angiogenic effect

In the i.p. treatment, the hemoglobin levels in the implants from vehicle-treated animals were $0.79 \pm 0.18 \mu\text{gHb mg}^{-1}$ wet tissue. Lapachol and the complex statistically reduced neo-vascularization of the implants, as detected by changes in the hemoglobin content (Fig. 2a). In both cases decreasing on hemoglobin content was approximately 50%. Since lapachol and complex groups did not present statistical difference between each other, results suggest that the reduction of neo-vascularization is caused by free lapachol in both experimental groups. Thus, the complex probably dissociates under in vivo conditions releasing lapachol molecules after i.p. administration. Decreasing on hemoglobin values was not observed in the implants from animals treated with BiCl_3 .

Hemoglobin levels in the implants from *per os* vehicle-treated animals were $0.72 \pm 0.06 \mu\text{gHb mg}^{-1}$ wet tissue (lapachol dose of $25 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$). After *per os* treatment with lapachol $25 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$ and equivalent doses of BiCl_3 and $[\text{Bi}(\text{Lp})_2]\text{Cl}$ only complex $[\text{Bi}(\text{Lp})_2]\text{Cl}$ statistically decreased the hemoglobin content in the implants (about 60%). Lapachol and BiCl_3 groups were unable to reduce neo-vascularization of the implants (Fig. 2b). *Per os* treatment was also performed with lapachol $2.5 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$ and equivalent doses of BiCl_3 and $[\text{Bi}(\text{Lp})_2]\text{Cl}$ to evaluate dose response effects (Fig. 2c). In this case no statistical difference was observed among the hemoglobin levels of the treated and control groups.

The discrepancy between results of i.p. and *per os* treatments may well be due to the distinct administration models. *Per os* administration comprises a great number of variables, such as rate of dissolution of the compounds and low gastric pH. Since these factors influence the absorption and bioavailability of

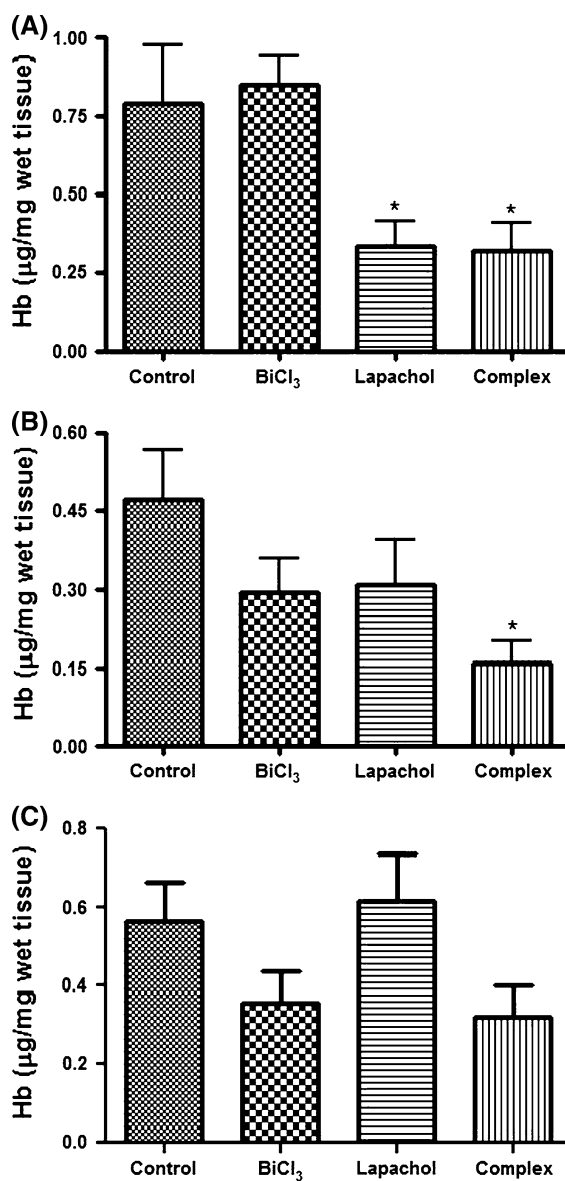


Fig. 2 Effects in the hemoglobin content induced by lapachol, complex $[\text{Bi}(\text{Lp})_2]\text{Cl}$ and BiCl_3 on angiogenesis in murine models ($n = 6-8$) for **a** i.p. treatment with lapachol at $25 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$ and equivalent doses of BiCl_3 and bismuth(III) complex, **b** *per os* treatment with lapachol at $25 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$ and equivalent doses of BiCl_3 and bismuth(III) complex, and **c** *per os* treatment with lapachol at $2.5 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$ and equivalent doses of BiCl_3 and bismuth(III) complex. *statistically different in comparison to control, $P < 0.05$

the compounds, they may have been responsible for the loss of activity of lapachol. Thus, results suggest that coordination seems to be a good strategy to

improve the anti-angiogenic profile of lapachol in the *per os* treatment.

Measurement of leukocyte accumulation

Inflammatory components of the sponge-induced chronic inflammation were determined by estimating the number of leukocytes in the implant by assaying marker enzyme activities. Macrophage and neutrophils accumulation in the implants were assessed by measuring NAG and MPO activities (Mendes et al. 2009b).

In the i.p. treatment, NAG activity was statistically decreased in the treated groups with lapachol and complex $[\text{Bi}(\text{Lp})_2]\text{Cl}$, showing an effect in this inflammatory cell population. After *per os* treatment with lapachol $25 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$ and equivalent doses of BiCl_3 and $[\text{Bi}(\text{Lp})_2]\text{Cl}$, NAG activity was inhibited relative to the control group only by the bismuth(III) complex. Thus, it is clear that lapachol was not able to interfere with macrophages recruitment after *per os* administration. Interestingly, the obtained results are in agreement with the reduction of neo-vascularization, where coordination to bismuth(III) seemed to improve the activity of lapachol in the *per os* treatment.

In the *per os* treatment with using lapachol $2.5 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$ and equivalent doses of BiCl_3 and $[\text{Bi}(\text{Lp})_2]\text{Cl}$ no statistical difference was observed between NAG activity in the treated and control groups (Fig. 3).

In both i.p. and *per os* treatments, MPO activity in the implants did not decrease suggesting that the studied compounds were unable to reduce neutrophils recruitment/activation in this model of inflammatory angiogenesis.

Gross appearance of implants and histological assessments

No signs of infection or rejection were observed in the implant location or in the incision during the 9-day period of the experiment. Histological analysis (H&E) showed that this procedure induced a fibro-vascular response causing the synthetic sponge matrix to be filled with a newly formed tissue (Fig. 4). The control implants were infiltrated by fibro-vascular stroma occupying the entire sponge by day 9. The tissue was composed of a dense inflammatory infiltrate with various cell types such as

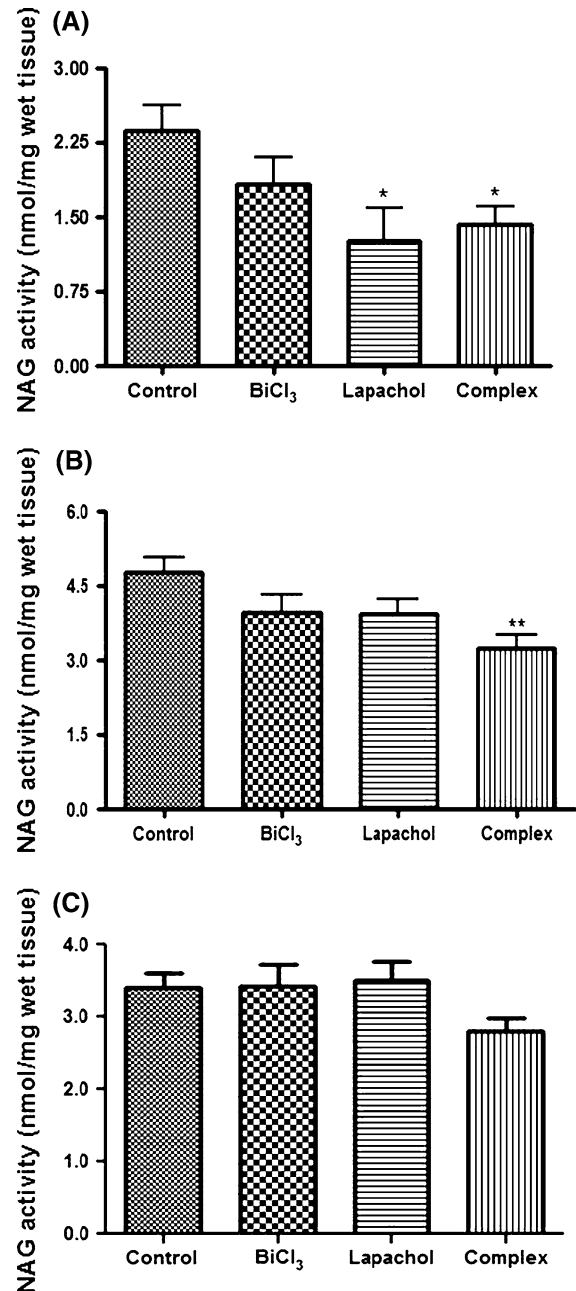


Fig. 3 Effects in the macrophage accumulation induced by lapachol, complex $[\text{Bi}(\text{Lp})_2]\text{Cl}$ and BiCl_3 on angiogenesis in murine models ($n = 8\text{--}13$) for **a** i.p. treatment with lapachol at $25 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$ and equivalent doses of BiCl_3 and bismuth(III) complex, **b** *per os* treatment with lapachol at $25 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$ and equivalent doses of BiCl_3 and bismuth(III) complex, and **c** *per os* treatment with lapachol at $2.5 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$ and equivalent doses of BiCl_3 and bismuth(III) complex. * and **statistically different in comparison to control, $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively

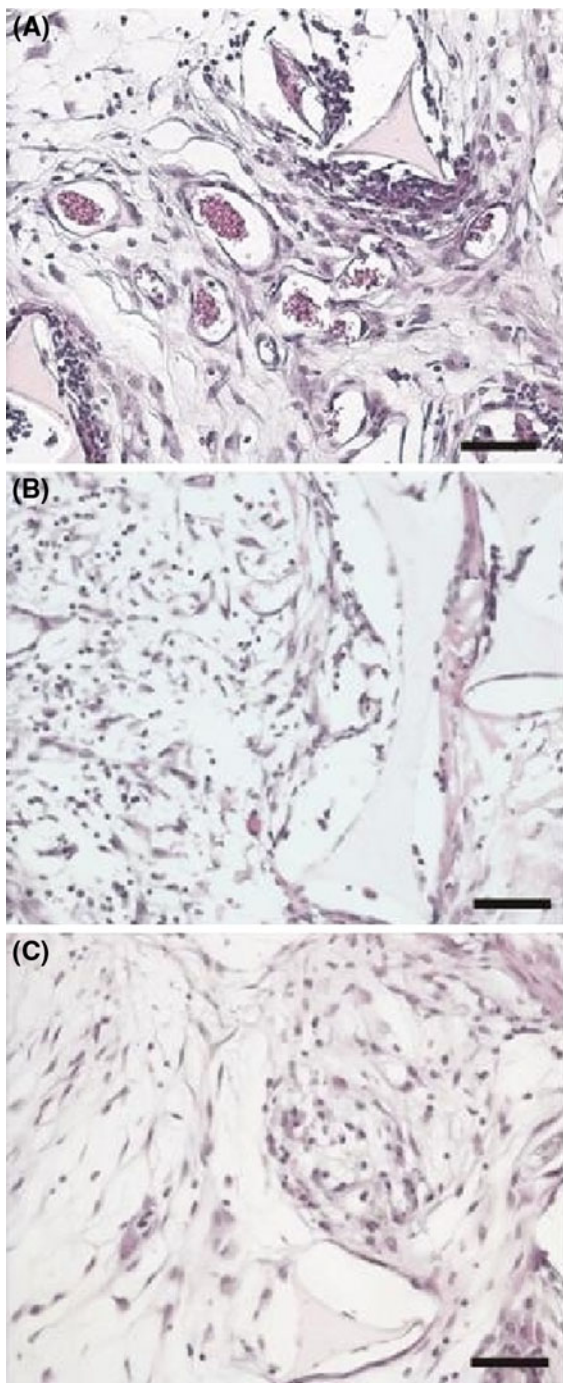


Fig. 4 Representative histological sections (5 μm , stained with H&E) of fibro-vascular tissue induced in subcutaneous sponge implants in Swiss mice at day 9 post implantation. The newly formed tissue in control implants (a) densely vascularized infiltrate with inflammatory cells, spindle-shaped fibroblasts. In lapachol- (b) and complex- (c) treated groups the number of vessels and inflammatory infiltrate are much lesser compared with the control group. Bar: 100 μm

leukocytes and microvessels. In lapachol- and complex-treated groups vascularization and inflammatory cell infiltrate were decreased.

Conclusions

Vascularization and inflammatory cell infiltrate were decreased in lapachol- and complex-treated groups. When i.p. administered lapachol and $[\text{Bi}(\text{Lp})_2]\text{Cl}$ statistically reduced the hemoglobin content in the implants suggesting that reduction of neo-vascularization is caused by free lapachol in both experimental groups. On the other hand, in the *per os* treatment only complex $[\text{Bi}(\text{Lp})_2]\text{Cl}$ statistically decreased the hemoglobin content in the implants. Similarly, NAG activity in the implants was statistically decreased by lapachol and $[\text{Bi}(\text{Lp})_2]\text{Cl}$ in the i.p. treatment, while in the *per os* treatment inhibition was observed only by the bismuth(III) complex. In both i.p. and *per os* treatments, MPO activity, did not decrease in the implants suggesting that the studied compounds are unable to reduce the number of neutrophils in the assayed conditions.

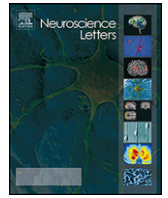
Our results indicate that lapachol and complex $[\text{Bi}(\text{Lp})_2]\text{Cl}$ present anti-angiogenic and anti-inflammatory properties on the fibro-vascular tissue induced by the synthetic matrix. The effects of $[\text{Bi}(\text{Lp})_2]\text{Cl}$ are attributed to the lapachol ligand. However, coordination to bismuth(III) could be an interesting strategy for improvement of lapachol's therapeutic effects. In the employed model, the sponge induces an inflammatory angiogenic response that reproduces many features of the healing occurring after mechanical and natural injuries such as balloon angioplasty, atherosclerosis, inflamed synovium and surgical wounds (Rocha et al. 2006). Hence, lapachol and its bismuth(III) complex $[\text{Bi}(\text{Lp})_2]\text{Cl}$ may present potential as drug candidates to be used to modulate the inflammatory and angiogenic components of a number of pathological conditions.

Acknowledgment This work was supported by CNPq and INCT-INOVAR (Proc. CNPq 573.364/2008-6).

References

- Araújo FA, Rocha MA, Mendes JB, Andrade SP (2010) Atorvastatin inhibits inflammatory angiogenesis in mice through down regulation of VEGF, TNF- α and TGF- β 1. *Biomed Pharmacother* 64:29–34

- Bezerra DP, Alves AP, De Alencar NM, Mesquita RO, Lima MW, Pessoa C, De Moraes MO, Lopes JN, Lopes NP, Costa-Lotufo LV (2008) Antitumor activity of two derivatives from 2-acylamine-1, 4-naphthoquinone in mice bearing S180 tumor. *J Exp Ther Oncol* 7:113–121
- Briand GG, Burford N (1999) Bismuth compounds and preparations with biological or medicinal relevance. *Chem Rev* 99:2601–2657
- Caruso F, Martínez MA, Rossi M, Goldberg A, Villalba EC, Aymonino PJ (2009) Crystal and molecular structure of manganese(II) lapacholate, a novel polymeric species undergoing temperature-reversible metal to ligand electron transfer. *Inorg Chem* 48:3529–3534
- Da Silva Júnior EN, Cavalcanti BC, Guimarães TT, Pinto MCFR, Cabral IO, Pessoa C, Costa-Lotufo LV, De Moraes MO, De Andrade CKZ, Dos Santos MR, De Simone CA, Goulart MOF, Pinto AV (2011) Synthesis and evaluation of quinonoid compounds against tumor cell lines. *Eur J Med Chem* 46:399–410
- De Almeida ER, Da Silva Filho AA, Dos Santos ER, Lopes CAC (1990) Antiinflammatory action of lapachol. *J Ethnopharmacol* 29: 239–241 (*AAPS PharmSciTech* 9: 163–168)
- Eyong KO, Kumar PS, Kuete V, Folefoc GN, Nkengfack EA, Baskaran S (2008) Semisynthesis and antitumoral activity of 2-acetylfuranonaphthoquinone and other naphthoquinone derivatives from lapachol. *Bioorg Med Chem Lett* 18:5387–5390
- Ferreira VF (1996) Aprendendo sobre os conceitos de ácido e base. *Química Nova na Escola* 4:35–36
- Ferreira MA, Barcelos LS, Campos PP, Vasconcelos AC, Teixeira MM, Andrades SP (2004) Sponge-induced angiogenesis and inflammation in PAF receptor-deficient mice (PAFR-KO). *Br J Pharmacol* 141:1185–1192
- Gong Y, Koh D-R (2010) Neutrophils promote inflammatory angiogenesis via release of preformed VEGF in an in vivo corneal model. *Cell Tissue Res* 339:437–448
- Hall DWR (1989) Review of the modes of action of colloidal bismuth subcitrate. *Scand J Gastroenterol* 24:3–6
- Lee SP (1991) The mode of action of colloidal bismuth subcitrate. *Scand J Gastroenterol* 26:1–6
- Lin C-Y, Shen Y-H, Wu S-H, Lin C-H, Hwang S-M, Tsai Y-C (2004) Effect of bismuth subgallate on nitric oxide and prostaglandin E2 production by macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 315:830–835
- Maeda M, Murakami M, Takegami T, Ota T (2008) Promotion or suppression of experimental metastasis of B16 melanoma cells after oral administration of lapachol. *Toxicol Appl Pharm* 229:232–238
- Martínez MA, De Jiménez MCL, Castellano EE, Piro OE, Aymonino PJ (2003) Synthesis, structure and properties of a zinc(II) complex with the lapacholate anion and ethanol as ligands. *J Coord Chem* 56:803–816
- Mendes JB, Campos PP, Rocha MA, Andrade SP (2009a) Cilostazol and pentoxifylline decrease angiogenesis, inflammation, and fibrosis in sponge-induced intraperitoneal adhesion in mice. *Life Sci* 84:537–543
- Mendes JB, Rocha MA, Araújo FA, Moura SAL, Ferreira MAND, Andrade SP (2009b) Differential effects of rolipram on chronic subcutaneous inflammatory angiogenesis and on peritoneal adhesion in mice. *Microvasc Res* 78:265–271
- Nakamoto K (1970) Infrared spectra of inorganic and coordination compounds, 2nd edn. Wiley-Interscience, New York
- Oliveira RAS, Azevedo-Ximenes E, Luzzati R, Garcia RC (2010) The hydroxy-naphthoquinone lapachol arrests mycobacterial growth and immunomodulates host macrophages. *Int Immunopharmacol* 10:1463–1473
- Rocha LTS, Costa KA, Oliveira ACP, Nascimento EB, Bertollo CM, Araújo F, Teixeira LR, Andrade SP, Beraldo H, Coelho MM (2006) Antinociceptive, anti-dematogenic and antiangiogenic effects of benzaldehyde semicarbazone. *Life Sci* 79:499–505
- Sadler PJ, Li H, Sun H (1999) Coordination chemistry of metals in medicine: Target sites for bismuth. *Coord Chem Rev* 185–186:689–709
- Severi C, Abdullahi M, Tari R, Vannella L, Marcheggiano A, Capoccia D, Leonetti F, Osborn J, Annibale B (2009) High efficacy of bismuth subcitrate for *Helicobacter pylori* eradication in pangastritis. *Digest Liver Dis* 41:555–558
- Walsh DA, Pearson CI (2001) Angiogenesis in the pathogenesis of inflammatory joint and lung diseases. *Arthritis Res* 3:147–153
- Xavier DO, Amaral LS, Gomes MA, Rocha MA, Campos PR, Cota BDCV, Tafuri LSA, Paiva AMR, Silva JH, Andrade SP, Belo AV (2010) Metformin inhibits inflammatory angiogenesis in a murine sponge model. *Biomed Pharmacother* 64:220–225
- Yang N, Sun H (2007) Biocoordination chemistry of bismuth: Recent advances. *Coord Chem Rev* 251:2354–2366



Intraneural dexamethasone applied simultaneously to rat sciatic nerve constriction delays the development of hyperalgesia and allodynia

Leandro F.S. Bastos^{a,b}, Daniel C. Medeiros^a, Rafael P. Vieira^c, Linda R. Watkins^b, Márcio M. Coelho^d, Márcio F.D. Moraes^{a,*}

^a Núcleo de Neurociências (NNC), Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biológicas, Bloco A4, Sala 168, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Avenida Antônio Carlos 6627, 31270-901 Belo Horizonte, Brazil¹

^b Department of Psychology and Neuroscience, Muenzinger Building, Colorado Avenue, University of Colorado at Boulder, Boulder, 80309 CO, USA

^c Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, UFMG, Brazil

^d Laboratório de Farmacologia, Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, UFMG, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 October 2011

Received in revised form 8 December 2011

Accepted 28 December 2011

Keywords:

Chronic constriction injury

Neuropathic pain

Peripheral neuropathy

Inflammation

Neuroimmune interaction

Corticosteroid

ABSTRACT

Although neuroimmune interactions associated with the development of pain sensitization in models of neuropathic pain have been widely studied, there are some aspects that require further investigation. Thus, we aimed to evaluate whether the local intraneural or perineural injections of dexamethasone, an efficacious anti-inflammatory and immunosuppressant drug, delays the development of both thermal hyperalgesia and mechanical allodynia in an experimental model of neuropathic pain in rats. Hargreaves and electronic von Frey tests were applied. The chronic constriction injury (CCI) of right sciatic nerve was performed. Single intraneural dexamethasone administration at the moment of constriction delayed the development of sensitization for thermal hyperalgesia and mechanical allodynia. However, perineural administration of dexamethasone, at the highest dose, did not delay experimental pain development. These results show that inflammation/immune response at the site of nerve lesion is an essential trigger for the pathological changes that lead to both hyperalgesia and allodynia. In conclusion, this approach opens new opportunities to study cellular and molecular neuroimmune interactions associated with the development of pain derived from peripheral neuropathies.

© 2012 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Immune activation and the subsequent release of immune mediators in the peripheral nervous system contribute to pain. A variety of peripheral immune cells, including mast cells, macrophages, and lymphocytes, are resident in peripheral nerves and/or recruited to sites of peripheral nerve injury [23,24]. These cells produce a plethora of inflammatory mediators that sensitize or directly activate peripheral nerves to generate action potentials, leading to peripheral and central sensitization [4].

Additional support to a role played by neuroinflammation in the development of experimental pain arises from the finding that dexamethasone, a potent anti-inflammatory and immunosuppressant drug, inhibits fibrovascular tissue formation around sutures, infiltration of inflammatory cells and thermal hyperalgesia when

administered intraperitoneally before and after CCI in rats [3]. It is tempting to associate the antihyperalgesic effect induced by dexamethasone to its action at the site of the nerve injury, leading to reduced infiltration of inflammatory cells and production of inflammatory mediators. However, when glucocorticoids are administered systemically, the site(s) of their action is(are) not clear as it has been shown that these drugs may also induce experimental pain suppressive effects after intrathecal administration in experimental models of neuropathic pain [12,25]. However, when rats are subjected to CCI and have the sciatic nerves re-exposed and treated locally with a depot form of methylprednisolone at day 10 after injury, antiallodynic and antihyperalgesic effects are observed up to day 21 [9], thus providing evidence that glucocorticoids may act locally at the site of nerve injury to inhibit sensitization. These results indicate that glucocorticoids applied around the site of nerve injury may reverse the sensitization when this phenomenon is fully established. To further elucidate the site of action of glucocorticoids, in the present study we investigated the ability of intraneural versus perineural administration of dexamethasone to prevent the development of thermal hyperalgesia and mechanical allodynia, when the drug was delivered at the time of sciatic injury in rats.

Abbreviations: CCI, chronic constriction injury; CGRP, calcitonin gene-related peptide; DRG, dorsal root ganglion.

* Corresponding author. Tel.: +55 31 3409 2930; fax: +55 31 3409 2924.

E-mail address: mfdm@icb.ufmg.br (M.F.D. Moraes).

¹ Permanent address.

2. Materials and methods

2.1. Animals

All experiments were performed according to the ethical guidelines for the investigation of experimental pain in conscious animals [28] and approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of the Federal University of Minas Gerais (protocol # 168/10). Male Wistar rats (240–280 g) were used, with groups matched on body mass (approximately 260 g). Efforts were made to minimize both animal distress and the number of animals used. The animals had free access to food and water and were maintained in a room with a 12 h light–dark cycle for 3 days before the experiment to allow for acclimatization. The experiments were conducted in the middle of light circadian phase, at room temperature between 26 and 28 °C, which corresponds to the thermoneutral zone for rats [7]. For three consecutive days before the experiment, the animals were habituated for approximately 30 min to the experimental apparatuses in order to minimize stress-induced antinociception. The investigator performing behavioral tests was blind to treatments.

2.2. Surgery and drug administration

CCI of the right sciatic nerve was performed as previously described by Bennett and Xie [2], under anesthesia induced by ketamine (90 mg/kg) and xylazine (9 mg/kg) hydrochlorides (both manufactured by Vetbrands; Paulínia, São Paulo, Brazil). Four ligatures with a flexible nylon thread (Sanifill, Rio de Janeiro, Brazil) were tied loosely around the sciatic nerve at mid-thigh level [13]. Sham-operated animals underwent the same surgical procedure, save that the sciatic was not ligated. When dexamethasone (100 or 250 µg/kg assuming 260 g rat on average hence 26 or 65 µg/rat; Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) or equivolume (10 µl) saline vehicle was injected directly into the sciatic nerve or administered perineurally onto the nerve, the two outermost ligatures were placed first and injection was performed using a 30-gauge needle connected to a Hamilton syringe (Reno, NV, USA) in the center between the ligatures. Then, the remaining middle two sutures were placed, as previously described [21].

2.3. Evaluation of thermal hyperalgesia

Paw withdrawal latency to a thermal stimulus was measured with a plantar test unit (model 7370, Ugo Basile, Comerio, Italy). Briefly, rats were kept in Perspex cells having a glass pane as a floor and a source of infrared light was directed upwards from below the glass toward the right hind paw plantar surface [8]. Cut-off time (20 s) was imposed to avoid tissue damage. The value for the response was obtained by averaging three measurements, with each determination separated by a minimum of 20 s. These procedures were performed under the same laboratory conditions as previously described [16].

2.4. Evaluation of mechanical allodynia

Rats were placed in acrylic cages with wire mesh floors 15 min before the start of testing. The test consisted of evoking a hind paw flexion reflex with a hand-held force transducer (electronic pressure-meter, Insight, Ribeirão Preto, Brazil) adapted to a 0.5-mm² polypropylene tip. The experimenter was trained to apply the tip perpendicularly to the central area of the hind paw with a gradual increase in pressure. The endpoint was characterized by the removal of the paw usually followed by flinching movements. After the paw withdrawal, the intensity of the pressure was automatically recorded. The value for the response

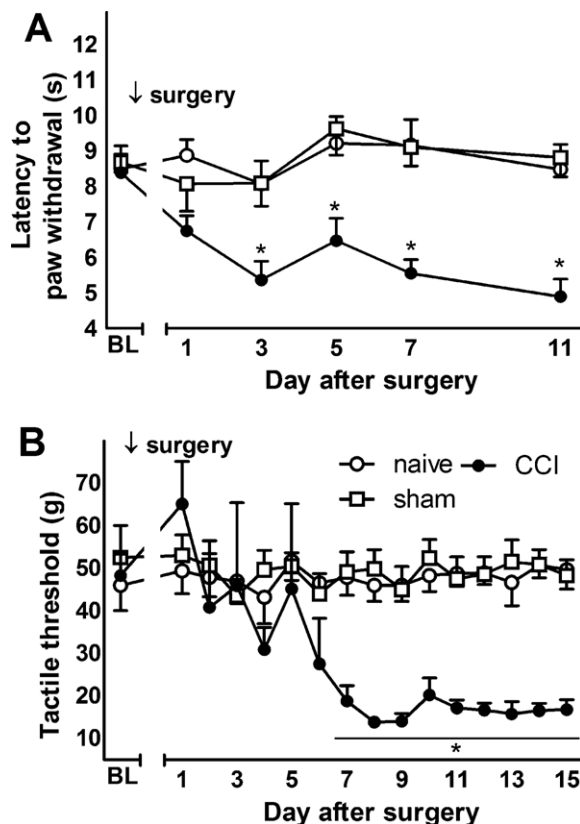


Fig. 1. Effect induced by chronic constriction injury (CCI) on the development of thermal hyperalgesia (A) and mechanical allodynia (B) in rats. Data are expressed as mean \pm standard error of the mean ($n=5-7$). * $p<0.05$ compared with the vehicle-treated group at the respective time-point, tested by two-way repeated measures ANOVA followed by Bonferroni *post hoc* test, taking time and surgery as main factors. Naive and sham-operated animals were unaffected by the surgery factor at all time points.

was obtained by averaging five measurements. The animals were tested before and after surgeries and/or treatments. The results are expressed by the absolute withdrawal threshold (in grams). These procedures were similar to those previously described [20].

2.5. Statistical analyses

The results, expressed as mean \pm standard error of the mean, were analyzed by two-way repeated measures ANOVA followed by Bonferroni *post hoc* test, taking surgery and time (Fig. 1A and B) or treatment and time (Figs. 2A, B and 3A, B) as main effects. Values of $p<0.05$ were considered to show significant differences between means. The software GraphPad Prism® 5.0 (San Diego, CA, USA) was used for the analyses.

3. Results

Thermal hyperalgesia was observed from day 3 after surgery onward (Fig. 1A; main effect of surgery factor: $F_{(2,100)}=21.68$, $p<0.0001$; main effect of time: $F_{(5,100)}=2.64$, $p=0.0275$; interaction: $F_{(10,100)}=1.87$, $p=0.0588$), whereas mechanical allodynia was observed from day 7 onward (Fig. 1B; main effect of surgery factor: $F_{(2,240)}=10.66$, $p=0.0011$; main effect of time: $F_{(15,240)}=3.95$, $p<0.0001$; interaction: $F_{(30,240)}=3.01$, $p<0.0001$).

Next, it was tested whether a single intraneural injection of dexamethasone at the time of sciatic injury could delay the development of both thermal hyperalgesia and mechanical allodynia. We

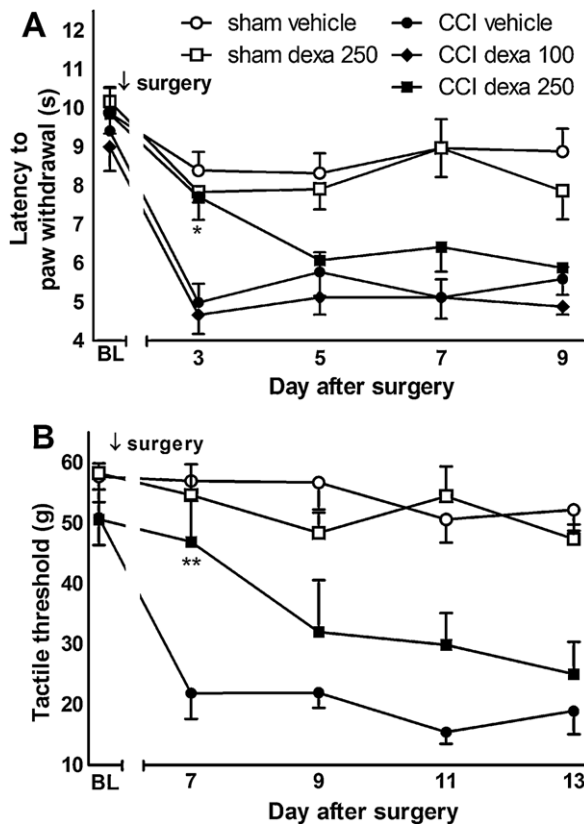


Fig. 2. Intra-neural dexamethasone (dexa; 100 or 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 10 μl) at the moment of chronic constriction injury (CCI) delayed the development of thermal hyperalgesia (A) and mechanical allodynia (B) in rats. Data are expressed as mean \pm standard error of the mean ($n = 5-8$). * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ compared with the vehicle-treated group at the respective time-point, tested by repeated measures two-way ANOVA followed by Bonferroni *post hoc* test, taking time and treatment as main factors. Sham-operated animals were unaffected by treatment at all time points.

observed that intra-neural treatment with the highest (250 $\mu\text{g}/\text{kg}$) dose of dexamethasone led to a rightward shift in the curve of sensitization for thermal (Fig. 2A; main effect of treatment: $F_{(2,68)} = 5.13$, $p = 0.0181$; main effect of time: $F_{(4,68)} = 21.08$, $p < 0.0001$; interaction: $F_{(8,68)} = 0.88$, $p = 0.5346$) and mechanical (Fig. 2B; main effect of treatment: $F_{(1,52)} = 4.82$, $p = 0.0468$; main effect of time: $F_{(4,52)} = 18.94$, $p < 0.0001$; interaction: $F_{(4,52)} = 3.01$, $p = 0.0261$) stimuli. Sham-operated animals had their thermal (Fig. 2A; main effect of treatment: $F_{(1,56)} = 0.47$, $p = 0.5060$; main effect of time: $F_{(4,56)} = 4.97$, $p < 0.0001$; interaction: $F_{(4,56)} = 0.50$, $p = 0.7371$) and mechanical (Fig. 2B; main effect of treatment: $F_{(1,56)} = 0.48$, $p = 0.4977$; main effect of time: $F_{(4,56)} = 1.75$, $p = 0.1528$; interaction: $F_{(4,56)} = 0.95$, $p = 0.4398$) sensitivities unaffected by treatment over the time course evaluated (Fig. 2A and B).

Finally, when the administration of dexamethasone (250 $\mu\text{g}/\text{kg}$) was performed perineurally, neither antihyperalgesic (main effect of treatment: $F_{(1,22)} = 1.28$, $p = 0.2814$; main effect of time: $F_{(2,22)} = 17.91$, $p < 0.0001$; interaction: $F_{(2,22)} = 0.31$, $p = 0.7342$) nor antiallodynic (main effect of treatment: $F_{(1,22)} = 0.01$, $p = 0.9415$; main effect of time: $F_{(2,22)} = 78.72$, $p < 0.0001$; interaction: $F_{(2,22)} = 0.27$, $p = 0.7628$) effects were observed in CCI rats (Fig. 3). Likewise, both thermal (main effect of treatment: $F_{(1,24)} = 0.10$, $p = 0.7626$; main effect of time: $F_{(2,24)} = 0.06$, $p = 0.9446$; interaction: $F_{(2,24)} = 0.49$, $p = 0.6213$) and mechanical (main effect of treatment: $F_{(1,24)} = 0.52$, $p = 0.4866$; main effect of time: $F_{(2,24)} = 2.16$, $p = 0.1374$; interaction: $F_{(2,24)} = 2.28$, $p = 0.1237$) sensitivities of sham-operated rats were unaffected by treatment over the time course evaluated (Fig. 3).

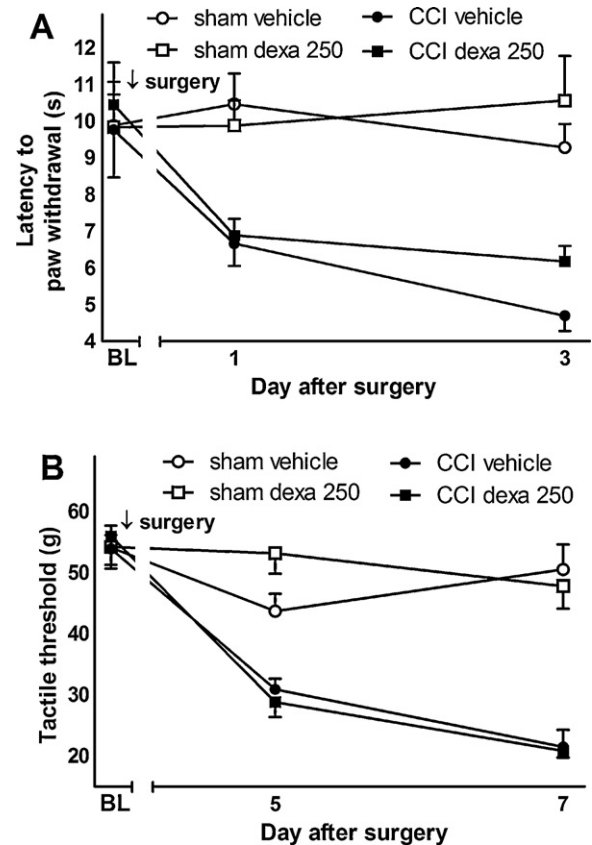


Fig. 3. Perineural dexamethasone (dexa; 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 10 μl) at the moment of chronic constriction injury (CCI) did not delay the development of thermal hyperalgesia (A) and mechanical allodynia (B) in rats ($p > 0.05$). Data are expressed as mean \pm standard error of the mean ($n = 7-8$) and tested by repeated measures two-way ANOVA followed by Bonferroni *post hoc* test, taking time and treatment as main factors. Sham animals were also unaffected by treatment at all time-points ($p > 0.05$).

4. Discussion and conclusions

In the present study, we show that the intra-neural, but not perineural, administration of dexamethasone (250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ based on 260 g rats, on average) delays the development of both thermal hyperalgesia and mechanical allodynia in CCI rats when administered at the time of sciatic nerve injury. While not examined here, we predict that intra-neural dexamethasone, but not perineural dexamethasone, inhibited the infiltration of inflammatory cells into the nerve and may have also inhibited the production of inflammatory mediators by Schwann cells. Suppression of neuropathic pain development by intra-neural dexamethasone cannot be accounted for by systemic spread, given that perineural dexamethasone would more readily become systemic, yet perineural dexamethasone failed to affect the development of neuropathic pain. Furthermore, the fact that different time courses were observed for intra-neural dexamethasone effects on hyperalgesia and allodynia reinforces prior evidence that CCI-induced thermal hyperalgesia and mechanical allodynia have distinct underlying mechanisms [4].

It has previously been shown that dexamethasone has a 2.3 h half-life after either intravenous or intramuscular injection in rats [18]. However, no information is available about the pharmacokinetics of this drug after intra-neural administration. If one assumes that dexamethasone exhibits similar pharmacokinetics after systemic versus intra-neural administration, it would then be highly likely that dexamethasone had already been biotransformed and eliminated by the time that antiallodynic effects were observed.

If this is true, then these results support that a short-lasting anti-inflammatory, immunosuppressant treatment, administered at the time of nerve injury, can be sufficient to delay experimental pain development for days. Consistent with our findings, local administration of the glucocorticoid agonist triamcinolone to ferret lingual nerve at the time of injury reduces injury-enhanced, evoked electrical activity in the nerve as long as 3 months after the injury [27].

It is likely that dexamethasone exerts its antihyperalgesic and antiallodynic effects through multiple mechanisms. The proinflammatory responses of neutrophils, macrophages, lymphocytes and mast cells, which normally infiltrate into the nerve after injury [14,15], can be suppressed by dexamethasone [3,5,10,11,26]. Moreover, Schwann cells are activated after CCI [6], and their production of cytokines and chemokines is inhibited by dexamethasone *in vitro* [17], though *in vivo* evidence seems to be lacking. These various cell types can release a wide array of inflammatory mediators which sensitize or activate nociceptive neurons, thereby enhancing pain [4]. Given the pleiotropic genomic and non-genomic anti-inflammatory actions of dexamethasone [1], it may prevent the initial proinflammatory events initiated in response to CCI and thus prevent or delay the subsequent development of hyperalgesia or allodynia.

Besides actions on immune cells, both genomic and non-genomic actions on neurons may be hypothesized to explain the effect induced by intraneural dexamethasone on the development of hyperalgesia and allodynia. Supporting genomic actions, modulation of expression of channels involved in excitability of neurons in nociceptive pathways by glucocorticoids may also interfere with nociceptive responses [22]. Dexamethasone may alter expression of pain-relevant receptors, as prenatal exposure of rats to dexamethasone decreases P2X3 expression in DRG and spinal cord [22], though effect on P2X3 expression in adult rats remains to be tested. Furthermore, glucocorticoids can alter the expression of neurotransmitters implicated in pain transmission. For example, removal of endogenous glucocorticoids by adrenalectomy increases calcitonin gene-related peptide (CGRP) concentrations in the dorsal root ganglia (DRG) suggestive that increases in glucocorticoids may be able to suppress CGRP production. As the adrenalectomy-induced increases in CGRP were reversed by dexamethasone [19], this give credence to the idea that glucocorticoids, rather than other adrenal factors, underlie the effects observed.

In conclusion, the results reinforce the evidence that early neuroimmune interactions are essential for triggering mechanisms necessary for the development of long lasting thermal hyperalgesia and mechanical allodynia in models of neuropathic pain, though additional actions on neural excitability may also be taken into account. The study presents a localized methodological approach that opens opportunities to study in detail the cellular and molecular multi-step inflammatory processes by which peripheral neuropathies lead to persistent, pathological pain states.

Conflict of interest

The authors state no actual or potential conflict of interest.

Acknowledgments

We acknowledge Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Ministry of Education, Brazil), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Ministry of Science and Technology, Brazil) and INCT-INCeMq, Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, Minas Gerais, Brazil) and Pró-Reitoria de Pesquisa (PRPq) da UFMG for constant support.

References

- [1] P.J. Barnes, Corticosteroid effects on cell signalling, *Eur. Respir. J.* 27 (2006) 413–426.
- [2] G.J. Bennett, Y.K. Xie, A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man, *Pain* 33 (1988) 87–107.
- [3] A.L. Clatworthy, P.A. Illich, G.A. Castro, E.T. Walters, Role of peri-axonal inflammation in the development of thermal hyperalgesia and guarding behavior in a rat model of neuropathic pain, *Neurosci. Lett.* 184 (1995) 5–8.
- [4] M. Costigan, J. Scholz, C.J. Woolf, Neuropathic pain a maladaptive response of the nervous system to damage, *Annu. Rev. Neurosci.* (2009).
- [5] D. Franchimont, J. Galon, M. Gadina, R. Visconti, Y. Zhou, M. Aringer, D.M. Frucht, G.P. Chrousos, J.J. O'Shea, Inhibition of Th1 immune response by glucocorticoids: dexamethasone selectively inhibits IL-12-induced Stat4 phosphorylation in T lymphocytes, *J. Immunol.* 164 (2000) 1768–1774.
- [6] E.S. Fu, Y.P. Zhang, J. Sagen, K.A. Candiotti, P.D. Morton, D.J. Liebl, J.R. Bethea, R. Brambilla, Transgenic inhibition of glial NF-kappa B reduces pain behavior and inflammation after peripheral nerve injury, *Pain* 148 (2010) 509–518.
- [7] C.J. Gordon, Thermal biology of the laboratory rat, *Physiol. Behav.* 47 (1990) 963–991.
- [8] K. Hargreaves, R. Dubner, F. Brown, C. Flores, J. Joris, A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia, *Pain* 32 (1988) 77–88.
- [9] A. Johansson, G.J. Bennett, Effect of local methylprednisolone on pain in a nerve injury model. A pilot study, *Regional Anesth.* 22 (1997) 59–65.
- [10] M. Kamberi, E. Brummer, D.A. Stevens, Regulation of bronchoalveolar macrophage proinflammatory cytokine production by dexamethasone and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor after stimulation by *Aspergillus conidia* or lipopolysaccharide, *Cytokine* 19 (2002) 14–20.
- [11] O. Kassel, A. Sancono, J. Kratzschmar, B. Kreft, M. Stassen, A.C. Cato, Glucocorticoids inhibit MAP kinase via increased expression and decreased degradation of MKP-1, *EMBO J.* 20 (2001) 7108–7116.
- [12] Z.L. Ma, W. Zhang, X.P. Gu, W.S. Yang, Y.M. Zeng, Effects of intrathecal injection of prednisolone acetate on expression of NR2B subunit and nNOS in spinal cord of rats after chronic compression of dorsal root ganglia, *Ann. Clin. Lab. Sci.* 37 (2007) 349–355.
- [13] P.G. Motta, A.C. Perez, D.P. Alves, I.D. Duarte, Peripheral control of inflammation but not neuropathic pain by endogenous cholinergic system, *Pharmacology* 88 (2011) 18–25.
- [14] T. Okuda, O. Ishida, Y. Fujimoto, N. Tanaka, A. Inoue, Y. Nakata, M. Ochi, The autotomy relief effect of a silicone tube covering the proximal nerve stump, *J. Orthop. Res.* 24 (2006) 1427–1437.
- [15] N.M. Perkins, D.J. Tracey, Hyperalgesia due to nerve injury: role of neutrophils, *Neuroscience* 101 (2000) 745–757.
- [16] L.T. Rocha, K.A. Costa, A.C. Oliveira, E.B. Nascimento, C.M. Bertollo Jr., F. Araujo, L.R. Teixeira, S.P. Andrade, H. Beraldo, M.M. Coelho, Antinociceptive, anti-edematogenic and antiangiogenic effects of benzaldehyde semicarbazone, *Life Sci.* 79 (2006) 499–505.
- [17] J.L. Rutkowski, G.F. Tuite, P.M. Lincoln, P.J. Boyer, G.I. Tennekoon, S.L. Kunkel, Signals for proinflammatory cytokine secretion by human Schwann cells, *J. Neuroimmunol.* 101 (1999) 47–60.
- [18] M.N. Samtani, W.J. Jusko, Comparison of dexamethasone pharmacokinetics in female rats after intravenous and intramuscular administration, *Biopharm. Drug Dispos.* 26 (2005) 85–91.
- [19] G.D. Smith, J.R. Seckl, W.J. Sheward, J.G. Bennie, S.M. Carroll, H. Dick, A.J. Harmar, Effect of adrenalectomy and dexamethasone on neuropeptide content of dorsal root ganglia in the rat, *Brain Res.* 564 (1991) 27–30.
- [20] G.G. Vivancos, W.A. Verri, T.M. Cunha Jr., I.R. Schivo, C.A. Parada, F.Q. Cunha, S.H. Ferreira, An electronic pressure-meter nociception paw test for rats, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 37 (2004) 391–399.
- [21] R. Wagner, M. Janjigian, R.R. Myers, Anti-inflammatory interleukin-10 therapy in CCI neuropathy decreases thermal hyperalgesia, macrophage recruitment, and endoneurial TNF-alpha expression, *Pain* 74 (1998) 35–42.
- [22] H. Wang, M. Zhou, B. Cong, P. He, M. Xu, X. Ni, B. Ma, Transient changes in P2X3 but not TRPV1 mRNA expression in rat after prenatal exposure to glucocorticoids, *Auton. Neurosci.* 141 (2008) 112–116.
- [23] L.R. Watkins, M.R. Hutchinson, E.D. Milligan, S.F. Maier, “Listening” and “talking” to neurons: implications of immune activation for pain control and increasing the efficacy of opioids, *Brain Res. Rev.* 56 (2007) 148–169.
- [24] L.R. Watkins, S.F. Maier, Beyond neurons: evidence that immune and glial cells contribute to pathological pain states, *Physiol. Rev.* 82 (2002) 981–1011.
- [25] W. Xie, X. Liu, H. Xuan, S. Luo, X. Zhao, Z. Zhou, J. Xu, Effect of betamethasone on neuropathic pain and cerebral expression of NF-kappaB and cytokines, *Neurosci. Lett.* 393 (2006) 255–259.
- [26] H. Yarwood, S. Nourshargh, S. Brain, T.J. Williams, Effect of dexamethasone on neutrophil accumulation and oedema formation in rabbit skin: an investigation of site of action, *Br. J. Pharmacol.* 108 (1993) 959–966.
- [27] J.M. Yates, K.G. Smith, P.P. Robinson, The effect of triamcinolone hexacetonide on the spontaneous and mechanically-induced ectopic discharge following lingual nerve injury in the ferret, *Pain* 111 (2004) 261–269.
- [28] M. Zimmermann, Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals, *Pain* 16 (1983) 109–110.