



Avaliação da atividade antimicrobiana e citotoxicidade de derivados aril-semicarbazônicos

Evaluation of antimicrobial activity and cytotoxicity of aryl-semicarbazones derivatives

Recebido em 13/02/2011

Aceito em 20/06/2011

José Wanderlan Pontes Espíndola¹, Lucas Oliveira da Silva¹, Dyego Revorêdo de Carvalho Silva¹, Victor Hugo Nunes Soares Costa¹, Amanda Ferreira de Almeida³, Cristiane Moutinho Lagos de Melo³, Érika Cristina de Lima Soares², Janete Magali de Araújo², Valéria Rêgo Alves Pereira³, Dalci José Brondani^{1*}

¹Departamento de Ciências Farmacêuticas, Laboratório de Planejamento, Avaliação e Síntese de Fármacos; LabSINFA, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

²Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

³Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Pernambuco, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM), Campus da UFPE, Recife, PE, Brasil

RESUMO

Semicarbazonas constituem uma importante classe de compostos amplamente estudada na Química Orgânica Medicinal, apresentando grande versatilidade química e uma ampla gama de atividades biológicas, tais como anticonvulsivante, anti-*Trypanosoma cruzi* e antimicrobiana. Foi sintetizada uma série de derivados aril-semicarbazônicos, dos quais avaliou-se a atividade antimicrobiana e a citotoxicidade dos compostos mais ativos. Os compostos aril-semicarbazônicos apresentaram baixo potencial antimicrobiano e baixa toxicidade a nível de células de mamíferos.

PALAVRAS-CHAVE: Aril-semicarbazonas, atividade antibacteriana, atividade antifúngica, toxicidade celular.

ABSTRACT

Semicarbazones are an important class of compounds that have been also extensively studied in Organic Medicinal Chemistry, showing great chemical versatility and a wide range of biological activities, such as anticonvulsant, anti-*Trypanosoma cruzi* and antimicrobial. Was synthesized a series of aryl semicarbazones derivatives, which were evaluated antimicrobial activity and cytotoxicity of the most active compounds. The aryl semicarbazones compounds showed low to moderate antimicrobial activity and low level of toxicity to mammalian cells.

KEYWORDS: Aryl-semicarbazones, antibacterial activity, antifungal activity, cell toxicity

INTRODUÇÃO

Em países de clima tropical e condições sócio-econômicas precárias é comum haver uma alta incidência de doenças causadas por microorganismos, especialmente bactérias e fungos. O clima, em conjunto com condições precárias de moradia em certas regiões, favorece a proliferação destes microorganismos (Brondani *et al.*, 2008).

Semicarbazidas e semicarbazonas são importantes grupamentos farmacofóricos na busca por novas drogas (Beraldo, 2004). Suas aplicações biológicas são exemplificadas por uma gama de propriedades terapêuticas, como ação anticonvulsivante (Shalini *et al.*, 2007; Shafiee *et al.*, 2009), contra o *Trypanosoma cruzi* (Aguirre *et al.*, 2006; Gerpe *et al.*, 2009) e antibacteriana

(Brondani *et al.*, 2008; Hemalatha *et al.*, 2008).

Em trabalhos anteriores foi avaliada a ação antimicrobiana de novos derivados da nitrofurazona (5-nitro-2-furaldeído semicarbazona), os quais apresentaram boa atividade antibacteriana, sobretudo, frente a cepas de microorganismos multirresistentes. A nitrofurazona possui reconhecida ação antibiótica, sendo utilizada no tratamento de infecções geniturinárias e como agente antibacteriano tópico (Tangallapally *et al.*, 2007). O seu uso tópico se deve à alta toxicidade por via oral, a qual está relacionada principalmente à presença do grupamento nitro (-NO₂) na molécula. O grupo nitro apresenta metabolização tanto *in vitro* como *in vivo*, resultando em sinais de toxicidade a nível celular e tecidual do hospedeiro humano (Abreu et

* **Contato:** Dalci José Brondani, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Laboratório de Planejamento, Avaliação e Síntese de Fármacos (LabSINFA), Universidade Federal de Pernambuco. Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, CEP: 50670-901, Recife, PE, Brasil, dalci@ufpe.br

al., 2002).

Com base na ampla gama de atividades farmacológicas exibida pelas semicarbazonas, inclusive antimicrobiana, foi sintetizada uma série de aril-semicarbazonas desprovidas do grupamento nitro e avaliaram-se as atividades antibacterianas e antifúngicas, bem como as propriedades citotóxicas dos compostos mais ativos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Parte Química

A série de derivados 01-10 foi obtida por meio da reação de condensação entre a semicarbazida hidrocloreto e uma série de aril-aldeídos substituídos no Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos, no Departamento de Ciências Farmacêuticas (UFPE). Esta reação ocorreu à temperatura ambiente e sob agitação magnética por um período de 3-5 horas, utilizando ácido clorídrico puro (HCl) como catalisador e etanol (EtOH) como solvente (Mester *et al.*, 1987). Os derivados 05 e 06, foram sintetizados por meio da condensação entre 1 equivalente do aldeído e 2 equivalentes da semicarbazida, ao passo que os outros são derivados monocondensados, na proporção de 1:1 semicarbazida/aldeído. O esquema geral de síntese está representado na Figura 1.

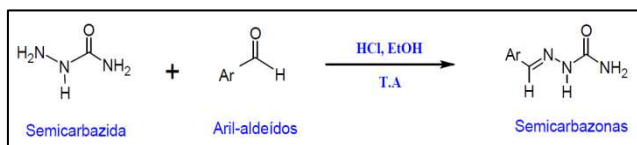


Figura 1. Rota geral de síntese para obtenção dos derivados aril-semicarbazônicos. * T.A – Temperatura ambiente

Avaliação da Atividade Antimicrobiana

Método da difusão em discos de papel: A atividade antimicrobiana foi testada *in vitro*, pelo método de difusão em disco de papel, frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Streptococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycobacterium smegmatis*) e fungos (*Candida albicans* e *Malassezia furfur*) da coleção de microorganismos do Departamento de Antibióticos da UFPE. Neste método, os discos contendo quantidades conhecidas dos compostos sintetizados ou dos fármacos utilizados como padrão foram depositados na superfície de uma placa de ágar, que foi inoculada com uma suspensão padronizada dos microorganismos testados. Discos de papel com apenas dimetilsulfóxido (DMSO) foram utilizados como controles negativos. As placas foram incubadas durante 24h e 48h à temperatura de 30°C e 37°C e, após o período de incubação, mediram-se os halos de inibição. As zonas médias de inibição para amoxicilina (antibiótico) e nistatina (antifúngico) foram utilizadas como valor de referência (mm). Os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos se os resultados fossem diferentes (Bauer *et al.*, 1966).

Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI), Concentração Mínima Bacteriostática (CMB) e Concentração Mínima Fungicida (CMF): Para os ensaios de CMI, CMB e CMF, uma solução-mãe (1mg/mL) de compostos do teste foi preparada em

solvente DMSO. Além disso, a diluição em série de compostos teste foi realizado em percentuais decrescentes de 1 para 2. Compostos de teste em várias concentrações foram adicionados ao meio de cultura em um tubo de ensaio e diferentes cepas foram inoculadas em concentração 10⁸ UFC/mL. Trípticos Soy Agar (TSA) (para antibacteriano) e Sabouraud líquido médio (para antifúngico) foram utilizados como meios de cultura. Os tubos foram incubados a 37°C (antibiótico) ou 30°C (antifúngico) por 24-48 h, e, em seguida, examinadas para a presença ou ausência de organismos de cultivo. Amoxicilina e Fluconazol foram utilizados como substâncias antibacterianas e antifúngicas padrão. Os valores de CMI foram obtidos a partir da menor concentração dos compostos dos tubos de ensaios, onde permaneceu claro, indicando que o crescimento de bactérias ou fungos foi completamente inibido na concentração. Os valores da CMB e CMF foram medidos através da inoculação dos caldos utilizados para determinação da CMI para meio sem drogas. Os valores da CMB e CMF foram os da primeira diluição onde nenhum crescimento é observado. Os valores da CMI, CMB e CMF, foram expressos em µg/mL (Silva, 2010).

Citotoxicidade

Células esplênicas (6x10⁵ células/poço) obtidas previamente foram cultivadas em placas de 96 poços de fundo plano, contendo meio de cultura Roswell Park Memorial Institute (RPMI) com 10% de soro bovino fetal. Para o ensaio de citotoxicidade, as células foram incubadas com os compostos em sete diferentes concentrações (faixa de 200 a 0,1 µg/mL) e com 1 µM de timidina tritiada/poço durante 24 h em estufa de CO₂ a 37°C. Em paralelo, foram feitos controles com células tratadas com saponina (0,05%), com células tratadas com DMSO (0,05%), substâncias com reconhecida atividade tóxica e um controle sem tratamento. Após 24 h de incubação, as células foram coletadas em papel de fibra de vidro e, posteriormente, a captação de timidina tritiada foi determinada através do contador beta de cintilação. O percentual de citotoxicidade foi determinado comparando-se a porcentagem de incorporação de timidina tritiada nos poços com as drogas em relação aos poços não tratados (Mosmann, 1983). Este teste foi realizado no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM), na UFPE.

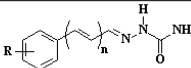
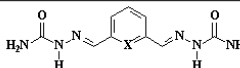
RESULTADOS E DISCUSSÃO

Química

Por meio da rota sintética utilizada, foi possível obter os derivados aril-semicarbazônicos (01-10) com excelentes rendimentos, na faixa 80-90%, e bons graus de pureza, necessitando de simples técnicas de purificação por meio de recristalização utilizando água destilada. Os derivados cristalinos obtidos foram então filtrados, secos e enviados para análises de elucidação estrutural.

Todos os compostos foram elucidados por técnicas espectroscópicas de infravermelho com transformada de Fourier (IVTF) e Ressonância Magnética Nuclear de Prótons (RMN ¹H). As estruturas dos compostos obtidos encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1. Estrutura dos derivados aril-semicarbazônicos obtidos.

Compostos				
	n	R	X	
01	0	4-N(CH ₃) ₂	-	
02	0	3-OCH ₃ , 4-OH	-	
03	0	4-OCH ₃	-	
04	1	H	-	
05	-	-	N	
06	-	-	C	
07	0	4-Br	-	
08	0	4-F	-	
09	0	4-Cl	-	
10	0	3,4-Cl,Cl	-	

Atividade Antimicrobiana

Por meio da avaliação *in vitro* da atividade antibacteriana e antifúngica, através da difusão em discos de papel dos dez derivados aril-semicarbazônicos testados, pôde-se obter os dados de inibição antimicrobiana presentes na Tabela 2.

Tabela 2: Atividade antimicrobiana dos derivados aril-semicarbazônicos expressa em diâmetro da zona de inibição (mm)

Microorganismos	Compostos										Padrão	
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	Amox.	Nist.
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	18
<i>B. subtilis</i>	8	-	-	-	8	8	-	-	-	-	-	18,5
<i>M. luteus</i>	12.	-	-	-	16	16,3	-	-	14	13.	-	57
	6	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-
<i>S. faecalis</i>	-	-	-	-	8	-	-	-	-	-	-	32,5
<i>E. coli</i>	12.	-	-	-	12.	11,3	-	-	10.	11	-	26
	3	-	-	-	3	-	-	-	6	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	12	-	-	-	11.	10	-	-	9,6	9,6	-	-
					3	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. smegmatis</i>	-	-	-	-	7,6	7,6	-	-	7,6	-	-	35
<i>Candida albicans</i>	17	-	-	-	16.	15,6	-	-	13.	11	-	10
					3	-	-	-	6	-	-	-
<i>Mullaseia furfur</i>	7,3	nt	nt	nt	7,5	7,3	nt	nt	-	-	-	-

- = ausência de inibição de crescimento microbiano; nt = não testado
Amox. = Amoxicilina; Nist. = Nistatina

Considerando os resultados obtidos, foi observado que os derivados aril-semicarbazônicos 01, 05, 06, 09 e 10 apresentaram de baixa a moderada ação frente aos patógenos avaliados, ao passo que os derivados 02, 03, 04, 07 e 08 não se mostraram ativos.

Nenhum dos compostos avaliados apresentou atividade frente a *Staphylococcus aureus*, e dentre os microorganismos submetidos ao teste, *Micrococcus luteus* e *Candida albicans* foram os mais sensíveis.

Os derivados 05 e 06 apresentaram atividade superior aos demais compostos da série. Os resultados obtidos revelaram grande similaridade entre eles em relação à potência inibitória do crescimento microbiano, sendo o derivado 05 discretamente mais ativo que 06.

Notou-se também que a substituição no anel benzênico por um átomo de halogênio não foi favorável, sendo 07 (4-Br) e 08 (4-F) inativos. O derivado 09 (4-Cl) apresentou moderada atividade, no entanto a adição de um segundo átomo de Cl na posição 3 do anel aromático de um modo geral não contribuiu para o aumento da atividade antimicrobiana, conforme observado para o derivado 10.

Por apresentarem uma melhor atividade em relação aos demais derivados, 05 e 06 foram selecionados para avaliação das concentrações mínima inibitória (CMI), mínima bacteriostática (CMB) e concentração mínima fungistática (CMF), dados presentes na Tabela 3.

Tabela 3. Valores da Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB) e Concentração Mínima Fungistática (CMF) para os compostos 05 e 06 frente às cepas avaliadas

		05	06	Padrão	
				Amoxicilina	Fluconazol
<i>M. luteus</i>	CMI	250 µg/mL	500 µg/mL	0,06 µg/ml	-
	CMB	125 µg/mL	250 µg/mL	-	-
<i>C. albicans</i>	CMI	250 µg/mL	250 µg/mL	-	1,0 µg/ml
	CMF	125 µg/mL	125 µg/mL	-	-

Através destes dados demonstra-se a baixa potência antibiótica desses compostos, evidenciada pelas altas doses necessárias para se obter a CMI, em relação aos fármacos utilizados como padrão.

Citotoxicidade

A avaliação da citotoxicidade dos compostos mais ativos (05 e 06) envolveu a utilização de células esplênicas de camundongos BALB/c, conforme descrito anteriormente na metodologia. Os resultados foram obtidos em µg/mL, que representa a maior concentração atóxica frente às células testadas, e são mostrados na Tabela 4.

Tabela 4. Citotoxicidade dos derivados aril-semicarbazônicos 05 e 06 (µg/mL)

Compostos	Citotoxicidade (µg/mL)
05	>100
06	>100

Estas aril-semicarbazonas 05 e 06 não apresentaram citotoxicidade considerável em concentrações de até 100 µg/mL. A baixa toxicidade celular apresentada por estes compostos pode estar relacionada principalmente à ausência do grupamento nitro, visto que derivados do 5-nitro-2-furaldeído semicarbazona apresentaram alta toxicidade, como podemos observar em resultados demonstrados por Farias (2006) e por Brondani e colaboradores (2008).

CONCLUSÕES

Os derivados aril-semicarbazônicos desejados foram obtidos com excelentes rendimentos, entre 80-90%, através de uma metodologia simples e rápida.

Por meio da avaliação da atividade bacteriana, esses compostos mostraram apresentar baixa ação antimicrobiana nas doses testadas, não sendo favorável o uso como drogas antibióticas.

Através dos ensaios de citotoxicidade observou-se que os compostos testados apresentaram muito baixa toxicidade celular, perfil este que pode estar relacionado principalmente à ausência do grupo nitro.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq e FACEPE pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

Abreu FC, Ferraz PAL, Goulart MOF. Some applications of electrochemistry in biomedical chemistry. emphasis on the correlation of electrochemical and bioactive properties.

Journal of Brazilian Chemical Society. 13: 19-35, 2002.

Aguirre G, Boiani M, Cabrera E, Cerecetto H, Di Maio R, Gonzales M, Denicola A, Santanna CMR, Barreiro EJ. New potent 5-nitrofuryl derivatives as inhibitors of *Trypanosoma cruzi* growth. 3D-QSAR (CoMFA) studies. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 41: 457-466, 2006.

Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol*. 45: 493-496, 1966.

Beraldo H. Semicarbazonas e Tiosemicarbazonas: O amplo perfil farmacológico e usos clínicos. *Quim. Nova*. 27(3): 461-471, 2004.

Brondani DJ, Caetano N, Moreira DRM, Soares RR, Lima VT, Araújo JM, abreu FC, Oliveira BG, Hernades MZ, Leite AC. Novel Nitrofurazone Derivatives Endowed with Antimicrobial Activity. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci*. 341: 655-660, 2008.

Farias MPA. Novos derivados da nitrofurazona: Síntese, toxicidade aguda, estudo das atividades antimicrobiana e antichagásica. 2006. 90 p. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco. Recife - PE.

Gerpe A, Álvarez G, Benítez D, Boiani L, Quiroga M, Hernandez P, Sortino M, Zacchino S, Gonzales M, Cerecetto H. 5-Nitrofuranes and 5-nitrothiophenes with anti-*Trypanosoma cruzi* activity and ability to accumulate squalene. *Bioorg. Med. Chem*. 17: 7500-7509, 2009.

Hemalatha T, Imram PKM, Gnanamani A, Nagarajan S. Synthesis, antibacterial and antifungal activities of some N-nitroso-2,6-diarylpiperidin-4-one semicarbazones and QSAR analysis. *Nitric Oxide*. 19: 303-311, 2008.

Mester B, Elguero J, Claramunt RM, Castanys S, Mascaro ML, Osuna A, Vilaplana MJ, Molina P. Activity against *Trypanosoma cruzi* of new analogues of Nifurtimox. *Arch. Pharm*. 320: 115- 120, 1987.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 65: 55-63, 1983.

Shafiee A, Rineh A, Kebriaeezadeh A, Foroumadi A, Sheibani V, Afarinesh MR. Synthesis and anticonvulsant activity of 4-(2-phenoxyphenyl) semicarbazones. *Med Chem Res*. 18:758-769, 2009.

Shalini M, Yogeewari P, Sriram D, Induja S. Microwave-assisted synthesis, anticonvulsant activity and quantum mechanical modelling of N-(4-bromo-3-methylphenyl) semicarbazones. *J Zhejiang Univ Sci B*. 8(1):45-55, 2007.

Silva DRC. Síntese e avaliação das atividades antimicrobiana e anti-*T. cruzi* de derivados nitro-aril-tiosemicarbazônicos. 2010. Recife. 153 p. Dissertação (mestrado), Universidade Federal de Pernambuco. Recife.

Tangallapally RP, Yendapally R, Daniels AJ, Lee REB, Lee RE. Nitrofurans as novel anti-tuberculosis agents: identification, development and evaluation. *Curr. Top. Med. Chem*. 7(5): 509-526, 2007.