

**Síntese e avaliação da atividade antifúngica e antimicrobiana de novos derivados
Triazólicos de 1,2,4-Oxadiazolinas Semicarbazônicas e Tiosemicarbazônicas**

**Synthesis and evaluation of antifungal and antimicrobial activity of new triazoles
derivatives from Semicarbazonic and Thiosemicarbazonic 1,2,4-Oxadiazolines**

Jéssica Araújo Bezerra Mesquita¹; Charles Christophe Du Barriere Mendes²

Endereço dos autores:

¹Estudante do Curso de Farmácia do Programa Institucional de Iniciação Científica de 2013/2014 (PIC/FPS) da Faculdade Pernambucana de Saúde (FPS), Recife, PE, Brasil.

²Tutor do Curso de Farmácia e Tutor do laboratório de Química Orgânica e Físico-Química da FPS.

^{1,2}Faculdade Pernambucana de Saúde, Av. Jean Emile Favre, nº 422; Imbiribeira, Recife, PE, Brasil; CEP: 51.200-060. E-mail: mesquita22@live.com, charlesmendes@fps.edu.br

RESUMO

Objetivos: Síntese de compostos derivados do biciclo pirrolidina-[1,2-*d*][1,2,4]-2-oxadiazolina, funcionalizados com semicarbazonas, tiossemicarbazonas e triazóis, bem como a análise das atividades antimicrobiana e antifúngica destas moléculas.

Métodos: As sínteses dos derivados oxadiazolil-tiossemicarbazona, oxadiazolil-aril-semicarbazona e 1,2,4-triazólicos, foram realizadas pela condensação do aldeído oxadiazolínico, com a 4-fenil-semicarbazida e tiossemicarbazida. Quando submetidas a um processo de ciclização, em meio básico com KOH 4%, a semicarbazona e tiossemicarbazona são convertidas em oxadiazolil-1,2,4-triazol-3-ona e oxadiazolil-1,2,4-triazol-3-tiona, respectivamente. As moléculas sintetizadas foram analisadas pelo método de difusão em disco frente aos seguintes micro-organismos: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida krusei* e *Candida albicans*.

Resultados: As oxadiazolil-aril-semicarbazona e oxadiazolil-tiossemicarbazona foram sintetizadas e caracterizadas por espectroscopia de RMN de ^1H , RMN de ^{13}C e infravermelho. Os oxadiazolil-1,2,4-triazóis foram sintetizados, porém sofreram clivagem no anel triazólico, o que culminou na degradação destes derivados. Nos ensaios visando atividade fungicida e antimicrobiana, foi evidenciado que o aldeído oxadiazolínico exibiu os maiores halos de inibição, resultados que foram menos evidentes para as demais moléculas.

Conclusões: A síntese do oxadiazolil-1,2,4-triazol será replanejada por meio de outras rotas sintéticas, visto que o éster, aldeído, álcool, oxadiazolil-aril-semicarbazona e

oxadiazolil-tiossemicarbazona, que são seus precursores, exibiram razoável atividade fungicida.

Palavras Chave: 1,2,4-oxadiazolinas, 1,2,4-triazóis, semicarbazona, tiossemicarbazona, atividades antimicrobiana/antifúngica.

ABSTRACT

Objectives: Synthesis of compounds derived from the bicycle pyrrolidine[1,2-*d*][1,2,4]-2-oxadiazoline, focusing on semicarbazones, thiosemicarbazones and triazoles classes, as well as the analysis of antimicrobial and antifungal activities of these molecules.

Method: The syntheses of the derivatives oxadiazolyl-tiossemicarbazone, oxadiazolyl-aryl-semicarbazone and 1,2,4-triazole were performed by the condensation of oxadiazoline aldehyde with 4-phenyl-semicarbazide and thiosemicarbazide. When subjected to a cyclization process, with KOH 4%, the semicarbazone and thiosemicarbazone are converted into oxadiazolyl-1,2,4-triazol-3-one and oxadiazolyl-1,2,4-triazole-3-thione, respectively. The synthesized molecules were analyzed by disk diffusion method against the following microorganisms: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida krusei* and *Candida albicans*.

Results: The oxadiazolyl-aryl-semicarbazone and oxadiazolyl-thiosemicarbazone were synthesized and characterized by ¹H NMR, ¹³C NMR spectroscopy and infrared. However, the oxadiazolyl-1,2,4-triazoles were synthesized, but suffered cleavage at the triazole ring, that resulted in the degradation of these derivatives. On the assays targeting antimicrobial and antifungal activity, it was shown that the oxadiazoline aldehyde exhibited the largest inhibition halos, results that were less noticeable for the other molecules.

Conclusions: The synthesis of oxadiazolyl-1,2,4-triazole will be redesigned by other synthetic routes, as the ester, aldehyde, alcohol, oxadiazolyl-aryl-semicarbazone and thiosemicarbazone, which are their precursors, showed reasonable fungicide activity.

Keywords: 1,2,4-oxadiazolines, 1,2,4-triazoles, semicarbazone, thiosemicarbazone, antimicrobial/antifungal activities.

1. INTRODUÇÃO

Compostos heterocíclicos são amplamente empregados na terapêutica, tais como, o benzodiazepínico Alprazolam, utilizado no tratamento de distúrbios de ansiedade e distúrbio do pânico^{[1][2]}, o Fluconazol, agente fungistático e fungicida^[3], inibidor da enzima 14 α -demetilase (conversora do lanosterol em ergosterol), e a Ribavirina, utilizada no tratamento de hepatite C (em associação), de infecções virais do trato respiratório inferior e febre amarela, interferindo na duplicação do RNA viral^{[4][5]}. Esses fármacos possuem em comum o heterociclo de cinco membros da classe dos triazóis, mais especificamente, 1,2,4-triazóis.

Em literatura recente são citadas diversas aplicações terapêuticas de compostos contendo o anel triazólico. El Kadiri e col.^[6] relataram a síntese de seis novas N,N-bis(1,2,4-triazolil-1-ilmetil) aminas, com grupos aminoácidos, alquila e arila volumosos ligados a um átomo de nitrogênio central, apresentando atividades antimicrobiana e antifúngica.

Em outro estudo^[7], foram desenvolvidos compostos oxadizolínicos com atividade contra *Candida albicans* e *Candida krusei*. O mais promissor resultado foi apresentado pelo composto aldeídico, que deriva de um composto oxadizolínico, também desenvolvido nesse estudo, porém esterificado na posição 3 (**Anexo 1**).

Baseando-se no sucesso dessas sínteses, bem como nos excelentes resultados biológicos, foi desenvolvida a síntese de compostos triazólicos, com o objetivo de expandir a aplicabilidade dessas substâncias já bem caracterizadas, além de analisar se existe relação entre a atividade da porção oxadizolínica com a porção triazólica.

Com esta finalidade, foi utilizada na síntese a hibridação molecular, em que, a molécula final será um híbrido de duas moléculas iniciais, possuindo ambas as funcionalidades. Assim, foram planejadas sínteses para a obtenção de híbridos que terão conformação semelhante ao 1,2,4-triazol.

Para obtenção dos derivados do 1,2,4-triazol, foram sintetizados os intermediários químicos, sendo classificados como oxadiazolil-aryl-semicarbazona e oxadiazolil-tiossemicarbazona, os quais foram obtidos a partir do heterociclo pirrolidina[1,2-*d*][1,2,4]-2-oxadiazolina.

Os triazóis são núcleos heterocíclicos aromáticos que possuem três átomos de nitrogênio em sua estrutura. Devido à sua extrema importância para a química medicinal, com interessantes atividades biológicas, este núcleo é alvo de inúmeras pesquisas. Quanto à classificação, existem dois tipos de triazóis, o 1,2,3-triazol e o 1,2,4-triazol.

Shaliniet et al.^[8] propuseram a ciclização de aril-semicarbazonas, que resultou na formação de 1,2,4-triazóis, para verificação dos efeitos concernentes a sua atividade anticonvulsivante.

Na síntese realizada por Kopariret al.^[9], houve a ciclização da tiossemicarbazida em meio básico na reação do grupamento triazólico. A molécula sintetizada foi avaliada quanto às atividades antimicrobiana e antineoplásica. Resultados positivos foram obtidos para a molécula oxadiazolil-1,2,4-triazol-3-tiona.

2. OBJETIVO

O presente trabalho tem como objetivo a síntese de moléculas derivadas do biciclo pirrolidina-[1,2-*d*][1,2,4]-2-oxadiazolina, com funcionalidades semicarbazonas, tiossemicarbazonas e triazóis. Após síntese dos compostos já mencionados foram realizadas as análises das atividades antimicrobiana e antifúngica destas moléculas.

3. MÉTODOS

No presente trabalho foi realizada a síntese de compostos oxadiazolil-aril-semicarbazona e oxadiazolil-tiossemicarbazona, derivados de materiais de partida já conhecidos na literatura, como a pirrolidina e o clorooximidoacetato de etila. Para tanto, foi aplicada uma metodologia utilizada nas sínteses de outros bicíclios^[10,11], que possuem o núcleo isoxazolininas que é semelhante ao utilizado nesse síntese, o heterociclo pirrolidina[1,2-*d*][1,2,4]-2-oxadiazolina^[12]. Pretendeu-se ainda a síntese dos compostos oxadiazolil-1,2,4-triazólicos.

Partindo do heterociclo supracitado, a síntese de oxadiazolil-aril-semicarbazona e oxadiazolil-tiossemicarbazona se precedeu por meio de reações clássicas de redução, oxidação e condensação.

O éster oxadiazolínico (**IV**) foi obtido partindo da 1-pirrolina (**III**), que por sua vez, foi proveniente do seu respectivo trímero (**II**) derivado da pirrolidina (**I**) (etapas a,b e c). A gênese deste núcleo base foi ocasionada por meio da reação de cicloadição entre a 1-pirrolina e o óxido de carboetoxiformonitrila (CEFNO), que é um derivado gerado *in situ*, quando se adiciona no meio reacional o clorooximidoacetato de etila (etapa c), sintetizado previamente, a partir do cloridrato da glicina esterificada.

A partir do éster oxadiazolínico (**IV**) sintetizado, procedeu a sua redução, via borohidreto de sódio (NaBH_4), com o propósito da obtenção do respectivo álcool oxadiazolínico (**V**) (etapa d). O aldeído correspondente (**VI**) foi sintetizado seguindo o método de oxidação de alcoóis por meio de dimetilsulfóxido (DMSO) “ativado”^[13] com $\text{C}_2\text{Cl}_2\text{O}_2$ (cloreto de oxalila) e trietilamina como base orgânica (etapa e).

Em seguida foram realizadas reações de condensação dos derivados alcoólicos com a semicarbazida e a tiossemicarbazida para obtenção da oxadiazolil-aril-semicarbazona (**VII**) e oxadiazolil-tiossemicarbazona (**VIII**). Para a síntese dos compostos 1,2,4-triazólicos, foi utilizado o KOH (hidróxido de potássio) a 4%. (**Anexo 1**)

Todas as etapas foram realizadas no Laboratório de Síntese Orgânica Aplicada a Fármacos – LASOF, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco.

3.1 SÍNTESE DO TRÍMERO DA 1-PIRROLINA

Uma solução aquosa de persulfato de sódio (16,91 g; 69,6 mmol, 67 mL de água) foi adicionada lentamente a 0°C no balão contendo solução aquosa de pirrolina (5,8 mL; 69,6 mmol), hidróxido de sódio (5,74 g; 139,2 mmol) e nitrato de prata (0,059 g; 0,38 mmol) em 70 mL de água. Terminada a adição do persulfato, a reação permaneceu em agitação vigorosa a 0°C por uma hora adicional. Decorrido este tempo, o banho de gelo foi retirado e a reação permaneceu por mais 3 horas sob vigorosa agitação em temperatura ambiente. A mistura resultante foi extraída com cloreto de metileno (4 x 30 mL). A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) e o solvente foi removido. A massa

do trímero (óleo amarelo-alaranjado) obtida foi 2,8438 g, correspondendo a um rendimento de 60,9%.

Propriedades Físicas do trímero: Óleo amarelo-alaranjado viscoso, de odor pungente.

3.2 SÍNTESE DO CLOROOXIIMIDO ACETATO DE ETILA

Em um balão de fundo redondo foi adicionado 30,6 g (219,2 mmol) de cloridrato de glicina esterificada e 45 mL de água, iniciou a agitação e em seguida foi acrescentado 18,9 ml de ácido clorídrico (HCl) em banho de gelo até o sistema atingir 0°, onde foi iniciado o gotejamento com a solução composta por 15,3 g (221,75 mmol) de nitrito de sódio (NaNO₂) e 27 ml de água destilada. Após o termino da adição foi adicionado 18,9 ml de HCl_(CONC) e através do funil de adição foi inserida mais solução de NaNO₂ (Igual a anterior).

A extração foi efetuada com 5 x 40 ml de cloreto de metileno (CH₂Cl₂), depois foi seca com sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄), realizou a filtração onde o filtrado foi levado ao rotaevaporador, o produto resultante foi cristalizado com n-hexano e filtrado a vácuo com o funil sinterizado.

Devido a sua grande estabilidade, ele pode ser armazenado em grandes quantidades por longo período e utilizado conforme necessidade. O precursor do dipolo foi obtido com aspecto branco cristalino, com um rendimento de 45%.

3.3 SÍNTESE DO 5,6,7,7Aa-TETRAHIDROPIRROL[1,2-d][1,2,4]-OXADIAZOL-3-CARBOXILATO DE ETILA A PARTIR DA 1-PIRROLINA - ÉSTER

Foi inserido no ultrassom com aquecimento o balão contendo o trímero 2,8438 g (41,19 mmol) e logo em seguida adicionou-se THF (113,75 mL), permanecendo

por 30 minutos para posterior adição da trietilamina, $N(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$, cujo volume foi de 3,98mL (28,55 mmol), onde permaneceu por 20 minutos. Em seguida foi adicionado gota a gota o Clorooxiimido acetato de etila (PRECURSOR) 3,98 g (26,26 mmol) quando foi observado a formação de um precipitado branco que turvou o sistema. A agitação ocorreu por mais 30 minutos, período em que foram realizadas cromatografias em camada delgada (CCD) para o acompanhamento da formação do éster oxadiazolínico. Após verificação da síntese do produto desejado, o sistema foi retirado do ultrassom e foi realizada a filtração do sólido branco, já o filtrado foi colocado no rotaevaporador para retirada do solvente. Foi obtido um rendimento de 50% na reação.

Nesta reação ocorre a formação do *N*-óxido de nitrila, *in situ*, partindo-se do ataque nucleófilo da trietilamina (TEA) ao clorooxiimido acetato de etila, havendo ao final precipitação do sal cloridrato de trietilamônio no meio. À medida que o *N*-óxido de nitrila vai se formando no meio reacional, ocorre prontamente o ataque nucleofílico pela Δ^1 -pirrolina, havendo formação do novo heterociclo pirrolidina[1,2-*d*][1,2,4]-2-oxadiazolina racêmico, contendo a porção éster em C3.

3.4 SÍNTESE DO 5,6,7,7a-TETRAHIDROPIRROL[1,2-*d*][1,2,4]-OXADIAZOL-3-IL)METANOL - ÁLCOOL

O éster oxadiazolínico 2,8852 g (184,1938 mmol) foi solubilizado em metanol (150 mL), a 0°C sob agitação vigorosa, e após sua completa solubilização foi adicionado 1,765 g (46,65 mmol) de borohidreto de sódio (NaBH_4) em pequenas porções. Após adição foi deixado sob agitação por aproximadamente 1h a 0° e 40 minutos a temperatura ambiente. Toda reação foi acompanhada através de CCD, para verificação da formação do álcool oxadiazolínico desde o início da adição do NaBH_4 . Após seu completo consumo, o

meio reacional foi colocado no rotaevaporador para completa retirada do metanol e após evaporação do solvente, o produto foi solubilizado em 70 mL de acetato de etila e 70 mL de solução saturada de NaCl para posterior extração.

Realizou-se a extração utilizando acetato de etila (3 x 70 mL), havendo formação de duas fases (uma aquosa mais densa e uma orgânica menos densa), ambas recolhidas em erlenmeyer separados. Após o término deste procedimento a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), filtrada com funil comum e levada para o rotaevaporador para remoção completa do solvente. O rendimento dessa síntese foi de 99%.

3.5 SÍNTESE DO 5,6,7,7a-TETRAHIDROPIRROL[1,2-d][1,2,4]-OXADIAZOL-3-CARBALDEÍDO - ALDEÍDO

Em um balão contendo cloreto de oxalila, $\text{C}_2\text{Cl}_2\text{O}_2$, (2,28 mL - 26,94 mmol) e diclorometano, CH_2Cl_2 , (49,33 mL) a -78°C e sob agitação vigorosa, foi adicionado dimetilsulfóxido^[13] [DMSO], 3,804 mL, (53,56 mmol) em diclorometano (11,42 mL) que permaneceu sob agitação por dois minutos. Posteriormente foi adicionado durante 5 minutos, o álcool oxadiazolínico 3,0682 g (21,58 mmol) solubilizado em diclorometano (13,36 mL) que ficou sob agitação por 15 minutos. A reação foi finalizada com a adição de trietilamina [TEA], 15,25 mL, (109,41 mmol) sendo acrescido mais 5 minutos ao tempo reacional, após término deste período foi retirado o gelo seco e a formação do produto foi acompanhado com CCD. O rendimento dessa reação foi de 60%.

3.6 SÍNTESE DA 2-(5,6,7,7A-TETRAHIDROPIRROLO[1,2-*d*][1,2,4]OXADIAZOL-3-ILMETILIDENO)HIDRAZINACARBOXAMIDA - SEMICARBAZONA

Em um balão foi adicionado 10 mL de etanol para homogenizar a semicarbazida, 233,92 mg (3,1174 mmol), em seguida adicionou-se em outro balão mais 10 mL de etanol para solubilizar o aldeído, 397,2 mg (2,834 mmol). Após solubilização, o aldeído foi adicionado ao balão contendo semicarbazida, onde permaneceu por uma hora sob agitação vigorosa, e decorrido este tempo, observou-se que a semicarbazida ainda encontrava-se precipitada. O sistema foi inserido em banho de silicone por mais 1h a 50°C, o que levou sua total dissolução. Toda reação foi acompanhada por CCD e após total consumo do aldeído, o sistema foi retirado do banho de silicone. Foi adicionado n-hexano ao balão para verificar a solubilidade do sal (cloridrato) da solução. Um sólido branco precipitou e em seguida o produto foi colocado no rotaevaporador para remoção completa do etanol/n-hexano.

A semicarbazona sintetizada está em fase de purificação, por esse razão ainda não foi caracterizada por RMN ¹³C e ¹H nem por infravermelho. Uma coluna cromatográfica foi realizada para isolamento e purificação final do produto, porém ainda resta dúvida acerca de sua identidade, já que ainda existem duas substâncias presentes no meio, identificadas por CCD.

3.7 SÍNTESE DA N-FENIL-2-(5,6,7,7a-TETRAHIDROPIRROL[1,2-*d*][1,2,4]OXADIAZOL-3-ILMETILIDENE)HIDRAZINACARBOXAMIDA – ARIL-SEMICARBAZONA

A oxadizolil-aril-semicarbazona foi obtida pela condensação da 4-fenil semicarbazida, adquirida comercialmente, com o aldeído oxadiazolínico, em reação que utilizou 718,5 mg

(5,127 mmol) de aldeído e 775,8 mg (5,132 mmol) de 4-fenil semicarbazida^[14,15]. O processo de obtenção foi semelhante ao da reação anterior.

O processo de purificação escolhido para esta substância foi à centrifugação e sucessivas lavagens, com posterior recristalização. Notou-se que esse processo necessita ser aperfeiçoado, já que, ele influenciou a quantidade final do produto puro, e assim o rendimento.

3.8 SÍNTESE DA 2-(5,6,7,7a-TETRAHIDROPIRROL[1,2-*d*][1,2,4]OXADIAZOL-3-ILMETILIDENE)HIDRAZINECARBOTIOAMIDA - TIOSSEMICARBAZONA

Em um balão foi adicionado 10 mL de etanol para solubilizar 0,4739 g (5,2 mmol) da tiossemicarbazida, que não foi solúvel a frio nem sob aquecimento com temperatura de 70°C. Foi adicionado 3 gotas de HCl com o propósito de auxiliar na solubilização, porém não houve sucesso. Em seguida o aldeído foi adicionado lentamente 0,7289g (5,2 mmol), solubilizado em etanol e após 30 minutos de adição, a única coloração visível foi o amarelo característico do aldeído. Após 45 minutos, a coloração alterou para amarelo claro, além de haver turvação do meio, característica que permaneceu inalterada até o término da reação, 1 hora e 10 minutos após a adição do aldeído. Verificou-se por CCD o total consumo deste e em seguida o sistema foi colocado no rotaevaporador para remoção completa do etanol.

3.9 - PURIFICAÇÃO DA 2-(5,6,7,7a-TETRAHIDROPIRROL[1,2-*d*][1,2,4]OXADIAZOL-3-ILMETILIDENE)HIDRAZINECARBOTIOAMIDA

Foi adicionado n-hexano ao balão contendo o pó amarelado (que restou após remoção do etanol), e foi verificado que este solvente permaneceu incolor, indicando que o produto

amarelado não é solúvel neste solvente. Posteriormente foi adicionado acetato de etila, que se tornou amarelado após agitação. O precipitado se tornou branco (sal inorgânico a ser separado do sistema), e logo após houve realização de CCD da fase em acetato de etila. Foi adicionado H₂O ao balão para testar a solubilidade do sólido branco, o que gerou três fases.

A extração foi realizada com AcOEt: H₂O, em que foram utilizadas 3 frações de AcOEt. A fase orgânica foi armazenada em um balão de 100 mL, já a fase aquosa foi mantida em um erlenmeyer (foi observado a formação de cristais após alguns dias). Posteriormente foi removido o acetato da fase orgânica, o que resultou num sólido castanho. Foi realizada uma CCD e verificou a presença de impurezas. Este sólido foi lavado com MeOH, o que removeu as impurezas, e como verificado em CCD, uma parte do produto também foi arrastada. O que permaneceu no funil sinterizado foi levado à estufa (50°C/1h) onde se observou a formação de um produto castanho claro. A parte que foi arrastada pelo metanol durante a lavagem, foi mantido no balão de 100 mL, após remoção do solvente.

3.10 ANÁLISES ESPECTROMÉTRICAS E ESPECTROSCÓPICAS

Os espectros de massas de alta resolução foram obtidos em aparelho Shimadzu LCMS-IT-TOF, bomba LC 20AD, Injetor SIL-20 A, tendo como fonte de ionização *electrospray*(ESI).

Os espectros no infravermelho (IV-FT) foram obtidos em aparelhos Bruker IFS 66 (transformada de Fourier), com as frequências das bandas de absorção sendo expressas em cm⁻¹, utilizando pastilhas ou janelas de KBr.

Os espectros de RMN de ¹H e de ¹³C foram obtidos em aparelhos VarianUnity 300 MHz, sendo os deslocamentos químicos (δ) expressos em ppm, tendo como padrão

interno o tetrametilsilano (TMS). Os solventes utilizados para as análises foram o clorofórmio deuterado, CDCl_3 , a acetonitrila deuterada, CD_3CN e o dimetilsulfóxido deuterado, $\text{DMSO-}d_6$. Os sinais dos espectros de RMN de ^1H são descritos da seguinte forma: deslocamento químico (ppm), multiplicidade (s = singlete, d = dubleto, dl = dubleto largo, t = tripleto, tl = tripleto largo, q = quarteto, dd = duplo dubleto, dt = duplo tripleto, ddl = duplo dubleto largo, m = multipleteo, ml = multipleteo largo, sl = sinal largo), constante de acoplamento (Hz) e integração dos sinais, indicando o número de hidrogênios por sinal.

As análises foram realizadas na Central Analítica do Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco –UFPE.

3.11 ENSAIOS BIOLÓGICOS

Os micro-organismos selecionados para esse estudo foram os seguintes:

- *Staphylococcus aureus* (Gram-positiva) – UFPEDA 02
- *Bacillus subtilis* (Gram-positiva) – UFPEDA 86
- *Enterococcus faecalis* (Gram-positiva) – UFPEDA 138
- *Escherichia coli* (Gram-negativa) – UFPEDA 224
- *Klebsiella pneumoniae* (Gram-negativa) – UFPEDA 396
- *Candida krusei* – UFPEDA 1002
- *Candida albicans* – UFPEDA 1007

Todos os micro-organismos testes são procedentes da coleção de micro-organismos do Departamento de Antibióticos da UFPE, e o estudo de atividade antimicrobiana foi realizado segundo o método de difusão em Agar desenvolvido por Bauer

e col.^[16]. As substâncias obtidas neste trabalho foram submetidos ao “*screening*” antimicrobiano, sendo utilizados os seguintes meios de cultura:

- Agar Nutritivo (AN)
- Agar Sabouraud (SAB)

Foram pesados 10,0 mg de cada um dos produtos a serem testados e solubilizados em 1,0 mL de uma solução DMSO/etanol (1:1), correspondendo a uma concentração de 10.000 µg/mL. Em seguida, foram diluídos de 1:10 utilizando a mistura de solventes, chegando a uma solução de 1000 µg/mL.

Os meios de cultura Agar Nutritivo e Agar Sabouraud foram preparados segundo as instruções dos seus fabricantes e esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos. O meio Agar Nutritivo foi utilizado para a avaliação da atividade antibacteriana e o meio Agar Sabouraud, para avaliação da atividade antifúngica.

Em placas de Petri estéreis de 9,0 cm de diâmetro foram adicionados 10,0 mL do meio de cultura, e colocadas em superfície plana até completa solidificação.

Os inóculos bacterianos foram obtidos a partir de uma cultura de 24 horas de cultivo. As suspensões foram preparadas utilizando água destilada esterilizada e turbidez para o grau 2, da escala de McFarland^[17], equivalente a 10^7 – 10^8 UFC/mL. Desta suspensão, foram retirados 100,0 µL e espalhada com alça de Drigalski em toda superfície da placa.

Discos de papel de filtro com diâmetro de 6 mm foram saturados com 100,0 µL da solução da substância a ser testada, correspondendo a 100,0 µg de cada produto no disco.

Após completa evaporação do solvente nos discos de papel, estes foram aplicados na superfície dos meios. As placas foram incubadas por 24 horas em estufa a 37°

C para as bactérias e 48 horas a 30° C para os fungos. Após incubação, foram efetuadas as leituras dos diâmetros dos halos de inibição em milímetros (mm).

Os ensaios foram realizados no Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ANÁLISE DO ÉSTER OXADIAZOLÍNICO

Os sinais característicos do novo heterociclo, são de 5,88 ppm em RMN de ^1H e 102,3 ppm em RMN de ^{13}C , que determinam a formação do cicloaduto.

Na análise espectrométrica de massa (GCMS-EL) do éster oxadiazolínico foi evidenciado o pico base em m/z 111, bem como o pico do íon molecular em m/z 184, corroborando a massa do novo éster oxadiazolínico.

Todos esses resultados primeiramente foram confirmados experimentalmente, através do acompanhamento das reações por CCD, onde se percebeu a formação de apenas um produto.

4.2 ANÁLISE DE RMN de ^1H , INFRAVERMELHO E MASSA DO ÁLCOOL OXADIAZOLÍNICO

Os hidrogênios metilênicos do grupamento hidroximetila do álcool foram evidenciados em um singlete no RMN de ^1H , 4,31 ppm, enquanto o hidrogênio da hidroxila mostrou-se como um singlete largo em 3,34 ppm. O álcool também apresentou, o espectro de IV-FT, a banda característica em torno de 3355 cm^{-1} , relativamente larga e intensa, caracterizando o estiramento da ligação O-H do grupamento hidroximetila em C3.

A massa do álcool foi confirmada por análise em GCMS-EI, onde nota-se o pico base em 58 m/z e o pico do íon-molecular em 142 m/z.

4.3 ANÁLISE DE RMN de ^1H , RMN de ^{13}C E INFRAVERMELHO DO ALDEÍDO OXADIAZOLÍNICO

Nas análises espectroscópicas de RMN de ^1H e de ^{13}C , foram evidenciados os picos característicos em 9,38 ppm para o hidrogênio da carbonila e 183 ppm para o carbono da carbonila. No IV-FT, o aldeído apresentou uma banda intensa em 1727 cm^{-1} , característica do estiramento da carbonila do aldeído, inexistente no IV-FT do álcool de partida.

4.4 ANÁLISE DE RMN de ^1H , RMN de ^{13}C E MASSA DA OXADIAZOLIL-ARIL-SEMICARBAZONA

Na análise espectrométrica de RMN de ^1H da semicarbazona, o sinal diagnóstico do hidrogênio azometínico é notado em 8,22 ppm. Para o hidrogênio da ligação N-H tem-se o deslocamento de 10,92 ppm em N4. O carbono carbonílico é notado em 156,6 ppm, confirmando a formação da oxadiazolil-aril-semicarbazona.

A espectrometria de massas da oxadiazolil-aril-semicarbazona foi realizada em HRMS-IT-TOF, em que foi confirmada sua massa com o valor de $M^+ + 1$ de 274,1297, frente ao valor teórico calculado de 273,1226.

4.5 ANÁLISE DE RMN de ^1H e RMN de ^{13}C DA TIOSSEMICARBAZONA

Na análise espectrométrica de RMN de ^1H da tiossemicarbazona, o sinal diagnóstico do hidrogênio azometínico é notado em 7,5 ppm. Para o hidrogênio da ligação N-H tem-se o deslocamento de 9,58 ppm. O C=S, característico da molécula analisada, é notado em 178,4 ppm, confirmando a formação da tiossemicarbazona.

A formação desse carbono e dos hidrogênio citados anteriormente é de grande importância, pois eles corroboram a formação do biciclo (**Anexo 4 e 5**).

4.6 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIFÚNGICA

Todas as moléculas sintetizadas neste trabalho (éster, álcool, aldeído, oxadiazolil-aryl-semicarbazona e oxadiazolil tiossemicarbazona) foram submetidas, em triplicata, aos testes antimicrobianos contra bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Enterococcus faecalis*) e Gram-negativas (*Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*).

As oxadiazolil-aryl-semicarbazona e oxadiazolil tiossemicarbazona não apresentaram desempenho frente às bactérias analisadas. As demais moléculas exibiram atividade antimicrobiana com halos de: 17 mm e 14 mm contra *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli*, para o aldeído; 11 mm contra *Bacillus subtilis*, para o éster; 12mm e 13mm contra *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli*, para o álcool (**Anexo 2**).

É notado que as porções semicarbazônicas e tiossemicarbazônicas inibem a atividade antimicrobiana, do heterociclo oxadiazolínico, visto que, a atividade é apresentada quando as outras funções orgânicas estão presentes.

Comparando-se ao controle é observado que o aldeído possuiu uma melhor atividade antimicrobiana, seguido do álcool que formou halos parecidos, porém menores

para as mesmas bactérias e por fim o éster que apresentou o menor halo e contra uma bactéria apenas.

Os testes também foram realizados em triplicata contra os fungos *Candida krusei* e *Candida albicans*.

Todas as moléculas testadas apresentaram atividades fungicida contra os dois fungos mencionados, com halos de: 26,0 mm e 18,0 mm para o aldeído; 10,0 mm e 15,0 mm para o éster; 10,0 mm e 14,0 mm para o oxadiazolil-aril-semicarbazona; 10,0 mm e 13,0 mm para o oxadiazolil tiossemicarbazona; 11,0 mm e 15,0 mm para o álcool (**Anexo 3**).

Apesar de não possuir atividade antimicrobiana, as oxadiazolil-aril-semicarbazona e oxadiazolil tiossemicarbazona quando comparadas com o controle apresentaram halos razoáveis, diferente do exibido contra as bactérias analisadas.

Como a oxadiazolil-aril-semicarbazona e oxadiazolil-tiossemicarbazona, precursores do 1,2,4-triazol, exibiram razoáveis halos contra os fungos analisados, supõe-se que o 1,2,4-triazol apresentará melhor atividade fungicida.

Por fim, se percebeu que as oxadiazolil-aril-semicarbazonas e oxadiazolil tiossemicarbazonas não apresentaram desempenho sobre as bactérias analisados, contrariando o que era apresentado na literatura, onde trabalhos de Chandra e col.^[18] e Kasuga e col.^[19, 20] que desenvolveram complexos de semicarbazonas e tiossemicarbazonas, onde na forma de ligantes, demonstraram-se ativos contra os microrganismos *S. aureus* e *E. coli* em baixas concentrações^[18].

5. CONCLUSÃO

Foram realizadas reações de condensação do aldeído oxadiazolínico com a tiossemicarbazida e 4-fenilsemicarbazida, alcançando as desejadas oxadiazolil tiossemicarbazona e oxadiazilil-aril-semicarbazona. Esperava-se que os derivados semicarbazônicos e tiossemicarbazônicos quando submetidas ao processo de ciclização em meio básico, levassem a obtenção da oxadiazolil-1,2,4-triazol-3-tiona e oxadiazolil-1,2,4-triazol-3-ona, porém sofreram degradação.

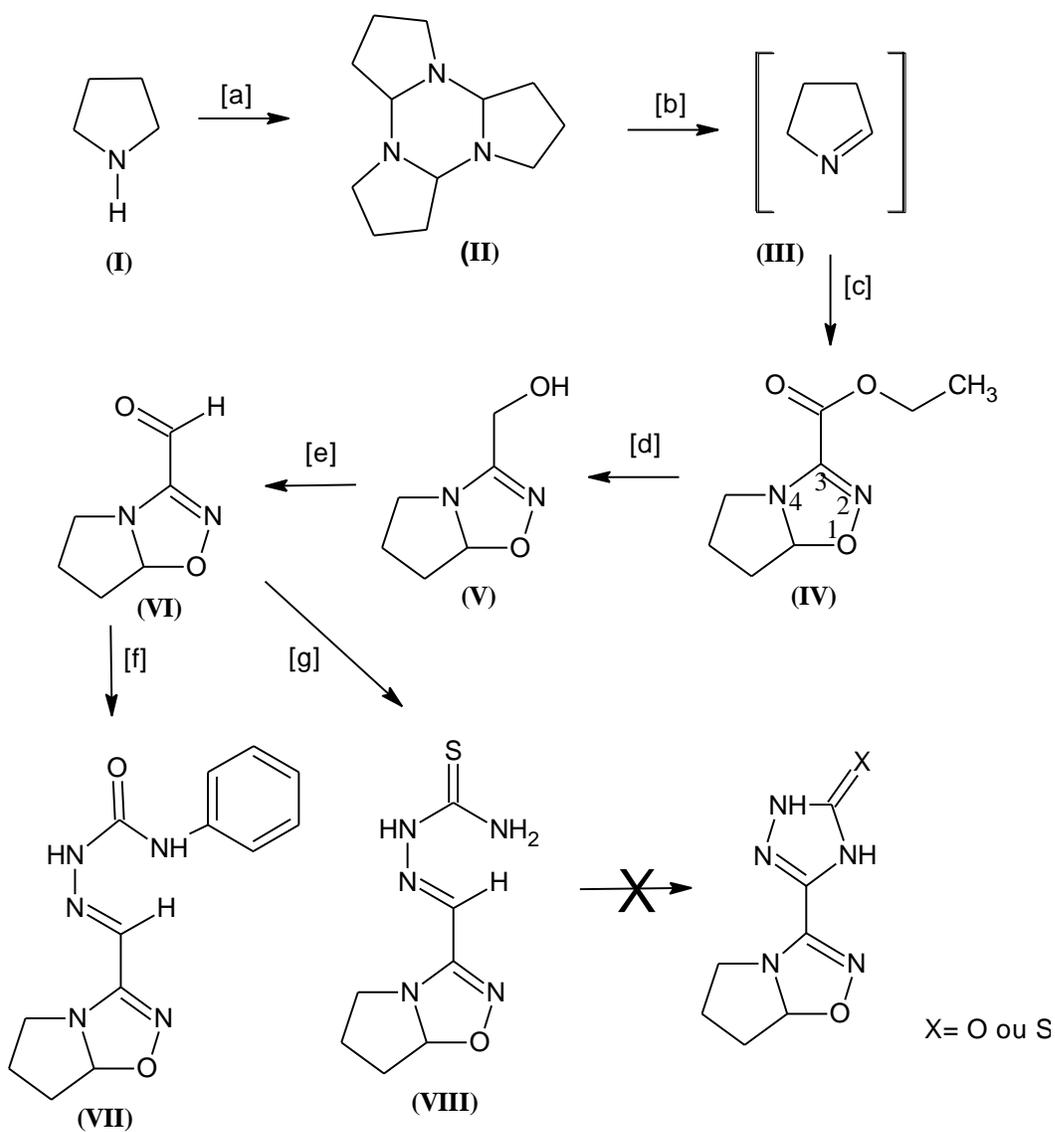
A síntese dos derivados 1,2,4-triazóis será replanejada por meio de outras rotas sintéticas, visto que os seus precursores, o éster oxadiazolínico, álcool oxadiazolínico, aldeído oxadiazolínico, oxadiazolil-aril-semicarbazona e a oxadiazolil-tiossemicarbazona, exibiram razoável atividade fungicida contra *Candida krusei* e *Candida albicans*. Por esta razão, espera-se obter o oxadiazolil-1,2,4-triazol para testar a atividade fungicida, como também atividade antimicrobiana, já que o aldeído oxadiazolínico e o álcool oxadiazolínico apresentaram moderados resultados contra *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli*.

6. BIBLIOGRAFIA

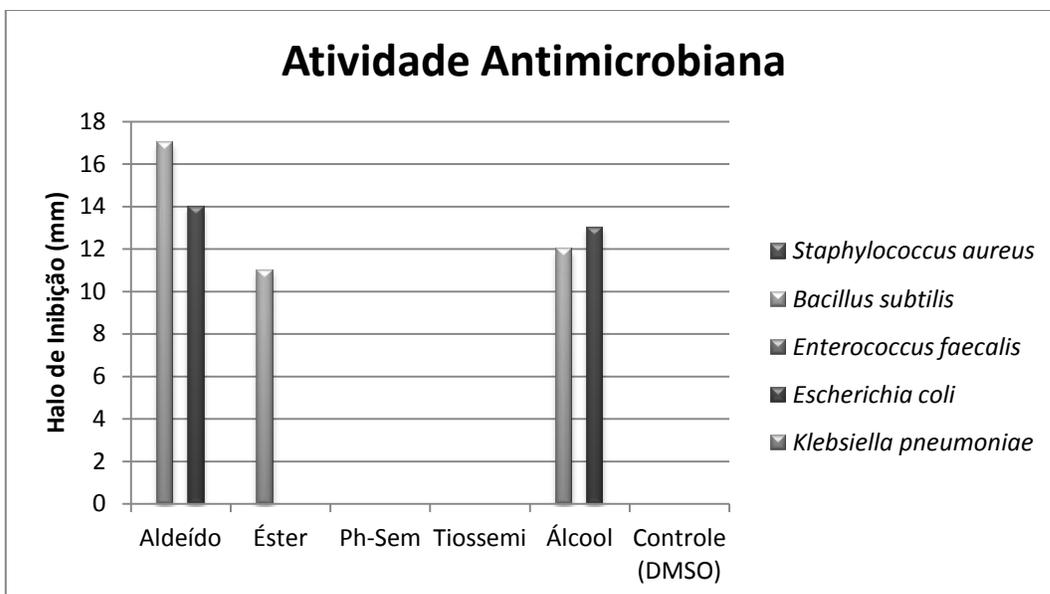
1. Gilchrist TL. Heterocyclic Chemistry. 2 ed. New York: Longman Scientific & Technical; 1992.
2. Avendano C. Introducción a La Química Farmacêutica. 2 ed. España: McGraw-Hill Interamericana; 2001.
3. Ganellin CR. Medicinal Chemistry - Principles and Practice. 2 ed. London: RSC; 1994.
4. Barreiro EJ, Fraga CAM. Química Medicinal – As Bases Farmacológicas da Ação dos Fármacos. 2 ed. ArtMed; 2001.
5. Beraldo H, Gambino D. The wide pharmacological versatility of semicarbazones, thiosemicarbazones and their metal complexes. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry. 2004; 4: 31-39
6. El Kadiri S, Bellaoui M, Taleb M, Al Bay H, Quaddouri B, Guaadaoui A, Touzani R, Benchat NE, Hamal A. Synthesis and Biological Activity of New Triazole Compounds. Letters in Drug Design & Discovery. 2010; 7: 41-45.
7. Alomar K, Khan MA, Allain M, Bouet G. Synthesis, crystal structure and characterization of 3-thiophene aldehyde thiosemicarbazone and its complexes with cobalt(II), nickel(II) and copper(II). Polyhedron. 2009; 28: 1273-1280.
8. Shalini M, Yogeeswari P, Sriram D, Stables JP. Cyclization of the semicarbazone template of aryl semicarbazones: synthesis and anticonvulsant activity of 4,5-diphenyl-2H-1,2,4-triazol-3(4H)-one. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2009; 63: 187.
9. Koparir M, Orek C, Koparir P, Sarac K. Synthesis, experimental, theoretical characterization and biological activities of 4-ethyl-5-(2-hydroxyphenyl)-2H-1,2,4-triazole-3(4H)-thione. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 2013; 105: 522-531.

18. Chandra S, Parmar S, Kumar Y. Synthesis, Spectroscopic, and Antimicrobial Studies on Bivalent Zinc and Mercury Complexes of 2-Formylpyridine Thiosemicarbazone. *Bioinorganic Chemistry and Applications*. 2009; 2009: 1-6.
19. Kasuga NC, Onodera K, Nakano S, Hayashi K, Nomiya K. Syntheses, crystal structures and antimicrobial activities of 6-coordinate antimony(III) complexes with tridentate 2-acetylpyridine thiosemicarbazone, bis(thiosemicarbazone) and semicarbazone ligands. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2006; 100: 1176–1186.
20. Kasuga NC, Sekino K, Ishikawa M, Honda A, Yokoyama M, Nakano S, Shimada N, Koumo C, Nomiya K. Synthesis, structural characterization and antimicrobial activities of 12 zinc(II) complexes with four thiosemicarbazone and two semicarbazone ligands. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2003; 96: 298–310.

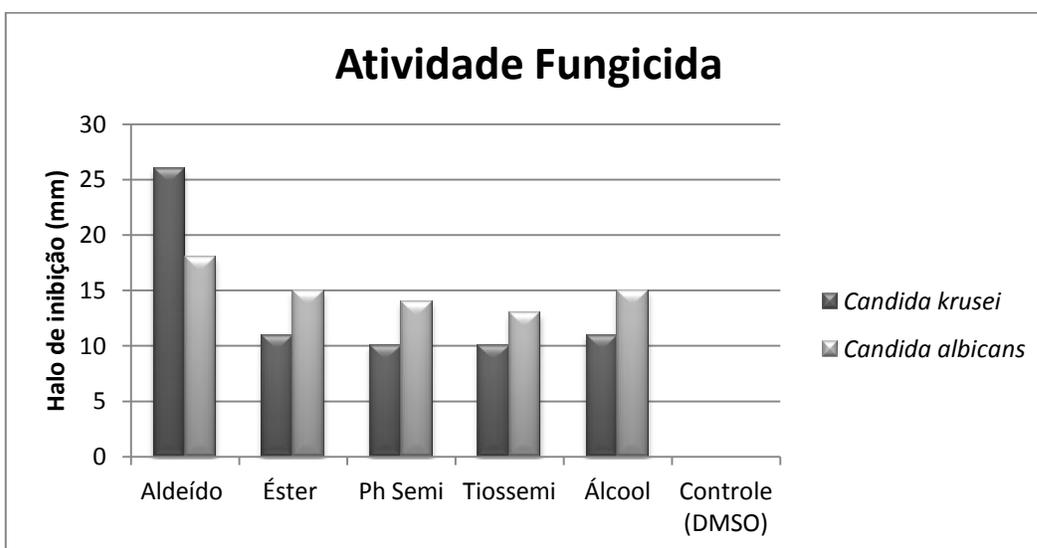
7. ANEXOS



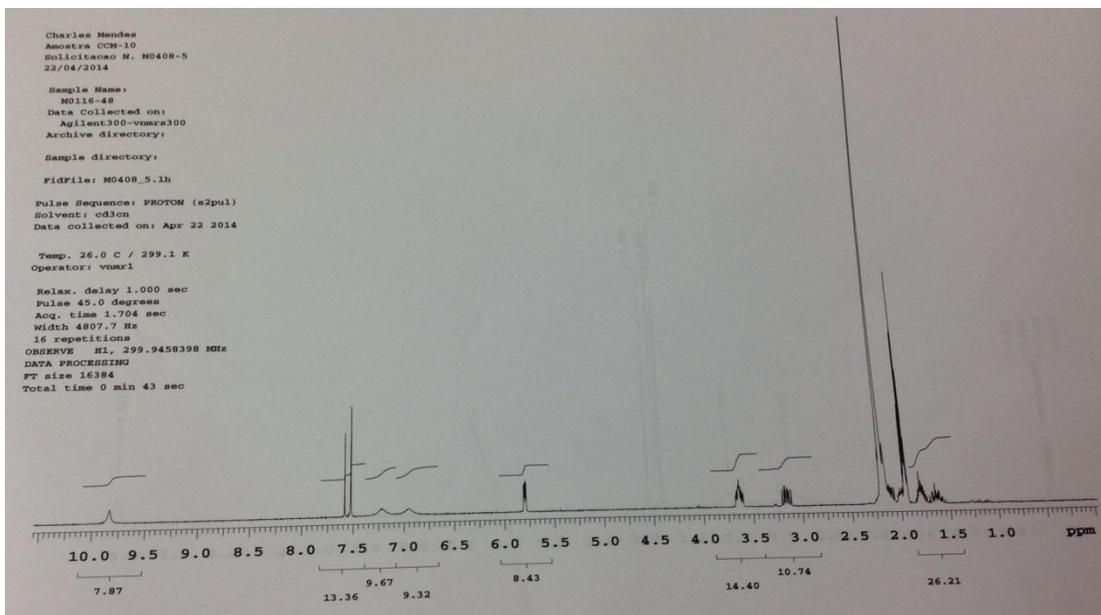
Anexo 1 - Rota sintética de obtenção dos novos compostos oxadiazolil-aryl-semicarbazona, oxadiazolil-tiossemicarbazona e 1,2,4-triazólicos (este último não foi formado pois sofreu degradação).



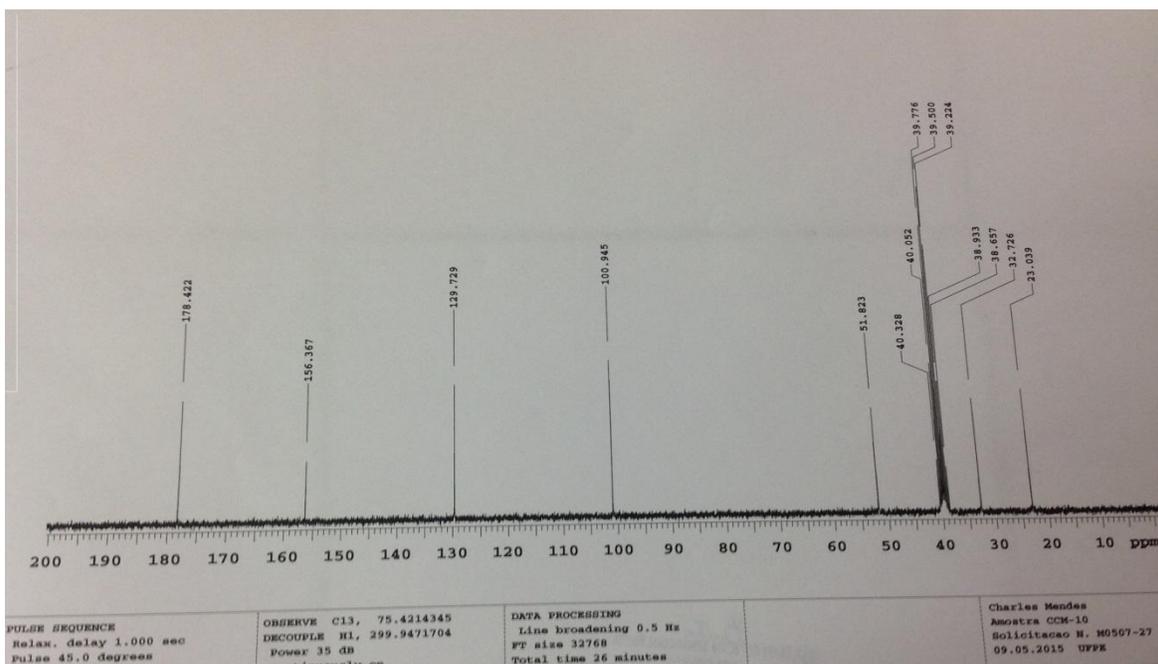
Anexo 2 – Valores dos halos de inibição apresentados pelas seguintes moléculas: aldeído contra *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*, álcool contra *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis* e éster contra *Bacillus subtilis*.



Anexo 3 – Valores dos halos de inibição exibidos pelas moléculas sintetizadas, possuindo um controle negativo (DMSO), contra *Candida krusei* e *Candida albicans*.



Anexo 4 - Espectro de RMN de ^1H – 300 MHz da oxadiazolil-tiossemicarbazona. Solvente $\text{DMSO-}d_6$.



Anexo 5 - Espectro de RMN de ^{13}C – 75 MHz da oxadiazolil-tiossemicarbazona. Solvente $\text{DMSO-}d_6$.