

## SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DA ATIVIDADE INIBITÓRIA DE NOVAS DIALQUILFOSFORILARILDRAZONAS SOBRE O CRESCIMENTO DE TRIPANOSSOMATÍDEOS

Andréa Janaina M. Nogueira, Marco Edilson F. de Lima e João Batista N. DaCosta\*

Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Antiga Rod. Rio/SP, km 47, 23890-000 Seropédica - RJ, Brasil

Eliomara Sousa Sobral Alves, Danielle Oliveira dos Anjos, Marcos André Vannier-Santos e Adriana Lanfredi-Rangel

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, R. Waldemar Falcão, 121, 40296-710 Salvador – BA, Brasil

Recebido em 26/11/10; aceito em 1/4/11; publicado na web em 10/6/11

SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND STUDY OF ACTIVITY INHIBITORY OF NEW DIALKYLPHOSPHORYLHYDRAZONES ON THE GROWTH OF TRYPANOSOMATIDS. A new series of dialkylphosphorylhydrazones was synthesized through the condensation of aromatic aldehydes with different phosphorylhydrazines. All synthesized compounds were characterized by IR, <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR and <sup>31</sup>P-NMR spectroscopies. The *in vitro* investigation of the activity of these compounds against *Leishmania amazonensis* promastigotes and epimastigotes of *T. cruzi*, showed an efficient inhibition of proliferation, at non toxic concentrations to mammalian cells. The results have shown some derivatives as potential antiparasitic agents against trypanosomatids.

Keywords: leishmaniasis; Chagas disease; dialkylphosphorylhydrazones.

### INTRODUÇÃO

As doenças tropicais, como malária, doença de Chagas, doença do sono, leishmaniose visceral, filariose linfática, dengue e esquistossomose, continuam sendo uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo. Essas doenças são consideradas negligenciadas por representarem importantes agravos à saúde e ainda permanecerem não solucionados.<sup>1,2</sup>

A leishmaniose é uma doença causada por mais de 20 espécies do protozoário kinetoplastida *Leishmania* spp., é transmitida por cerca de 30 espécies de vetores flebotomos, atingindo cerca de 12 milhões de pessoas em 88 países.<sup>3</sup>

A tripanossomíase americana ou doença de Chagas é uma infecção causada pelo parasita kinetoplastida *Trypanosoma cruzi* e é transmitida de forma vetorial através de insetos conhecidos como barbeiros, por transfusão de sangue, por transplante de órgãos e através das vias congênita e oral, tendo esta última forma aumentada nos últimos anos. Apresenta cerca de 8 milhões de casos com 14.000 mortes por ano e é endêmica em 21 países da América Latina, inclusive no Brasil.<sup>2,4</sup>

A quimioterapia disponível para a doença de Chagas no Brasil resume-se ao uso do benzonidazol (Figura 1) que apenas é ativo na fase aguda da doença e, para a leishmaniose, os fármacos de primeira escolha são os antimoniais pentavalentes (Glucantime) (Figura 1) e os de segunda escolha são a pentamidina e a Anfotericina B; além desses, é utilizada a paromomicina, porém geralmente apresenta alta toxicidade e já apresenta casos de resistência.<sup>5,6</sup>

Considerando este cenário, a descoberta de novos fármacos, preferencialmente de administração oral, seguros, efetivos e de baixo custo, é um desafio colocado aos pesquisadores envolvidos no desenvolvimento de novos protótipos de fármacos aplicáveis na quimioterapia antiparasitária.<sup>7</sup>

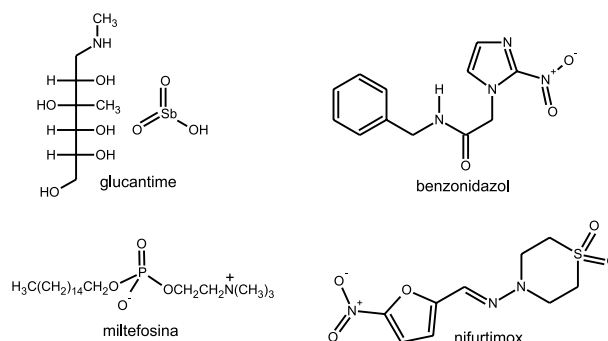


Figura 1. Compostos utilizados na quimioterapia da leishmaniose e da doença de Chagas

Com o objetivo de se encontrar novas alternativas quimioterápicas para o combate dessas doenças e com base na similaridade do *Trypanosoma cruzi* com os patógenos causadores das leishmanioses, já que são tripanossomatídeos, uma nova série de dialquilfosforilidrazonas foi planejada e sintetizada segundo os conceitos de hibridação molecular dos grupos funcionais hidrazônico do nifurtimox, que é um antichagásico não mais utilizado no Brasil<sup>7</sup> e fosfato da miltefosina, uma droga anticâncer alquilfosfolípida, ativa contra *Leishmania*<sup>6</sup> (Figura 1).

### PARTE EXPERIMENTAL

Todos os reagentes usados eram de grau analítico e os solventes utilizados nas reações e nos procedimentos de purificação foram previamente destilados e, quando necessário, tratados e secos de acordo com os métodos usuais descritos na literatura.<sup>8</sup>

Todos os pontos de fusão, não corrigidos, foram determinados em um aparelho Buchi 510.

Os aparelhos utilizados para a caracterização dos compostos foram: espectrômetro de infravermelho Perkin-Elmer modelo 1600

\*e-mail: dacosta@ufrj.br

FT - os espectros foram obtidos utilizando-se um filme sobre células de NaCl, nas amostras líquidas e pastilhas de KBr, nas amostras sólidas. As absorções foram medidas em centímetros recíprocos ( $\text{cm}^{-1}$ ); cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas (CG/EM), em espectrômetro modelo Saturn 2000-Varian equipado com coluna VF-5 ms (30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$ ); espectrômetro de ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  (200 MHz),  $^{13}\text{C}$  (50 MHz) e  $^{31}\text{P}$  (162 MHz) Bruker, modelo AC-200. Os espectros foram obtidos utilizando-se tetrametilsilano (TMS), ou o próprio solvente como referência para os núcleos de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . Para o núcleo de  $^{31}\text{P}$  foi utilizado o ácido fosfórico 85% como referência externa. Os solventes deuterados são especificados em cada caso, sendo os deslocamentos químicos medidos em ppm e as constantes de acoplamento em Hertz (Hz).

Os experimentos foram realizados nas seguintes condições: ionização por impacto de elétrons a 70 eV; hélio como gás de arraste e fluxo de 1 mL/min; injetor no modo *split* (1:80); gradiente crescente de temperatura de 10  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , de 150 a 290  $^{\circ}\text{C}$ . A temperatura do injetor foi de 270  $^{\circ}\text{C}$ ; EM trap 220  $^{\circ}\text{C}$ , manifold 60  $^{\circ}\text{C}$  trline 250  $^{\circ}\text{C}$ .

### Síntese dos fosfonatos de dialquila (1 e 2)

Os fosfonatos de dialquila (1 e 2) foram sintetizados através do tratamento de tricloreto de fósforo com três mols do respectivo álcool.<sup>9-11</sup>

### Síntese das dialquilfosforilidrazinas (3 e 4)

As dialquilfosforilidrazinas foram sintetizadas através da fosforilação da hidrazina em meio aquoso em reação bifásica com fosfonato de dialquila (1 e 2), em quantidades equimolares, em tetracloreto de carbono.<sup>12,13</sup>

### Síntese das dialquilfosforilarilidrazonas (3a-e e 4a-h)

#### Procedimento geral

Em um balão monotubulado de 50 mL adicionam-se quantidades equimolares de dialquilfosforilidrazina solubilizada em 3 mL de EtOH e do aldeído correspondente, previamente dissolvido em 3 mL de EtOH seguidos de aproximadamente duas 2 gotas de HCl 37%. Mantém-se a mistura reacional sob agitação em temperatura ambiente. Terminado o tempo de reação (3 h para as reações em que o aldeído tem substituintes retiradores de elétrons na posição 4 do anel aromático e 24 h quando o substituinte é doador de elétrons), a mistura reacional é vertida em água destilada gelada e deixada em banho de gelo por 30 min. Com exceção dos compostos 4c e 4h, que foram extraídos com cloreto de metileno ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) no funil de separação, os demais produtos foram filtrados e recristalizados em etanol.

#### Síntese da dibutilfosforilfenilidrazona (3a)

Aspecto físico: sólido branco; rend.: 81%; p.f.: 55-58  $^{\circ}\text{C}$ ; IV ( $\text{KBr}/\text{cm}^{-1}$ ): 3398 e 3168 ( $\nu\text{NH}$ ); 2960 e 2873 ( $\nu\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$ ); 1240 ( $\nu\text{P}=\text{O}$ ); 1029 ( $\nu\text{P}-\text{O}-\text{C}$ ); 1064 ( $\nu\text{P}-\text{N}$ ); 1606 ( $\nu\text{C}=\text{N}$ ); 1477 ( $\delta_{\text{as}}\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$ ); 1380 ( $\delta_{\text{sim}}\text{CH}_3$ ); 698 e 763 (aromático). RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{DMSO}-d_6/\text{ppm}$ )  $\delta$ : 0,84 (t, 6H,  $\text{CH}_3$ ), 1,36 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ ), 1,58 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ ); 3,97 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ ), 7,91 (s, 1H,  $-\text{N}=\text{CH}$ ); 7,53-7,91 (m, 5H arom.); 9,60 (d,  $J = 28,12$  Hz, 1H,  $-\text{P}-\text{NH}-$ ). RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3/\text{ppm}$ )  $\delta$ : 13,43; 18,26; 31,80; 65,95; 143,77; 129,15; 128,76; 126,52; 134,78. RMN  $^{31}\text{P}$  ( $\text{CDCl}_3/\text{ppm}$ ): 2,33 dq (acoplado).

#### Síntese da dibutilfosforil-4-nitrofenilidrazona (3b)

Aspecto físico: sólido amarelo; rend.: 80%; p.f.: 225-228  $^{\circ}\text{C}$ ; IV ( $\text{KBr}/\text{cm}^{-1}$ ): 3434 e 3085 ( $\nu\text{NH}$ ); 2958 e 2933 ( $\nu\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$ ); 1240 ( $\nu\text{P}=\text{O}$ ); 1035 ( $\nu\text{P}-\text{O}-\text{C}$ ); 1076 ( $\nu\text{P}-\text{N}$ ); 1596 ( $\nu\text{C}=\text{N}$ ); 1515 e 1346

( $\nu\text{NO}_2$ (arom.)). RMN  $^1\text{H}$  (Piridina- $d_5/\text{ppm}$ )  $\delta$ : 0,83 (t, 6H,  $\text{CH}_3$ ), 1,40 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ ), 1,71 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ ); 4,36 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ ); 7,92 e 8,26 (2d, 4H arom.); 8,37 (s, 1H,  $-\text{N}=\text{CH}$ ); 11,32 (d,  $J = 28,63$  Hz, 1H,  $-\text{P}-\text{NH}-$ ). RMN  $^{13}\text{C}$  (Piridina- $d_5/\text{ppm}$ )  $\delta$ : 13,61; 18,97; 32,61; 67,06; 141,85; 141,79; 148,79; 124,22; 127,26. RMN  $^{31}\text{P}$  (Piridina- $d_5/\text{ppm}$ ): 2,12 dq (acoplado).

#### Síntese da dibutilfosforil-2-nitrofenilidrazona (3c)

Aspecto físico: sólido branco; rend.: 75%; p.f.: 58-61  $^{\circ}\text{C}$ ; RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{DMSO}/\text{ppm}$ )  $\delta$ : 0,84 (t, 6H,  $\text{CH}_3$ ), 1,32 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ ), 1,59 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ ); 3,97 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ ); 7,58-8,01 (m, 4H arom.); 8,29 (s, 1H,  $-\text{N}=\text{CH}$ ); 9,97 (d,  $J = 28,88$  Hz, 1H,  $-\text{P}-\text{NH}-$ ). RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{DMSO}-d_6/\text{ppm}$ )  $\delta$ : 13,37; 18,20; 31,75; 66,07; 138,97; 147,58; 124,51-133,44. RMN  $^{31}\text{P}$  ( $\text{DMSO}-d_6/\text{ppm}$ ): 1,25 dq (acoplado).

#### Síntese da dibutilfosforil-4-cianofenilidrazona (3d)

Aspecto físico: sólido amarelo; rend.: 49%; p.f.: 265-270  $^{\circ}\text{C}$ ; IV ( $\text{KBr}/\text{cm}^{-1}$ ): 3434 e 3085 ( $\nu\text{NH}$ ); 2960 e 2927 ( $\nu\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$ ); 2227 ( $\nu\text{CN}(\text{arom.})$ ); 1241 ( $\nu\text{P}=\text{O}$ ); 1033 ( $\nu\text{P}-\text{O}-\text{C}$ ); 1066 ( $\nu\text{P}-\text{N}$ ); 1594 ( $\nu\text{C}=\text{N}$ ); 835 (aromático). RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{DMSO}-d_6/\text{ppm}$ )  $\delta$ : 0,84 (t, 6H,  $\text{CH}_3$ ), 1,34 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ ), 1,58 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ ); 3,97 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ ), 7,91 (s, 1H,  $-\text{N}=\text{CH}$ ); 9,89 (d,  $J = 28,37$  Hz, 1H,  $-\text{P}-\text{NH}-$ ) 7,62-7,85 (2d, 4H arom.).

#### Síntese da dibutilfosforil-4-carboxifenilidrazona (3e)

Aspecto físico: sólido branco; rend.: 58%; p.f.: 115-118  $^{\circ}\text{C}$ ; IV ( $\text{KBr}/\text{cm}^{-1}$ ): 3436 e 3089 ( $\nu\text{NH}$ ); 2960 e 2930 ( $\nu\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$ ); 1679 ( $\nu\text{C}=\text{O}$ ); 1245 ( $\nu\text{P}=\text{O}$ ); 1033 ( $\nu\text{P}-\text{O}-\text{C}$ ); 1064 ( $\nu\text{P}-\text{N}$ ); 1598 ( $\nu\text{C}=\text{N}$ ); 835 (aromático). RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{DMSO}-d_6/\text{ppm}$ )  $\delta$ : 0,83 (t, 6H,  $\text{CH}_3$ ), 1,34 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ ), 1,58 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ ); 3,98 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ ); 7,65-7,94 (2d, 4H arom.); 7,96 (s, 1H,  $-\text{N}=\text{CH}$ ); 9,81 (d,  $J = 28,63$  Hz, 1H,  $-\text{P}-\text{NH}-$ ); 12,94 (s, 1H, OH). RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{DMSO}-d_6/\text{ppm}$ )  $\delta$ : 13,79; 18,63; 32,20; 66,42; 142,66; 139,23; 126,49; 131,26; 130,14; 166,97. RMN  $^{31}\text{P}$  ( $\text{DMSO}-d_6/\text{ppm}$ ): 1,85 dq (acoplado).

#### Síntese da di-isobutilfosforilfenilidrazona (4a)

Aspecto físico: sólido branco; rend.: 82%; p.f.: 101-105  $^{\circ}\text{C}$ ; IV ( $\text{KBr}/\text{cm}^{-1}$ ): 3409 e 3178 ( $\nu\text{NH}$ ); 2960 ( $\nu\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$ ); 1236 ( $\nu\text{P}=\text{O}$ ); 1018 ( $\nu\text{P}-\text{O}-\text{C}$ ); 1060 ( $\nu\text{P}-\text{N}$ ); 1606 ( $\nu\text{C}=\text{N}$ ); 1471 ( $\delta_{\text{as}}\text{CH}$ ); 1396 e 1369 ( $\delta_{\text{sim}}\text{CH}$ ); 700 e 765 (aromático). RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{DMSO}-d_6/\text{ppm}$ )  $\delta$ : 0,87 (d, 12H,  $\text{CH}_3$ ), 1,89 (m, 2H, CH), 3,75 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ ); 7,53-8,36 (d, 4H, arom.); 7,91 (s, 1H,  $-\text{N}=\text{CH}$ ); 9,56 (d,  $J = 28,38$  Hz, 1H,  $-\text{P}-\text{NH}-$ ). RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{DMSO}-d_6/\text{ppm}$ )  $\delta$ : 18,96; 28,96; 72,50; 143,73; 129,48; 128,91 a 134,76 (C arom.). RMN  $^{31}\text{P}$  ( $\text{DMSO}-d_6/\text{ppm}$ ): 1,93 dq (acoplado).

#### Síntese da di-isobutilfosforil-4-nitrofenilidrazona (4b)

Aspecto físico: sólido amarelo; rend.: 85%; p.f.: 132-135  $^{\circ}\text{C}$ ; IV ( $\text{KBr}/\text{cm}^{-1}$ ): 3446 e 3091 ( $\nu\text{NH}$ ); 2932 e 2834 ( $\nu\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$ ); 1243 ( $\nu\text{P}=\text{O}$ ); 1033 ( $\nu\text{P}-\text{O}-\text{C}$ ); 1090 ( $\nu\text{P}-\text{N}$ ); 1580 ( $\nu\text{C}=\text{N}$ ); 1480 ( $\delta_{\text{as}}\text{CH}$ ); 1516 e 1343 ( $\nu\text{NO}_2$ (arom.)); 863 (aromático). RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{DMSO}-d_6/\text{ppm}$ )  $\delta$ : 0,94 (d, 12H,  $\text{CH}_3$ ), 2,00 (m, 2H, CH), 3,88 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ ); 7,72-8,20 (2d, 4H arom.); 7,92 (s, 1H,  $-\text{N}=\text{CH}$ ); 9,35 (d,  $J = 29,75$  Hz, 1H,  $-\text{P}-\text{NH}-$ ). RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3/\text{ppm}$ )  $\delta$ : 18,68; 29,03; 73,53; 142,04; 147,81; 123,97; 126,94; 140,85. RMN  $^{31}\text{P}$  ( $\text{CDCl}_3/\text{ppm}$ ): 1,55 dq (acoplado).

#### Síntese da di-isobutilfosforil-4-metoxifenilidrazona (4c)

Aspecto físico: óleo amarelo; rend.: 48%; IV ( $\text{KBr}/\text{cm}^{-1}$ ): 3410 e 3150 ( $\nu\text{NH}$ ); 2961 e 2840 ( $\nu\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_3$ ); 1270 ( $\nu\text{P}=\text{O}$ ); 1172 ( $\nu\text{P}-\text{N}$ ); 1024 ( $\nu\text{P}-\text{O}-\text{C}$ ); 1607 ( $\nu\text{C}=\text{N}$ ); 1467 ( $\delta_{\text{as}}\text{CH}$ ); 1395 e 1370 ( $\delta_{\text{sim}}\text{CH}$ ); 866 (aromático); RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3/\text{ppm}$ )  $\delta$ : 0,95 (d, 12H,  $\text{CH}_3$ ); 2,00 (m, 2H, CH); 3,81 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ); 3,88 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ ); 7,83 (s, 1H,  $-\text{N}=\text{CH}$ ); 8,64 (d, 1H,  $J = 28,44$  Hz, NH); 6,88 e 7,54 (2d, 4H, arom.);

RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3/\text{ppm}$ )  $\delta$ : 18,56; 28,85; 55,10; 73,03; 144,27; 129,95; 113,82; 127,83; 160,30.

#### Síntese da di-isobutilfosforil-4-carboxifenilidrazona (4d)

Aspecto físico: sólido branco; rend.: 78%; p.f.: 179-181 °C; IV ( $\text{KBr}/\text{cm}^{-1}$ ): 3788 e 3663 ( $\nu\text{OH}$ ); 3432 e 3123 ( $\nu\text{NH}$ ); 2961 ( $\nu\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_3$ ); 1243 ( $\nu\text{P=O}$ ); 1089 ( $\nu\text{P-N}$ ); 1029 ( $\nu\text{P-O-C}$ ); 1600 ( $\nu\text{C=N}$ ); 1691 ( $\nu\text{C=O}$ ); 1471 ( $\delta\text{as.CH}$ ); 1422 e 1313 ( $\delta\text{sim.CH}$ ); 858 (aromático). RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3/\text{ppm}$ )  $\delta$ : 0,98 (d, 12H,  $\text{CH}_3$ ), 2,03 (m, 2H, CH), 3,92 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ ), 7,94 (s, 1H,  $-\text{N=CH}$ ); 8,97 (d,  $J = 28,75$  Hz, 1H,  $-\text{P-NH-}$ ), 7,71-8,12 (d, 4H, arom.); 9,53 (s, 1H, OH). RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3/\text{ppm}$ )  $\delta$ : 18,70; 29,02; 73,66; 126,49; 130,43; 139,14; 144,66; 170,27. RMN  $^{31}\text{P}$  ( $\text{CDCl}_3/\text{ppm}$ ): 1,88 dq (acoplado).

#### Síntese da di-isobutilfosforil-4-clorofenilidrazona (4e)

Aspecto físico: sólido branco; end.: 85%; p.f.: 83-86 °C; IV ( $\text{KBr}/\text{cm}^{-1}$ ): 3376 e 3160 ( $\nu\text{NH}$ ); 2961 ( $\nu\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_3$ ); 1234 ( $\nu\text{P=O}$ ); 1087 ( $\nu\text{P-N}$ ); 1029 ( $\nu\text{P-O-C}$ ); 1604 ( $\nu\text{C=N}$ ); 1484 ( $\delta\text{as.CH}$ ); 1471 ( $\delta\text{sim.CH}$ ); 692 ( $\nu\text{C-Cl}_{\text{arom.}}$ ); 854 (aromático). RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3/\text{ppm}$ )  $\delta$ : 0,94 (d, 12H,  $\text{CH}_3$ ), 2,00 (m, 2H, CH), 3,88 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ ), 7,82 (s, 1H,  $-\text{N=CH}$ ); 8,69 (d,  $J = 27,24$  Hz, 1H,  $-\text{P-NH-}$ ), 7,32-7,53 (d, 4H arom.). RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{DMSO-}d_6/\text{ppm}$ )  $\delta$ : 18,73; 29,02; 73,34; 143,52; 133,23; 127,72; 128,80; 134,92. RMN  $^{31}\text{P}$  ( $\text{CDCl}_3/\text{ppm}$ ): 1,97 dq (acoplado).

#### Síntese da di-isobutilfosforil-4-N,N-dimetilaminofenilidrazona (4f)

Aspecto físico: sólido vermelho; rend.: 80%; p.f.: 58-61 °C; IV ( $\text{KBr}/\text{cm}^{-1}$ ): 3394 e 3167 ( $\nu\text{NH}$ ); 2959 e 2893 ( $\nu\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_3$ ); 1236 ( $\nu\text{P=O}$ ); 1172 ( $\nu\text{P-N}$ ); 1025 ( $\nu\text{P-O-C}$ ); 1610 ( $\nu\text{C=N}$ ); 1473 ( $\delta\text{as.CH}$ ); 1361 e 1184 ( $\nu\text{C-N}(\text{CH}_3)_{2\text{arom.}}$ ); 871 (aromático). RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{DMSO-}d_6/\text{ppm}$ )  $\delta$ : 0,87 (d, 12H,  $\text{CH}_3$ ), 1,87 (m, 2H, CH), 3,75 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ ), 7,78 (s, 1H,  $-\text{N=CH}$ ); 9,17 (d,  $J = 27,49$  Hz, 1H,  $-\text{P-NH-}$ ), 6,68-7,35 (d, 4H arom.). RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3/\text{ppm}$ )  $\delta$ : 18,47; 28,62; 39,84; 71,94; 144,38; 111,04; 127,21; 111,93; 122,59. RMN  $^{31}\text{P}$  ( $\text{CDCl}_3/\text{ppm}$ ): 2,61 dt (acoplado).

#### Síntese da di-isobutilfosforil-4-cianofenilidrazona (4g)

Aspecto físico: sólido amarelo; rend.: 87%; p.f.: 81-85 °C; IV ( $\text{KBr}/\text{cm}^{-1}$ ): 3359 e 3156 ( $\nu\text{NH}$ ); 2958 ( $\nu\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_3$ ); 2227 ( $\nu\text{CN}_{\text{arom.}}$ ); 1243 ( $\nu\text{P=O}$ ); 1091 ( $\nu\text{P-N}$ ); 1025 ( $\nu\text{P-O-C}$ ); 1596 ( $\nu\text{C=N}$ ); 1471 ( $\delta\text{as.CH}$ ); 854 (aromático). RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3/\text{ppm}$ )  $\delta$ : 0,94 (d, 12H,  $\text{CH}_3$ ), 2,00 (m, 2H, CH), 3,87 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ ), 7,87 (s, 1H,  $-\text{N=CH}$ ); 9,14 (d,  $J = 29,76$  Hz, 1H,  $-\text{P-NH-}$ ), 7,62-7,69 (d, 4H arom.). RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3/\text{ppm}$ )  $\delta$ : 18,70; 29,52; 73,74; 143,52; 139,01; 126,83; 132,39; 112,20; 118,72. RMN  $^{31}\text{P}$  ( $\text{CDCl}_3/\text{ppm}$ ): 1,17 dt (acoplado).

#### Síntese da di-isobutilfosforil-3,4-dioximetilfenilidrazona (4h)

Aspecto físico: sólido pastoso branco; rend.: 75%; IV ( $\text{KBr}/\text{cm}^{-1}$ ): 3359 e 3156 ( $\nu\text{NH}$ ); 2958 ( $\nu\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_3$ ); 1243 ( $\nu\text{P=O}$ ); 1129 ( $\nu\text{P-N}$ ); 1017 ( $\nu\text{P-O-C}$ ); 1608 ( $\nu\text{C=N}$ ); 1477 ( $\delta\text{as.CH}$ ); 1450 e 1396 ( $\delta\text{sim.CH}$ ); 872 (aromático). RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3/\text{ppm}$ )  $\delta$ : 0,94 (d, 12H,  $\text{CH}_3$ ); 2,00 (m, 2H, CH); 3,90 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ ); 6,03 (d, 2H,  $-\text{OCH}_2\text{O-}$ ); 7,77 (s, 1H,  $=\text{CH}$ ); 8,41 (d, 1H, NH,  $J = 26,33$  Hz); 6,78, 6,93 e 7,23 (2d e s 3H arom.). RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3/\text{ppm}$ )  $\delta$ : 18,71; 28,53; 73,21; 144,29; 18,31; 129,19; 105,20; 108,02; 122,40; 148,08; 148,66; 101,20.

## Ensaio biológicos

### Parasitas

Promastigotas da cepa Josefa (MHOM/Br/75/Josefa) de *Leishmania (L.) amazonensis* foram mantidos em meio Warren e as formas epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi* foram cultivadas em meio LIT - Liver Infusion Tryptose, ambos os meios suplementados com 10% de soro fetal bovino e mantidos a 26 °C.

### Medidas de proliferação celular

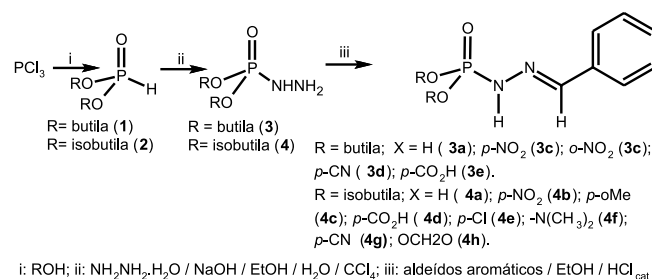
Foram utilizados inóculos de  $5 \times 10^5$  parasitos/mL. Os parasitos na fase estacionária de crescimento axênico foram centrifugados e lavados duas vezes em solução salina tamponada com fosfato (PBS) estéril. Após a última lavagem, o sobrenadante foi desprezado, as células foram ressuspensas em 1 mL de solução de formaldeído 5% e contadas em câmara de Neubauer. Os parasitos foram incubados, a 27 °C, na presença de soluções de 50  $\mu\text{M}$  em DMSO das substâncias sintetizadas, na ausência das substâncias e em DMSO (0,05%) para controle e o crescimento verificado após 72 h (*Leishmania*) e 120 h (*T. cruzi*). Os dados apresentados são representativos de ao menos 3 experimentos independentes realizados em triplicata.

### Citotoxicidade em linfócitos

O efeito citotóxico dos compostos foi determinado através da redução do MTT [brometo de (3-(4, 5-Dimetiltiazol-2-il) - 2,5 difenil tetrazolol], que fornece informações sobre a integridade mitocondrial em que há redução enzimática da formazana pela ação das desidrogenases mitocondriais. Inóculos de  $1 \times 10^6$  esplenócitos de camundongos Balb/C foram incubados em meio RPMI completo, suplementado com 10% de soro fetal bovino na presença das substâncias na concentração de 50  $\mu\text{M}$ . Após 24 h, adicionaram-se 20  $\mu\text{L}$  de MTT e as amostras foram incubadas por 3 h, a 36 °C, a 5% de  $\text{CO}_2$ . Após esse intervalo, adicionou-se DMSO (dimetilsulfóxido) e a absorbância foi determinada em 540 nm em leitor de ELISA (Molecular Devices), Sunnyvale, California (EUA).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As dialquilfosforilidrazonas foram obtidas em três etapas. Na primeira etapa da síntese o  $\text{PCl}_3$  reage, via  $\text{S}_{\text{N}}2$ ,<sup>14,15</sup> com 3 mols do álcool correspondente para formar o fosfonato de dialquila (Esquema 1). Os fosfonatos de dialquila foram utilizados sem a necessidade de destilação.



### Esquema 1. Rota sintética de obtenção das dialquilfosforilidrazonas

Esses fosfonatos foram caracterizados por espectroscopia de infravermelho, no qual apresentaram bandas de absorções nas faixas de 2426 e 2434  $\text{cm}^{-1}$ , 1216 e 1255  $\text{cm}^{-1}$  e 1006 e 983  $\text{cm}^{-1}$ , que são, respectivamente, vibrações de deformações axiais das ligações P-H, P=O e P-O.<sup>14</sup>

Nos espectros de RMN  $^1\text{H}$  dos fosfonatos de dialquila foram observados sinais em duas regiões características, uma em torno de 4,0 ppm, que corresponde aos hidrogênios do carbono ligado aos oxigênios do grupo fosforila e a outra, um duplete referente ao H ligado diretamente ao átomo de fósforo centrado em, aproximadamente, 6,70 ppm com uma constante de acoplamento P-H elevada, em torno de 690 Hz.

Na etapa seguinte os fosfonatos de dialquila reagem, em um sistema bifásico, segundo a reação de Todd-Atherton modificada,<sup>12,15-18</sup> com hidra-

zina mono-hidratada formando as dialquilfosforilidrazinas (Esquema 1).

O sinal característico das dialquilfosforilidrazinas, observado na espectrometria de RMN de  $^1\text{H}$ , é um simpleto largo em aproximadamente 3,6 ppm, correspondente aos hidrogênios ligados aos átomos de nitrogênio.

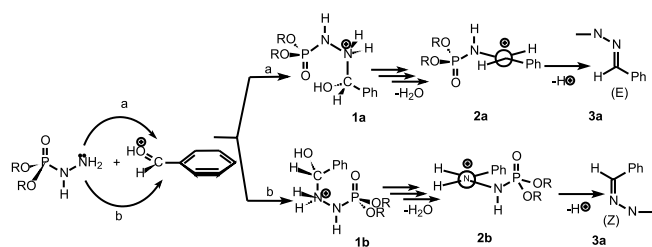
A partir das dialquilfosforilidrazinas sintetizadas os derivados fosforilidrazônicos foram obtidos explorando a clássica condensação catalisada por ácido com os respectivos aldeídos benzoicos *orto* ou *para*-substituídos, à temperatura ambiente<sup>19,20</sup> (Esquema 1).

A natureza dos substituintes (R e X) foi eleita em função de suas propriedades eletrônicas e hidrofóbicas, de maneira a permitir que se avaliassem suas distintas contribuições para o perfil de atividade desejado.

Embora em derivados hidrazônicos de aldeídos ou cetonas, pode-se obter dois diastereoisômeros configuracionais, *Z* e *E*. A análise dos espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  destes compostos permitiu evidenciar apenas um dos dois possíveis diastereoisômeros. O experimento de RMN de  $^1\text{H}$  NOESY evidenciou, quando comparado com trabalhos anteriores, ser o diastereoisômero *E*, por ser a configuração termodinamicamente mais estável.<sup>13,19</sup>

Para a cadeia lateral foram escolhidos o butanol e o isobutanol a fim de propiciar maior lipofilicidade aos novos compostos, quando comparados aos compostos sintetizados por nosso grupo em trabalho anterior.<sup>13</sup>

Podemos observar no Esquema 2, onde está demonstrado simplificada o mecanismo de obtenção das dialquilfosforilidrazonas, que há possibilidade de ataque do par de elétrons do nitrogênio pelas duas faces da carbonila levando, a princípio, a um par de enantiômeros que, por sua vez, em cada estereoisômero, elimina água para gerar a hidrazona correspondente. Assim, existem duas possibilidades de eliminação, em um a fenila se encontra entre um hidrogênio e o par de elétrons livres do nitrogênio (1a) e em outro a fenila está entre a fosforila, que é um grupo volumoso tetraédrico, e o par de elétrons livres (1b), resultando em um acentuado impedimento estérico. Assim, o ataque pelo caminho a é preferencial e apenas o diastereoisômero *E* é formado.



**Esquema 2.** Proposta mecanística simplificada de obtenção das dialquilfosforilidrazonas

Os espectros de infravermelho das dialquilfosforilidrazonas apresentam bandas de absorções bem definidas, sendo as principais correspondentes às frequências de estiramento das ligações P=O, P-O-C e C=N. Nos compostos de fósforo pentavalente, onde o átomo de fósforo está ligado a um átomo de nitrogênio e a dos grupamentos alcóxidos, a faixa de frequência de estiramento da ligação P=O é, geralmente, de 1198 a 1274  $\text{cm}^{-1}$ .<sup>15</sup> Já a ligação P-O-C, como citado, absorve na faixa de 950 a 1018  $\text{cm}^{-1}$ , enquanto que a ligação C=N possui frequência de estiramento na faixa de 1580 a 1690  $\text{cm}^{-1}$ .<sup>21</sup>

Na análise por espectrometria de RMN  $^1\text{H}$ , esses compostos apresentam como característica principal um duplete com deslocamento químico centrado em 8,41 a 11,32 ppm, referente ao hidrogênio ligado ao nitrogênio, com constante de acoplamento (*J*) com o fósforo variando de 26,33 a 29,76 Hz e um simpleto com deslocamento químico ( $\delta$ ) em

7,77 a 8,37, referente ao hidrogênio imídico. Na análise por espectrometria de RMN  $^{13}\text{C}$ , são característicos desses compostos um duplete com deslocamento químico em aproximadamente 143 ppm, relativo ao carbono imídico, com constante de acoplamento de 19 a 20 Hz.

### Atividade anti-*Leishmania* (*L.*) *amazonensis* e anti-*T. cruzi*

As dialquilfosforilidrazonas foram avaliadas *in vitro* sobre promastigotas de *Leishmania* (*L.*) *amazonensis* e epimastigotas de *T. cruzi* por contagem direta em câmara de Neubauer, na concentração de 50  $\mu\text{M}$  em DMSO, que foi utilizado no controle e também contra a célula do hospedeiro (linfócitos de murine). Os resultados dos experimentos estão na Tabela 1.

**Tabela 1.** Percentual de inibição da proliferação de *Leishmania* (*L.*) *amazonensis* (promastigota) e de *T. cruzi* (epimastigota)

Compostos	<i>T. cruzi</i>	<i>L. (L.) amazonensis</i>
<b>3a</b>	56,4	86,7
<b>3b</b>	62,7	95,2
<b>3c</b>	74,5	91,6
<b>3d</b>	40,7	91,6
<b>3e</b>	42	N.T.
<b>4a</b>	N.T.	24,0
<b>4b</b>	69	99,4
<b>4d</b>	83,5	N.T.
<b>4e</b>	63,7	95,2
<b>4f</b>	73,3	86,7
<b>4g</b>	8,3	86,7

Pelos dados mostrados na Tabela 1 observa-se, em linhas gerais, um maior percentual de inibição dos compostos testados contra a *Leishmania amazonensis*, exceto no caso de 3e e 4d, que foram mais ativos contra epimastigotas do *T. cruzi*. Não houve correlação entre as atividades tóxicas frente aos dois protozoários.

Apesar dos dados obtidos não nos permitirem traçar uma relação entre o efeito eletrônico dos substituintes e as atividades tóxicas observadas, nota-se que a presença do grupamento  $\text{NO}_2$  (3b, 3c e 4b) gera compostos com acentuada toxicidade, provavelmente devido à geração de espécies radiculares citotóxicas.<sup>22</sup>

Cabe ressaltar que todos os derivados quando avaliados frente a linfócitos do hospedeiro não apresentaram efeitos tóxicos na dose testada (50  $\mu\text{M}$ ).

### CONCLUSÕES

As treze dialquilfosforilidrazonas são inéditas e foram obtidas com bons rendimentos. Por se tratar de reações relativamente simples e seu método de obtenção ser extremamente eficaz, isto é um passo inicial importante para a síntese de novos derivados com outros diferentes substituintes a fim de se estabelecer uma relação estrutura atividade.

O estudo preliminar *in vitro* desses compostos sobre promastigotas de *Leishmania amazonensis* e epimastigotas de *T. cruzi* evidenciou uma eficiente atividade inibitória de sua proliferação, em concentrações não tóxicas para células de mamíferos. Os resultados obtidos apontam alguns derivados como potenciais agentes antiparasitários contra tripanossomatídeos, em especial, *Leishmania amazonensis*. Estão sendo realizados processamentos ultraestruturais para elucidar os sítios-alvo destes compostos nos parasitos.

**AGRADECIMENTOS**

À CAPES, ao CNPQ e à FAPERJ pelo apoio financeiro.

**REFERÊNCIAS**

1. Chirac, P.; Torrelee, E.; *Lancet* **2006**, 367, 1560.
2. <http://www.dndi.org.br/pt/doencas-negligenciadas/>, acessada em Novembro 2010.
3. Organização Mundial de Saúde; <http://www.who.int/leishmaniasis/>, acessada em Novembro 2010.
4. Agência Nacional de Vigilância Sanitária; *Informe Técnico* N° 35 de 19/6/2008, disponível em [www.saude.pr.gov.br/.../vigilancia%20sanitaria/Legislacao\\_junho\\_2008.doc](http://www.saude.pr.gov.br/.../vigilancia%20sanitaria/Legislacao_junho_2008.doc)[http://www.anvisa.gov.br/alimentos/informes/35\\_190608.pdf](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/informes/35_190608.pdf), acessada em Setembro 2010.
5. Soares-Bezerra, R. J.; Leon, L.; Genestra, M.; *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* **2004**, 2, 40.
6. Rath, S.; Trivelim, L. A.; Imbrunito, T. R.; Tomazela D. M.; de Jesús, M. N.; Marzal, P. C.; Andrade Jr., H. F. M.; Tempone, A. G.; *Quim. Nova* **2003**, 26, 550.
7. Cerecetto, H.; Gonzalez, M.; *Pharmaceuticals* **2010**, 3, 810.
8. Vogel, A. I.; *Análise Orgânica Qualitativa*, Ao Livro Técnico S.A.: Rio de Janeiro, 1981.
9. McCombie, H.; Saunders, B. C.; Stacey, G. J.; *J. Chem. Soc.* **1945**, 380.
10. Rodrigues, J. M.; DaCosta, J. B. N.; *Phosphorus, Sulfur, Silicon Relat. Elem.* **2002**, 177, 137.
11. dos Santos, V. M. R.; Donnici, C. L.; Caixeiro, J. M. R.; DaCosta, J. B. N.; *Quim. Nova* **2007**, 30, 159.
12. Zhao, Y. F.; Xue, C. B.; Zeng, J. N.; Ji, G. J.; *Synthesis-Stuttgart* **1988**, 6, 444.
13. Rodrigues, J. M.; Sant'Anna, C. M. R.; Rumjanek, V. M.; DaCosta, J. B. N.; *Phosphorus, Sulfur, Silicon Relat. Elem.* **2010**, 185, 1.
14. Thomas, L. C.; *Interpretation of the Infrared Spectra of Organophosphorus Compounds*, Heyden & Son, Ltd.: London, 1974.
15. Todd, A. R.; Atherton, F. R.; Openshaw, H. T.; *J. Chem. Soc.* **1945**, 660.
16. Todd, A. R.; Atherton, F. R.; *J. Chem. Soc.* **1947**, 674.
17. Todd, A. R.; Atherton, F. R.; Howard, H. T.; *J. Chem. Soc.* **1948**, 1106.
18. Zhao, Y. F.; Xi, S. K.; Song, A. T.; Ji, G. J.; *J. Org. Chem.* **1984**, 49, 4549.
19. Costa, P.; Pilli, R.; Pinheiro, S.; Vasconcelos, M.; *Substâncias Carboniladas e Derivados*, Artmed Ed. S. A./Subdivisão Bookman Companhia Ed.: Porto Alegre, Série Química Orgânica, 2003.
20. Barreiro, E. J.; Fraga, C. A. M.; Miranda, A. L. P.; Rodrigues, C. R.; *Quim. Nova* **2002**, 25, 129.
21. Pretsch, E.; Clerc, T.; Seibl, J.; Simon, W.; *Tablas para la Elucidacion Estructural de Compuestos Organicos por Metodos Espectroscopicos*, 1ª ed., Alhambra S. A.: Madri, 1980.
22. Paula, F. R.; Serrano, S. H. P.; Tavares, L. C.; *Quim. Nova* **2009**, 32, 1013.