

SEMICARBAZONAS: SEQUÊNCIA DIDÁTICA INTERDISCIPLINAR EM AULAS EXPERIMENTAIS DE QUÍMICA ORGÂNICA E QUÍMICA MEDICINALVanessa da Silva Oliveira^a, Ingredy Aianne Gomes Sá^b, Georgtown Almir Oliveira da Silva^b, Victória Laysna dos Anjos Santos^a, Cleônia Roberta Melo Araújo^{a,c,*} e Arlan de Assis Gonsalves^{a,b,c}^aColegiado de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Vale do São Francisco, 56304-917 Petrolina – PE, Brasil^bColegiado de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais, Universidade Federal do Vale do São Francisco, 56304-917 Juazeiro – BA, Brasil^cColegiado de Pós-Graduação em Ciências da Saúde e Biológicas, Universidade Federal do Vale do São Francisco, 56304-917 Petrolina-PE, Brasil

Recebido em 01/07/2022; aceito em 03/10/2022; publicado na web em 04/11/2022

SEMICARBAZONES: INTERDISCIPLINARY APPROACH IN EXPERIMENTAL CLASSES OF ORGANIC CHEMISTRY AND MEDICINAL CHEMISTRY. Considering the chemical and pharmacological properties of semicarbazones, an interdisciplinary didactic sequence was developed to be applied in experimental classes of undergraduate courses in Pharmacy, Chemistry and related areas. This didactic sequence was planned in three steps, starting from the planning of the target molecule, a semicarbazone derived from helional, to its synthesis, physicochemical characterization (CCD, melting point, FTIR and UV-Vis) and *in silico* tests of its pharmacokinetic properties using the free software ADMETlab 2.0. The proposed target molecule has as molecular scaffold the 1,3-benzodioxole nucleus and the semicarbazone function, aiming to obtain a molecule with promising anticonvulsant action and that can be obtained by a low cost and easy to execute methodology, which makes it attractive for use in experimental classes. Thus, the application of this didactic sequence aims to provide undergraduate students the opportunity to experience the process of drug development, applying techniques for planning, synthesis, characterization, and pharmacokinetic evaluation *in silico*. Besides reinforcing the interdisciplinary teaching of Medicinal Chemistry, applying in an integrated way the theoretical and practical knowledge of the disciplines of Organic Chemistry, Physical Chemistry, Pharmacology and Computational Chemistry.

Keywords: 1,3-benzodioxole; stiripentol; privileged structure; molecular scaffold.

INTRODUÇÃO

A Química Orgânica, ou mais especificamente a Química Orgânica Sintética, é um ponto chave essencial no planejamento e desenvolvimento de novos fármacos, uma vez que é através dela que se materializará, em diversos aspectos, a Química Medicinal (QM). Por sua vez, a QM é uma disciplina ministrada como um componente curricular obrigatório ou optativo em alguns cursos de graduação (Farmácia, Química, Engenharia Química e Biotecnologia). A QM pode ser considerada uma disciplina de caráter multi, trans e interdisciplinar, já que envolve e exige do estudante conhecimentos integrados de Biologia Molecular, Bioquímica, Físico-Química, Química Orgânica e Farmacologia.¹ Apesar de ser normalmente ministrada apenas no âmbito teórico, aulas práticas ou cursos teórico-práticos dessa disciplina são estimulados para despertar o interesse do graduando nessa importante área científica, assim como, para formar profissionais mais capacitados para trabalhar no ramo do desenvolvimento de novos fármacos no aspecto prático-laboratorial.

As semicarbazonas (Figura 1) são compostos orgânicos usados em análises orgânicas clássicas de compostos carbonílicos,² mas que possuem outras propriedades químicas atraentes, como a capacidade de coordenação de metais,³ e propriedades farmacológicas interessantes do ponto de vista da Química Medicinal.⁴

O stiripentol **1** é um fármaco com ação anticonvulsivante usado no tratamento de síndrome de Dravet, um tipo de epilepsia infantil. Esse ativo ainda não é comercializado no Brasil, mas se

encontra disponível na Europa desde 2007, com nome comercial Diacomit[®]. No quesito farmacológico, esse antiepiléptico atua como um modulador alostérico de receptor GABA_A.⁵ Do ponto de vista da QM, o stiripentol **1** traz em sua estrutura química um atraente bióforo natural inspirado no safrol, o substituinte 1,3-benzodioxol, que exibe capacidade em interagir com sítios de receptores biológicos tanto como acceptor de ligações de hidrogênio quanto por interações hidrofóbicas, sendo considerado uma estrutura privilegiada.⁶ Em 2012, o stiripentol **1** foi empregado como inspiração por Aboul-Enein e colaboradores⁷ para a preparação de vários compostos com potencial anticonvulsivante e, entre eles, a 2-[(1*E*)-1-(1,3-benzodioxol-5-il)-4,4-dimetilpent-1-en-3-ilidene] hidrazinacarboxamida, aqui denominada de semicarbazona do stiripentol **2**. Em adição, essa semicarbazona apresentou atividade anticonvulsivante, *in vitro*, cerca de 1,4 vezes superior à do fármaco antiepiléptico **1**.

Considerando a importância química e farmacológica da função semicarbazona, bem como a necessidade de literaturas científicas mais atuais que enfatizem a relevância desse grupo funcional orgânico, o presente artigo propõe três aulas experimentais visando oferecer uma estratégia de aprendizagem contextualizada e interdisciplinar que integre de forma prática os saberes da Química Orgânica e da QM. Nesse sentido, é proposta uma sequência didática composta por síntese, caracterização química e físico-química, bem como o estudo farmacocinético *in silico* de um composto contendo o grupo 1,3-benzodioxol e a função semicarbazona conectados por um espaçador, com potencial anticonvulsivante, conforme estrutura geral mostrada na Figura 1.

*e-mail: cleonia.araujo@univasf.edu.br

Para viabilizar a atividade didática foi necessário determinar uma rota de síntese viável para ser desenvolvida em aulas práticas de cursos de graduação ou pós-graduação no ensino superior. Então, buscou-se por moléculas de baixo custo contendo o anel 1,3-benzodioxol e, frente a alguns compostos encontrados, o helional **3** surgiu como alternativa, visto que se trata de um aldeído de venda livre utilizado na perfumaria nacional. Sendo o helional **3** o composto de partida, a molécula alvo passou a ser a 2-metil-3-(1,3-benzodioxol) semicarbazona **4**, aqui denominada como semicarbazona do helional **4** ou simplesmente molécula alvo, Figura 1.

Assim, é proposto um material científico para fins pedagógicos, de forma contextualizada e simplificada, que visa o desenvolvimento de compostos bioativos a partir da temática semicarbazonas. Ele propõe fornecer um suporte de ensino-aprendizagem de baixo custo e fácil execução em laboratórios de Química de instituições de ensino superior, de forma a colaborar com o desenvolvimento do saber científico dos discentes, e auxiliar na compreensão sobre planejamento racional de novas moléculas bioativas. A sequência didática apresentada exibe um caráter interdisciplinar, indo desde a teoria de preparação de semicarbazonas e bioatividade dessa classe de compostos, ao enfoque prático da síntese orgânica, da caracterização físico-química e da abordagem de ensaios computacionais (*in silico*) para obter e discutir parâmetros moleculares, farmacocinéticos e de toxicidade.

ASPECTOS TEÓRICOS

Propriedades químicas das semicarbazonas

As semicarbazonas representam uma classe de compostos derivados de iminas (bases de Schiff), em razão da presença da ligação azometina ($R^1R^2C=N-R^3$) em suas estruturas, e podendo ser obtidas por reação de condensação entre uma semicarbazida e um aldeído ou uma cetona, com catálise mediada por ácidos (Figura 2).⁸ A semicarbazida atua como uma base devido à presença da amina primária ($-NH_2$), enquanto que o produto reacional, a semicarbazona atua principalmente como um grupo levemente

ácido, em razão do grupo amina secundário $-NH$. O grupo amina terminal da semicarbazona se comporta como uma amida. A ligação azometina $C=N$ torna essa porção estrutural mais rígida, e a porção terminal iniciada a partir da ligação simples $C-N$ permite mobilidade o que pode assim, influenciar na bioatividade da molécula.⁹ As semicarbazonas normalmente apresentam aspecto de sólidos cristalinos, com pontos de fusão bem definidos e, tal qual as hidrazonas, também podem ser utilizadas em análises orgânicas para a caracterização de aldeídos e cetonas.²

Na síntese da semicarbazona, o par de elétrons do nitrogênio nucleofílico da amina ($-NH_2$) da semicarbazida ataca o carbono da carbonila ($C=O$) do aldeído ou cetona, gerando um intermediário instável de carbinolamina, o qual sofre eliminação de água para produzir a ligação azometina ($C=N$) e a imina correspondente (semicarbazona), Figura 2. Em geral, a reatividade de aldeídos é maior que de cetonas, por serem estericamente menos impedidos. Essa reação também é afetada pelo pH, sendo mais bem conduzida em meio contendo quantidades catalíticas de ácidos para facilitar a etapa determinante da velocidade da reação, que é a desidratação da carbinolamina. Contudo, deve-se evitar pH muito baixo para minimizar a protonação da amina e suprimir o ataque nucleofílico no início da reação.⁸

Em razão da ligação dupla presente no grupo funcional semicarbazona, denominada de azometina ($C=N$), esses compostos produzem isômeros geométricos *E* e *Z*, os quais são geralmente obtidos como uma mistura de ambos, sendo normalmente majoritária a configuração *E*. Outro fenômeno também decorrente dessa ligação dupla é o tautomerismo ceto-enólico ($R_1R_2C=N-NH-C(=O)-NH_2 \rightleftharpoons R_1R_2C=N-N=C(OH)-NH_2$), o qual é observado em solução. Porém, quando isoladas em fase sólida, as semicarbazonas mantêm-se majoritariamente na forma ceto.³

Outra propriedade química relevante das semicarbazonas é a facilidade de complexação com cátions metálicos. Na forma ceto, a função semicarbazona coordena com o cátion metálico usando preferencialmente o nitrogênio da azometina e o oxigênio da carbonila. Já na forma enólica, e em solução básica, observa-se a desprotonação do enol e formação de um sítio aniônico que também

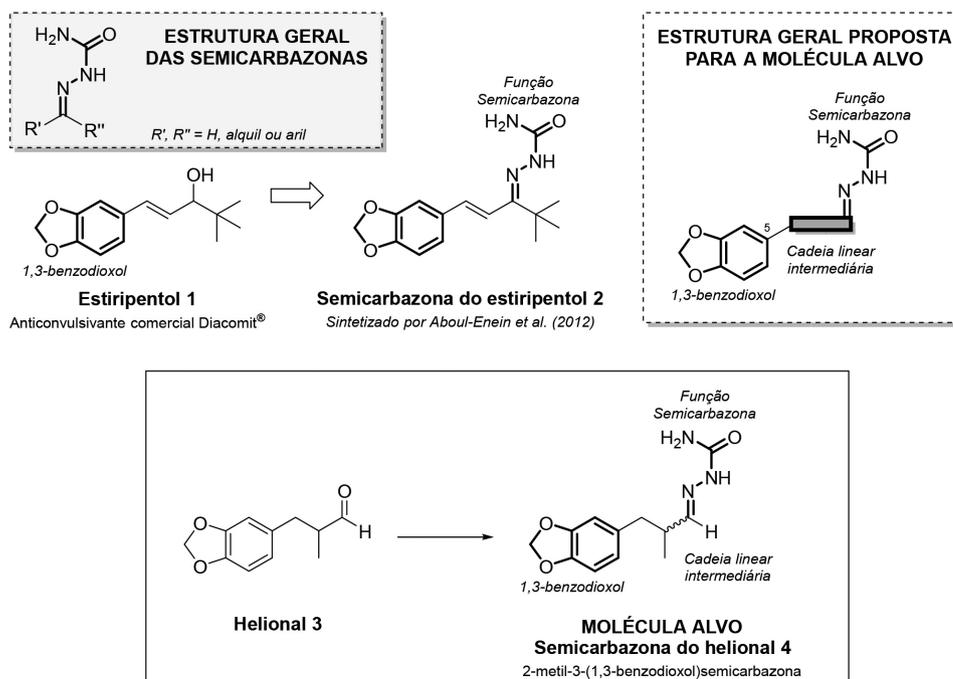


Figura 1. Estrutura geral das semicarbazonas e estruturas químicas do estripentol **1**, da semicarbazona do estripentol **2**, do helional **3** e da semicarbazona do helional **4**, a molécula alvo cuja síntese e caracterização são propostas neste trabalho

Mecanismo geral da reação de formação de semicarbazonas

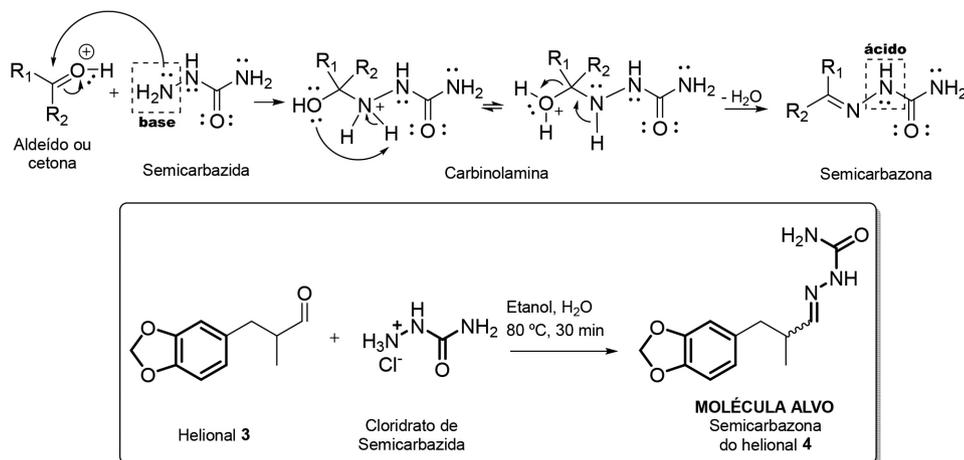


Figura 2. Mecanismo geral da reação de formação de semicarbazonas e rota sintética para obtenção da semicarbazona do helional 4

coordena, junto com o nitrogênio imínico, cátions metálicos. Contudo, em ambas as formas tautoméricas, as semicarbazonas atuam normalmente como ligantes bidentados.³

Propriedades farmacológicas das semicarbazonas

A semicarbazona representa um grupo funcional orgânico que, sob a ótica da QM, é considerada uma estrutura privilegiada amida-mimética, assim como as *N*-acilidrazonas e as tiosemicarbazonas.¹⁰ Do ponto de vista estrutural, as semicarbazonas apresentam um arcabouço molecular simples, normalmente presente em vários fármacos ou em compostos bioativos protótipos de fármacos, e capaz de fornecer sítios de interação com biorreceptores, Quadro 1. Cabe frisar que modificações moleculares suplementares de estruturas privilegiadas, envolvendo a inserção de outras subunidades estruturais, tem se tornado um conceito e uma estratégia útil ao desenvolvimento da QM moderna e ao desenvolvimento de novos compostos ativos.⁶

Frente às possibilidades de bioatividade que esse grupo funcional pode gerar, é possível citar derivados de semicarbazonas com ação anti-hemorrágica,¹² leishmanicida,⁴ antidepressiva,¹³ antitumoral,¹⁴ antimicrobiana¹⁵ e anticonvulsivante.¹⁶ Contudo, essa última ação farmacológica, a inibição de convulsões em ensaios de epilepsia induzida em cobaias, é tida como uma bioatividade de grande destaque associada a essa classe de compostos, já que a epilepsia é uma desordem bastante comum do sistema nervoso central, frequentemente associada a quadros de convulsão, e que demanda uma busca constante por novos fármacos.¹⁶

Pesquisas de relação estrutura-atividade indicam que o esqueleto molecular de uma semicarbazona com provável ação anticonvulsivante deve possuir as seguintes características estruturais: I) um sítio de interação hidrofóbica do tipo arila; II) um sítio com grupo doador de elétrons; III) um sítio receptor de ligação de hidrogênio; e IV) um sítio hidrofóbico ou hidrofílico para controle/adequação de propriedades farmacocinéticas. Sendo as características II e III exercidas pela própria função semicarbazona existente no composto teste.¹⁶

Quadro 1. Exemplos de fármacos comerciais contendo estruturas privilegiadas do tipo amida-miméticas destacando as respectivas funções orgânicas

Fármaco	Estrutura Química	Função	Ação
Primidona		Amida	Anticonvulsivante ¹¹
Nifuroxazida		<i>N</i> -acilidrazona	Antibacteriana ¹²
Carbazocromo		Semicarbazona	Anti-hemorrágica ¹²
Metisazona		Tiosemicarbazona	Antiviral ¹¹

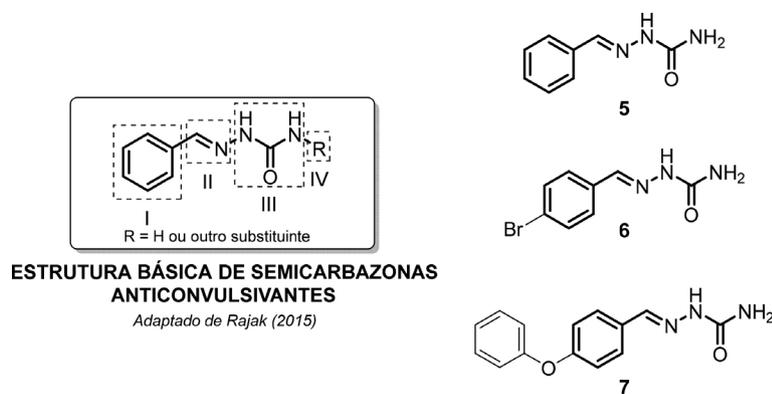


Figura 3. Características estruturais de semicarbazonas com ação anticonvulsivante e alguns exemplos de aril semicarbazonas bioativas, onde: I) sítio de interação hidrofóbica do tipo aril; II) sítio com grupo doador de elétrons; III) sítio de ligação de hidrogênio; e IV) sítio hidrofóbico ou hidrofílico para controle/adequação de propriedades farmacocinéticas (adaptado de Beraldo, 2004 e Rajak, 2015)^{16,17}

Contudo, moléculas mais simples, contendo apenas as características estruturais I, II e III também podem inibir convulsões em modelos experimentais de epilepsia, como pode ser observado na Figura 3. É válido salientar que o derivado semicarbazônico **7** é considerado um protótipo promissor com ação anticonvulsivante e reduzidos efeitos colaterais, tendo sido patenteado pelo *National Institute of Health (NIH)* americano.¹⁷

Em razão da capacidade complexante das semicarbazonas, compostos de coordenação com esses ligantes também vêm sendo avaliados quanto às suas propriedades farmacológicas. Em 2021, Enyedy e colaboradores¹⁸ sintetizaram complexos de Cu(II) e Ga(III) usando derivados semicarbazônicos do hormônio estrona e verificaram que alguns desses compostos de coordenação exibiram atividade antibacteriana e antitumoral relevantes. Em adição, além da possível atividade biológica, complexos metálicos de semicarbazonas também vêm sendo estudados como catalisadores em reações orgânicas de oxidação, e como precursores de nanopartículas,⁸ fatos que demonstram a diversidade de aplicações de compostos dessa classe.

PARTE EXPERIMENTAL

Equipamentos

O comportamento cromatográfico da semicarbazona do helional **4** foi avaliado usando placa de cromatografia em camada delgada (CCD) de sílica-gel (2 × 5 cm) com indicador de fluorescência GF₂₅₄. O ponto de fusão (PF) foi determinado utilizando Fusímetro digital Microquímica (MQAPF-302). Espectros de absorção molecular na região do UV-Vis foram obtidos usando o Espectrofotômetro Nova Instruments (NI-1600 UV). O espectro de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) foi registrado utilizando o Espectrômetro de Infravermelho com Transformada de Fourier Shimadzu (IRTracer-100, método ATR). Já os espectros de Ressonância Magnética de Nuclear (RMN) de ¹H e ¹³C foram obtidos no Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear Bruker (modelo AscendTM 400).

Reagentes e materiais

Para a realização dos experimentos de síntese foram utilizados os reagentes: cloridrato de semicarbazida (99%, Sigma-Aldrich), álcool etílico absoluto (Vetec) e ácido clorídrico (HCl 37%, Synth) em solução aquosa na concentração de 0,10 mol L⁻¹.

Para sintetizar a semicarbazona **4** contendo o núcleo benzodioxol optou-se em utilizar o helional **3** (95%, Perfumoteca Senes

Fragrâncias) como material de partida (Figura 4). É um aldeído derivado do safrol, denominado de 3-benzo[1,3]dioxol-5-il-2-metilpropinaldeído, de fórmula molecular C₁₁H₁₂O₃, massa molar 192,21 g mol⁻¹, densidade 1,16 g mL⁻¹, aspecto de um óleo amarelo claro com odor floral e amadeirado, e ligeiramente solúvel em etanol. Sua venda é livre e é um produto químico de baixo custo, podendo ser adquirido em lojas especializadas de essências por se tratar de uma fragrância usada na preparação de perfumes.

Sequência didática das aulas práticas

Este trabalho visa descrever uma sequência de experimentos, envolvendo síntese, caracterização físico-química e realização de ensaios computacionais, na forma de aulas práticas isoladas, porém, complementares. Foram então planejadas três aulas práticas, cada uma com duração de até 2 h, sendo que o professor responsável pela disciplina pode optar pela aplicação de cada proposta experimental, dependendo das particularidades do curso, de seus estudantes, assim como dos recursos disponíveis no laboratório de ensino.

Do ponto de vista pedagógico, a estratégia de execução dessas aulas práticas seguirá um caráter ilustrativo, exigindo do estudante uma desenvoltura técnica laboratorial básica já adquirida em disciplinas práticas de química cursadas anteriormente em sua graduação.¹⁹

Proposta de aula experimental 1: síntese da semicarbazona do helional 4

Na primeira aula, os estudantes devem seguir o seguinte roteiro experimental para a síntese da 2-metil-3-(1,3-benzodioxol) semicarbazona **4** (Figura 2): pesar 0,192 g de helional **3** (1,0 mmol) em balão de reação de fundo chato de 25 mL, sendo este diluído em 7 mL de etanol absoluto. Em um béquer pesar 0,167 g de cloridrato de semicarbazida (1,5 mmol), sendo este dissolvido em 3 mL de água destilada. Colocar o balão diretamente em chapa de aquecimento (ajustada em 80 °C), sem necessidade de refluxo, e sob agitação magnética. Adicionar a solução de cloridrato de semicarbazida ao balão contendo o aldeído e deixar a reação sob agitação e aquecimento por 25 min na mesma condição inicial. Em seguida, adicionar 15 mL de solução aquosa de HCl 0,10 mol L⁻¹, e deixar a reação sob agitação por mais 5 min, até completa precipitação do produto. Filtrar a vácuo a mistura reacional, e lavar o sólido com 50 mL de água destilada para a remoção do excesso de HCl e do cloridrato de semicarbazida. Em seguida, colocar o papel de filtro contendo o sólido sobre um vidro de relógio e levar à estufa por 30 min à 75 °C. Após esfriar, o sólido seco deve ser removido do papel e pesado para cálculo de rendimento reacional bruto. Por fim, realizar cromatografia em camada delgada

(CCD) do produto obtido usando acetato de etila como eluente e revelação em luz UV_{254nm} e iodo.

Proposta de aula experimental 2: caracterização da semicarbazona do helional 4

Na segunda aula, o sólido seco obtido no experimento anterior (semicarbazona do helional 4) deve ser submetido inicialmente à determinação de ponto de fusão. Em seguida, deve-se preparar uma solução dessa substância na concentração de 5 mg L⁻¹ em metanol:água destilada (4:1), para análise espectrofotométrica de varredura entre 220 e 320 nm, a intervalos de 10 nm, sendo as absorvâncias anotadas. A própria mistura de solventes deverá ser usada como “branco” espectrofotométrico. Uma solução de helional 3, nas mesmas condições experimentais anteriores, também será analisada espectrofotometricamente para fins comparativos. Os estudantes devem inserir os dados de absorvância obtidos no Microsoft Excel[®] para a construção do gráfico e determinação dos comprimentos de onda de máxima absorção molecular ($\lambda_{\text{máx}}$).

Nessa aula, sugere-se também que o professor mostre aos estudantes os espectros de FTIR e de RMN de ¹H e ¹³C da semicarbazona 4 (Figura 3S e 4S), disponibilizados no Material Suplementar, visando ampliar a abordagem e discussão sobre métodos de análise e caracterização de produtos de síntese.

Proposta de aula experimental 3: ensaios *in silico* de perfil farmacocinético

Na terceira aula, sugere-se que os estudantes utilizem seus computadores pessoais e a rede institucional de acesso à internet para usar a ferramenta online ADMETlab 2.0 (<https://admetmesh.scbdd.com/>)²⁰ no módulo de avaliação farmacocinética (função: “ADMET evaluation”). Essa ferramenta realiza ensaios *in silico* (computacionais) para fazer predição de parâmetros moleculares, farmacocinéticos e de toxicidade de um composto teste, de forma gratuita, rápida, e sem requerer cadastro prévio. No módulo “ADMET evaluation” desse *software*, pode-se usar o código SMILES do composto teste (função: “paste a single SMILES string”) ou ainda desenhar a estrutura química em 2D do composto em estudo (função: “draw a molecule using JMSE editor”). Após escolher a forma de uso do *software*, basta submeter o composto teste para análise (função: “submit”). Os códigos SMILES dos compostos que terão os parâmetros computacionais comparados nessa aula (estiripentol 1, semicarbazona do estiripentol 2, helional 3 e semicarbazona do helional 4) são mostrados adiante, para o caso do professor e/ou estudantes optarem em usar essa função nas predições. Sugere-se que os principais dados obtidos para cada composto sejam organizados pelos discentes em tabelas, para análise e discussão conjunta durante a aula.

Códigos SMILES dos compostos a serem analisados:

- Estiripentol 1: CC(C)(C)C(O)C=C\C1=CC=C2OCOC2=C1
- Semicarbazona do estiripentol 2: CC(C)(C)\C(\C=C\C1=CC=C2OCOC2=C1)=N\N(C(N)=O
- Helional 3: CC(C=O)CC2=CC=C1OCOC1=C2
- Semicarbazona do helional 4: CC(CC1=CC=C2OCOC2=C1)\C=N\N(C(N)=O

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na primeira aula experimental, o professor deverá explicar os procedimentos da prática na síntese da semicarbazona do helional 4 (molécula alvo), incluindo a importância desse grupo funcional para a química medicinal, a rota sintética e o mecanismo da reação (Figuras 1 e 2). Em adição, recomenda-se que o docente aborde a razão da escolha do helional 3 no tocante à busca de sítios de similaridades

estruturais com o fármaco protótipo (estiripentol 1) e com o derivado 2, os quais exibem atividade anticonvulsivante. Esse é um ponto importante a ser explorado pois pode contribuir com o aprendizado do discente sobre planejamento e desenvolvimento racional de novos compostos bioativos, com foco em similaridade estrutural e estruturas privilegiadas. Sugere-se usar como material de suporte para essa discussão a publicação de Barreiro e Fraga,²¹ que destaca o núcleo benzodioxol do safrol e diversos compostos bioativos que o contêm em suas estruturas, assim como a publicação de Heloisa Beraldo,¹⁷ que enfatiza as funções semicarbazona e tiossemicarbazona e suas versatilidades farmacológicas.

Ao término dessa primeira aula, os discentes deverão obter resultados semelhantes aos apresentados neste artigo. Nessa ocasião, na síntese da semicarbazona do helional 4 foi obtido 0,2140 g de produto bruto (sem prévia purificação), que se mostrou como um sólido branco de aspecto cristalino. A análise por CCD com eluição em acetato de etila (Rf = 0,30) demonstrou que o produto, aparentemente, encontrava-se puro (Figura 1S).

Frente ao produto sólido obtido, o rendimento reacional bruto ficou próximo de 86%, sendo esse rendimento calculado em função da quantidade de matéria (em mmol) de helional 3 (reagente limitante) usado na reação, e considerando a massa molar da semicarbazona 4 de 249,11 g mol⁻¹ (C₁₂H₁₅N₃O₃). Esse valor reflete um bom rendimento e gera uma massa de produto considerável, partindo-se de apenas 1 mmol da matéria prima, o que facilita a visualização e manipulação pelos discentes, e também ajuda na economicidade do experimento. Outro ponto é que essa reação clássica é rápida e de fácil execução, podendo ser acompanhada visualmente, pois permite ao estudante a observação da formação gradual de um precipitado branco (produto) no meio reacional. Além disso, os discentes podem acompanhar visualmente a formação da molécula alvo (semicarbazona do helional 4), uma vez que ela apresenta características distintas das matérias primas usadas, ou seja, o helional 3 é uma substância líquida amarelada à temperatura ambiente e o cloridrato de semicarbazida é um sólido branco bastante solúvel em água, enquanto a semicarbazona do helional 4 obtida é um sólido branco insolúvel em água e solúvel em metanol. Apesar da simplicidade da reação de formação de semicarbazonas, os procedimentos e técnicas laboratoriais que os estudantes devem efetuar nessa aula prática são diversos, fato que possibilita um aprimoramento de habilidades como: manipulação e pesagem de substâncias em balança analítica, montagem do aparato de síntese, filtração à vácuo, secagem em estufa, cálculos de rendimento reacional e análise por cromatografia em camada delgada. Todos esses aspectos em conjunto viabilizam a aplicação dessa proposta em aulas experimentais na maioria dos cursos de ensino superior, como parte de aulas experimentais de disciplinas de química.

A partir da segunda aula experimental os discentes realizarão e discutirão alguns ensaios de caracterização da semicarbazona do helional 4 e, novamente, deverão comparar os resultados com os apresentados no presente artigo. Nessa ocasião, a faixa de fusão determinada com fusiômetro digital para a semicarbazona 4 ficou entre 165 e 168 °C. Esse valor estreito de faixa de fusão é indicativo de pureza do produto obtido, fato que corrobora com o perfil cromatográfico verificado na CCD obtida na primeira aula experimental (Figura 1S). O espectro de absorção molecular na região do UV-Vis da semicarbazona 4 em metanol/água (4:1) mostrou bandas em 230 nm e 290 nm, as quais correspondem aos comprimentos de onda de máxima absorção molecular ($\lambda_{\text{máx}}$) (Figura 4). A absorção intensa em 230 nm refere-se provavelmente à transição $\pi \rightarrow \pi^*$ oriunda do núcleo benzodioxol, enquanto a banda em 290 nm deve-se provavelmente à transição $n \rightarrow \pi^*$ oriunda dos elétrons livres dos heteroátomos de N e O na ligação azometina (C=N) e carbonila (C=O). Esse mesmo perfil de absorção molecular foi observado

nos espectros de UV-Vis das aril semicarbazonas sintetizadas por Jadon e Colaboradores.²² O perfil de absorção UV-Vis do helional **3** é semelhante ao de sua respectiva semicarbazona **4** contudo, exhibe discreto efeito hipsocrômico e batocrômico nas bandas em 240 e 280 nm, respectivamente, além de um intenso efeito hiperacrômico em ambas as regiões de absorção, com destaque para a banda em 280 nm, que é resultado da transição $n \rightarrow \pi^*$ da carbonila (C=O) do aldeído.²³

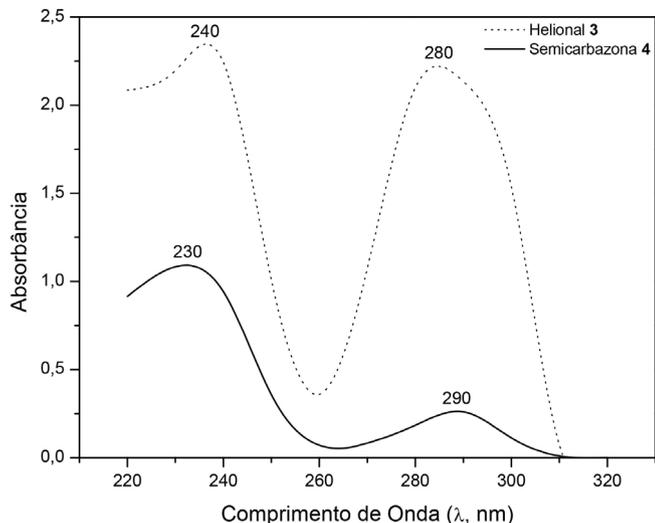


Figura 4. Espectro de absorção molecular na região do UV-Vis do helional **3** e do seu derivado semicarbazona **4**

No espectro de FTIR da semicarbazona **4** (Figura 2S) são observadas diversas bandas, com os principais estiramentos em: 3462 (ν N-H), 1677 (ν C=O), 1575 (ν C=N, azometina), 1488 (ν CH₂) e 1240 cm^{-1} (ν C-O). Essas bandas são características dos grupos funcionais existentes na molécula alvo **4**, estando os sinais específicos da amina, carbonila e azometina do grupo semicarbazona em concordância com o relatado por Jadon e colaboradores.²² Os sinais referentes ao núcleo benzodioxol (metileno e éter) também estão presentes, conforme relatado por Panicker e colaboradores.²⁴

No espectro de RMN de ¹H da semicarbazona **4** (Figura 3S) são observados sinais característicos dos núcleos de ¹H da molécula alvo, sendo registrados em DMSO-*d*₆ os seguintes deslocamentos (δ em ppm): 0,96 (d, 3H, CH₃), 2,55 (m, 1H, CH quiral), 2,47 e 2,73 (m, 2H, CH₂ linear), 5,96 (s, 2H, CH₂ cíclico), 6,09 (sl, 2H, NH₂), 6,63 (dd, 1H, $J = 7,9/1,4$ Hz, H aromático), 6,77 (dd, 1H, $J = 1,4$ Hz, H aromático), 6,81 (d, 1H, $J = 7,9$ Hz, H aromático), 7,13 (d, 1H, $J = 4,8$ Hz, HC=N azometina) e 9,76 (s, 1H, NH). Por fim, a elucidação por RMN de ¹³C da semicarbazona **4** (Figura 4S) também revelou sinais característicos da molécula alvo, sendo registrados em DMSO-*d*₆ os seguintes deslocamentos principais (δ em ppm): 17,2 (CH₃), 37,6 (CH quiral), 39,7 (CH₂ linear), 100,6 (CH₂ cíclico), 146,8 (HC=N azometina) e 156,7 (C=O). Esses sinais de carbono foram confirmados por correlações heteronuclear de ¹H e ¹³C (HSQC e HMBC).

Os resultados obtidos com essas caracterizações permitem confirmar a síntese da semicarbazona do helional **4**. Vale ressaltar que além das discussões de caracterização fornecidas, o professor pode explorar o material suplementar para complementar a aplicação dessa aula prática junto a seus estudantes e ampliar as discussões.

Na terceira aula experimental o objetivo dos estudantes será as análises computacionais da molécula alvo **4**, os denominados ensaios *in silico*. Atualmente é necessário considerar a relevância da realização, o mais cedo possível, de ensaios *in silico* durante o processo de desenvolvimento de fármacos. Esses ensaios são capazes de estimar o ajuste de um possível ligante, denominado de

composto teste, a um alvo biológico, bem como, a predição do perfil de absorção, distribuição, metabolismo, eliminação e toxicidade, as chamadas propriedades ADMET do ligante.²⁵ Assim, usando o *software* online ADMETlab 2.0, no módulo “ADMET evaluation”, os estudantes poderão obter parâmetros de ADMET dos compostos sob estudo: estiripentol **1**, semicarbazona do estiripentol **2**, helional **3** e a semicarbazona do helional **4**, a molécula alvo sintetizada anteriormente. Nessa análise comparativa, os estudantes visualizarão os resultados na forma de gráficos do tipo “teia de aranha” (Figura 5), além de diversos outros dados organizados em diferentes seções. É importante realizar o *download* do arquivo em PDF (“download as PDF”) disponibilizado na interface do *software* para obter a conversão do código de sinais (---, --, -, +, ++ e +++) em valores numéricos, de forma a facilitar a organização das tabelas e processamento dos dados junto com os estudantes.

Propõe-se que o professor inicie o tratamento pelos gráficos obtidos para os quatro compostos estudados (estiripentol **1**, semicarbazona do estiripentol **2**, helional **3** e a semicarbazona do helional **4**), no qual são apresentadas as propriedades físico-químicas de cada molécula analisada. Assim, são apresentadas treze propriedades físico-químicas que podem afetar no perfil farmacocinético de cada uma das moléculas analisadas, sendo elas: peso molecular (MW), número de anéis (nRig), carga formal (fChar), número de heteroátomos (nHet), número de átomos no maior anel (MaxRing), número de anéis (nRing), número de ligações rotacionáveis (nRot), área de superfície polar topológica (TPSA), número de doadores e aceptores de ligação de hidrogênio (nHD e nHA), coeficiente de lipossolubilidade (LogP), LogP em pH fisiológico = 7.4 (LogD), e Log da solubilidade aquosa (LogS) (Figura 5).

Assim, para que um composto teste seja tido como um bom candidato a fármaco, é desejável que suas propriedades físico-químicas estejam, preferencialmente, dentro dos limites superior e inferior dos gráficos obtidos, ou seja, dentro da zona laranja e fora da zona rosa de seu gráfico. Ao analisar as substâncias estudadas, foi possível observar que tanto o fármaco protótipo estiripentol **1** quanto a sua semicarbazona **2** exibem parâmetros de solubilidade (Log P e Log D) ligeiramente fora da área delimitada (Figura 5A e 5B). Já o helional **3** e a semicarbazona do helional **4** apresentam todas as suas propriedades físico-químicas inseridas na zona laranja, conforme apresentado na Figura 5C e 5D. Essa predição revela que a molécula alvo exibe um conjunto de características químicas minimamente desejável para um candidato a fármaco. Contudo, salienta-se que o helional **3**, por ser um aldeído muito reativo é,² portanto, inadequado para ser um candidato à fármaco.

Dentre os vários parâmetros calculados pelo *software*, os relacionados às propriedades estruturais (físico-químicas) considerados para abordagem nessa aula foram definidos e organizados na Tabela 1. Nessa tabela, os parâmetros conjuntos de MW, Log P, nHA e nHD compõe a clássica “Regra dos 5 de Lipinski”, que descreve empiricamente um padrão molecular desejável em uma substância capaz de auxiliar seu emprego como fármaco, a saber: MW < 500 g mol⁻¹, Log P < 5, nHA < 10 e nHD < 5. Vale ressaltar que o nome dessa regra não se refere à avaliação de 5 parâmetros, mas sim aos valores limite de cada propriedade que são múltiplos de 5. Portanto, os dados preditos e dispostos na Tabela 1 demonstram que nenhum composto analisado viola a Regra dos 5 de Lipinski, sugerindo que todos possuem grau de lipofilicidade que facilitam suas respectivas permeabilidades através de membranas celulares, podendo ser facilmente transportados, difundidos e absorvidos em sistemas biológicos, e que ainda podem exibir boa biodisponibilidade após administração por via oral.¹⁹

Como complemento, e visando prever a biodisponibilidade oral de uma substância de forma mais assertiva, outros parâmetros

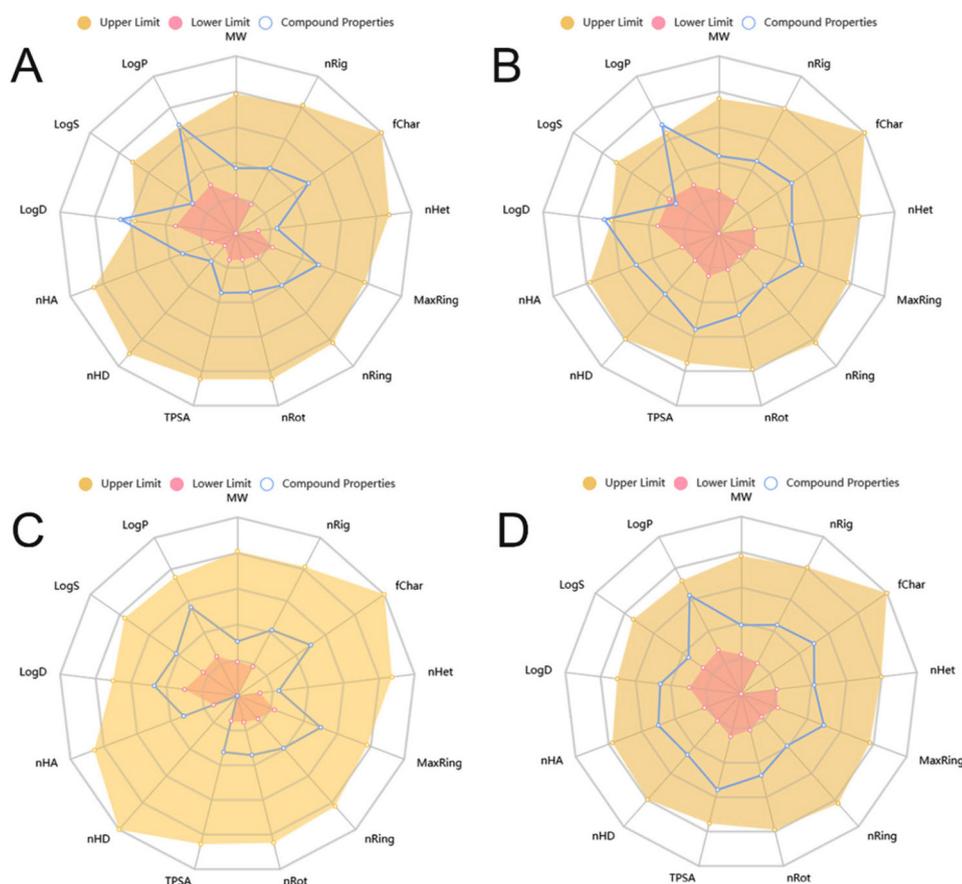


Figura 5. Representação gráfica da análise das propriedades físico-químicas para os compostos teste, onde: A (estiripentol 1), B (semicarbazona do estiripentol 2), C (helional 3) e D (semicarbazona do helional 4)

físico-químicos além dos estabelecidos por Lipinski, são considerados importantes, tais como: TPSA ($< 140 \text{ \AA}$), nRot (< 11), Log D (< 3) e nAR (< 4), os quais também foram analisados e os resultados obtidos listados na Tabela 1.²⁵ Considerando essas últimas propriedades físico-químicas, foi observado que estiripentol 1 e a semicarbazona 2 violam o limite de Log D, contudo, de todos os 8 parâmetros avaliados, esse é o único acima do ideal, o que não descarta a possibilidade desses compostos exibirem biodisponibilidade oral adequada. Inclusive, o fármaco estiripentol 1 já é comercializado na Europa com o nome comercial Diacomit®, na forma de cápsulas ou em pó para suspensão oral, nas doses de 250 ou 500 mg.

No tocante às propriedades farmacocinéticas previstas pelo ADMETlab 2.0 (Tabela 1) e, para fins de comparação, é recomendável usar os valores e referências numéricas mostrados no documento em PDF de cada composto teste. Nesse tópico, destaca-se inicialmente o parâmetro de absorção HIA - Potencial de absorção intestinal do composto teste em humanos, e o parâmetro de distribuição BBB - Potencial de penetração na barreira hematoencefálica. Os valores obtidos sugerem uma boa absorção intestinal, com taxa $\geq 30\%$ para todos os compostos analisados (estiripentol 1, helional 3,

semicarbazona do estiripentol 2 e semicarbazona do helional 4), o que pode favorecer a administração dessas substâncias por via oral. Além disso, todos os compostos analisados apresentaram capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica, quando analisados *in silico*, com valores de BBB entre 0,741 e 0,975. Nesse caso, o resultado obtido é desejável, já que todos os compostos foram planejados para atuarem farmacologicamente a nível de sistema nervoso central, com efeito anticonvulsivante. Ao analisar os parâmetros de metabolismo, todos os compostos estudados atuam como inibidores ou substratos de enzimas microsossomais do citocromo P450. Assim, como o *software* considera várias enzimas na predição, avaliações mais específicas desse quesito devem ser realizadas caso se deseje obter um entendimento mais aprofundado, a depender do nível de discussão sobre o conteúdo teórico-prático com os discentes. Por fim, no âmbito de eliminação, os valores de *clearance* (CL), que se refere à depuração dos compostos teste a partir de fluidos biológicos, sugerem potenciais de alto a moderado, preditos entre $6,565$ e $16,682 \text{ mL min}^{-1} \text{ kg}^{-1}$, indicando uma eliminação favorável dessas substâncias do organismo através da urina.

Tabela 1. Propriedades físico-química dos compostos determinadas *in silico* pelo *software* ADMETlab 2.0

Composto Teste	MW	Log P	nHA	nHD	TPSA	nRot	Log D	nAR*
Valores de Referência	< 500	< 5	< 10	< 5	< 140	< 11	< 3	< 4
Estiripentol 1	234,13	3,09	3	1	38,69	3	3,70	1
Semicarbazona do estiripentol 2	289,14	3,48	6	3	85,94	5	3,31	1
Helional 3	192,08	1,86	3	0	35,53	3	1,85	1
Semicarbazona do helional 4	249,11	2,37	6	3	85,94	5	1,80	1

Em relação à toxicidade predita pelo ADMETlab 2.0 (Tabela 2) para os três compostos analisados, a semicarbazona **4** demonstrou o maior risco em produzir efeitos tóxicos, seguido de seu precursor (helional **3**), da semicarbazona do estiripentol **2** e, por fim, do fármaco estiripentol **1**, o qual exibe o menor potencial toxicológico considerando os parâmetros comparados de DILI – Potencial de lesão hepática; AMES – Potencial de mutagenicidade; e CARC – Potencial de carcinogenicidade. Comparando o estiripentol **1** e a sua respectiva semicarbazona **2**, percebe-se que o aumento de potencial tóxico predito foi provavelmente associado à substituição da hidroxila presente no fármaco **1** pela função semicarbazona, na estrutura de seu derivado (**2**). E, comparando-se esses dois últimos compostos teste com a semicarbazona do helional **4**, apesar da menor similaridade estrutural entre essas substâncias, a ausência da insaturação e do grupo *terc*-butil associada à presença da função semicarbazona, podem ter proporcionado uma maior toxicidade para a molécula alvo **4**. Assim, frente aos dados apresentados, pode-se inferir que a presença da função semicarbazona, apesar de ela ser considerada uma estrutura privilegiada na Química Medicinal, nos estudos *in silico* em questão elevou a toxicidade dos derivados que a possuem.

Tabela 2. Propriedades toxicológicas previstas pelo *software* ADMETlab 2.0

Composto Teste	DILI*	AMES*	CARC*
Estiripentol 1	0,220	0,009	0,605
Semicarbazona do estiripentol 2	0,701	0,378	0,898
Helional 3	0,632	0,188	0,931
Semicarbazona do helional 4	0,879	0,833	0,948

Legenda: DILI = potencial de lesão hepática; AMES = potencial de mutagenicidade; CARC = potencial de carcinogenicidade; *códigos de sinais convertidos em valores numéricos (mostrados no arquivo em PDF gerado pelo ADMETlab 2.0 para cada composto).

CONCLUSÕES

Os experimentos apresentados neste trabalho sugerem atividades práticas de baixo custo, capazes de serem desenvolvidas em laboratórios de Química de instituições de Ensino Superior e reproduzidos por graduandos em cursos de Química, Farmácia, Bioquímica e/ou Engenharia Química. As propostas experimentais apresentam processos envolvidos no desenvolvimento de moléculas bioativas, especificamente a síntese, caracterização e avaliação *in silico* de propriedades farmacocinéticas de uma semicarbazona.

A partir das aulas experimentais propostas e dos resultados que podem ser obtidos ao executá-las, acredita-se que essas atividades práticas podem auxiliar os discentes a entender um pouco mais sobre planejamento e desenvolvimento racional de novos compostos bioativos. Outro ponto positivo que cabe ser enfatizado é o uso da estratégia de aprendizagem interdisciplinar, que integra de forma prática alguns saberes da Química Orgânica e QM, e possibilita aos estudantes o desenvolvimento de habilidades e competências importantes e relacionadas com essas disciplinas.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Fotografias e espectros de FTIR e de RMN de ¹H e ¹³C da semicarbazona do helional **4** sintetizada estão disponíveis em <http://quimicanova.s bq.org.br>, em arquivo pdf, com livre acesso.

AGRADECIMENTOS

Os autores desejam agradecer ao CNPq e à CAPES pelas bolsas recebidas por estudantes de iniciação científica e mestrado que participaram deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- Montanari, C. A.; *Química medicinal: métodos e fundamentos em planejamento de fármacos*; Edusp: São Paulo, 2011.
- Costa, P. R. R.; Pilli, R. A.; Pinheiro, S.; *Substâncias carboniladas e derivados*, 2ª ed.; EditSBQ: São Paulo, 2019.
- Venkatachalam, T. K.; Bernhardt, P. V.; Noble, C. J.; Fletcher, N.; Pierens, G. K.; Thurecht, K. J.; Reutens, D. C.; *J. Inorg. Biochem.* **2016**, *162*, 295. [Crossref]
- Queiroz, A. C.; Alves, M. A.; Barreiro, E. J.; Lima, L. M.; Alexandre-Moreira, M. S.; *Exp. Parasitol.* **2019**, *201*, 57. [Crossref]
- Thome-Souza, S.; Valente, K. D. R.; *J. Epilepsy Clin. Neurophysiol.* **2011**, *17*, 144. [Crossref]
- Barreiro, E. J.; Fraga, C. A. M.; *Química Medicinal*, 3ª ed.; Artmed: Porto Alegre, 2015.
- Aboul-Enein, M. N.; El-Azzouny, A. A.; Attia, M. I.; Maklad, Y. A.; Amin, K. M.; Abdel-Rehim, M.; El-Behairy, M. F.; *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *47*, 360. [Crossref]
- More, M. S.; Joshi, P. G.; Mishra, Y. K.; Khanna, P. K.; *Mater. Today Chem.* **2019**, *14*, 100195. [Crossref]
- Pandeya, S. N.; *Acta Pharm.* **2012**, *62*, 263. [Crossref]
- Alves, M. A.; Queiroz, A. C.; Alexandre-Moreira, M. S.; Varela, J.; Cerecetto, H.; González, M.; Dorigueto, A. C.; Landre, I. M.; Barreiro, E. J.; Lima, L. M.; *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *100*, 24. [Crossref]
- Korolkovas, A.; Burckhalter, J. H.; *Química Farmacêutica*; Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1988.
- Thota, S.; Rodrigues, D. A.; Pinheiro, P. S. M.; Lima, L. M.; Fraga, C. A. M.; Barreiro, E. J.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2018**, *28*, 2797. [Crossref]
- Qazi, S. U.; Naz, A.; Hameed, A.; Osra, F. A.; Jalil, S.; Iqbal, J.; Shah, S. A. A.; Mirza, A. Z.; *Bioorg. Chem.* **2021**, *115*, 105209. [Crossref]
- Bai, C.; Wu, S.; Ren, S.; Zhu, M.; Luo, G.; Xiang, H.; *Bioorg. Med. Chem.* **2021**, *37*, 116107. [Crossref]
- Ahsan, M. J.; Amir, M.; Bakht, M. A.; Samy, J. G.; Hasan, M. Z.; Nomani, M. S.; *Arabian J. Chem.* **2016**, *9*, S861. [Crossref]
- Rajak, H.; *Int. J. Chem. Eng. Appl.* **2015**, *6*, 142. [Crossref]
- Beraldo, H.; *Quim. Nova* **2004**, *27*, 461.
- Enyedy, E. A.; Petrasheuskaya, T. V.; Kiss, M. A.; Wernitznig, D.; Wenisch, D.; Keppler, B. K.; Spengler, G.; May, N. V.; Frank, E.; Domotor, O.; *J. Inorg. Biochem.* **2021**, *220*, 111468. [Crossref]
- Arruda, I. E.; Macedo, B. V. S.; Macedo, J. C.; Campos, W. R. A.; Araújo, C. R. M.; Gonsalves, A. A.; *Quim. Nova* **2020**, *43*, 642. [Crossref]
- Crossref, acessada em outubro 2022.
- Barreiro, E. J.; Fraga, C. A. M.; *Quim. Nova* **1999**, *22*, 744.
- Jadon, S.; Khedr, A. M.; Kumar, S.; Yadav, S.; Kumar, V.; Gupta, K. C.; *Asian J. Chem.* **2011**, *23*, 4209.
- Silverstein, R. M.; Bassler, G. C.; Morrill, T. C.; *Identificação espectrométrica de compostos orgânicos*, 3ª ed.; Guanabara Dois: Rio de Janeiro, 1979.
- Panicker, C. Y.; Varghese, H. T.; Mary, Y. S.; *Orient. J. Chem.* **2012**, *28*, 1037.
- Piccirillo, E.; Amaral, A. T.; *Quim. Nova* **2018**, *41*, 662. [Crossref]

