Artigo

Investigação do Potencial Biológico de Hidrazonas Obtidas Sinteticamente na Última Década (2006-2016): Uma Revisão Sistemática

Guimarães, D. G.; Rolim, L. A.; Gonsalves, A. A.; Araújo, C. R. M.*

Rev. Virtual Quim., 2017, 9 (6), 2551-2592. Data de publicação na Web: 18 de dezembro de 2017

<http://rvq.sbq.org.br>

Biological Potential of Synthetic Hydrazones in the Last Decade: A Systematic Review

Abstract: Hydrazones are a class of organic compounds with the general structure --C=N--NH-- , resulting from the condensation of carbonylated substances with amines. The synthesis of this functional group generally occurs by the condensation of hydrazines or hydrazides with aldehydes and ketones. In recent years, the functional group hydrazone has been gaining prominence in medicinal chemistry, due mainly to its wide spectrum of applications and chemical and biological properties, as well as its structural versatility. Thus, this systematic review is aimed to investigate the biological potential of hydrazones obtained synthetically in the last decade.

Among the papers included in this study, over 80% of them exhibit promising results for the evaluation activity, and less than 15% of these had unimpressive results. In addition, the relationship and importance of the coordination properties of the hydrazone derivatives for the evaluated activities became apparent. Moreover, synthetic hydrazones are promising organic substances for the research and development of new chemical prototypes for the discovery of new drugs.

Keywords: Hydrazones; Synthesis; Biological activity; Metallic complexes; Coordination.

Resumo

Hidrazonas são uma classe de compostos orgânicos com estrutura geral --C=N--NH-- , resultantes da condensação de substâncias carboniladas com aminas. A obtenção deste grupo funcional geralmente ocorre pela condensação de hidrazinas ou hidrazidas com aldeídos e cetonas. Nos últimos anos, o grupo funcional hidrazona vem ganhando destaque na química medicinal, devido principalmente a seu amplo espectro de aplicações e propriedades químicas e biológicas, assim como pela sua versatilidade estrutural. Deste modo, esta revisão sistemática teve como objetivo a investigação do potencial biológico de hidrazonas obtidas sinteticamente na última década. Entre os artigos científicos incluídos neste trabalho, mais de 80% deles apresentaram resultados promissores para a atividade avaliada, e menos de 15% destes exibiram resultados inexpressivos. Em adição, tornou-se perceptível a relação e a importância das propriedades de coordenação dos derivados hidrazônicos para as atividades avaliadas. E ainda, podemos afirmar que as hidrazonas sintéticas são substâncias orgânicas promissoras para a pesquisa e desenvolvimento de novos protótipos químicos visando a descoberta de novos fármacos.

Palavras-chave: Hidrazonas; Síntese; Atividade biológica; Complexos metálicos; Coordenação.

* Universidade Federal do Vale do São Francisco, Colegiado de Ciências Farmacêuticas, Campus Petrolina Centro, CEP 56304-917, Petrolina-PE, Brasil.

cleonia.araujo@univasf.edu.br

DOI: [10.21577/1984-6835.20170151](https://doi.org/10.21577/1984-6835.20170151)

Investigação do Potencial Biológico de Hidrazonas Obtidas Sinteticamente na Última Década (2006-2016): Uma Revisão Sistemática

Délis G. Guimarães, Larissa A. Rolim, Arlan de A. Gonsalves, Cleônia Roberta M. Araújo*

Universidade Federal do Vale do São Francisco, Colegiado de Ciências Farmacêuticas, Campus Petrolina Centro, CEP 56304-917, Petrolina-PE, Brasil.

* cleonia.araujo@univasf.edu.br

Recebido em 17 de agosto de 2017. Aceito para publicação em 13 de dezembro de 2017

1. Introdução
2. Método
3. Resultados e discussão
 - 3.1. Seleção de artigos
 - 3.2. Química e estratégias sintéticas
 - 3.3. Atividades biológicas
4. Considerações Finais

1. Introdução

As hidrazonas pertencem a uma classe de compostos com estrutura geral --C=N--NH-- , sendo obtidas normalmente pela condensação de hidrazinas com cetonas ou aldeídos.¹⁻⁵ Uma vez que a hidrazina seja uma *N*-acilhidrazina (ou hidrazida), o produto é uma *N*-acilhidrazona (Esquema 1).⁶

O grupo funcional hidrazona tem despertado crescente interesse científico, em virtude de seu amplo espectro de aplicações e propriedades químicas, terapêuticas, biológicas e industriais.⁷⁻¹¹ Outros atrativos desta função que justificam sua relevância são suas variadas propriedades estruturais, a facilidade de síntese e a estabilidade à hidrólise.^{7,12}

Esquema 1. Reação geral de formação de uma hidrazona

Ao longo dos anos tem sido descrito na literatura, para a classe de compostos orgânicos em questão, um expressivo número de atividades biológicas, tais como: atividade antiviral, anticonvulsivante, antituberculose, antifúngica, antibacteriana, antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral, antidepressiva, dentre muitas outras.^{4,13-17} Neste contexto, esta revisão sistemática foi realizada com o objetivo de descrever as atividades biológicas que estão sendo avaliadas e descritas para hidrazonas obtidas sinteticamente nos últimos anos, no período entre 2006 e 2016, e assim avaliar se compostos contendo esse grupo funcional podem ser considerados promissores candidatos a protótipos de novos fármacos.

2. Método

Esta revisão sistemática foi realizada através de uma pesquisa bibliográfica em bancos de dados de pesquisa (ScienceDirect, SciFinder e Google Scholar), no mês de Janeiro de 2017. As palavras-chave foram organizadas numa frase no singular em inglês (use of hydrazone, assessment of hydrazone activity) para a busca dos artigos nestas plataformas. Na base de dados SciFinder a pesquisa foi feita sem o uso de vírgula ou qualquer outro caractere de separação entre as palavras-chave. A pesquisa incluiu apenas artigos científicos publicados entre os anos de 2006 e 2016. Os critérios de inclusão dos

artigos foram: ser um artigo original publicado em revista científica; possuir no título a palavra hidrazona; reportar a avaliação de algum tipo de atividade biológica de hidrazonas sintéticas; e ter sido publicado em revista com classificação no mínimo Qualis B1 na área de Farmácia segundo os critérios empregados pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) em 2017. A seleção dos estudos foi realizada por três pesquisadores de maneira independente, obedecendo rigorosamente os critérios de inclusão previamente estabelecidos. Posteriormente, os artigos selecionados foram criteriosamente revisados.

3. Resultados e discussão

3.1. Seleção de artigos

A pesquisa principal identificou 676 artigos: 630 no ScienceDirect, 26 no SciFinder, os quais continham todos os termos da pesquisa estreitamente relacionados entre si, e 20 no Google Scholar. Artigos indexados em duas ou mais bases de dados foram considerados apenas uma vez. Do total de artigos obtidos, 26 foram selecionados de acordo com os critérios de inclusão anteriormente definidos. Dos 26 artigos selecionados, dois deles foram excluídos por apresentarem inconsistência na

descrição, ou mesmo pela ausência da metodologia empregada nos ensaios biológicos, o que torna os resultados questionáveis uma vez que não fica claro o

modo e as condições na qual os testes foram realizados. Um diagrama de fluxo que ilustra a seleção progressiva dos estudos é apresentado na Figura 1.

Figura 1. Fluxograma de estudos incluídos na revisão sistemática

3.2. Química e estratégias sintéticas

De maneira geral, as hidrazonas são sintetizadas através da condensação equimolar de hidrazinas ou hidrazidas com aldeídos e cetonas. O emprego de catálise ácida é comum para este tipo de reação, onde resumidamente, ocorre a adição nucleofílica seguida da transferência de prótons (Esquema 2).¹⁸

Frequentemente são utilizados o ácido acético, ácido clorídrico ou o ácido sulfúrico, como catalisadores.¹⁹ Catalisadores básicos também podem ser empregados nesta síntese, contudo, poucos relatos são descritos, como no caso da estratégia sintética adotada por Hasková e colaboradores (2011) e Simunek e equipe (2008).^{20,21} A catálise básica caracteriza-se pela desprotonação do nitrogênio, após a

adição nucleofílica à carbonila, seguida de desidratação.¹⁸

O tempo de reação para obtenção das hidrazonas pode variar de minutos a horas, e a maioria dos trabalhos relatam reações sob refluxo ou temperatura ambiente, ainda que outros recursos, tais como micro-ondas, ultrassom e autoclave, também tenham sido reportados.¹⁹ Hrusková e equipe (2016) e Macková e colaboradores (2012) reportaram a síntese de compostos hidrazônicos por catálise ácida em micro-ondas.^{22,23} Neste mesmo ano, Hrusková e colaboradores (2016) também relataram a síntese em autoclave a 110 °C, para aquelas reações mais difíceis de serem realizadas.²² Hernandez e colaboradores (2010) sintetizaram uma série de tiazolilhidrazonas em ultrassom, com tempos de reação variando entre 20 e 30 min.²⁴

Esquema 2. Mecanismo de reação de formação de hidrazona via catálise ácida

Além da rota sintética convencional, alguns autores como El-Sayed e colaboradores (2011) e Mahmudov e equipe (2014) utilizaram estratégias sintéticas não usuais para obtenção de hidrazonas, como pela relação tautomérica azo-hidrazo, onde o composto é preparado através da reação de

azoacoplamento.^{25,26} Isto é possível uma vez que, a função azo esteja localizada em um carbono α de um enol, e envolve a transferência do hidrogênio da hidroxila para um dos nitrogênios no grupo azo (Esquema 3).²⁷

Esquema 3. Reação de formação de hidrazona por equilíbrio tautomérico azo-hidrazo

3.3. Atividades biológicas

Aparentemente, as variadas atividades biológicas de derivados hidrazônicos envolvem uma série de mecanismos, como inibição enzimática, quelação de íons biologicamente importantes, interação com o

DNA, eliminação de radicais livres, dentre outros.^{9,21,22,24,28-30} As investigações biológicas feitas na última década revelam a versatilidade dessa classe de compostos que, a depender das modificações estruturais, apresentam um amplo espectro de atividades.

3.3.1. Atividade antineoplásica

O principal objetivo dos agentes quimioterápicos do câncer é destruir as células neoplásicas preservando as normais. No entanto, a maioria desses agentes atua de forma não específica, lesando tanto células malignas quanto normais. Embora já tenham ocorrido grandes avanços, até agora o tratamento medicamentoso para o câncer baseia-se principalmente no uso de fármacos citotóxicos.³¹ À vista disso, é crescente o interesse científico por novos agentes citotóxicos, sobretudo aqueles que possuam maior seletividade para células cancerosas, evitando danos às células sadias.

Neste contexto, no ano de 2010, Effenberger, Breyer e Schobert sintetizaram uma série de análogos da doxorubicina (Dox),³² um fármaco antineoplásico inibidor da telomerase, indispensável no tratamento de alguns tipos mais comuns de câncer,²⁹ tais como: cânceres hematológicos, tumores sólidos, linfomas e sarcomas de tecidos moles. O objetivo dos autores no presente estudo era sintetizar uma série de *N*-acilhidrazonas derivadas da Dox, contendo unidades de ácidos graxos saturados e insaturados, e terpenos, com potencial para modular o perfil farmacocinético deste agente antineoplásico e contornar os efeitos adversos, que incluem mielossupressão e toxicidade cardíaca, mantendo a ação terapêutica desejada.³³

Nesse sentido, foram sintetizados nove derivados hidrazônicos da Dox, sendo estes testados quanto à atividade citotóxica frente a quatro linhagens de células cancerosas humana, nomeadamente: leucemia (HL-60), melanoma (518A2) e as duas linhagens de

carcinoma resistentes a múltiplos fármacos, carcinoma de mama (MCF-7/Topo) e de colo do útero (KB-V1/Vbl). Estes ensaios foram realizados empregando-se o método colorimétrico de MTT (brometo de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) por 24, 48 e 72 h de tratamento.

O teste de MTT consiste em uma análise colorimétrica que quantifica indiretamente células viáveis a partir da avaliação da atividade de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. Este método fundamenta-se na conversão do sal de MTT, um composto de cor amarela, a formazan, de coloração púrpura, pelas redutases mitocondriais.^{34,35} A partir deste ensaio, a citotoxicidade dos compostos em teste foi quantificada em valores de concentração inibitória média (CI₅₀), ou seja, a concentração dos compostos necessária para reduzir 50% da viabilidade celular.²³

Os resultados do estudo de Effenberger e colaboradores mostraram que os derivados hidrazônicos apresentaram, em sua grande maioria, atividade citotóxica semelhante ou mesmo superior à da Dox nos três tempos de tratamento. Destacaram-se os compostos: doxorubicina heptadecanoil hidrazona (**1**), possuindo uma unidade de ácido graxo saturado, o qual apresentou eficácia cerca de três vezes maior que a Dox para a linhagem KB-V1/Vbl; e doxorubicina 11-(mentoxicarbonil) undecanoilhidrazona (**2**), que foi cerca de duas vezes mais ativo que a Dox para as linhagens 518A2 e KB-V1/Vbl após 72 h de tratamento (Tabela 1). Além disso, foi verificado, por investigações morfológicas e de fragmentação de DNA das células cancerosas, que o modo de ação citotóxica desses derivados hidrazônicos foi, em grande parte, por apoptose.

Tabela 1. Efeito dos derivados *N*-acilhidrazonas, **1** e **2**, sintetizados por Effenberger, Breyer e Schobert sobre a viabilidade de linhagens celulares cancerosas³²

Composto	Cl ₅₀ ^a (μM)					
	518A2 ^b			HL-60 ^b		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
1	0,76 ± 0,05	0,35 ± 0,09	0,11 ± 0,05	1,4 ± 0,2	0,86 ± 0,00	0,28 ± 0,07
2	0,23 ± 0,06	0,16 ± 0,05	0,06 ± 0,01	0,30 ± 0,10	0,25 ± 0,19	0,11 ± 0,05
Dox ^c	0,34 ± 0,11	0,17 ± 0,09	0,12 ± 0,04	0,22 ± 0,10	0,10 ± 0,03	0,08 ± 0,01
	KB-V1/Vbl ^b			MCF-7/Topo ^b		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
1	42,9 ± 10,8	10,7 ± 4,3	5,1 ± 0,9	5,9 ± 1,9	3,2 ± 0,6	3,0 ± 0,9
2	30,5 ± 4,6	17,1 ± 2,5	8,8 ± 0,7	7,1 ± 1,8	2,6 ± 1,1	2,6 ± 1,1
Dox ^c	59,9 ± 13,0	35,6 ± 8,5	18,3 ± 7,6	6,2 ± 1,5	1,3 ± 0,5	1,0 ± 0,4

^a Os valores são expressos em concentração inibitória média (Cl₅₀) em μM após 24, 48 e 72 h de tratamento com os compostos em teste. Os resultados equivalem às médias de experimentos independentes ± o desvio padrão (DP).

^b Abreviações: 518A2 – melanoma; HL-60 – leucemia; KB-V1/Vbl – carcinoma de colo de útero resistente a múltiplos fármacos; MCF-7/Topo – carcinoma de mama resistente a múltiplos fármacos.

^c Doxorubicina, empregada como fármaco de referência.

De forma semelhante, tendo em vista as evidências científicas do potencial citotóxico de quelantes de ferro para células cancerosas,^{36,37} Macková e colaboradores (2012) sintetizaram e avaliaram a atividade citotóxica *in vitro* de uma série de metil e etil cetonas análogas ao salicilaldeído isonicotinoil hidrazona (**SIH**), um quelante de ferro, contra duas linhagens celulares tumorais humanas, especificamente, adenocarcinoma de mama (MCF-7) e HL-60, e uma linhagem celular normal, de

cardiomioblastos embrionários de ratos (H9c2).²³

Para avaliação da atividade citotóxica foram empregados os ensaios colorimétricos de MTT e vermelho neutro por 72 h de tratamento. O método de vermelho neutro baseia-se na habilidade de células viáveis em incorporar este corante em seus lisossomos.³⁸

De acordo com os protocolos do National Cancer Institute (NCI), que define que

compostos que apresentam valores de Cl_{50} menores que 15 μM são considerados ativos,³⁹ observou-se que mais da metade dos derivados hidrazônicos sintetizados por Macková e colaboradores foram ativos contra as linhagens cancerosas testadas, além de apresentarem citotoxicidade superior aos quelantes de ferro **SIH** e

desferroxamina (DFO). O composto (*E*)-*N'*-[1-(5-cloro-2-hidroxifenil)etilideno]isonicotinoilhidrazida (**3**) apresentou a melhor atividade citotóxica contra as duas linhagens cancerosas avaliadas, embora tenha sido ativo também contra a linhagem celular normal (Tabela 2).

Tabela 2. Efeito do derivado hidrazônico **3** sintetizado por Macková e colaboradores sobre a viabilidade das linhagens celulares MCF-7, HL-60 e H9c2²³

3

Composto	Cl_{50}^a (μM)		
	MCF-7 ^b	HL-60 ^b	H9c2 ^b
3	0,65 $\pm$ 0,07	0,69 $\pm$ 0,06	3,41 $\pm$ 0,63
SIH ^c	12,40 $\pm$ 0,63	5,70 $\pm$ 0,45	28,89 $\pm$ 6,74
DFO ^c	15,27 $\pm$ 1,89	27,96 $\pm$ 1,26	132,67 $\pm$ 51,79

^a Os valores são expressos em concentração inibitória média (Cl_{50}) em μM após 72 h de tratamento com os compostos em teste. Os resultados equivalem às médias de experimentos independentes $\pm$ o erro padrão.

^b Abreviações: MCF-7 – adenocarcinoma de mama; HL-60 – leucemia; H9c2 – linhagem normal de cardiomioblastos embrionários de ratos.

^c Salicilaldeído isonicotinoil hidrazona e desferroxamina, quelantes de ferro empregados como padrão comparativo.

Em 2014, três trabalhos sobre síntese e avaliação da citotoxicidade de derivados hidrazônicos foram publicados. Nair e colaboradores (2014) estudaram os efeitos de dois complexos distintos de vanádio com nicotinoil hidrazonas, sintetizados anteriormente, sobre linhagens celulares de câncer de colo de útero infectados com o papiloma vírus humano (HPV).⁵

Os complexos estudados neste trabalho foram compostos de coordenação de vanádio com benzoilpiridina nicotinoil hidrazona (**4**) e 2-hidróxi-4-metoxibenzaldeído nicotinoil hidrazona (**5**), sendo avaliados quanto ao potencial de inibição do crescimento celular

de três linhagens celulares de câncer do colo de útero: HeLa (subtipo positivo para HPV-18), SiHa (subtipo positivo para HPV-16) e C33A (não infectado por HPV). O ensaio de MTT foi empregado para a determinação da inibição do crescimento celular após 48 h de tratamento com os compostos em teste.

Embora o complexo **4** tenha apresentado valores de Cl_{50} melhores que o complexo **5** para as linhagens infectadas com HPV, nenhum dos complexos de vanádio apresentou resultados expressivos para a inibição de células cancerosas, considerando os elevados valores de Cl_{50} revelados no ensaio (Tabela 3).

Tabela 3. Efeito dos complexos **4** e **5**, avaliados por Nair e colaboradores, sobre a viabilidade de linhagens celulares cancerosas⁵

Complexo	Cl ₅₀ ^a (μM)		
	HeLa (HPV-18) ^b	SiHa (HPV-16) ^b	C33A ^b
4	100	50	>200
5	>100	100	200

^a Os valores são expressos em concentração inibitória média (Cl₅₀) em μM após 48 h de tratamento com os compostos em teste.

^b Abreviações: HeLa (HPV-18) - câncer de colo do útero (subtipo positivo para HPV-18); SiHa (HPV-16) - câncer de colo do útero (subtipo positivo para HPV-16); C33A - câncer de colo do útero (não infectado por HPV).

As enzimas topoisomerases são consideradas um importante alvo para o tratamento do câncer, tendo em vista seu papel crucial na replicação e transcrição do DNA.^{40,41} Chew e colaboradores (2014) desenvolveram e estudaram a citotoxicidade e a capacidade de inibição da enzima topoisomerase I de uma série de complexos de cobre contendo ligantes de cloreto de 5-(trifenilfosfôniometil)-salicilaldeído benzoilhidrazona (**7**) e bases heterocíclicas, tais como 1,10'-fenantrolina (**9**), 2,2'-bipiridina (**10**) e 5,5'-dimetil- 2,2'- bipiridina (**11**).⁹

Neste trabalho, a atividade citotóxica dos compostos foi estudada *in vitro* pelo ensaio de MTT por 72 h de tratamento, tendo sido empregadas as linhagens celulares: carcinoma de pulmão humano (A549), adenocarcinoma da próstata humana (PC-3) e uma linhagem celular saudável de fibroblastos humanos (MRC-5).

Uma interessante descoberta feita no estudo de Chew e colaboradores foi que o composto 5-(trifenilfosfôniometil)-salicilaldeído (**6**) não apresentou atividade citotóxica significativa, com valores de Cl₅₀ superiores a 30 μM, para as células cancerosas e normais. No entanto, este composto tornou-se citotóxico quando na forma de hidrazona (**7**), com valores de Cl₅₀ expressivos para as linhagens PC-3 e MRC-5. Além disso, os autores observaram que o respectivo complexo de cobre, [5-(trifenilfosfôniometil)-salicilaldeído benzoilhidrazonato] cobre(II) (**8**), exibiu citotoxicidade semelhante ao ligante **7** para a linhagem PC-3, embora o complexo **8** não apresentasse citotoxicidade significativa frente à linhagem de células normais (MRC-5), o que representa um importante resultado, uma vez que este complexo mostrou-se seletivo para a linhagem cancerosa. Sugerindo, portanto, que a complexação do ligante **7** ao cobre acarretou em citoseletividade (Tabela 4).

Tabela 4. Efeito dos derivados hidrazônicos sintetizados por Chew e colaboradores sobre a viabilidade das linhagens celulares A549, PC-3 e MRC-5⁹

Composto	Cl_{50}^a (μM)		
	A549 ^b	PC-3 ^b	MRC-5 ^b
6	>30	>30	>30
7	>30	14,4 $\pm$ 2,6	12,2 $\pm$ 0,6
8	>30	16,6 $\pm$ 3,1	>30
9	4,2 $\pm$ 0,8	3,2 $\pm$ 0,2	5,1 $\pm$ 0,3
10	>30	8,1 $\pm$ 0,5	12,8 $\pm$ 1,5
11	6,7 $\pm$ 1,7	4,6 $\pm$ 0,5	4,9 $\pm$ 0,1
Cis ^c	1,95 $\pm$ 0,83 ^d	0,95 $\pm$ 0,07 ^e	-

^a Os valores são expressos em concentração inibitória média (Cl_{50}) em μM após 72 h de tratamento com os compostos em teste. Os resultados equivalem às médias de experimentos independentes $\pm$ DP.

^b Abreviações: A549 - carcinoma de pulmão humano; PC-3 - adenocarcinoma da próstata humana; MRC-5 – linhagem normal de fibroblastos humanos.

^c Cisplatina, um fármaco antineoplásico de referência.

^d Ostrowska et al., 2017.⁴³

^e Hu et al., 2017.⁴⁴

Ainda no estudo de Chew e colaboradores, foi observado que a adição de outros pontos de coordenação para o complexo de cobre conduziu a um aumento na citotoxicidade dos compostos de **9** a **11**, com o menor valor de Cl_{50} , sendo 3,2 μM

para o composto **9**. A ordem de aumento da citotoxicidade dos complexos, segundo os autores, reflete a importância do sistema aromático estendido e da hidrofobicidade das diiminas na melhoria da citotoxicidade das estruturas de coordenação. Entretanto, nenhum dos compostos ensaiados apresentou citotoxicidade superior à cisplatina (Cis), um fármaco antineoplásico alquilante do DNA,^{31,42} frente às mesmas linhagens cancerosas, segundo valores obtidos por Ostrowska e colaboradores (2017) e Hu e equipe (2017).^{43,44}

Todos os compostos em teste de Chew e colaboradores mostraram-se mais tóxicos contra a linhagem celular PC-3 do que para A549. Estudos anteriores apontaram que ocorre um aumento de duas a dez vezes na concentração da enzima topoisomerase I nos tumores de próstata em comparação ao tecido benigno da próstata hiperplásica dos mesmos pacientes.⁴⁵ Consequentemente, células de carcinoma de próstata são bons modelos para estudar compostos projetados para atingir a enzima em questão. Na investigação da capacidade de inibição da topoisomerase I, os autores sugeriram que a citotoxicidade dos compostos em teste poderia estar diretamente relacionada à capacidade de inibição desta enzima, sendo o complexo **9** o composto que mostrou ser o inibidor da topoisomerase I mais ativo.

Ainda em 2014, Mahmudov e equipe prepararam e avaliaram a atividade antiproliferativa *in vitro* de dois complexos de compostos organoestânicos contendo ligantes arilhidrazonas de compostos metileno ativos (**12** e **13**).²⁶ A citotoxicidade *in vitro* foi avaliada pelo método de MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio), um ensaio colorimétrico com o mesmo princípio do teste de MTT,⁴⁶ por 48 h de tratamento, e expressa em CI_{50} em μM .

Os dois complexos foram avaliados contra duas linhagens de células cancerosas,

nomeadamente: carcinoma colo retal humano (HCT-116) e carcinoma hepatocelular humano (HepG2). Os resultados alcançados neste estudo demonstraram que os ligantes livres eram inativos, e seus complexos correspondentes eram significativamente ativos contra ambas as linhagens celulares avaliadas. Em especial, o complexo **14**, derivado do ligante **12** com $SnPh_3$, mostrou-se expressivamente mais ativo que a Cis para a linhagem HepG2, no mesmo tempo de tratamento, por confrontação com os dados de Kumar e colaboradores (2017).⁴⁷ Assim como, também, para a linhagem HCT-116, embora esta linhagem tenha sido submetida a um tempo de tratamento, com o complexo **14**, 24 h menor em relação à Cis, segundo valores obtidos por Yu e equipe (2006) (Tabela 5).⁴⁸

Kaplánek e colaboradores (2015) sintetizaram e posteriormente analisaram uma série de derivados hidrazônicos baseados no esqueleto de uma base de Tröger's,²⁸ uma unidade alifática bicíclica fundida com dois anéis aromáticos, possuindo como principais características a rigidez estrutural, e a quiralidade devido à presença de um carbono metilênico ligando os dois nitrogênios estereogênicos em sua estrutura.⁴⁹

Este estudo objetivou principalmente a avaliação do potencial anticâncer dos compostos recém-sintetizados, contudo, também foi avaliada a atividade antimicrobiana e a capacidade de complexação das hidrazonas frente a alguns íons metálicos e seus efeitos sobre o DNA. Como resultado, todos os derivados hidrazônicos sintetizados apresentaram-se ativos para pelo menos uma das linhagens cancerosas testadas pelo ensaio de MTT por 72 h de tratamento. Em contrapartida, alguns destes compostos também foram ativos para as células saudáveis.

Tabela 5. Estrutura molecular dos ligantes livres (**12** e **13**) e do complexo **14**, sintetizados por Mahmudov e equipe, e efeito deste último sobre a viabilidade das linhagens celulares HCT-116 e HepG2²⁶

Composto	Cl ₅₀ ^a (μM)	
	HCT-116 ^b	HepG2 ^b
14	0,0284 ± 0,0001	0,287 ± 0,0001
Cis ^c	4,14 ± 0,80 ^d	22,1 ± 0,19 ^e

^a Os valores são expressos em concentração inibitória média (Cl₅₀) em μM após 48 h de tratamento com os compostos em teste. Os resultados equivalem às médias de experimentos independentes ± erro padrão ou DP.

^b Abreviações: HCT-116 - carcinoma colorretal humano; HepG2 - carcinoma hepatocelular humano.

^c Doxorubicina e cisplatina, fármacos de referência.

^d Yu et al., 2006.⁴⁸

^e Kumar et al., 2017.⁴⁷

Dentre os compostos testados, os melhores resultados foram apresentados por **15**, **16** e **17**, os quais apresentaram significativa seletividade para células cancerosas. Além disso, se comparados com a Dox frente às mesmas linhagens celulares, segundo valores reportados por Joray e colaboradores (2017),⁵⁰ estes compostos

exibem muitas vezes atividade citotóxica semelhante ou mesmo superior a este fármaco de referência (Tabela 6).

O composto **15** exibiu o melhor resultado dentre estes, uma vez que apresentou índice de seletividade (IS) superior para todas as linhagens cancerosas em comparação com as linhagens de células saudáveis (Tabela 7).

Tabela 6. Efeito dos derivados hidrazônicos, **15**, **16** e **17**, sintetizados por Kapláneek e colaboradores sobre a viabilidade de linhagens celulares cancerosa²⁸

Composto	Cl ₅₀ ^a (μM)				
	CCRF-CEM ^b	CEM-DNR ^b	K562 ^b	K562-TAX ^b	A549 ^b
15	0,18 ± 0,15	2,14 ± 1,30	0,08 ± 0,05	0,21 ± 0,09	0,23 ± 0,11
16	1,58 ± 1,17	4,25 ± 1,15	2,30 ± 1,09	2,36 ± 0,84	1,24 ± 0,58
17	0,58 ± 0,53	6,29 ± 2,70	0,82 ± 1,01	10,14 ± 6,05	18,58 ± 3,10
Dox ^c	0,13 ^d	-	1,15 ^d	-	5,12 ^d
	HCT-116 ^b	HCT-116 p53-/- ^b	BJ ^b	MRC-5 ^b	
15	0,05 ± 0,04	0,06 ± 0,03	57,15 ± 20,82	0,11 ± 0,07	
16	0,64 ± 0,35	0,81 ± 0,41	54,14 ± 28,47	29,03 ± 15,12	
17	17,66 ± 6,86	25,30 ± 38,05	>100	>100	
Dox ^c	0,60 ^d	-	-	-	

^a Os valores são expressos em concentração inibitória média (Cl₅₀) em μM após 72 h de tratamento com os compostos em teste. Os resultados equivalem às médias de experimentos independentes ± DP.

^b Abreviações: CCRF-CEM - leucemia linfoblástica T; CEM-DNR - leucemia linfoblástica T, resistente a daunorubicina; K562 - leucemia mielóide aguda; K562-TAX - leucemia mielóide aguda, resistente ao paclitaxel; A549 - carcinoma de pulmão humano; HCT-116 - carcinoma colorretal humano; HCT-116 p53-/- - câncer colorretal humano, com deficiência de p53; BJ - fibroblasto humano; MRC-5 - fibroblastos de pulmão humano.

^c Doxorubicina, fármaco de referência.

^d Joray et al., 2017.⁵⁰

Tabela 7. Índice de seletividade (IS), para as linhagens de células cancerosas, dos derivados hidrazônicos **15**, **16** e **17** sintetizados por Kaplánek e colaboradores²⁸

Composto	Índice de seletividade (IS) ^a							
	CCRF-CEM ^b	CEM-DNR ^b	K562 ^b	K562-TAX ^b	A549 ^b	HCT-116 ^b	HCT-116 p53-/- ^b	ST ^c
15	162,3	13,3	357,2	137,7	123,2	622,3	495,0	68,0
16	26,3	9,8	18,1	17,6	33,6	64,9	51,0	22,1
17	172,0	15,9	121,9	9,9	5,4	5,7	4,0	8,8

^a IS = [média dos valores de Cl_{50} das linhagens celulares saudáveis BJ^d e MRC-5^d]/[valores de Cl_{50} das linhagens de células cancerosas].

^b Abreviações: CCRF-CEM - leucemia linfoblástica T; CEM-DNR - leucemia linfoblástica T, resistente a daunorubicina; K562 - leucemia mielóide aguda; K562-TAX - leucemia mielóide aguda, resistente ao paclitaxel; A549 - carcinoma de pulmão humano; HCT-116 - carcinoma colorretal humano; HCT-116 p53-/- - câncer colorretal humano, com deficiência de p53.

^c Seletividade total (ST) = [média dos valores de Cl_{50} das linhagens celulares saudáveis BJ^d e MRC-5^d]/[média dos valores de Cl_{50} de todas as linhagens de células cancerosas].

^d Abreviações: BJ - fibroblasto humano; MRC-5 - fibroblastos de pulmão humano.

Nenhum dos derivados hidrazônicos de Kaplánek e colaboradores apresentou qualquer atividade antibacteriana contra as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas avaliadas, especificamente: *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus* resistentes à meticilina (*Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus haemolyticus*) e cepas resistentes a múltiplos fármacos (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Candida crusei*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* e *Mycobacterium bovis*).

Além disso, estudos de complexação com íons metálicos demonstraram que estes compostos podem ligar-se ao Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Ni^{2+} e Zn^{2+} . E estudos de interação com o DNA mostraram que os compostos não interagem com o DNA na forma isolada, mas que os seus respectivos metalocomplexos, com Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Ni^{2+} e Zn^{2+} , interagem, ocorrendo provavelmente através de intercalação no DNA. Os autores relataram que a propriedade dos derivados hidrazônicos de

quelação de íons metálicos tem sido cada vez mais explorada, uma vez que estes compostos podem ser utilizados tanto como agentes terapêuticos para o tratamento da sobrecarga de ferro transfusional e crônica, quanto para o combate ao câncer, também por quelação de ferro, um cátion metálico indispensável para o crescimento e divisão de células cancerosas.

Do mesmo modo, Ibrahim e equipe (2016) prepararam e investigaram a atividade citotóxica *in vitro* de quatro séries de bis-isatina hidrazonas com vários substituintes contra três linhagens de células tumorais humanas, nomeadamente: HepG2, MCF-7 e HCT-116, utilizando o ensaio de MTT por 24 h de tratamento.⁵¹

A partir dos resultados obtidos concluiu-se que a grande maioria dos derivados hidrazônicos tinham propriedades citotóxicas moderadas ou fracas contra todas as linhagens celulares investigadas. Apenas um dos compostos, o *N*²,*N*⁴-bis(5-metóxi-2-oxoindolin-3-ilideno)-1,3,5-trimetil-1*H*-pirrol-

2,4-dicarbohidrazida (**18**), mostrou-se ativo empregado como referência no estudo contra as três linhagens celulares com valores (Tabela 8). de Cl_{50} semelhantes aos da Dox, fármaco

Tabela 8. Atividade citotóxica *in vitro* do derivado hidrazônico **18** sintetizado por Ibrahim e equipe contra as linhagens celulares tumorais humanas HepG2, MCF-7 e HCT-116⁵¹

Composto	Cl_{50}^a (μM)		
	HepG2 ^b	MCF-7 ^b	HCT-116 ^b
18	6,99 ± 0,88	1,84 ± 0,29	3,31 ± 0,83
Dox ^c	3,56 ± 0,56	2,57 ± 0,43	3,70 ± 0,18

^a Os valores são expressos em concentração inibitória média (Cl_{50}) em μM após 24 h de tratamento com os compostos em teste. Os resultados equivalem às médias de experimentos independentes ± DP.

^b Abreviações: HepG2 - carcinoma hepatocelular humano; MCF-7 - adenocarcinoma de mama; HCT-116 - carcinoma colorretal humano.

^c Doxorubicina, empregada como fármaco de referência.

Deng e colaboradores (2016) sintetizaram três complexos de hidrazona com cobre nas razões de 1:1 e 1:2 (metal:ligante) e avaliaram sua atividade citotóxica *in vitro* contra quatro linhagens celulares tumorais humanas: câncer de colo do útero (HeLa), A549 e A549cisR (resistente a Cis), MCF-7, e uma linhagem celular normal, a WI-38 (fibroblasto de pulmão humano).¹⁴

Neste estudo, no qual foi empregado o ensaio de MTT por 48 h de tratamento, foi observado que os três complexos hidrazona:cobre foram ativos contra todas as linhagens celulares testadas, inclusive frente à linhagem celular normal, apresentando

valores de Cl_{50} inferiores aos da Cis, utilizada no estudo como controle positivo. Entretanto, o complexo **20** foi o que apresentou a melhor resposta citotóxica para todas as linhagens celulares investigadas, com atividade superior, cerca de duas a três vezes, a dos outros dois complexos (**21** e **22**). Em adição, quando testado apenas a hidrazona livre, o composto (*E*)-*N'*-(1-(piridina-2-il)etilideno)benzohidrazida (**19**), frente às mesmas linhagens celulares, observou-se que esta não apresentou resposta citotóxica significativa para nenhuma das linhagens (Tabela 9).

Tabela 9. Estrutura molecular dos derivados hidrazônicos sintetizados por Deng e colaboradores e atividade citotóxica *in vitro* do ligante livre (**19**) e do complexo **20**, contra as linhagens celulares HeLa, A549, A549cisR, MCF-7 e WI-38¹⁴

Composto	Cl ₅₀ ^a (μM)				
	HeLa ^b	A549 ^b	A549cisR ^b	MCF-7 ^b	WI-38 ^b
19	>40	>40	>40	>40	>40
20	2,21 ± 0,02	1,27 ± 0,22	1,33 ± 0,09	1,62 ± 0,13	2,93 ± 0,28
Cis ^c	11,47 ± 1,24	20,74 ± 1,21	>40	19,39 ± 1,25	21,61 ± 1,83

^a Os valores são expressos em concentração inibitória média (Cl₅₀) em μM após 48 h de tratamento com os compostos em teste. Os resultados equivalem às médias de experimentos independentes ± DP.

^b Abreviações: HeLa - câncer de colo do útero; A549 – carcinoma de pulmão humano; A549cisR - carcinoma de pulmão humano resistente a Cis; MCF-7 - adenocarcinoma de mama; WI-38 - fibroblasto de pulmão humano.

^c Cisplatina, empregada como fármaco de referência.

Alam e Lee (2016) obtiveram por síntese e avaliaram a atividade citotóxica e antioxidante de uma série de quinze benzilideno hidrazonas.²⁹ Adicionalmente, os autores também realizaram *screening in silico* por *docking* molecular e estimaram parâmetros computacionais, tais como: *drug-likeness*, propriedades ADME (absorção, distribuição, metabolismo e excreção), perfil de toxicidade e *drug score*, a fim de se avaliar

a potencialidade dos derivados hidrazônicos para o uso como fármaco.

Os autores empregaram o ensaio colorimétrico de sulforrodamina B (SRB), o qual permite avaliar a viabilidade celular através uma estimativa do conteúdo proteico total que está relacionado ao número de células,⁵² por 48 h de tratamento, para determinação da citotoxicidade dos compostos em estudo. E utilizaram o ensaio colorimétrico de eliminação do radical DPPH

(2,2-difenil-1-picrilhidrazil), fundamentado na redução do radical DPPH pela ação de compostos redutores de radicais livres,⁵³ para avaliação da atividade antioxidante destes.

A atividade citotóxica *in vitro* foi analisada frente a quatro linhagens celulares de câncer humano, nomeadamente: A549, câncer de ovário (SK-OV-3), câncer de pele (SK-MEL-2) e câncer de cólon (HCT-15). Dos quinze derivados sintetizados, quatro apresentaram atividade citotóxica

significante, com valores de CI_{50} que variaram entre 0,024 e 17,14 μM . Dentre estes, o composto (E)-N'-(2,4-dimetoxibenzilideno)benzohidrazida (**24**) foi o que exibiu maior atividade citotóxica contra todas as linhagens celulares cancerosas, com atividade cerca de dezessete e três vezes maior contra HCT-15 e SK-OV-3, respectivamente, do que a atividade da Dox (Tabela 10).

Tabela 10. Efeito dos derivados hidrazônicos **23-26**, sintetizados por Alam e Lee sobre a viabilidade de linhagens celulares cancerosas²⁹

Comp.	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
23	H	OH	H	OH	H	H
24	H	OCH ₃	H	OCH ₃	H	H
25	OH	OH	H	H	H	H
26	H	H	H	N(CH ₃) ₂	H	H

Composto	CI_{50}^a (μM)			
	A549 ^b	SK-OV-3 ^b	SK-MEL-2 ^b	HCT-15 ^b
23	5,71	4,26	6,84	7,03
24	0,12	0,024	0,097	0,05
25	2,25	1,50	2,41	1,96
26	17,14	8,27	8,12	7,86
Dox ^c	0,021	0,074	0,001	0,872

^a Os valores são expressos em concentração inibitória média (CI_{50}) em μM após 48 h de tratamento com os compostos em teste.

^b Abreviações: A549 – carcinoma de pulmão humano; SK-OV-3 - câncer de ovário; SK-MEL-2 - câncer de pele; HCT-15 - câncer de cólon.

^c Doxorubicina, empregada como fármaco de referência.

Ao usarem as ferramentas da química computacional, Alam e Lee fizeram observações interessantes acerca da relação estrutura-atividade dos compostos sintetizados. Na ocasião, os autores observaram que a posição dos substituintes no grupo fenil desempenhava um papel

fundamental para ambas as atividades biológicas avaliadas.

Neste sentido, verificou-se que a presença de substituintes nas posições *orto* e *para* foram determinantes para a citotoxicidade dos compostos. Foi observado que a

presença de um grupo metoxila ($-\text{OCH}_3$), nas posições acima mencionadas, aumentava significativamente a atividade citotóxica, enquanto que a substituição deste por um grupo hidroxila ($-\text{OH}$), que exibe efeito doador de elétrons mais forte, conduzia a uma diminuição da atividade.

Ainda, verificou-se que quando um grupo retirador de elétrons estava presente no anel a atividade citotóxica foi significativamente diminuída. Tais observações sugeriram que uma densidade eletrônica ótima no grupo fenil dos derivados hidrazônicos em questão seria determinante para atividade citotóxica.

Nenhum dos quinze compostos sintetizados por Alam e Lee descumpriu as regras de Linpinski ou as regras de Veber, tendo, portanto, exibido bons resultados para os estudos de *drug-likeness*,

propriedades ADME, perfil de toxicidade e *drug score*. Estes resultados indicaram que os compostos mais potentes deste estudo poderiam ser considerados protótipos promissores para o desenvolvimento de agentes antineoplásicos inibidores da telomerase.

Já frente à atividade antioxidante, Alam e Lee observaram que, aparentemente, o grupo $-\text{OH}$ na posição *para* era essencial para a eliminação do radical livre DPPH. A maioria dos compostos em teste apresentou expressiva atividade antioxidante. Contudo, a maior atividade foi apresentada pelo composto (E)-N'-(3,4-dihidroxibenzilideno)benzohidrazida (**27**) (Figura 2) ($\text{Cl}_{50} = 0,60 \mu\text{M}$), o qual superou a atividade antioxidante do padrão utilizado no ensaio, o ácido ascórbico ($\text{Cl}_{50} = 0,87 \mu\text{M}$).

Figura 2. Estrutura molecular do composto **27**, sintetizado por Alam e Lee²⁹

3.3.2. Atividade antimicrobiana

Dentre os diversos motivos que justificam a necessidade da busca por novos agentes antibióticos disponíveis à terapêutica está o desenvolvimento de resistência microbiana e, conseqüentemente, a necessidade por fármacos que atuem por mecanismos de ação distintos dos medicamentos antimicrobianos convencionais.⁵⁴ Neste sentido, é possível destacar como potenciais terapêuticos das hidrazonas as atividades antibacteriana e antifúngica, sendo estas expressivamente descritas na literatura.⁵⁵⁻⁵⁷

Com o intuito de se obter novas moléculas farmacologicamente ativas, López-Torres, Zani e Mendiola (2011) sintetizaram e investigaram a atividade antimicrobiana *in*

vitro de complexos de compostos organoestânicos contendo ligantes benzil bis(benzoilhidrazona) e unidades bipyridil.⁷ No procedimento adotado, a atividade antimicrobiana foi avaliada pelo método de diluição em caldo, ensaio utilizado para determinação da concentração do composto em teste necessária para inibir o crescimento ou matar um micro-organismo.^{58,59}

A determinação da atividade antimicrobiana dos compostos em estudo foi feita contra bactérias Gram-positivas (*Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*, *Sarcina lutea*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, isolados clínicos de *Staphylococcus haemolyticus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus faecalis*,

Streptococcus faecium e cepas de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, ambas resistentes à meticilina), Gram-negativas (*Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens* e um isolado clínico de *Klebsiella pneumoniae*), leveduras (*Candida tropicalis* e *Saccharomyces cerevisiae*) e o fungo *Aspergillus niger*.

De acordo com os resultados obtidos, verificou-se que o ligante livre benzil bis(benzoilhidrazona) (**28**) e a maioria dos complexos investigados, eram isentos de

atividade antibacteriana e antifúngica. Apenas os complexos **29**, **30** e **31** (Figura 3), derivados do ligante **28** com SnBu_2 , $\text{SnBu}_2(\text{bipiridil})$ e $\text{SnBu}_2(\text{bipiridil})_2$, respectivamente, exibiram algum grau de atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas *Bacillus subtilis*, com valores de concentração inibitória mínima (CIM) entre 6 e 12 $\mu\text{g mL}^{-1}$. No entanto, estes valores foram consideravelmente superiores àquele referente ao fármaco padrão, a ampicilina (0,007 $\mu\text{g mL}^{-1}$), para a mesma cepa bacteriana.

Figura 3. Estrutura molecular do ligante livre (**28**), e dos complexos **29**, **30** e **31**, sintetizados por López-Torres, Zani e Mendiola⁷

Além disso, observou-se que todos os compostos em estudo atuaram de forma bacteriostática e fungistática, sendo suas concentrações bactericidas (CBM) e fungicidas mínimas (CFM), duas ou mais vezes superiores às correspondentes concentrações inibitórias mínimas.

No ano seguinte, Wang e equipe (2012) prepararam e avaliaram a atividade antibacteriana *in vitro*, também pelo método

de diluição em caldo, de uma série de acilhidrazonas.⁵⁷ Na ocasião, dos 30 derivados hidrazônicos sintetizados, um se destacou, o composto (*E*)-*N'*-(3,5-dicloro-2-hidroxibenzilideno)-4-hidróxi-3-metoxibenzohidrazida (**32**), o qual apresentou valores de CIM consideravelmente inferiores aos do agente antibacteriano de referência, a canamicina B, empregada como padrão no estudo, contra todas as bactérias avaliadas (Tabela 11).

Tabela 11. Atividade antimicrobiana do derivado hidrazônico **32**, sintetizado por Wang e equipe⁵⁷

Composto	CIM ^a (µg mL ⁻¹)			
	Gram-positivas		Gram-negativas	
	SA ^b	BS ^b	EC ^b	PA ^b
32	1,56	0,78	0,39	0,39
Canamicina B ^c	3,13	3,13	1,56	1,56

^a Os valores são expressos em concentração inibitória mínima (CIM) em µg mL⁻¹.

^b Abreviações: SA - *Staphylococcus aureus*; BS - *Bacillus subtilis*; EC - *Escherichia coli*; PA - *Pseudomonas aeruginosa*.

^c Canamicina B, empregada como fármaco de referência.

Adicionalmente, os compostos que apresentaram os melhores resultados para a atividade antibacteriana foram também avaliados quanto à citotoxicidade para células de rato (fibroblastos embrionários – NIH-3T3) empregando-se o ensaio de MTT. Os resultados deste ensaio evidenciaram a baixa toxicidade dos derivados hidrazônicos para células de mamífero, uma vez que os

valores de Cl₅₀ foram sempre superiores a 100 µM.

Em 2014, Altintop e colaboradores sintetizaram uma série de quatorze novos derivados tiazolil hidrazonas nitro-substituídos (Figura 4), e avaliaram suas respectivas atividades antifúngica, contra espécies patogênicas de *Candida sp.*, e sua citotoxicidade *in vitro* frente a duas linhagens celulares: a MCF-7 e a NIH-3T3.⁶⁰

Figura 4. Núcleo básico dos derivados tiazolil hidrazonas nitro-substituídos sintetizados por Altintop e colaboradores⁶⁰

O ensaio antifúngico contra *Candida sp.* foi realizado empregando-se a técnica de microdiluição em caldo, a qual possui a mesma fundamentação do método de diluição em caldo, diferindo apenas no volume empregado.⁵⁹ Na ocasião, os compostos em teste foram avaliados contra seis diferentes espécies de *Candida*, nomeadamente: *C. albicans*, *C. utilis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata*. Já a avaliação da citotoxicidade *in vitro* foi realizada empregando-se o ensaio de MTT por 24 h de tratamento frente às duas linhagens celulares anteriormente citadas.

Os autores observaram neste estudo que todos os compostos testados apresentaram baixa atividade para ambos os testes biológicos. Para avaliação da atividade antifúngica os melhores valores de CIM foram de 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$, valores

consideravelmente superiores a aqueles apresentados pelo fluconazol (1-2 $\mu\text{g mL}^{-1}$), o fármaco utilizado como padrão no ensaio. Para a atividade citotóxica, todos os compostos exibiram valores de CI_{50} superiores aos do controle positivo, a Cis (31,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$), para a linhagem celular cancerosa. Os melhores valores de CI_{50} variaram entre 102,58 e 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

No ano de 2015, dois trabalhos sobre síntese e avaliação da atividade antibiótica de derivados hidrazônicos foram publicados. Loginova e equipe (2015) sintetizaram e submeteram a análise antibacteriana e antifúngica dois complexos de prata redox-ativos com hidrazona e tiossemicarbazona derivados de 4,6-di-*terc*-butil-2,3-dihidroxibenzaldeído, compostos **33** e **34** (Figura 5).⁵⁶

Figura 5. Estrutura molecular dos ligantes livres, **33** e **34**, sintetizados por Loginova e equipe⁵⁶

A avaliação da atividade antimicrobiana dos ligantes **33** e **34** e de seus respectivos complexos de prata ($[\text{Ag}(\mathbf{33})_2]\text{NO}_3$ e $[\text{Ag}(\mathbf{34})_2]\text{NO}_3$) foi feita *in vitro* com bactérias Gram-positivas (*Bacillus subtilis*, *Sarcina lutea*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium smegmatis*), Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Salmonella typhimurium*), leveduras (*Cryptococcus laurentii*, *Lipomyces lipofer*, *Candida albicans*, *Candida boidinii*, *Candida utilis*, *Saccharomyces cerevisiae*) e fungos (*Aspergillus niger*, *Alternaria alternata*, *Mucor spp.*, *Botrytis cinerea*, *Monilia spp.*, *Fusarium spp.*, *Penicillium lividum*, *Sclerotinia sclerotiorum*).

Os complexos de prata inibiram o crescimento bacteriano, tanto das bactérias Gram-positivas quanto das Gram-negativas, a concentrações expressivamente baixas, com valores de CIM que variaram entre 0,003 e 0,004 $\mu\text{mol mL}^{-1}$. Neste contexto, a atividade antibacteriana apresentada pelos complexos mostrou-se superior a atividade de alguns antibióticos convencionais, como a sulfadiazina de prata (CIM entre 0,018 e 0,070 $\mu\text{mol mL}^{-1}$), a estreptomicina (CIM entre 0,005 e 0,172 $\mu\text{mol mL}^{-1}$), a tetraciclina (CIM entre 0,007 e 0,056 $\mu\text{mol mL}^{-1}$) e o cloranfenicol (CIM entre 0,009 e 0,039 $\mu\text{mol mL}^{-1}$), frente as mesmas cepas bacterianas.

Neste estudo foi possível observar que os complexos de prata foram mais ativos que os

seus respectivos ligantes. Isto pode ser justificado pela maior lipofilicidade dos complexos, com coeficiente de partição octanol/água ($\log P$) de $4,50 \pm 0,22$ e $4,70 \pm 0,20$ para $[\text{Ag}(\mathbf{33})_2]\text{NO}_3$ e $[\text{Ag}(\mathbf{34})_2]\text{NO}_3$, respectivamente, em comparação aos ligantes livres, com $\log P$ de $4,09 \pm 0,36$ e $3,60 \pm 0,34$ para **33** e **34**, respectivamente. Portanto, a lipofilicidade destes complexos sugere uma maior capacidade para transpor as membranas celulares e atingir o alvo farmacológico.

Dentre os complexos, o que apresentou os melhores resultados contra os micro-organismos testados foi $[\text{Ag}(\mathbf{33})_2]\text{NO}_3$ ($\text{CIM} = 0,003 \mu\text{mol mL}^{-1}$). Além disso, ambos os complexos exibiram valores de CIM menores, para *Mycobacterium smegmatis*, que a isoniazida ($\text{CIM} = 0,009 \mu\text{mol mL}^{-1}$), um medicamento antituberculose de primeira linha. Este resultado é significativo uma vez que esta micobactéria, não patogênica e de crescimento rápido, é comumente empregada como modelo de estudo, em ensaios antimicobacterianos, para *M. tuberculosis* e outras micobactérias patogênicas.⁶¹

Outro resultado deste estudo que merece destaque é a atividade comparável do complexo $[\text{Ag}(\mathbf{33})_2]\text{NO}_3$ com a da anfotericina B, isto porque o número de antibióticos antifúngicos de largo espectro eficazes e disponíveis à terapêutica é bastante limitado. Ambos, $[\text{Ag}(\mathbf{33})_2]\text{NO}_3$ e anfotericina B,

apresentaram CIM igual a $0,003 \mu\text{mol mL}^{-1}$ para todas as leveduras e fungos avaliados.

Neste mesmo ano, Rawat e Singh (2015) sintetizaram, estudaram a reatividade química, as propriedades conformacionais e espectrais e, adicionalmente, avaliaram a atividade antimicrobiana de um derivado hidrazônico, especificamente, o composto pirrol-2,5-dicarboxaldeído bis(oxaloildihidrazona) (**35**).⁸

A atividade antimicrobiana do derivado hidrazônico foi avaliada pelo ensaio de disco-difusão, o qual fundamenta-se na difusão do possível agente antimicrobiano na superfície do ágar, após a semeadura do micro-organismo ensaiado, a partir de um disco impregnado com este agente.⁶² O ensaio foi feito contra bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*), Gram-negativas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*), uma levedura (*Candida albicans*) e um fungo (*Aspergillus niger*). O derivado hidrazônico, bem como os fármacos de referência, foram ensaiados nas concentrações de 100 e 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Os resultados obtidos mostraram que o composto em estudo foi, de maneira geral, ativo contra os micro-organismos testados. Entretanto, a atividade apresentada pelo composto **35**, em diâmetro da zona de inibição em mm, foi sempre inferior aos fármacos de referência, cloranfenicol e nistatina, empregados como padrões comparativos no ensaio (Tabela 12).

Tabela 12. Atividade antimicrobiana do derivado hidrazônico **35**, sintetizado por Rawat e Singh⁸

Atividade antibacteriana								
Zona de inibição (mm) ^a								
Composto	Gram-positivas				Gram-negativas			
	SA ^b		SP ^b		EC ^b		PA ^b	
	μg mL ⁻¹		μg mL ⁻¹		μg mL ⁻¹		μg mL ⁻¹	
	100	200	100	200	100	200	100	200
35	11	18	10	17	9	17	8	17
Cloranfenicol ^c	14	20	13	20	13	23	13	19
Atividade antifúngica								
Zona de inibição (mm) ^a								
	CA ^b				AN ^b			
	μg mL ⁻¹				μg mL ⁻¹			
	100		200		100		200	
35	10		17		11		21	
Nistatina ^c	12,5		22		14		25	

^a Os valores são expressos em diâmetro da zona de inibição em mm, nas concentrações de 100 e 200 μg mL⁻¹.

^b Abreviações: SA - *Staphylococcus aureus*; SP - *Streptococcus pyogenes*; EC - *Escherichia coli*; PA - *Pseudomonas aeruginosa*; CA - *Candida albicans*; NA - *Aspergillus niger*.

^c Cloranfenicol e nistatina, fármacos de referência.

No ano seguinte, González-García e colaboradores (2016) prepararam e posteriormente analisaram a atividade antimicrobiana *in vitro*, pelo método de diluição em caldo, de quatro derivados hidrazônicos, nomeadamente: diacetil-2-(4-isopropil-3-tiossemicarbazona)-3-(3-hidróxi-

2-naftohidrazona) (**36**), diacetil-2-(4-cicloxil-3-tiossemicarbazona)-3-(3-hidróxi-2-naftohidrazona) (**37**), diacetil bis(3-hidróxi-2-naftohidrazona) (**38**), diacetil bis(4-ciclohexil-3-tiossemicarbazona) (**39**) (Figura 6) e seus respectivos complexos com compostos organoestânicos.⁵⁵

Figura 6. Estrutura molecular dos derivados hidrazônicos sintetizados por González-García e colaboradores⁵⁵

A atividade antimicrobiana destes derivados hidrazônicos foi avaliada frente a bactérias Gram-positivas (*Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*), Gram-negativas (*Escherichia coli* e *Haemophilus influenzae*), leveduras (*Candida tropicalis* e *Saccharomyces cerevisiae*) e ao fungo *Aspergillus niger*.

Dentre todos os compostos testados na forma de ligante, apenas o composto **37** apresentou atividade antibacteriana

significativa contra *Staphylococcus aureus* com CIM de $12 \mu\text{g mL}^{-1}$, embora esta atividade tenha sido expressivamente inferior à do fármaco de referência, a ampicilina ($0,15 \mu\text{g mL}^{-1}$), para a mesma cepa bacteriana. Já dentre os complexos organoestânicos avaliados, o composto **40** (Figura 7), derivado do ligante **36** com SnMe_2 , mostrou-se o mais ativo, inibindo o crescimento de *Bacillus subtilis* na concentração de $6 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Figura 7. Estrutura molecular do complexo **40**, sintetizado por González-García e colaboradores⁵⁵

Nenhum dos ligantes ou seus complexos apresentaram atividade antimicrobiana superior à da ampicilina e do miconazol, utilizados, respectivamente, como controle positivo antibacteriano e antifúngico. Em adição, os resultados obtidos pelos autores

sugerem que os compostos testados apresentaram um comportamento bacteriostático e fungistático.

3.3.3. Atividade tripanocida

Tendo em vista a escassez de fármacos clinicamente disponíveis para a quimioterapia da doença de Chagas, causada pelo protozoário parasita *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), é crescente o interesse no desenvolvimento de novos medicamentos para o tratamento desta condição patológica. Sabe-se que atualmente existem no mercado apenas dois fármacos disponíveis para o tratamento desta enfermidade: o nifurtimox e o benznidazol, os quais possuem significativos efeitos colaterais.⁶³

Em vista disto, no ano de 2009, explorando diversas modificações estruturais, Santos Filho e equipe sintetizaram uma série de *N*-acilhidrazonas e avaliaram a atividade *in vitro* desses derivados contra as formas

evolutivas epimastigota e tripomastigota do *T. cruzi*.³⁰ Adicionalmente, os autores também investigaram por *docking* molecular a interação dos derivados *N*-acilhidrazonas com a enzima cruzaina do *T. cruzi*, uma cisteína protease com funções essenciais ao parasita relacionadas à replicação e nutrição, sendo esta, portanto, um atraente alvo terapêutico.⁶³

Dentre os derivados *N*-acilhidrazonas sintetizados por Santos Filho e equipe, o composto 3-fenil-*N'*-[(4-acetamidofenil)metileno]-1,2,4-oxadiazol-5-carbohidrazida (**41**) (Figura 8) exibiu expressiva atividade tripanocida *in vitro* contra a forma evolutiva tripomastigota, com valor de Cl_{50} de 3,6 μ M, sendo esta atividade superior à do fármaco de referência, o benznidazol (5,0 μ M).

Figura 8. Estrutura molecular do derivado *N*-acilhidrazona **41**, sintetizado por Santos Filho e equipe³⁰

Ademais, o composto **41** também apresentou baixa toxicidade *in vitro*, contra células normais de camundongos (esplenócitos de camundongos - BALB/c), e *in vivo*, no ensaio de toxicidade aguda. Neste último ensaio, a *N*-acilhidrazona **41** mostrou-se não letal a camundongos a uma dose de 100 mg kg⁻¹. Em adição, sugere-se que os derivados *N*-acilhidrazonas em estudo, do ponto de vista teórico, possuem reatividade suficiente para estabelecer interações covalentes com a enzima cruzaina.

No ano seguinte, Hernandez e colaboradores (2010) fizeram um estudo de otimização estrutural e prepararam uma série de tiazolilhidrazonas com o objetivo de identificar novos inibidores não peptídicos da enzima cruzaina do *T. cruzi*.²⁴

Os resultados mostraram que dois dos derivados da série de tiazolilhidrazonas, os compostos 2-[(*p*-clorofeniltio)propilide-1-nohidrazinil]-5-metiltiazolidin-4-ona (**42**) e 2-[(feniltio)propilide-1-nohidrazinil]-5-metiltiazolidin-4-ona (**43**) (Figura 9), apresentaram-se como potentes inibidores (*in vitro*) da cruzaina, com valores de Cl_{50} de 0,2 e 0,4 μ M, respectivamente. Além disso, o derivado **43** exibiu significativa seletividade para o parasita em comparação às células normais de camundongos (BALB/c) e uma percentagem de inibição *in vitro* do crescimento do parasita na forma evolutiva epimastigota de 100% a 40 μ M, sendo esse resultado superior ao fármaco de referência, o benznidazol (97% a 40 μ M).

Figura 9. Estrutura molecular dos derivados tiazolilhidrazônicos **42** e **43**, sintetizados por Hernandez e colaboradores²⁴

3.3.4. Atividade antimalárica

O desenvolvimento intra-eritrócito de *P. falciparum*, uma das espécies de *Plasmodium* causadores da malária, é dependente de ferro e, portanto, pode ser reprimido por fármacos quelantes de ferro, tal qual a DFO.

Diante disto, Walcourt e colaboradores (2013) sintetizaram três quelantes de ferro derivados de arilhidrazonas e tiossemicarbazonas e avaliaram (*in vitro*) seus efeitos sobre a morfologia e a integridade da membrana de eritrócitos humanos não infectados, bem como, sobre o desenvolvimento intra-eritrócito do parasita *P. falciparum*.⁶⁴

No ensaio que avaliou o efeito dos três compostos sintetizados, especificamente: (*E*)-*N'*-((2-hidroxinaftalen-1-il)metileno)isonicotinohidrazida (**44**), (*E*)-2-((2-hidroxinaftalen-1-il)metileno)-*N*-metilhidrazinacarbotoamida (**45**) e (*E*)-2-((2-hidroxinaftalen-1-il)metileno)-*N*-fenilhidrazinacarbotoamida (**46**), sobre o formato de eritrócitos humanos não parasitados, os quais podem ser alterados em resposta a tratamentos químicos, foi observado que os mesmos, nas condições de incubação empregadas, não afetaram a morfologia destas células. Entretanto, o tratamento com esses compostos resultou em um ligeiro aumento na hemólise dos

eritrócitos em todas as concentrações testadas.

Com relação aos efeitos sobre o crescimento do parasita, observou-se que os três compostos sintetizados por Walcourt e colaboradores foram significativamente mais ativos na inibição do crescimento das cepas de *P. falciparum* (resistente à cloroquina - 7G8 e sensível a cloroquina - 3D7) do que a DFO, empregada como padrão. Dentre os compostos avaliados, o análogo **46** foi o quelante que exibiu os melhores resultados, com os menores valores de Cl_{50} , diferindo do composto **45** apenas pela presença de um anel aromático (Tabela 13). Isto pode estar relacionado com uma maior permeabilidade às membranas causada pelo aumento da lipofilicidade.⁶⁵

Além disso, para investigar o papel do ferro no mecanismo de inibição do crescimento do parasita, Walcourt e colaboradores avaliaram os efeitos dos complexos de ferro de **44**, **45** e **46** sobre o parasita (*P. falciparum* 3D7). Na ocasião, verificou-se um aumento significativo dos valores de Cl_{50} dos complexos em comparação aos ligantes livres. Estes resultados sugeriram, portanto, que o efeito inibitório dos quelantes no desenvolvimento e crescimento do parasita durante o ciclo de desenvolvimento intra-eritrócito é mediado, pelo menos em parte, através da ligação ao ferro intracelular do parasita e/ou da célula hospedeira.

Tabela 13. Efeito dos compostos **44**, **45** e **46**, sintetizados por Walcourt e colaboradores, sobre a inibição do crescimento do parasita *Plasmodium falciparum*⁶⁴

Composto	CI ₅₀ ^a (μM)	
	<i>P. falciparum</i> 3D7 ^b	<i>P. falciparum</i> 7G8 ^b
44	4,45 ± 1,70	4,46 ± 0,30
45	10,30 ± 4,40	10,81 ± 2,00
46	3,64 ± 2,00	2,68 ± 1,90
DFO ^c	23,43 ± 3,40	18,54 ± 4,70

^a A inibição do crescimento do parasita foi expressa em valores de concentração inibitória média (CI₅₀) em μM. Os resultados equivalem às médias de experimentos independentes ± DP.

^b Abreviações: *P. falciparum* 3D7 – cultura de *Plasmodium falciparum* sensível à cloroquina; *P. falciparum* 7G8 - cultura de *Plasmodium falciparum* resistente à cloroquina;

^c Desferroxamina, empregada como fármaco de referência.

3.3.5. Atividade anticonvulsivante

No ano de 2014, percebendo a necessidade de pesquisa e desenvolvimento de novos protótipos químicos com potencial antiepilético, Amir e colaboradores sintetizaram e avaliaram a capacidade anticonvulsivante de uma série de derivados triazina hidrazonas.⁶⁶

Na ocasião, foram utilizados dois métodos de indução de convulsão em camundongos para avaliação do potencial anticonvulsivante dos compostos em teste. Um por estímulo elétrico, eletrochoque máximo convulsivo (EMC), e outro por estímulo químico, pentilenotetrazol subcutâneo (PTZsc).

Neste ensaio, a maioria dos derivados hidrazônicos, exceto dois deles, apresentou algum grau de proteção contra as convulsões nas doses testadas (30, 100 e 300 mg kg⁻¹). Foi observado, no ensaio por EMC, que os compostos 4-[(2-(5-(3-clorobenzil)-3-fenil-1,2,4-triazin-6-il)-hidrazono)metil]-*N,N*-dimetil anilina (**47**) (4 h após a administração) e 4-[(2-(5-(4-clorobenzil)-3-fenil-1,2,4-triazin-6-il)-hidrazono)metil]-*N,N*-dimetil anilina (**48**) (30 min após a administração) apresentaram os melhores resultados, uma vez que exibiram efeitos anticonvulsivantes na menor dose testada (30 mg kg⁻¹). Estes resultados são similares aos de fármacos convencionais, como fenitoína (Fen) e carbamazepina (Carb) (Tabela 14).

Tabela 14. Atividade anticonvulsivante dos derivados hidrazônicos sintetizados por Amir e colaboradores⁶⁶ **47-51**

Composto	R ₁	R ₂	R ₃	EMC ^a mg kg ⁻¹		PTZsc ^a mg kg ⁻¹	
				0,5 h	4,0 h	0,5 h	4,0 h
47	3-Cl	H	4-N,N-Me ₂	100	30	100	100
48	4-Cl	H	4-N,N-Me ₂	30	30	100	100
49	H	H	H	100	100	-	100
50	H	H	4-N,N-Me ₂	100	100	300	100
51	4-Cl	H	4-OCH ₃	100	100	300	100
Fen. ^b	-	-	-	30	30	-	-
Carb. ^b	-	-	-	30	100	100	300

^a Foram administradas doses de 30, 100 e 300 mg kg⁻¹ por via intraperitoneal. Os valores na tabela indicam a dose mínima em que a atividade foi evidenciada em 50% ou mais dos animais. Os animais foram examinados 0,5 e 4 h após o tratamento. O traço (-) indica ausência de atividade à dose máxima administrada (300 mg kg⁻¹).

^b Fenitoína e carbamazepina, empregados como fármacos de referência.

Uma observação interessante descrita pelos autores, a respeito da relação estrutura-atividade desses compostos, é que a presença de grupos doadores de elétrons na porção benzilideno e grupos retiradores de elétrons na porção benzil produziram compostos anticonvulsivantes mais ativos.

Todos os compostos sintetizados por Amir e colaboradores que apresentaram boa atividade anticonvulsivante nos ensaios de EMC e PTZsc, foram também avaliados quanto aos seus efeitos de comprometimento motor, empregando-se o teste de *rotarod*, o qual avalia o desempenho motor dos animais a partir do equilíbrio

destes sobre um aparelho cilíndrico em rotação automática.⁶⁷ Apenas três dos compostos induziram déficit neurológico na maior dose testada (300 mg kg⁻¹) e após 4 h da administração.

Ainda, considerando-se que as principais desvantagens terapêuticas dos fármacos antiepilépticos são seus efeitos depressores do sistema nervoso central (SNC), alguns dos compostos que apresentaram significativa atividade anticonvulsivante foram também investigados quanto aos seus efeitos depressores do SNC pelo teste de natação forçada. Nesse ensaio os animais são submetidos à natação em um tanque

cilíndrico para análise do comportamento de luta ou imobilidade frente à impossibilidade de fuga.⁶⁸

Os compostos 4-[[2-(5-(3-clorobenzil)-3-fenil-1,2,4-triazin-6-il)-hidrazono]metil]-*N,N*-dimetil anilina (**47**), 4-[[2-(5-(4-clorobenzil)-3-fenil-1,2,4-triazin-6-il)-hidrazono]metil]-*N,N*-dimetil anilina (**48**), 5-Benzil-6-[2-(benzilideno)hidrazinil]-3-fenil-1,2,4-triazina (**49**), 5-Benzil-6-[2-(4-*N,N*-dimetilaminobenzilideno)-hidrazinil]-3-fenil-1,2,4-triazina (**50**) e 5-(4-clorobenzil)-6-[2-(4-metoxibenzilideno)-hidrazinil]-3-fenil-1,2,4-triazina (**51**), exibiram, respectivamente, um aumento de 62,41, 57,78, 94,39, 120,47 e 24,83% no tempo de imobilidade dos animais em relação ao grupo controle. Enquanto que o fármaco padrão, a carbamazepina, exibiu um aumento de 63,35% no tempo de imobilidade dos animais. Logo, os derivados hidrazônicos, **47** (62,41%), **48** (57,78%) e **51** (24,83%) apresentaram efeitos depressores do SNC menores do que a carbamazepina (63,35%).

Além disso, os dois compostos mais potentes da série de Amir e colaboradores (análogos **47** e **48**) foram investigados quanto à sua relação com os níveis de ácido γ -aminobutírico (GABA) no cérebro dos animais tratados. Nesta análise observou-se que os compostos em teste aumentaram significativamente os níveis de GABA quando comparados com os animais controle. Estes resultados sugeriram que os compostos em questão também podiam exercer atividade anticonvulsivante através de um mecanismo mediado pelo GABA.

Por fim, os compostos **47** e **48** também foram avaliados quantitativamente quanto à sua atividade anticonvulsivante (dose efetiva a 50% - DE_{50}) e efeito de comprometimento motor (dose tóxica a 50% - DT_{50}). No ensaio por EMC, os análogos **47** e **48** apresentaram atividade anticonvulsivante com valores de DE_{50} de 54,31 e 46,05 mg kg⁻¹, respectivamente, sendo tais valores

inferiores ao do valproato de sódio (DE_{50} = 272 mg/kg), um fármaco de referência. Enquanto que no ensaio de PTZsc, **47** e **48** apresentaram atividade anticonvulsivante com valores de DE_{50} de 92,01 e 83,90 mg kg⁻¹, respectivamente, valores estes expressivamente inferiores a aqueles apresentados pelos três fármacos de referência (Tabela 15). Além disso, os valores de DT_{50} para ambos os compostos também foram consideravelmente superiores a aqueles dos fármacos padrão.

3.3.6. Atividade antidepressiva

Oliveira e colaboradores reportaram, no ano de 2011, a síntese e avaliação de uma série de sulfonamidas e sulfonyl-hidrazonas quanto a seus respectivos efeitos antidepressivos.¹⁵

O efeito antidepressivo destes compostos foi avaliado pelos testes de natação forçada e suspensão de calda em camundongos. O teste de suspensão de calda baseia-se na observação do comportamento do animal suspenso, o qual pode ser de agitação (luta) ou imobilidade.⁶⁹ O parâmetro comportamental observado nestes testes é a redução do tempo de imobilidade do animal, o que é indicativo da atividade antidepressiva. Após o tratamento com os compostos em teste e fármacos de referência, este parâmetro foi medido em percentagem quando comparado aos grupos controle.

Dos compostos investigados, a sulfonyl-hidrazona **52** (Figura 10) apresentou-se como o antidepressivo mais ativo, com 72,02% de atividade na concentração de 60 mg kg⁻¹, sendo este composto mais ativo que a imipramina, um agente antidepressivo clássico, embora esta exerça seu efeito antidepressivo a uma concentração significativamente menor em relação ao composto em teste (10 mg kg⁻¹).

Tabela 15. Avaliação quantitativa da atividade anticonvulsivante dos derivados hidrazônicos **47** e **48**, sintetizados por Amir e colaboradores⁶⁶

Composto	DE ₅₀ ^a (mg kg ⁻¹)		
	EMC	PTZsc	DT ₅₀ ^b (mg kg ⁻¹)
47	54,31	92,01	435,32
48	46,05	83,90	360,43
Fen. ^c	9,5	>300	65,5
Carb. ^c	8,8	>100	71,6
Valp. ^c	272	149	426

^a Dose efetiva a 50% (DE₅₀) em miligramas por quilograma (mg kg⁻¹) de massa corporal.

^b A dose tóxica a 50% (DT₅₀) foi determinada por teste de *rotarod* 30 min após a administração dos fármacos em teste. Os valores são apresentados em mg kg⁻¹.

^c Fenitoína, carbamazepina e valproato de sódio, empregados como fármacos de referência.

Figura 10. Estrutura molecular da sulfonil-hidrazona **52**, sintetizada por Oliveira e colaboradores¹⁵

Em adição, dos nove derivados hidrazônicos sintetizados, quatro deles apresentaram efeito próximo ao do antidepressivo imipramina. Contudo, nenhum dos compostos testados apresentou eficácia superior à fluoxetina, outro antidepressivo convencional com atividade superior a da imipramina. A análise da

relação estrutura-atividade dos compostos sintetizados indicou que o grupo benzilnaftalimida seria importante para a atividade antidepressiva dos compostos investigados, embora o mecanismo molecular de ação não tenha sido proposto.

3.3.7. Atividade anti-inflamatória

Na busca por candidatos anti-inflamatórios mais potentes, inovadores e com menos efeitos colaterais, El-Sayed e equipe (2011) prepararam uma série de novos derivados de arilhidrazonas e 1,5-difenil pirazóis com o objetivo de desenvolver inibidores específicos para a enzima ciclo-oxygenase-2 (COX-2).²⁵

Nesta ocasião, os compostos sintetizados tiveram a atividade anti-inflamatória aguda avaliada *in vivo* empregando-se o modelo de edema de pata induzido por carragenina. Além disso, tais compostos também foram investigados quanto à atividade inibitória das isoformas 1 e 2 da enzima ciclo-oxygenase (COX) utilizando um ensaio de inibição *in vitro* da COX.

Dos dezenove compostos sintetizados, o derivado hidrazônico 1-(4-clorofenil)-2-(2-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)hidrazona)-4,4,4-trifluorobutano-1,3-diona (**58**) foi o agente anti-inflamatório mais potente do estudo, uma vez que exibiu uma percentagem de inibição do edema, no teste *in vivo*, de 88,4% na dose de 200 mg kg⁻¹ por via intraperitoneal, após 2 h de tratamento. Além de ter apresentado DE₅₀ de 112 mg kg⁻¹, sendo este valor menor que o do fármaco de referência empregado como padrão no ensaio, o diclofenaco sódico (114 mg kg⁻¹).

No teste *in vitro* realizado por El-Sayed e equipe, nenhum dos compostos apresentou inibição da COX-1 até 50 µM. No entanto, a

maioria dos compostos em teste exibiu uma expressiva inibição da COX-2. O derivado hidrazônico **58** apresentou uma das atividades mais potentes para a inibição da COX-2, com CI₅₀ de 0,45 µM e IS de 111,1, valores estes expressivos, se comparados com os do inibidor seletivo da COX-2, o celecoxibe (CI₅₀ = 0,30 µM; IS = 166,7) (Tabela 16).

De acordo com a avaliação estrutural-atividade dos compostos em teste, observou-se que a presença de grupos substituintes retiradores de elétrons no grupo fenil dos derivados hidrazônicos, como ocorre para os compostos **53** a **56**, conduzia a uma seletividade para a isoforma 2 da ciclo-oxygenase. Em contrapartida, a presença de substituintes doadores de elétrons no grupo fenil destes, tal como a metoxila no composto **57**, resultou na redução da seletividade para a COX-2. Tais resultados sugerem a importância do efeito eletrônico sobre os derivados hidrazônicos.

Ainda, no estudo por *docking* molecular, os autores observaram que a seletividade do composto **58** para a COX-2 seria justificada pela interação, orientada por seu fragmento 3,5-ditrifluorometilfenil, no bolso lateral hidrofílico da enzima (Figura 11). Esta porção da molécula, bem como outros grupos, estaria envolvida com a formação de ligações de hidrogênio com os resíduos de aminoácidos da enzima, fato que proporcionaria estabilidade a interação ligante-enzima.

Tabela 16. Avaliação *in vitro* da atividade inibitória das isoformas 1 e 2 da enzima ciclo-oxigenase (COX) pelos derivados hidrazônicos **53-58**, sintetizados por El-Sayed e equipe²⁵

	Comp.	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
53	Cl	H	H	H
	54	H	H	Cl	H
	55	H	H	Br	H
	56	H	H	NO ₂	H
	57	H	H	OCH ₃	H
	58	H	CF ₃	H	CF ₃

Composto	CI ₅₀ ^a (μM)		
	COX-1	COX-2	IS ^b
53	>50	0,90	54,9
54	>50	0,91	54,9
55	>50	0,91	54,9
56	>50	0,90	54,9
57	>50	2,95	16,9
58	>50	0,45	111,1
Diclofenaco ^c	0,16	2,5	0,06
Celecoxibe ^d	>50	0,30	166,7

^a Valores de concentração inibitória média (CI₅₀) da COX-1 ou COX-2 em μM. Os resultados equivalem às médias de experimentos independentes.

^b Índice de seletividade (valores de CI₅₀ da COX-1/valores de CI₅₀ da COX-2).

^c Diclofenaco sódico, fármaco anti-inflamatório não seletivo da COX;

^d Celecoxibe, fármaco anti-inflamatório seletivo para a COX-2.

Figura 11. Estrutura molecular do derivado hidrazônico **58** sintetizado por El-Sayed e equipe.²⁵
O fragmento 3,5-ditrifluorometilfenil está em destaque

3.3.8. Atividade cardioprotetora

As antraciclina, como a daunorrubicina (Dau) e a Dox, estão entre os fármacos antineoplásicos mais empregados no tratamento de uma ampla variedade de cânceres, embora suas cardiotoxicidades gerem certos limites para suas utilizações na terapêutica.⁷⁰ A produção de espécies reativas de oxigênio mediada pelo ferro é uma das linhas de justificativa para a cardiotoxicidade das antraciclina. E,

portanto, a quelação de ferro intracelular por agentes quelantes estaria relacionada à cardioproteção.

Diante disto, Simunek e equipe (2008) sintetizaram o composto **59** (Figura 12), denominado salicilaldeído isonicotinoil hidrazona, e investigaram sua capacidade de proteção de células cardíacas tratadas com Dau.²¹ A toxicidade celular foi avaliada *in vitro* pela liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH) por 48 h de tratamento com os compostos em teste.

Figura 12. Estrutura molecular do derivado hidrazônico **59**, sintetizado por Simunek e equipe²¹

Os autores avaliaram inicialmente os efeitos do composto **59** (0,3-100 μM) contra a lesão celular oxidativa induzida por 500 μM de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Nesta ocasião observou-se que o composto **59** protegia, de maneira dose-dependente, os cardiomiócitos ventriculares neonatais de ratos. Tendo sido observado proteção completa em concentrações deste composto $\geq 10 \mu\text{M}$.

Posteriormente avaliou-se os efeitos do derivado hidrazônico **59** nas concentrações de 3 e 100 μM , sobre a viabilidade celular de cardiomiócitos após 48 h de incubação com 10 μM de Dau. Como resultado, observou-se que a presença do derivado **59** aumentou o número de células viáveis. No entanto, a percentagem de células viáveis foi mais acentuada com a menor concentração deste composto, ou seja, de 3 μM (24%), do que com 100 μM (16%). Isto é, o composto **59** apresentou citoproteção à baixa concentração, embora esta proteção tenha sido apenas parcial e sem dependência da dose.

Adicionalmente, no ensaio de avaliação da toxicidade *in vitro* do composto **59**, os

autores observaram que este não apresentou citotoxicidade a concentrações inferiores a 3 μM . Contudo, acima dessa concentração, este derivado hidrazônico induzia um aumento, dose-dependente, na liberação de LDH.

Além disso, no ensaio de avaliação dos efeitos do composto **59** sobre a atividade antiproliferativa de Dau, frente a uma linhagem celular cancerosa (HL-60), verificou-se que este composto não diminuía a eficácia antiproliferativa de Dau. Contrariamente, em concentrações que reduziram a cardiotoxicidade de Dau, o composto **59** aumentou sua ação antiproliferativa. Os valores de CI_{50} para a atividade antiproliferativa do derivado hidrazônico **59** foram de 4,70 e 4,66 μM para este isoladamente, e em combinação com Dau, respectivamente. Este resultado indica uma ação sinérgica ou aditiva entre os compostos.

Três anos mais tarde, objetivando explorar a cardiotoxicidade, catalisada pelo ferro, de catecolaminas, Hasková e colaboradores (2011) realizaram um estudo centrado na investigação do papel do íon ferro no processo de oxidação espontânea de

duas catecolaminas, a epinefrina fisiológica e a isoprenalina sintética, e suas toxicidades frente a uma linhagem celular de cardiomioblastos embrionários de rato (H9c2).²⁰

Além disso, os autores Hasková e colaboradores (2011), assim como Simunek e equipe (2008) também sintetizaram e analisaram o potencial cardioprotetor do salicilaldeído isonicotinoil hidrazona, o composto **59**, em razão de suas propriedades quelante e antioxidante, bem como, sua baixa toxicidade.

Neste estudo constatou-se que, de fato, os intermediários de oxidação das catecolaminas, e não as mesmas isoladamente, é que estavam diretamente envolvidas com a lesão oxidativa dos cardiomiócitos. Além disso, a partir dos resultados obtidos, os autores sugeriram que os íons ferro redox-ativos são importantes catalisadores da conversão de catecolaminas em produtos de oxidação. Tendo, portanto, o composto **59**, um quelante de ferro, apresentado potencial considerável para proteção de células cardíacas.

Neste mesmo contexto, Hrusková e equipe (2016) sintetizaram uma série de análogos do composto **59** e analisaram o potencial destes para a quelação de ferro.²²

Neste estudo, os autores também avaliaram a atividade anti- ou pró-oxidante dos análogos, suas respectivas capacidades de proteção do tecido cardíaco contra lesão oxidativa, além da toxicidade, e atividade antiproliferativa frente a algumas linhagens de células cancerosas.

Inicialmente os autores compararam as atividades quelantes de ferro do quelante adotado como referência, o composto **59**, e de seus análogos recém-sintetizados empregando o ensaio da calceína, o qual baseia-se na determinação da intensidade de fluorescência da calceína, um composto fluorescente que complexa facilmente com íons ferro, o que diminui sua fluorescência. Assim, à medida que um agente quelante de ferro remove o ferro complexado a calceína ocorre um aumento da intensidade de sua fluorescência na forma livre.²²

A eficiência de quelação dos compostos ensaiados foi expressa em porcentagem, em comparação a atividade do quelante de referência, o composto **59**. Deste modo, verificou-se que todos os derivados hidrazônicos apresentaram atividade superior a 70% da atividade do composto **59**, exceto um deles, o (*E*)-*N'*-[1-(2-hidroxifenil)etilideno]-(bifenil)-4-carbohidrazida (**60a**) (Figura 13), o qual alcançou apenas 7% da atividade da hidrazona de origem.

Figura 13. Estrutura molecular dos análogos do composto **59**, sintetizados por Hrusková e equipe²²

Ademais, tendo em vista que um dos possíveis mecanismos de atividade antitumoral de compostos quelantes de ferro seriam suas propriedades pró-oxidantes, a capacidade desses ligantes em formar complexos redox-ativos foi investigada pelo ensaio de oxidação do ascorbato, o qual fundamenta-se na avaliação espectrofotométrica da taxa de oxidação do ascorbato induzida por íons férricos.²⁰

Neste ensaio, constatou-se que os derivados hidrazônicos contendo bifenil e naftil, ou seja, os compostos **60a**, (*E*)-*N'*-[1-(2-Hidroxifenil)propilideno]-bifenil-4-carbohidrazida (**61a**), (*E*)-*N'*-[1-(2-Hidroxifenil)etilideno]-1-naftoilhidrazida (**60b**) e (*E*)-*N'*-[1-(2-Hidroxifenil)propilideno]-1-naftoilhidrazida (**61b**), não apresentaram perfis antioxidante ou pró-oxidante, tendo exibido taxa de oxidação do ascorbato, em percentagem, semelhantes aos do grupo controle (100% sem a presença de agentes quelantes). Os demais compostos exibiram significativa atividade antioxidante, com níveis de oxidação do ascorbato de 10 a 44%, resultados estes comparáveis ao quelante de ferro convencional, a DFO, que apresentou taxa de oxidação do ascorbato de 16%.

Em seguida, Hrusková e equipe estudaram a capacidade de proteção de células do tecido cardíaco contra lesão oxidativa induzida por H₂O₂ de seus análogos sintéticos. Tal capacidade de proteção foi determinada após 24 h de co-incubação da linhagem celular H9c2 com as substâncias em teste e 200 µM de H₂O₂, sendo expressa em valores de CE₅₀ (concentração que reduz a citotoxicidade induzida pelo H₂O₂ em 50% em relação ao controle não tratado).

O análogo (*E*)-*N'*-[1-(2-Hidroxifenil)propilideno]piridazina-4-carbohidrazida (**61d**), neste ensaio, demonstrou o valor de CE₅₀ (25,0 ± 1,5 µM) mais expressivo da série, o que aponta algum grau de proteção celular (Tabela 17). Na

continuação dos estudos, no ensaio de toxicidade às células saudáveis, a maioria dos produtos de síntese apresentaram valores de Cl₅₀ elevados, indicando que esses análogos são menos tóxicos que o composto **59** (Cl₅₀ = 28,9 ± 6,7 µM). Nesta ocasião, foi observada uma combinação interessante entre efeito protetor e toxicidade para o composto **61d**, o qual apresentou valor de CE₅₀ de 25,0 µM e Cl₅₀ superior a 200 µM (Tabela 17). Embora estes valores não sejam diretamente comparáveis, em razão dos diferentes tempos de incubação das linhagens nos dois ensaios, os autores consideraram que esta razão é uma estimativa aproximada da seletividade da ação protetora do composto em questão.

Na avaliação da atividade antiproliferativa dos análogos sintetizados por Hrusková e equipe, empregando-se o ensaio de MTT frente a duas linhagens celulares malignas, especificamente, MCF-7 e HL-60, após 72 h de incubação, verificou-se que a maioria dos compostos apresentou expressivos valores de Cl₅₀ para ambas as linhagens cancerosas, embora alguns tenham apresentado toxicidade não específica para células malignas. Curiosamente, o composto **61d**, que mostrou atividade protetora considerável, também apresentou boa atividade antiproliferativa e expressiva seletividade para células malignas (Tabela 17).

Finalmente, alguns dos análogos que apresentaram os melhores resultados nas análises anteriores realizadas por Hrusková e equipe foram, adicionalmente, estudados quanto à sua estabilidade no plasma *in vitro*. Os resultados foram expressos em percentagem do composto que permaneceu no plasma durante o período de incubação de 10 h. Todos os ligantes estudados exibiram boa estabilidade hidrolítica no plasma, com percentagens que variaram entre 41 e 95%.

Tabela 17. Atividade cardioprotetora e antiproliferativa do derivado hidrazônico **61d**, sintetizado por Hrusková e equipe²²

Comp.	CE ₅₀ ^a (μM)	CI ₅₀ ^b (μM)			CI ₅₀ ^c (μM)	
	H9c2 ^d	H9c2 ^d	MCF-7 ^d	HL-60 ^d	H9c2/MCF-7	H9c2/HL-60
61d	25,0 ± 1,5	>200	14,9 ± 4,8	9,1 ± 0,6	>13	>21
59^e	18,2	28,9 ± 6,7	12,4 ± 0,6	5,7 ± 0,5	2,3	5,1

^a Valores de CE₅₀ (concentração que reduziu a toxicidade, induzida por 200 μM de H₂O₂, em 50% em relação ao controle não tratado) em μM. Os resultados equivalem às médias de experimentos independentes ± DP.

^b Os valores são expressos em concentração inibitória média (CI₅₀) em μM. Os resultados equivalem às médias de experimentos independentes ± DP.

^c As razões dos valores de CI₅₀ para células H9c2/valores de CI₅₀ para células cancerosas, indicam a seletividade da ação antiproliferativa.

^d Abreviações: H9c2 – cardiomioblastos embrionários de rato; MCF-7 - adenocarcinoma de mama; HL-60 – Leucemia.

^e Salicilaldeído isonicotinoil hidrazona, composto de origem da série de Hrusková e equipe.

4. Considerações Finais

Dos artigos científicos publicados na última década (2006-2016) e avaliados nesta revisão sistemática, os quais o objeto de estudo era a avaliação do potencial biológico de hidrazonas obtidas sinteticamente, mais de 80% deles apresentaram resultados positivos e promissores para a atividade avaliada. E menos de 15% dos artigos em estudo exibiram resultados inexpressivos. Em adição, do total de trabalhos que apontaram resultados positivos, mais da metade deles apresentaram pelo menos um derivado hidrazônico com resultados mais potentes que fármacos convencionais ou substâncias padrões empregadas como referência.

Além disso, de maneira geral, esta revisão sistemática tornou mais perceptível a relação e a importância das propriedades de coordenação dos derivados hidrazônicos para as atividades avaliadas. Quer seja pela observação de que os complexos metálicos com derivados hidrazônicos algumas vezes superam a atividade de seu ligante de origem, quer seja pelos possíveis mecanismos de ação envolvidos com as atividades biológicas desses compostos, que parecem estar relacionados com a coordenação com íons biologicamente importantes. Nesse sentido, é seguro afirmar que hidrazonas sintéticas são substâncias orgânicas promissoras para a pesquisa e desenvolvimento de novos protótipos químicos visando a descoberta de novos fármacos.

Lista de abreviaturas e siglas

A549	Linhagem celular de carcinoma de pulmão humano
A549cisR	Linhagem celular de carcinoma de pulmão humano resistente a cisplatina
BALB/c 2	Linhagem celular de esplenócitos de camundongo
BJ 3	Linhagem celular de fibroblasto humano
CCRF-CEM	Linhagem celular de leucemia linfoblástica T
CEM-DNR	Linhagem celular de leucemia linfoblástica T resistente a daunorubicina
Cis	Cisplatina
C33A	Linhagem celular de câncer de colo do útero não infectado por HPV
Dau	Daunorubicina
DFO	Desferroxamina
Dox	Doxorubicina
EMC	Eletrochoque máximo convulsivo
HCT-116	Linhagem celular de carcinoma colorretal humano
HCT-116 p53-/-	Linhagem celular de câncer colorretal humano com deficiência de p53
HCT-15	Linhagem celular de câncer de cólon humano
HeLa	Linhagem celular de câncer de colo do útero
HeLa (HPV-18)	Linhagem celular de câncer de colo do útero, subtipo positivo para HPV-18
HepG2	Linhagem celular de carcinoma hepatocelular humano
HL-60	Linhagem celular de leucemia humana
H9c2	Linhagem celular de cardiomioblastos embrionários de rato
IS	Índice de Seletividade
KB-V1/Vbl	Linhagem celular de carcinoma de colo do útero humano resistente a múltiplos fármacos
K562	Linhagem celular de leucemia mielóide aguda
K562-TAX	Linhagem celular de leucemia mielóide aguda resistente ao paclitaxel
MCF-7	Linhagem celular de adenocarcinoma de mama humana
MCF-7/Topo	Linhagem celular de carcinoma de mama humana resistente a múltiplos fármacos
MRC-5	Linhagem celular de fibroblastos humanos
MTT	Brometo de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
PC-3	Linhagem celular de adenocarcinoma da próstata humana
<i>P. falciparum</i> 3D7	Cultura de <i>Plasmodium falciparum</i> sensível à cloroquina
<i>P. falciparum</i> 7G8	Cultura de <i>Plasmodium falciparum</i> resistente à cloroquina
PTZsc	Pentilenotetrazol subcutâneo
SIH	Salicilaldeído isonicotinoil hidrazona
SiHa (HPV-16)	Linhagem celular de câncer de colo do útero, subtipo positivo para HPV-16
SK-OV-3	Linhagem celular de câncer de ovário humano
SK-MEL-2	Linhagem celular de câncer de pele humana
WI-38	Linhagem celular de fibroblasto de pulmão humano
518A2	Linhagem celular de melanoma humano

Referências Bibliográficas

- acilidrazonas: novos compostos-protótipos de fármacos analgésicos, antiinflamatórios e anti-trombóticos. *Química Nova* **2002**, 25, 129. [CrossRef]
- ¹ Barreiro, E. J.; Fraga, C. A. M.; Miranda, A. L. P.; Rodrigues, C. R. A química medicinal de N-

- ² Alam, M. S.; Lee, D-U. Syntheses, crystal structure, Hirshfeld surfaces, fluorescence properties, and DFT analysis of benzoic acid hydrazone Schiff bases. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2015**, *145*, 563. [CrossRef] [PubMed]
- ³ El-Gammal, O. A. Mononuclear and binuclear complexes derived from hydrazone Schiff base NON donor ligand: Synthesis, structure, theoretical and biological studies. *Inorganica Chimica Acta* **2015**, *435*, 73. [CrossRef]
- ⁴ Khanmohammadi, H.; Abnosi, M. H.; Hosseinzadeh, A.; Erfantalab, M. Synthesis, biological and computational study of new Schiff base hydrazones bearing 3-(4-pyridine)-5-mercapto-1,2,4-triazole moiety. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2008**, *71*, 1474. [CrossRef] [PubMed]
- ⁵ Nair, R. S.; Kuriakose, M.; Somasundarama, V.; Shenoi, V.; Kurup, M. R. P.; Srinivas, P. The molecular response of vanadium complexes of nicotinoyl hydrazine in cervical cancers—A possible interference with HPV oncogenic markers. *Life Sciences* **2014**, *116*, 90. [CrossRef] [PubMed]
- ⁶ Sugiura, M.; Kobayashi, S. *N*-Acyldhydrazones as versatile electrophiles for the synthesis of nitrogen-containing compounds. *Angewandte Chemie International Edition* **2005**, *44*, 5176. [CrossRef] [PubMed]
- ⁷ López-Torres, E.; Zani, F.; Mendiola, M. A. Antimicrobial activity of organotin(IV) complexes with the ligand benzyl bis(benzoylhydrazone) and 4,4'-bipyridyl as coligand. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2011**, *105*, 600. [CrossRef] [PubMed]
- ⁸ Rawat, P.; Singh, R. N. Assessment of conformational, spectral, antimicrobial activity, chemical reactivity and NLO application of Pyrrole-2,5-dicarboxaldehyde bis(oxaloyldihydrazone). *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2015**, *140*, 344. [CrossRef] [PubMed]
- ⁹ Chew, S. T.; Lo, K. M.; Lee, S. K.; Heng, M. P.; Teoh, W. Y.; Sim, K. S.; Tan, K. W. Copper complexes with phosphonium containing hydrazone ligand: topoisomerase inhibition and cytotoxicity study. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2014**, *76*, 397. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁰ Yang, Z-Y.; Wang, B-D.; Li, Y-H. Study on DNA-binding properties and cytotoxicity in L_{1210} of La(III) complex with PMBP-isonicotinoyl hydrazine. *Journal of Organometallic Chemistry* **2006**, *691*, 4159. [CrossRef]
- ¹¹ Despaigne, A. A. R.; Vieira, L. F.; Mendes, I. C.; Costa, F. B.; Speziali, N. L.; Beraldo, H. Organotin(IV) complexes with 2-acetylpyridine benzoyl hydrazones: antimicrobial activity. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2010**, *21*, 1247. [CrossRef]
- ¹² Ferraresi-Curotto, V.; Echeverría, G. A.; Piro, O. E.; Pis-Diez, R.; González-Baró, A. C. Synthesis and characterization of a series of isoniazid hydrazones. Spectroscopic and theoretical study. *Journal of Molecular Structure* **2017**, *1133*, 436. [CrossRef]
- ¹³ Congiu, C.; Onnis, V. Synthesis and biological evaluation of novel acylhydrazone derivatives as potential antitumor agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2013**, *21*, 6592. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁴ Deng, J.; Gou, Y.; Chen, W.; Fu, X.; Deng, H. The Cu/ligand stoichiometry effect on the coordination behavior of aroyl hydrazone with copper(II): Structure, anticancer activity and anticancer mechanism. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2016**, *24*, 2190. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁵ Oliveira, K. N.; Costa, P.; Santin, J. R.; Mazzambani, L.; Bürger, C.; Mora, C.; Nunes, R. J.; Souza, M. M. Synthesis and antidepressant-like activity evaluation of sulphonamides and sulphonyl-hydrazones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2011**, *19*, 4295. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁶ Yu, X.; Shi, L.; Ke, S. Acylhydrazone derivatives as potential anticancer agents: synthesis, bio-evaluation and mechanism of action. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2015**, *25*, 5772. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁷ Costa, F. N.; Silva, T. F.; Silva, E. M. B.; Barroso, R. C. R.; Braz, D.; Barreiro, E. J.; Lima, L. M.; Punzog, F.; Ferreira, F. F. Structural features evolution – from fluids to solid

phase – and crystal morphology study of LASSBio 1601: a cyclohexyl-*N*-acylhydrazone derivative. *RSC Advances*, **2015**, *5*, 39889. [CrossRef]

¹⁸ Carey, F. A.; Sundberg, R. J. *Advanced Organic Chemistry*, 5a. ed., Springer: Charlottesville, 2007. [Link]

¹⁹ Cachiba, T. H.; Carvalho, B. D.; Carvalho, D. T.; Cusinato, M.; Prado, C. G.; Dias, A. L. T. Síntese e avaliação preliminar da atividade antibacteriana e antifúngica de derivados *N*-acilidrazônicos. *Química Nova* **2012**, *35*, 1566. [CrossRef]

²⁰ Hasková, P.; Kovariková, P.; Koubková, L.; Vávrová, A.; Macková, E.; Simunek, T. Iron chelation with salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone protects against catecholamine autoxidation and cardiotoxicity. *Free Radical Biology & Medicine* **2011**, *50*, 537. [CrossRef] [PubMed]

²¹ Simunek, T.; Sterba, M.; Popelová, O.; Kaiserová, H.; Adamcová, M.; Hroch, M.; Hasková, P.; Ponka, P.; Gersl, V. Anthracycline toxicity to cardiomyocytes or cancer cells is differently affected by iron chelation with salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone. *British Journal of Pharmacology* **2008**, *155*, 138. [CrossRef]

²² Hrusková, K.; Potucková, E.; Hergeselová, T.; Liptáková, L.; Hasková, P.; Mingas, P.; Kovariková, P.; Simunek, T.; Vávrová, K. Aroylhydrazone iron chelators: Tuning antioxidant and antiproliferative properties by hydrazide modifications. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2016**, *120*, 97. [CrossRef] [PubMed]

²³ Macková, E.; Hrusková, K.; Bendová, P.; Vávrová, A.; Jansová, H.; Hasková, P.; Kovariková, P.; Vávrová, K.; Simunek, T. Methyl and ethyl ketone analogs of salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone: novel iron chelators with selective antiproliferative action. *Chemico-Biological Interactions* **2012**, *197*, 69. [CrossRef] [PubMed]

²⁴ Hernandez, M. Z.; Rabello, M. M.; Leite, A. C. L.; Cardoso, M. V. O.; Moreira, D. R. M.; Brondani, D. J.; Simone, C. A.; Reis, L. C.; Souza, M. A.; Pereira, V. R. A.; Ferreira, R. S.; McKerrow, J. H. Studies toward the structural optimization of novel thiazolylhydrazone-

based potent antitrypanosomal agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2010**, *18*, 7826. [CrossRef] [PubMed]

²⁵ El-Sayed, M. A. A.; Abdel-Aziz, N. I.; Abdel-Aziz, A. A. M.; El-Azab, A. S.; Asiri, Y. A.; Eltahir, K. E. H. Design, synthesis, and biological evaluation of substituted hydrazone and pyrazole derivatives as selective COX-2 inhibitors: Molecular docking study. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2011**, *19*, 3416. [CrossRef] [PubMed]

²⁶ Mahmudov, K. T.; Silva, M. F. C. G.; Kopylovich, M. N.; Fernandes, A. R.; Silva, A.; Mizar, A.; Pombeiro, A. J. L. Di- and tri-organotin(IV) complexes of arylhydrazones of methylene active compounds and their antiproliferative activity. *Journal of Organometallic Chemistry* **2014**, *760*, 67. [CrossRef]

²⁷ Francisco, A. I.; Vargas, M. D.; Frago, T. P.; Carneiro, W. M.; Casellato, A.; Silva, F. C.; Ferreira, V. F.; Barbosa, J. P.; Pessoa, C.; Costa-Lotufo, L. V.; Marinho Filho, J. D. B.; Moraes, M. O.; Mangrich, A. S. Theoretical studies of the tautomerism in 3-(2-*R*-phenylhydrazono)-naphthalene-1,2,4-triones: synthesis of copper(II) complexes and studies of antibacterial and antitumor activities. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2010**, *21*, 1293. [CrossRef]

²⁸ Kaplánek, R.; Havlík, M.; Dolenský, B.; Rak, J.; Dzubák, P.; Konečný, P.; Hajdúch, M.; Králová, J.; Král, V. Synthesis and biological activity evaluation of hydrazone derivatives based on a Tröger's base skeleton. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2015**, *23*, 1651. [CrossRef] [PubMed]

²⁹ Alam, M. S.; Lee, D.-U. Synthesis, biological evaluation, drug-likeness, and in silico screening of novel benzylidene-hydrazone analogues as small molecule anticancer agents. *Archives of Pharmacal Research* **2016**, *39*, 191. [CrossRef] [PubMed]

³⁰ Santos Filho, J. M.; Leite, A. C. L.; Oliveira, B. G.; Moreira, D. R. M.; Lima, M. S.; Soares, M. B. P.; Leite, L. F. C. C. Design, synthesis and cruzain docking of 3-(4-substituted-aryl)-1,2,4-oxadiazole-*N*-acylhydrazones as anti-*Trypanosoma cruzi* agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2009**, *17*, 6682. [CrossRef] [PubMed]

- ³¹ Almeida, V. L.; Leitão, A.; Reina, L. D. C. B.; Montanari, C. A.; Donnici, C. L.; Lopes, M. T. P. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. *Química Nova* **2005**, *28*, 118. [CrossRef]
- ³² Effenberger, K.; Breyer, S.; Schobert, R. Modulation of doxorubicin activity in cancer cells by conjugation with fatty acyl and terpenyl hydrazones. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2010**, *45*, 1947. [CrossRef] [PubMed]
- ³³ Zucchi, R.; Danesi, R. Cardiac toxicity of antineoplastic anthracyclines. *Current Medicinal Chemistry - Anti-Cancer Agents* **2003**, *3*, 151. [PubMed]
- ³⁴ Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* **1983**, *65*, 55. [PubMed]
- ³⁵ Berridge, M. V.; Tan, A. S.; McCoy, K. D.; Wang, R. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. *Biochemica* **1996**, *4*, 14. [Link]
- ³⁶ Fukushima, T.; Kawabata, H.; Nakamura, T.; Iwao, H.; Nakajima, A.; Miki, M.; Sakai, T.; Sawaki, T.; Fujita, Y.; Tanaka, M.; Masaki, Y.; Hirose, Y.; Umehara, H. Iron chelation therapy with deferisirox induced complete remission in a patient with chemotherapy-resistant acute monocytic leukemia. *Anticancer Research* **2011**, *31*, 1741. [PubMed]
- ³⁷ Noulisri, E.; Richardson, D. R.; Lerdwana, S.; Fucharoen, S.; Yamagishi, T.; Kalinowski, D. S.; Pattanapanyasat, K. Antitumor activity and mechanism of action of the iron chelator, Dp44mT, against leukemic cells. *American Journal of Hematology* **2009**, *84*, 170. [CrossRef] [PubMed]
- ³⁸ Abreu-Pereira, F.; Alves, G. G.; Castro, L. O.; Linhares, A. B. R.; Maia, M. D. C.; Granjeiro, J. M.; Calasans-Maia, J. A. Avaliação multiparamétrica da citotoxicidade *in vitro* de um fio ortodôntico à base de resina polimérica reforçada com fibra de vidro. *Innovations Implant Journal: Biomaterials and Esthetics (Online)* **2010**, *5*, 35. [Link]
- ³⁹ Lindgren, E. B.; Brito, M. A.; Vasconcelos, T. R. A.; Moraes, M. O.; Montenegro, R. C.; Yoneda, J. D.; Leal, K. Z. Synthesis and anticancer activity of (E)-2-benzothiazole hydrazones. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2014**, *86*, 12. [CrossRef] [PubMed]
- ⁴⁰ Jeon, K-H.; Yu, H-B.; Kwak, S. Y.; Kwon, Y.; Na, Y. Synthesis and topoisomerases inhibitory activity of heteroaromatic chalcones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2016**, *24*, 5921. [CrossRef] [PubMed]
- ⁴¹ Matsumoto, H.; Yamashita, M.; Tahara, T.; Hayakawa, S.; Wada, S-I.; Tomioka, K.; Lida, A. Design, synthesis, and evaluation of DNA topoisomerase II-targeted nucleosides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2017**, *25*, 4133. [CrossRef] [PubMed]
- ⁴² Oun, R.; Rowan, E. Cisplatin induced arrhythmia; electrolyte imbalance or disturbance of the SA node? *European Journal of Pharmacology* **2017**, *811*, 125. [CrossRef] [PubMed]
- ⁴³ Ostrowska, K.; Olejarz, W.; Wrzosek, M.; Głuszkod, A.; Nowicka, G.; Szczepański, M.; Matereke, I. M.; Koziół, A. E.; Struga, M. Anticancer effects of O-aminoalkyl derivatives of alloxanthoxyletin and seselin. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **2017**, *95*, 1412. [CrossRef] [PubMed]
- ⁴⁴ Hu, W.; Fang, L.; Hua, W.; Gou, S. Biotin-Pt (IV)-indomethacin hybrid: a targeting anticancer prodrug providing enhanced cancer cellular uptake and reversing cisplatin resistance. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2017**, *175*, 47. [CrossRef] [PubMed]
- ⁴⁵ Husain, I.; Mohler, J. L.; Seigler, H. F.; Besterman, J. M. Elevation of topoisomerase I messenger RNA, protein, and catalytic activity in human tumors: demonstration of tumor-type specificity and implications for cancer chemotherapy. *Cancer research* **1994**, *54*, 539. [PubMed]
- ⁴⁶ Silva, T. F. S.; Martins, L. M. D. R. S.; Silva, M. F. C. G.; Fernandes, A. R.; Silva, A.; Borralho, P. M.; Santos, S.; Rodrigues, C. M. P.; Pombeiro, A. J. L. Cobalt complexes bearing scorpionate ligands: synthesis, characterization, cytotoxicity and DNA

- cleavage. *Dalton Transactions* **2012**, 41, 12888. [CrossRef] [PubMed]
- ⁴⁷ Kumar, D.; Mariappan, G.; Husain, A.; Monga, J.; Kumar, S. Design, synthesis and cytotoxic evaluation of novel imidazolone fused quinazolinone derivatives. *Arabian Journal of Chemistry* **2017**, 10, 344. [CrossRef]
- ⁴⁸ Yu, C-W.; Li, K. K. W.; Pang, S-K.; Au-Yeung, S. C. F.; Ho, Y-P. Anticancer activity of a series of platinum complexes integrating demethylcantharidin with isomers of 1,2-diaminocyclohexane. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2006**, 16, 1686. [CrossRef] [PubMed]
- ⁴⁹ Rúnarsson, O. V.; Artacho, J.; Wärnmark, K. The 125th anniversary of the Tröger's base molecule: synthesis and applications of Tröger's base analogues. *European Journal of Organic Chemistry* **2012**, 2012, 7015. [CrossRef]
- ⁵⁰ Joray, M. B.; Villafañez, F.; González, M. L.; Crespo, M. I.; Laiolo, J.; Palacios, S. M.; Bocco, J. L.; Soria, G.; Carpinella, M. C. P53 tumor suppressor is required for efficient execution of the death program following treatment with a cytotoxic limonoid obtained from *Melia azedarach*. *Food and Chemical Toxicology* **2017**, 109, 888. [CrossRef] [PubMed]
- ⁵¹ Ibrahim, H. S.; Abou-seri, S. M.; Ismail, N. S. M.; Elaasser, M. M.; Aly, M. H.; Abdel-Aziz, H. A. Bis-isatin hydrazones with novel linkers: Synthesis and biological evaluation as cytotoxic agents. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2016**, 108, 415. [CrossRef] [PubMed]
- ⁵² Papazisis, K. T.; Geromichalos, G. D.; Dimitriadis, K. A.; Kortsaris, A. H. Optimization of the sulforhodamine B colorimetric assay. *Journal of Immunological Methods* **1997**, 208, 151. [CrossRef] [PubMed]
- ⁵³ Justo, O. R.; Moraes, A. M.; Barreto, G. P. M.; Mercadante, A. Z.; Rosa, P. T. V. Avaliação do potencial antioxidante de extratos ativos de plantas obtidos por extração com fluido supercrítico. *Química Nova* **2008**, 31, 1699. [CrossRef]
- ⁵⁴ Guimarães, D. O.; Momesso, L. S.; Pupo, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Química Nova* **2010**, 33, 667. [CrossRef]
- ⁵⁵ González-García, C.; Mata, A.; Zani, F.; Mendiola, M. A.; López-Torres, E. Synthesis and antimicrobial activity of tetradentate ligands bearing hydrazone and/or thiosemicarbazone motifs and their diorganotin(IV) complexes. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2016**, 163, 118. [CrossRef] [PubMed]
- ⁵⁶ Loginova, N. V.; Koval'chuk, T. V.; Gres, A. T.; Osipovich, N. P.; Polozov, G. I.; Halauko, Y. S.; Faletrov, Y. V.; Harbatsevich, H. I.; Hlushko, A. V.; Azarko, I. I.; Bokshits, Y. V. Redox-active metal complexes of sterically hindered phenolic ligands: Antibacterial activity and reduction of cytochrome c. Part IV. Silver(I) complexes with hydrazone and thiosemicarbazone derivatives of 4,6-di-tert-butyl-2,3-dihydroxybenzaldehyde. *Polyhedron* **2015**, 88, 125. [CrossRef]
- ⁵⁷ Wang, X-L.; Zhang, Y-B.; Tang, J-F.; Yang, Y-S.; Chen, R-Q.; Zhang, F.; Zhu, H-L. Design, synthesis and antibacterial activities of vanillic acylhydrazone derivatives as potential b-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III (FabH) inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2012**, 57, 373. [CrossRef] [PubMed]
- ⁵⁸ Ostrosky, E. A.; Mizumoto, M. K.; Lima, M. E. L.; Kaneko, T. M.; Nishikawa, S. O.; Freitas, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2008**, 18, 301. [CrossRef]
- ⁵⁹ Alves, E. G.; Vinholis, A. H. C.; Casemiro, L. A.; Furtado, N. A. J. C.; Silva, M. L. A.; Cunha, W. R.; Martins, C. H. G. Estudo comparativo de técnicas de *screening* para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. *Química Nova* **2008**, 31, 1224. [CrossRef]
- ⁶⁰ Altıntop, M. D.; Ozdemir, A.; Turan-Zitouni, G.; Ilgin, S.; Atlı, O.; Demirci, F.; Kaplancıklı, Z. A. Synthesis and in vitro evaluation of new nitro-substituted thiazolyl hydrazone derivatives as anticandidal and anticancer agents. *Molecules* **2014**, 19, 14809. [CrossRef] [PubMed]

- ⁶¹ Chacon, O.; Feng, Z.; Harris, N. B.; Cáceres, N. E.; Adams, L. G.; Barletta, R. G. *Mycobacterium smegmatis* D-alanine racemase mutants are not dependent on D-alanine for growth. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2002**, 46, 47. [CrossRef] [PubMed]
- ⁶² Takamune, L. F.; Vieira, D. C. M. Comparação da metodologia para determinação da potência de amoxicilina: método de difusão em ágar e método de espalhamento. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada* **2013**, 34, 555. [Link]
- ⁶³ Braga, S. F. P.; Martins, L. C.; Silva, E. B.; Sales Júnior, P. A.; Murta, S. M. F.; Romanha, A. J.; Soh, W. T.; Brandstetter, H.; Ferreira, R. S.; Oliveira, R. B. Synthesis and biological evaluation of potential inhibitors of the cysteine proteases cruzain and rhodesain designed by molecular simplification. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2017**, 25, 1889. [CrossRef] [PubMed]
- ⁶⁴ Walcourt, A.; Kurantsin-Mills, J.; Kwagyand, J.; Adenuga, B. B.; Kalinowski, D. S.; Lovejoy, D. B.; Lane, D. J. R.; Richardson, D. R. Antiplasmodial activity of aroylhydrazone and thiosemicarbazone iron chelators: effect on erythrocyte membrane integrity, parasite development and the intracellular labile iron pool. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2013**, 129, 43. [CrossRef] [PubMed]
- ⁶⁵ Kalinowski, D. S.; Richardson, D. R. The evolution of iron chelators for the treatment of iron overload disease and cancer. *Pharmacological Reviews* **2005**, 57, 547. [CrossRef] [PubMed]
- ⁶⁶ Amir, M.; Ali, I.; Hassan, M. Z.; Mulakayala, N. Design, synthesis, and biological evaluation of hydrazone incorporated 1,2,4-triazines as anticonvulsant agents. *Archiv der Pharmazie Chemistry in Life Sciences* **2014**, 347, 958. [CrossRef] [PubMed]
- ⁶⁷ Lopes, J. R. G.; Riet-Correa, F.; Medeiros, M. A.; Dantas, F. P. M.; Medeiros, R. M. T. Administração de diferentes concentrações de folhas de *Ipomoea asarifolia* na ração de camundongos. *Ciência Rural (Online)* **2014**, 44, 872. [CrossRef]
- ⁶⁸ Calil, C. M.; Bianchi, F. J.; Tanno, A. P.; Cunha, T. S.; Marcondes, F. K. Análise do significado do tempo de imobilidade em modelos experimentais de natação. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* **2002**, 38, 479. [CrossRef]
- ⁶⁹ Steru, L.; Chermat, R.; Thierry, B.; Simon, P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology* **1985**, 85, 367. [PubMed]
- ⁷⁰ Adão, R.; Keulenaer, G.; Leite-Moreira, A.; Brás-Silva, C. Cardiotoxicidade associada à terapêutica oncológica: mecanismos fisiopatológicos e estratégias de prevenção. *Revista Portuguesa de Cardiologia* **2013**, 32, 395. [CrossRef]