

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**TESE DE DOUTORADO**

**Síntese, caracterização e estudo da atividade fungicida e antitumoral de  
novas dialquilfosfonilacilidrazonas**

**Henriqueta Talita Guimarães Barboza**

**2018**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DA ATIVIDADE  
FUNGICIDA E ANTITUMORAL DE NOVAS  
DIALQUILFOSFONILACILIDRAZONAS**

**HENRIQUETA TALITA GUIMARÃES BARBOZA**

*Sob a Orientação do Professor Dr.*  
**João Batista Neves da Costa**

*e Coorientação do Professor Dr.*  
**Otniel Freitas Silva**

Tese submetida como requisito parcial  
para obtenção do grau de **Doutora em  
Química**, no Programa de Pós-  
Graduação em Química, Área de  
Concentração em Química.

Seropédica, RJ  
Abril de 2018

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

B238s Barboza, Henriqueta Talita Guimarães , 1978-  
Síntese, caracterização e estudo da atividade  
fungicida e antitumoral de novas  
dialquilfosfonilacilidrazonas / Henriqueta Talita  
Guimarães Barboza. - 2018.  
199 f.

Orientador: João Batista Neves da Costa.  
Coorientador: Otniel Freitas-Silva.  
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do  
Rio de Janeiro, Pós-Graduação Em Química, 2018.

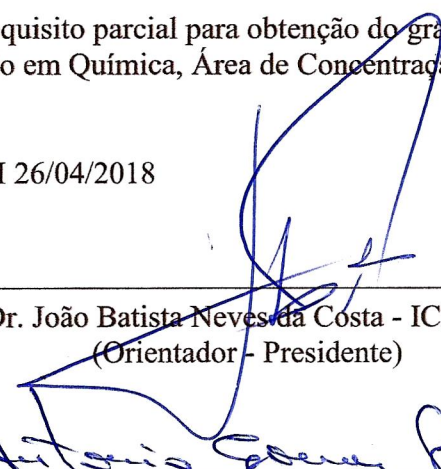
1. Acetilcolinesterase. 2. fungos pós-colheita. 3.  
melanoma. I. da Costa, João Batista Neves , 1956-,  
orient. II. Freitas-Silva, Otniel , 1966-, coorient.  
III Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Pós  
Graduação Em Química. IV. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**HENRIQUETA TALITA GUIMARÃES BARBOZA**


Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Química**, no Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química.

TESE APROVADA EM 26/04/2018



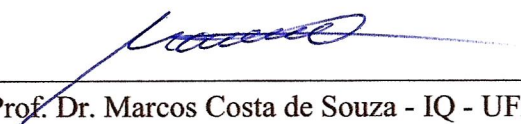
---

Prof. Dr. João Batista Neves da Costa - ICE - UFRRJ  
(Orientador - Presidente)




---

Pesq. Dr. Antonio Gomes Soares - EMBRAPA CTAA  
(Membro titular)



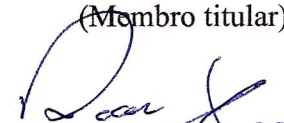
---

Prof. Dr. Marcos Costa de Souza - IQ - UFF  
(Membro titular)



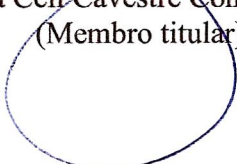
---

Prof. Dr. Marco Edilson Freire de Lima - ICE - UFRRJ  
(Membro titular)



---

Profª. Dra. Regina Celi Cavestré Coneglian - IA - UFRRJ  
(Membro titular)



Dedico esse trabalho aos meus pais e meu irmão, meu maior tesouro na terra. Eles são anjos que Deus colocou em minha vida. Com eles, cada dificuldade é só um obstáculo a ser superado, pois é deles que vem a minha força.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me permitir viver um dia novo e conduzir meus passos!

Aos meus pais e irmão que completam a minha vida e me dão forças para perseguir meus sonhos. Em cada momento de felicidade, encontro a presença deles.

Ao meu coorientador Otniel Freitas Silva, que abriu meus olhos e me colocou no caminho, me abastecendo de todos os recursos necessários e me agraciando com sua amizade.

Ao meu orientador João Batista Neves da Costa por toda dedicação, atenção, conhecimento e carinho, uma pessoa que transformou um caminho longo e duro em uma jornada agradável e de sucesso.

Ao amigo Jorge Luiz Potxci de Azevedo, pelo seu apoio constante, pela amizade fiel e por toda torcida.

Ao meu chefe e amigo Antonio Gomes Soares, um modelo de profissional, a pessoa que me permitiu crescer e que me auxilia em cada novo voo.

À amiga Xênia Porto Ramos do Nascimento, meu braço esquerdo, direito e minhas duas pernas. Sua amizade veio quando mais precisei.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, a minha casa e fonte inesgotável de aprendizado.

À professora Rosane Nora Castro, uma mulher forte, sempre disposta a ajudar com seus conhecimentos, seu trabalho e sua bondade.

Ao professor Carlos Maurício Rabello de Sant'Anna por compartilhar seus conhecimentos e idéias.

À professora Cristiane Martins Cardoso pela disponibilidade e engrandecimento deste trabalho.

Aos técnicos da UFRRJ, pelos espectros gerados, principalmente ao Maurício Lemos Matos, por tornar o meu caminho mais curto e rápido.

À Embrapa Agroindústria de Alimentos, por ser meu porto seguro e por mais essa oportunidade de crescimento.

À Maria Inez de Moura Sarquis e a Fundação Oswaldo Cruz pelas cepas cedidas para conclusão deste trabalho, uma parceria fundamental.

Ao Ivan Alcântara, um amigo, que novamente marcou presença e ajudou na realização desse projeto.

Ao professor Marcos Andre Vannier dos Santos e toda sua equipe do Laboratório de Biologia Parasitária (LBP) do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/Fundação Oswaldo Cruz (CPqGM-FIOCRUZ) pela oportunidade de realizar mais este trabalho e pelo acolhimento recebido.

À Alexandra Mara Goulart Nunes Mamed, Andressa Moreira de Souza, Jeane Santos da Rosa e Leuza Mayumi Ishii Ishikawa, amigas para todas as horas e em todos os tempos, mulheres queridas que permaneceram ao meu lado em meio à correria, falta de tempo e ausências.

A todos vocês, agradeço imensamente.

## RESUMO

Barboza, Henriqueta Talita Guimarães. **Síntese, caracterização e estudo da atividade fungicida e antitumoral de novas dialquilfosfonilacilidrazonas.** Tese (Doutorado em Química). Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

O trabalho apresentado refere-se a síntese de dialquilfosfonilacilidrazonas inéditas que ocorreu em 3 etapas: a primeira etapa consistiu na síntese de diferentes fosfonoacetatos de dialquila obtidos por meio da reação do bromoacetato de etila com o fosfito de trialquila de interesse. A segunda etapa foi a síntese da dietoxifosfonilidrazida acética formada por meio da reação dos fosfonoacetatos de dialquila sintetizados com a hidrazina. A terceira e última etapa consistiu na condensação das dietoxifosfonilidrazidas acética com diferentes aldeídos heterocíclicos. Os compostos obtidos, nomeados de um até 17, foram caracterizados por RMN de  $H^1$  e  $C^{13}$  e  $P^{31}$ , infravermelho (IV) e espectroscopia de massas (EM). Foram obtidos 17 compostos inéditos com mistura diastereoisomérica, de conformação preferencial *E*. A atividade fungicida de cada molécula sintetizada foi realizada por meio do teste de sensibilidade *in vitro* em relação aos fitopatógenos fúngicos *Pilidium* sp., *Alternaria* sp., *Penicilium* sp. e *Colletotrichum gloeosporioides*, responsáveis por doenças de importância econômica na pós-colheita de frutos. No entanto, nenhum dos compostos apresentou a atividade fungicida esperada para os fungos avaliados. Os compostos ainda foram testados em células de melanoma murino da linhagem B16F10, com objetivo de verificar a atividade biológica no crescimento tumoral de células de melanoma. De todos os compostos testados os compostos 2 e 13 apresentaram atividade biológica, ainda que relativamente baixa. Após a síntese e a purificação dos compostos sintetizados, foi verificada a atividade dos mesmos frente a enzima acetilcolinesterase, usada como indicador de toxicidade de compostos organofosforados. O ensaio de inibição da enzima AChE revelou que o composto 2 não inibe a enzima, juntamente com os compostos 3, 7, 8 e 16 enquanto o composto 13 além do composto 9 inibem fortemente a AChE, sendo inclusive mais inibidores que o Propoxur, utilizado como padrão.

Palavras chave: Acetilcolinesterase, fungos pós-colheita e melanoma.

## ABSTRACT

Barboza, Henriqueta Talita Guimarães. **Synthesis, characterization and study of the fungicidal and antitumor activity of new dialkylphosphonylacylidrazones.** Thesis (Doctor in Chemistry). Institute of Exact Sciences, Department of Chemistry, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

In This work is shown the synthesis of novel dialkylphosphorylacylhydrazones that occurs in 3 reaction steps: the first step consisted in the synthesis of different dialkyl acetate phosphonoacetates obtained by the reaction of the ethyl bromoacetate with the trialkyl phosphite of interest. The second step was the synthesis of acetic diethoxyphosphonylhydrazides which occurred by reaction between dialkyl phosphonoacetates synthesized and hydrazine. The third and final ones occurred by the condensation of acetic diethoxyphosphonylhydrazides with different heterocyclic aldehydes. The compounds obtained were fully characterized by <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C and <sup>31</sup>P NMR, infrared (IR) and mass spectrometry (MS). In total, 17 novel compounds, namely one to 17, respectively, were obtained with diastereoisomeric mixture of preferential conformation *E*. The fungicidal activity of the molecule synthesized was performed against plant pathogens responsible for postharvest diseases of economic importance such as *Pilidium* sp., *Alternaria* sp., *Penicilium* sp. and *Colletotrichum gloeosporioides*, however, they did not present fungicidal activity in the evaluated fungi. The compounds were further tested against melanoma cells, for the purpose of verify whether they have any activity in tumor growth of melanoma cells with only compounds 2 and 10 showed some biological activity, although relatively low. After synthesis and purification of the synthesized compounds, they are checked against the acetylcholinesterase enzyme activity, used as indicator of toxicity of organophosphorus compounds. The AChE enzyme inhibition assay has shown that compound 2 does not inhibit the enzyme along with compounds 3, 7, 8 and 16 while compound 13 in addition to compound 9 strongly inhibits AChE and showing even high inhibitory activity than the standard used, the Propoxur.

Keywords: Acetylcholinesterase, post-harvest fungus and melanoma.



## Índice de Tabela

<b>Tabela 1</b> - Bandas de IV (ν) dos fosfonoacetatos de dialquil etila sintetizados. ....	32
<b>Tabela 2</b> - Dados de RMN <sup>1</sup> H dos fosfonoacetatos de dialquil etila sintetizados. ....	35
<b>Tabela 3</b> - Dados de RMN <sup>13</sup> C dos fosfonoacetatos de dialquil etila sintetizados. ....	35
<b>Tabela 4</b> - Bandas de IV (ν) dos fosfonoacetatos de dialquil etila sintetizados. ....	37
<b>Tabela 5</b> - Dados de RMN <sup>1</sup> H das dialquifosfonil hidrazidas acética sintetizados. ....	40
<b>Tabela 6</b> - Dados de RMN <sup>13</sup> C das dialquifosfonil hidrazidas acéticas sintetizados. ....	40
<b>Tabela 7</b> - Dados dos compostos sintetizados. ....	41
<b>Tabela 8</b> - Dados de IV dos compostos sintetizados em cm <sup>-1</sup> . ....	47
<b>Tabela 9</b> - Dados de δ (ppm) de RMN <sup>1</sup> H dos compostos sintetizados a partir da reação do intermediário III e aldeídos. ....	49
<b>Tabela 10</b> - Dados de δ (ppm) de RMN <sup>1</sup> H dos compostos sintetizados a partir da reação do intermediário III e isatinas. ....	51
<b>Tabela 11</b> - Dados de δ (ppm) de RMN <sup>1</sup> H dos compostos sintetizados a partir da reação do intermediário IV com aldeídos e a nitroisatina. ....	53
<b>Tabela 12</b> - Dados de δ (ppm) de RMN <sup>13</sup> C dos compostos sintetizados a partir da reação do intermediário III e aldeídos. ....	56
<b>Tabela 13</b> - Dados de δ (ppm) de RMN <sup>1</sup> H dos compostos sintetizados a partir da reação do intermediário III e isatinas. ....	58
<b>Tabela 14</b> - Dados de δ (ppm) de RMN <sup>13</sup> C dos compostos sintetizados a partir da reação do intermediário IV com aldeídos e a nitroisatina. ....	60
<b>Tabela 15</b> - δ (ppm) em CDCl <sub>3</sub> . ....	62
<b>Tabela 16</b> - Proporção dos diastereoisômeros na mistura. ....	63
<b>Tabela 17</b> - Dados de massas dos compostos sintetizados. MM (massa molecular). ....	63
<b>Tabela 18</b> - % de inibição da enzima AChE pelos compostos sintetizados. ....	70

## Índice de Esquemas

<b>Esquema 1</b> - Esquema de reação (i) e (ii) sugeridos por Atherton e Todd em 1945; adaptado de ATHERTON <i>et al.</i> , (1945). .....	8
<b>Esquema 2</b> - Inversão da configuração no centro de fósforo. ....	8
<b>Esquema 3</b> - Aplicações sintéticas do $\text{PCl}_3$ . ....	9
<b>Esquema 4</b> - Estrutura geral e estereoquímica da acilidrazona. ....	12
<b>Esquema 5</b> - Hidrólise da Ach pela AChE. ....	17
<b>Esquema 6</b> - Mecanismo de hidrólise da ACh. ....	17
<b>Esquema 7</b> - Mecanismo clássico de inibição da AChE por inseticidas organofosforados. ...	19
<b>Esquema 8</b> - Reativação espontânea e do Envelhecimento, sendo, R o grupo alquil, O-alquil ou amida; $R_1$ o grupo O-alquil ou amida. ....	20
<b>Esquema 9</b> - Reação de reativação do conjugado AChE-OF por uma oxima, sendo R o grupo alquil, O-alquil ou amida; $R_1$ o grupo O-alquil ou amida. ....	20
<b>Esquema 10</b> - Rota de síntese das dialquilfosfonilacilidrazonas. ....	30
<b>Esquema 11</b> - Síntese dos fosfonoacetatos de dialquil etila: (I)R= Etil, (II) R= Butil. ....	30
<b>Esquema 12</b> - Proposta de Proposta de mecanismo de síntese do fosfonoacetato de dialquil etila via reação de Michaelis - Arbuzov. ....	31
<b>Esquema 13</b> - Reação geral de formação dos doisdialquilfosfonil hidrazidas acéticas sintetizados. ....	36
<b>Esquema 14</b> - Proposta de mecanismo de síntese do fosfonato de dietila - 2-hidrazino-2-oxietila. ....	36
<b>Esquema 15</b> - Rota sintética geral das dialquifosfonilacilidrazonas. ....	41
<b>Esquema 16</b> - Proposta de mecanismo de síntese dos compostos dialquifosfonilacilidrazonas demonstrado através do composto I. ....	44
<b>Esquema 17</b> - Provável mecanismo da mistura diastereoisomérica das dialquifosfonilacilidrazonas sintetizadas. ....	46
<b>Esquema 18</b> - Provável fragmentação do composto 1. ....	64

## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> - Estrutura química de compostos organoclorados persistentes no ambiente.....	5
<b>Figura 2</b> -Paration (fossforotiotato de O, O-dietil-O-4-nitrofenila), pesticida organofosforados amplamente utilizado na agricultura.....	6
<b>Figura 3</b> - Estruturas de amidas e fosforamidas.....	7
<b>Figura 4</b> - Estrutura do herbicida glifosato.....	9
<b>Figura 5</b> - Estrutura dos fungicidas OFs Kitasin, Alliette e Edifenfós.....	10
<b>Figura 6</b> - Morango com infecção por <i>Colletotrichum sp.</i> . Fonte: Syngenta.....	13
<b>Figura 7</b> - <i>Pilidium concavum</i> (CBS 139802) a. Colônia em Agar de Dextrose de Batata (PDA); b. Colônia em Agar de Farinha de Aveia (OA); c. Colônia em Agar de Extrato de Malte (MEA); d, e, f. <i>Conidiomata</i> ; G. <i>Conidia</i> , h. Sintomas típicos de doença de morango em frutas e i. em folhas.....	14
<b>Figura 8</b> - Na sequência: (a) MES - se espalha radialmente, tornando-se gradualmente vertical invasivo. No pé, a maioria dos melanomas deste subtipo é encontrada no dorso; (b) NM - afetando a unha. Melanoma mais agressivo que o MES, pois pode rapidamente tornar-se verticalmente invasivo. Esta lesão é mais comum em pacientes mais velhos; (c) AML - O subtipo mais raro da doença, porém mais comum no pé, particularmente na sola e na unha, podendo ocorrer na mesma taxa em todas as raças/tipos de pele.....	15
<b>Figura 9</b> - Figura simplificada do sítio ativo da AChE de <i>T. californicum</i> .. Fonte: PETRONILHO <i>et al.</i> , 2011.....	18
<b>Figura 10</b> - Estrutura geral dos compostos sintetizados.....	21
<b>Figura 11</b> - Estrutura do procloraz, princípio ativo do fungicida comercial Sportak®.....	26
<b>Figura 12</b> - Princípio do teste suscetibilidade pela metodologia do disco-difusão.....	26
<b>Figura 13</b> - Inoculação dos fungos.....	27
<b>Figura 14</b> - Distribuição dos discos nas placas de petri.....	27
<b>Figura 15</b> - Bandas de IV características do fosfonoaceto de trietila.....	32
<b>Figura 16</b> - Dados de RMN- <sup>1</sup> H do fosfonoacetato de trietila (I).....	33
<b>Figura 17</b> - Dados de RMN <sup>13</sup> C do fosfonoacetato de trietila (I).....	34
<b>Figura 18</b> - Dados de infravermelho do 2-hidrazinil-2-oxoetilfosfonato de dietila (III).....	37
<b>Figura 19</b> - Dados de RMN <sup>1</sup> H do 2-hidrazinil-2-oxoetilfosfonato de dietila (III).....	38
<b>Figura 20</b> - Dados de RMN <sup>13</sup> C dietoxifosfonil hidrazida acética (III).....	39
<b>Figura 21</b> - Aldeídos, isatinas e derivados utilizados para a sínteses de novos compostos. ...	42
<b>Figura 22</b> - Compostos sintetizados a partir do 2-hidrazinil-2-oxoetilfosfonato de dietila (III) representados pelos estereoisômeros ( <i>E</i> ).....	43
<b>Figura 23</b> - Compostos sintetizados a partir da 2-hidrazinil-2-oxoetilfosfonato de dibutila (IV) representados pelos estereoisômeros ( <i>E</i> ).....	44
<b>Figura 24</b> - Compostos descritos na Tabela 9 e suas assinalações.....	50
<b>Figura 25</b> - Compostos descritos na Tabela 10 e suas assinalações.....	52
<b>Figura 26</b> - Compostos descritos na Tabela 11 e suas assinalações.....	54
<b>Figura 27</b> - Compostos descritos na Tabela 12 e suas assinalações.....	57
<b>Figura 28</b> - Compostos descritos na Tabela 13 e suas assinalações.....	59
<b>Figura 29</b> - Compostos descritos na Tabela 14 e suas assinalações.....	61
<b>Figura 30</b> - Teste de disco: difusão em meio sólido (BDA), a) para <i>Alternaria sp.</i> e <i>Penicillium sp.</i> , b) para os demais fungos.....	65
<b>Figura 31</b> - Halo de inibição formado pelo controle positivo após o crescimento fúngico durante 3 dias a 25°C ± 1°C de <i>Penicillium sp.</i> . Fundo (A) e frente (B) da placa, respectivamente....	65
<b>Figura 32</b> - Tratamentos testados sem formação do halo de inibição após o crescimento fúngico durante 3 dias a 25°C ± 1°C do fungo <i>Penicillium sp.</i> . Fundo (A) e frente (B) da placa, respectivamente.....	66

<b>Figura 33</b> - Repetição do ensaio com fungo <i>Penicillium</i> sp.com um tratamento por placa onde observa-se a não formação do halo de inibição após 3 dias a 25°C ± 1°C. a) Tratamento 3; b) tratamento 11; c) tratamento Branco e d) Tratamento controle positivo.....	67
<b>Figura 34</b> - Gráfico com as % de inibição do melanoma com os respectivos desvios padrão dos compostos sintetizados. *Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si a 95% de probabilidade, pelo teste de LSD.....	68
<b>Figura 35</b> - Estrutura comum aos compostos 1 e 12 do presente trabalho e do composto 5b de YADAGIRI <i>et al.</i> (2014).....	69
<b>Figura 36</b> - Estrutura química do inseticida carbamato Propoxur.....	69
<b>Figura 37</b> - Espectro de IV (Célula de NaCl) - [2(E/Z) -2- (3-metoxibenzilideno)hidrazinil] -2-oxoetilfosfonato de dietila (1).....	84
<b>Figura 38</b> - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ) - [2(E/Z) -2- (3-metoxibenzilideno)hidrazinil] -2-oxoetilfosfonato de dietila (1).....	85
<b>Figura 39</b> - Espectro de RMN <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> ) - [2(E/Z) -2- (3-metoxibenzilideno)hidrazinil] -2-oxoetilfosfonato de dietila (1).....	86
<b>Figura 40</b> - Espectro de RMN <sup>31</sup> P (CDCl <sub>3</sub> ) - [2(E/Z) -2- (3-metoxibenzilideno)hidrazinil] -2-oxoetilfosfonato de dietila (1).....	87
<b>Figura 41</b> - Espectro de RMN <sup>31</sup> P <sub>CPD</sub> (CDCl <sub>3</sub> ) - [2(E/Z) -2- (3-metoxibenzilideno)hidrazinil] -2-oxoetilfosfonato de dietila (1). ....	88
<b>Figura 42</b> - Espectro de Massas - [2(E/Z) -2- (3-metoxibenzilideno)hidrazinil] -2-oxoetilfosfonato de dietila (1).....	89
<b>Figura 43</b> - Espectro de IV (Célula de NaCl) - [2(E/Z) -2- (1,3-benzodioxol-4-ilmetileno)hidrazinil] -2- oxoetilfosfonato de dietila (2).....	90
<b>Figura 44</b> - Espectro de RMN <sup>1</sup> H(DMSO) - [2(E/Z) -2- (1,3-benzodioxol-4-ilmetileno)hidrazinil] -2- oxoetilfosfonato de dietila (2).....	91
<b>Figura 45</b> - Espectro de RMN <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> ) - [2(E/Z) -2- (1,3-benzodioxol-4-ilmetileno)hidrazinil] -2- oxoetilfosfonato de dietila (2).....	92
<b>Figura 46</b> - Espectro de RMN <sup>31</sup> P (CDCl <sub>3</sub> ) - [2(E/Z) -2- (1,3-benzodioxol-4-ilmetileno)hidrazinil] -2- oxoetilfosfonato de dietila (2).....	93
<b>Figura 47</b> - Espectro de RMN <sup>31</sup> P <sub>CPD</sub> (CDCl <sub>3</sub> ) - [2(E/Z) -2- (1,3-benzodioxol-4-ilmetileno)hidrazinil] -2- oxoetilfosfonato de dietila (2).....	94
<b>Figura 48</b> - Espectro de massas - [2(E/Z) -2- (1,3-benzodioxol-4-ilmetileno)hidrazinil] -2-oxoetilfosfonato de dietila (2).....	95
<b>Figura 49</b> - Espectro de IV (Célula de NaCl) - {2(E/Z) -2 - [(5-bromo-2-furil) metileno]hidrazinil} -2- oxoetilfosfonato de dietila (3). ....	96
<b>Figura 50</b> - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (DMSO) - {2(E/Z) -2 - [(5-bromo-2-furil) metileno]hidrazinil} -2- oxoetilfosfonato de dietila (3). ....	97
<b>Figura 51</b> - Espectro de RMN <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> ) - {2(E/Z) -2 - [(5-bromo-2-furil) metileno]hidrazinil} -2- oxoetilfosfonato de dietila (3). ....	98
<b>Figura 52</b> - Espectro de RMN <sup>31</sup> P (CDCl <sub>3</sub> ) - {2(E/Z) -2 - [(5-bromo-2-furil) metileno]hidrazinil} -2- oxoetilfosfonato de dietila (3). ....	99
<b>Figura 53</b> - Espectro de RMN <sup>31</sup> P <sub>CPD</sub> (CDCl <sub>3</sub> ) - {2(E/Z) -2 - [(5-bromo-2-furil) metileno]hidrazinil} -2- oxoetilfosfonato de dietila (3). ....	100
<b>Figura 54</b> - Espectro de Massas - {2(E/Z) -2 - [(5-bromo-2-furil) metileno]hidrazinil} -2-oxoetilfosfonato de dietila (3).....	101
<b>Figura 55</b> - Espectro de IV (Célula de NaCl) - {2(E/Z) -2 - [(5-metil-2-furil) metileno]hidrazinil} -2- oxoetilfosfonato de dietila (4). ....	102
<b>Figura 56</b> - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (DMSO) - {2(E/Z) -2 - [(5-metil-2-furil) metileno]hidrazinil} -2- oxoetilfosfonato de dietila (4).....	103

<b>Figura 57</b> - Espectro de RMN <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> ) - {2( <i>E/Z</i> ) -2 - [(5-metil-2-furil) metileno]hidrazinil} -2- oxoetilfosfonato de dietila (4).....	104
<b>Figura 58</b> - Espectro de RMN <sup>31</sup> P (CDCl <sub>3</sub> ) - {2( <i>E/Z</i> ) -2 - [(5-metil-2-furil) metileno]hidrazinil} -2- oxoetilfosfonato de dietila (4).....	105
<b>Figura 59</b> - Espectro de RMN <sup>31</sup> P <sub>CPD</sub> (CDCl <sub>3</sub> ) - {2( <i>E/Z</i> ) -2 - [(5-metil-2-furil) metileno]hidrazinil} -2- oxoetilfosfonato de dietila (4).....	106
<b>Figura 60</b> - Espectro de Massas - {2( <i>E/Z</i> ) -2 - [(5-metil-2-furil) metileno]hidrazinil} -2- oxoetilfosfonato de dietila (4).....	107
<b>Figura 61</b> - Espectro de IV (Célula de NaCl) - [2( <i>E/Z</i> ) -2- (5-fluoro-2-oxo-1,2-di-hidro-3H-indol-3-ilideno)hidrazinil] -2- oxoetilfosfonato de dietila (5).....	108
<b>Figura 62</b> - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ) - [2( <i>E/Z</i> ) -2- (5-fluoro-2-oxo-1,2-di-hidro-3H-indol-3-ilideno)hidrazinil] -2- oxoetilfosfonato de dietila (5).....	109
<b>Figura 63</b> - Espectro de RMN <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> ) - [2( <i>E/Z</i> ) -2- (5-fluoro-2-oxo-1,2-di-hidro-3H-indol-3-ilideno)hidrazinil] -2- oxoetilfosfonato de dietila (5).....	110
<b>Figura 64</b> - Espectro de RMN <sup>31</sup> P (CDCl <sub>3</sub> ) - [2( <i>E/Z</i> ) -2- (5-fluoro-2-oxo-1,2-di-hidro-3H-indol-3-ilideno)hidrazinil] -2- oxoetilfosfonato de dietila (5).....	111
<b>Figura 65</b> - Espectro de RMN <sup>31</sup> P <sub>CPD</sub> (CDCl <sub>3</sub> ) - [2( <i>E/Z</i> ) -2- (5-fluoro-2-oxo-1,2-di-hidro-3H-indol-3-ilideno)hidrazinil] -2- oxoetilfosfonato de dietila (5).....	112
<b>Figura 66</b> - Espectro de Massas - [2( <i>E/Z</i> ) -2- (5-fluoro-2-oxo-1,2-di-hidro-3H-indol-3-ilideno)hidrazinil] -2- oxoetilfosfonato de dietila (5).....	113
<b>Figura 67</b> - Espectro de IV (Célula de NaCl) - [2( <i>E/Z</i> ) -2- (2-oxo-1,2-di-hidro-3H-indol-3-ilideno)hidrazinil] -2-oxoetilfosfonato de dietila (6).....	114
<b>Figura 68</b> - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ) - [2( <i>E/Z</i> ) -2- (2-oxo-1,2-di-hidro-3H-indol-3-ilideno)hidrazinil] -2-oxoetilfosfonato de dietila (6).....	115
<b>Figura 69</b> - Espectro de RMN <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> ) - [2( <i>E/Z</i> ) -2- (2-oxo-1,2-di-hidro-3H-indol-3-ilideno)hidrazinil] -2-oxoetilfosfonato de dietila (6).....	116
<b>Figura 70</b> - Espectro de RMN <sup>31</sup> P (CDCl <sub>3</sub> ) - [2( <i>E/Z</i> ) -2- (2-oxo-1,2-di-hidro-3H-indol-3-ilideno)hidrazinil] -2-oxoetilfosfonato de dietila (6).....	117
<b>Figura 71</b> - Espectro de RMN <sup>31</sup> P <sub>CPD</sub> (CDCl <sub>3</sub> ) - [2( <i>E/Z</i> ) -2- (2-oxo-1,2-di-hidro-3H-indol-3-ilideno)hidrazinil] -2-oxoetilfosfonato de dietila (6).....	118
<b>Figura 72</b> - Espectro de Massas - [2( <i>E/Z</i> ) -2- (2-oxo-1,2-di-hidro-3H-indol-3-ilideno)hidrazinil] -2-oxoetilfosfonato de dietila (6).....	119
<b>Figura 73</b> - Espectro de IV (Célula de NaCl) - [(2 <i>E/Z</i> ) -2- (5-nitro-2-oxo-1,2-di-hidro-3H-indol-3-ilideno)hidrazinil] -2- oxoetilfosfonato de dietila (7).....	120
<b>Figura 74</b> - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ) - [(2 <i>E/Z</i> ) -2- (5-nitro-2-oxo-1,2-di-hidro-3H-indol-3-ilideno)hidrazinil] -2- oxoetilfosfonato de dietila (7).....	121
<b>Figura 75</b> - Espectro de RMN <sup>13</sup> C (DMSO) - [(2 <i>E/Z</i> ) -2- (5-nitro-2-oxo-1,2-di-hidro-3H-indol-3-ilideno)hidrazinil] -2- oxoetilfosfonato de dietila (7).....	122
<b>Figura 76</b> - Espectro de RMN <sup>31</sup> P (DMSO) - [(2 <i>E/Z</i> ) -2- (5-nitro-2-oxo-1,2-di-hidro-3H-indol-3-ilideno)hidrazinil] -2- oxoetilfosfonato de dietila (7).....	123
<b>Figura 77</b> - Espectro de RMN <sup>31</sup> P <sub>CPD</sub> (DMSO) - [(2 <i>E/Z</i> ) -2- (5-nitro-2-oxo-1,2-di-hidro-3H-indol-3-ilideno)hidrazinil] -2- oxoetilfosfonato de dietila (7).....	124
<b>Figura 78</b> - Espectro de IV (Célula de NaCl) - [2( <i>E/Z</i> ) -2- (piridin-3-ilmetileno)hidrazinil] -2- oxoetilfosfonato de dietila (8).....	125
<b>Figura 79</b> - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (DMSO) - [2( <i>E/Z</i> ) -2- (piridin-3-ilmetileno)hidrazinil] -2- oxoetilfosfonato de dietila (8).....	126
<b>Figura 80</b> - Espectro de RMN <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> ) - [2( <i>E/Z</i> ) -2- (piridin-3-ilmetileno)hidrazinil] -2- oxoetilfosfonato de dietila (8).....	127
<b>Figura 81</b> - Espectro de RMN <sup>31</sup> P (CDCl <sub>3</sub> ) - [2( <i>E/Z</i> ) -2- (piridin-3-ilmetileno)hidrazinil] -2- oxoetilfosfonato de dietila (8).....	128

<b>Figura 82</b> - Espectro de RMN <sup>31</sup> P <sub>CPD</sub> (CDCl <sub>3</sub> ) - [2( <i>E/Z</i> ) -2- (piridin-3-ilmetileno)hidrazinil] -2-oxoetilfosfonato de dietila (8).....	129
<b>Figura 83</b> - Espectro de massas - [2( <i>E/Z</i> ) -2- (piridin-3-ilmetileno)hidrazinil] -2-oxoetilfosfonato de dietila (8).....	130
<b>Figura 84</b> - Espectro de IV (Célula de NaCl) - [2( <i>E/Z</i> ) -2- (2-furilmetileno)hidrazinil] -2-oxoetilfosfonato de dietila (9).....	131
<b>Figura 85</b> - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (DMSO) - [2( <i>E/Z</i> ) -2- (2-furilmetileno)hidrazinil] -2-oxoetilfosfonato de dietila (9).....	132
<b>Figura 86</b> - Espectro de RMN <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> ) - [2( <i>E/Z</i> ) -2- (2-furilmetileno)hidrazinil] -2-oxoetilfosfonato de dietila (9).....	133
<b>Figura 87</b> - Espectro de RMN <sup>31</sup> P (CDCl <sub>3</sub> ) - [2( <i>E/Z</i> ) -2- (2-furilmetileno)hidrazinil] -2-oxoetilfosfonato de dietila (9).....	134
<b>Figura 88</b> - Espectro de RMN <sup>31</sup> P <sub>CPD</sub> (CDCl <sub>3</sub> ) - [2( <i>E/Z</i> ) -2- (2-furilmetileno)hidrazinil] -2-oxoetilfosfonato de dietila (9).....	135
<b>Figura 89</b> - Espectro de massas - [2( <i>E/Z</i> ) -2- (2-furilmetileno)hidrazinil] -2-oxoetilfosfonato de dietila (9).....	136
<b>Figura 90</b> - Espectro de IV (Célula de NaCl) - [2( <i>E/Z</i> ) -2- (2-tienilmetileno)hidrazinil] -2-oxoetilfosfonato de dietila (10).....	137
<b>Figura 91</b> - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (DMSO) - [2( <i>E/Z</i> ) -2- (2-tienilmetileno)hidrazinil] -2-oxoetilfosfonato de dietila (10).....	138
<b>Figura 92</b> - Espectro de RMN <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> ) - [2( <i>E/Z</i> ) -2- (2-tienilmetileno)hidrazinil] -2-oxoetilfosfonato de dietila (10).....	139
<b>Figura 93</b> - Espectro de RMN <sup>31</sup> P (CDCl <sub>3</sub> ) - [2( <i>E/Z</i> ) -2- (2-tienilmetileno)hidrazinil] -2-oxoetilfosfonato de dietila (10).....	140
<b>Figura 94</b> - Espectro de RMN <sup>31</sup> P <sub>CPD</sub> (CDCl <sub>3</sub> ) - [2( <i>E/Z</i> ) -2- (2-tienilmetileno)hidrazinil] -2-oxoetilfosfonato de dietila (10).....	141
<b>Figura 95</b> - Espectro de massas - [2( <i>E/Z</i> ) -2- (2-tienilmetileno)hidrazinil] -2-oxoetilfosfonato de dietila (10).....	142
<b>Figura 96</b> - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (DMSO) - [2( <i>E/Z</i> ) -2 - ({5- [3- (trifluorometil) fenil] -2-furil} metileno)hidrazinil] 2-oxoetilfosfonato de dietila (11). .....	143
<b>Figura 97</b> - Espectro de RMN <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> ) - [2( <i>E/Z</i> ) -2 - ({5- [3- (trifluorometil) fenil] -2-furil} metileno)hidrazinil] 2-oxoetilfosfonato de dietila (11). .....	144
<b>Figura 98</b> - Espectro de RMN <sup>31</sup> P (CDCl <sub>3</sub> ) - [2( <i>E/Z</i> ) -2 - ({5- [3- (trifluorometil) fenil] -2-furil} metileno)hidrazinil] 2-oxoetilfosfonato de dietila (11). .....	145
<b>Figura 99</b> - Espectro de RMN <sup>31</sup> P <sub>CPD</sub> (CDCl <sub>3</sub> ) - [2( <i>E/Z</i> ) -2 - ({5- [3- (trifluorometil) fenil] -2-furil} metileno)hidrazinil] 2-oxoetilfosfonato de dietila (11). .....	146
<b>Figura 100</b> - Espectro de massas - [2( <i>E/Z</i> ) -2 - ({5- [3- (trifluorometil) fenil] -2-furil} metileno)hidrazinil] 2-oxoetilfosfonato de dietila (11). .....	147
<b>Figura 101</b> - Espectro de IV (Célula de NaCl) - [2( <i>E/Z</i> ) -2- (3-metoxibenzilideno)hidrazinil] -2-oxoetilfosfonato de dibutila (12).....	148
<b>Figura 102</b> - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (DMSO) - [2( <i>E/Z</i> ) -2- (3-metoxibenzilideno)hidrazinil] -2-oxoetilfosfonato de dibutila (12). .....	149
<b>Figura 103</b> - Espectro de RMN <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> ) - [2( <i>E/Z</i> ) -2- (3-metoxibenzilideno)hidrazinil] -2-oxoetilfosfonato de dibutila (12). .....	150
<b>Figura 104</b> - Espectro de RMN <sup>31</sup> P (CDCl <sub>3</sub> ) - [2( <i>E/Z</i> ) -2- (3-metoxibenzilideno)hidrazinil] -2-oxoetilfosfonato de dibutila (12). .....	151
<b>Figura 105</b> - Espectro de RMN <sup>31</sup> P <sub>CPD</sub> (CDCl <sub>3</sub> ) - [2( <i>E/Z</i> ) -2- (3-metoxibenzilideno)hidrazinil] -2-oxoetilfosfonato de dibutila (12).....	152
<b>Figura 106</b> - Espectro de massas - [2( <i>E/Z</i> ) -2- (3-metoxibenzilideno)hidrazinil] -2-oxoetilfosfonato de dibutila (12). .....	153

<b>Figura 107</b> - Espectro de IV (Célula de NaCl) - [2(E/Z) -2 - (5-metil-2-furilmetileno)hidrazinil] -2- oxoetilfosfonato de dibutila (13).....	154
<b>Figura 108</b> - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (DMSO) - [2(E/Z) -2 - (5-metil-2-furilmetileno)hidrazinil] -2- oxoetilfosfonato de dibutila (13).....	155
<b>Figura 109</b> - Espectro de RMN <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> ) - [2(E/Z) -2 - (5-metil-2-furilmetileno)hidrazinil] -2- oxoetilfosfonato de dibutila (13).....	156
<b>Figura 110</b> - Espectro de RMN <sup>31</sup> P (CDCl <sub>3</sub> ) - [2(E/Z) -2 - (5-metil-2-furilmetileno)hidrazinil] -2- oxoetilfosfonato de dibutila (13).....	157
<b>Figura 111</b> - Espectro de RMN <sup>31</sup> P <sub>PCPD</sub> (CDCl <sub>3</sub> ) - [2(E/Z) -2 - (5-metil-2-furilmetileno)hidrazinil] -2- oxoetilfosfonato de dibutila (13).....	158
<b>Figura 112</b> - Espectro de massas - [2(E/Z) -2 - (5-metil-2-furilmetileno)hidrazinil] -2- oxoetilfosfonato de dibutila (13). .....	159
<b>Figura 113</b> - Espectro de IV (Célula de NaCl) - [2(E/Z) -2- (2-furilmetileno)hidrazinil] -2- oxoetilfosfonato de dibutila (14). .....	160
<b>Figura 114</b> - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (DMSO) - [2(E/Z) -2- (2-furilmetileno)hidrazinil] -2- oxoetilfosfonato de dibutila (14). .....	161
<b>Figura 115</b> - Espectro de RMN <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> ) - [2(E/Z) -2- (2-furilmetileno)hidrazinil] -2- oxoetilfosfonato de dibutila (14). .....	162
<b>Figura 116</b> - Espectro de RMN <sup>31</sup> P (CDCl <sub>3</sub> ) - [2(E/Z) -2- (2-furilmetileno)hidrazinil] -2- oxoetilfosfonato de dibutila (14). .....	163
<b>Figura 117</b> - Espectro de RMN <sup>31</sup> P <sub>CPD</sub> (CDCl <sub>3</sub> ) - [2(E/Z) -2- (2-furilmetileno)hidrazinil] -2- oxoetilfosfonato de dibutila (14). .....	164
<b>Figura 118</b> - Espectro de IV (Célula de NaCl) - [2(E/Z) -2- (2-tienilmetileno)hidrazinil] -2- oxoetilfosfonato de dibutila (15). .....	165
<b>Figura 119</b> - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (DMSO) - [2(E/Z) -2- (2-tienilmetileno)hidrazinil] -2- oxoetilfosfonato de dibutila (15). .....	166
<b>Figura 120</b> - Espectro de RMN <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> ) - [2(E/Z) -2- (2-tienilmetileno)hidrazinil] -2- oxoetilfosfonato de dibutila (15). .....	167
<b>Figura 121</b> - Espectro de RMN <sup>31</sup> P (CDCl <sub>3</sub> ) - [2(E/Z) -2- (2-tienilmetileno)hidrazinil] -2- oxoetilfosfonato de dibutila (15). .....	168
<b>Figura 122</b> - Espectro de RMN <sup>31</sup> P <sub>CPD</sub> (CDCl <sub>3</sub> ) - [2(E/Z) -2- (2-tienilmetileno)hidrazinil] -2- oxoetilfosfonato de dibutila (15). .....	169
<b>Figura 123</b> - Espectro de massas - [2(E/Z) -2- (2-tienilmetileno)hidrazinil] -2- oxoetilfosfonato de dibutila (15). .....	170
<b>Figura 124</b> - Espectro de IV (Célula de NaCl) - [2(E/Z) -2- (5-nitro-2-oxo-1,2-di-hidro-3H-indol-3-ilideno)hidrazinil] -2- oxoetilfosfonato de dibutila (16).....	171
<b>Figura 125</b> - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (DMSO) - [2(E/Z) -2- (5-nitro-2-oxo-1,2-di-hidro-3H-indol-3-ilideno)hidrazinil] -2- oxoetilfosfonato de dibutila (16). .....	172
<b>Figura 126</b> - Espectro de RMN <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> ) - [2(E/Z) -2- (5-nitro-2-oxo-1,2-di-hidro-3H-indol-3-ilideno)hidrazinil] -2- oxoetilfosfonato de dibutila (16). .....	173
<b>Figura 127</b> - Espectro de RMN <sup>31</sup> P (CDCl <sub>3</sub> ) - [2(E/Z) -2- (5-nitro-2-oxo-1,2-di-hidro-3H-indol-3-ilideno)hidrazinil] -2- oxoetilfosfonato de dibutila (16). .....	174
<b>Figura 128</b> - Espectro de RMN <sup>31</sup> P <sub>PCPD</sub> (CDCl <sub>3</sub> ) - [2(E/Z) -2- (5-nitro-2-oxo-1,2-di-hidro-3H-indol-3-ilideno)hidrazinil] -2- oxoetilfosfonato de dibutila (16).....	175
<b>Figura 129</b> - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ) - [2(E/Z) -2 - (5-cloro-2-tienilmetileno)hidrazinil] -2- oxoetilfosfonato de dibutila (17).....	176
<b>Figura 130</b> - Espectro de RMN <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> ) - [2(E/Z) -2 - (5-cloro-2-tienilmetileno)hidrazinil] -2- oxoetilfosfonato de dibutila (17).....	177
<b>Figura 131</b> - Espectro de RMN <sup>31</sup> P (CDCl <sub>3</sub> ) - [2(E/Z) -2 - (5-cloro-2-tienilmetileno)hidrazinil] -2- oxoetilfosfonato de dibutila (17).....	178

<b>Figura 132</b> - Espectro de RMN $^{31}\text{P}_{\text{CPD}}$ ( $\text{CDCl}_3$ ) - [2( <i>E/Z</i> ) -2 - (5-cloro-2-tienilmetileno)hidrazinil] -2- oxoetilfosfonato de dibutila (17). .....	179
<b>Figura 133</b> - Espectro de massas - [2( <i>E/Z</i> ) -2 - (5-cloro-2-tienilmetileno)hidrazinil] -2-oxoetilfosfonato de dibutila (17). .....	180



## ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

$\delta$	Deslocamento químico (na análise pela espectrometria de RMN)
$\sigma$	Desvio padrão
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
Ar	Arila
d	Dupleto
DA	Defensivos agrícolas
dd	Duplo dupleto
DMSO	Dimetilsulfóxido
dq	Duplo quarteto
dquint	Duplo quinteto
dt	Duplo tripleto
Hz	Hertz
IV	Infravermelho
$J$	Constante de acoplamento
M	Molar
m	Multiplete
°C	Graus Celsius
OF	Compostos organofosforados
s	Simpleto
T	Temperatura
t	Tripleto
t.a.	Temperatura ambiente
UVA	Ultravioleta A
UVB	Ultravioleta B
UVC	Ultravioleta C
$\Delta$	Aquecimento
ppm	Parte por milhão
RMN $^1\text{H}$	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN $^{13}\text{C}$	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN $^{31}\text{P}$	Ressonância Magnética Nuclear de Fósforo 31
RMN $^{31}\text{P}_{\text{CPD}}$	Ressonância Magnética Nuclear de Fósforo 31 acoplada

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1 Revisão de Literatura.....	4
1.1.1 Agricultura brasileira e a utilização de defensivos químicos.....	4
1.1.2 Compostos de fósforos.....	6
1.1.3 Hidrazonas.....	10
1.1.4 Fungos e doenças Pós-colheita.....	12
1.1.5 Melanoma.....	15
1.1.6 Acetilcolinesterase .....	16
<b>2. OBJETIVO.....</b>	<b>21</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>22</b>
3.1. Considerações Gerais .....	22
3.2 Síntese dos fosfonoacetatos de dialquil etila .....	23
3.2.1 Fosfonoacetato de trietila (I).....	23
3.2.2 Fosfonoacetato de dibutil etila (II). .....	23
3.3. Síntese das dialquilfosfonil hidrazidas acéticas.....	23
3.3.1 2-hidrazinil-2-oxoetilfosfonato de dietila (III) .....	23
3.3.2 2-hidrazinil-2-oxoetilfosfonato de dibutila (IV).....	23
3.4. Síntese das dialquilfosfonilacilidrazonas.....	23
3.4.1 [2(E/Z) -2- (3-metoxibenzilideno)hidrazinil] -2-oxoetilfosfonato de dietila (1).....	24
3.4.2 [2(E/Z) -2- (1,3-benzodioxol-4-ilmetileno)hidrazinil] -2- oxoetilfosfonato de dietila (2).....	24
3.4.3 {2(E/Z) -2 - [(5-bromo-2-furil) metileno]hidrazinil} -2- oxoetilfosfonato de dietila (3).....	24
3.4.4 {2(E/Z) -2 - [(5-metil-2-furil) metileno]hidrazinil} -2- oxoetilfosfonato de dietila (4).....	24
3.4.5 [2(E/Z) -2- (5-fluoro-2-oxo-1,2-di-hidro-3H-indol-3-ilideno)hidrazinil] -2-oxoetilfosfonato de dietila (5).....	24
3.4.6 [2(E/Z) -2- (2-oxo-1,2-di-hidro-3H-indol-3-ilideno)hidrazinil] -2-oxoetilfosfonato de dietila (6) .....	24
3.4.7 [(2E/Z) -2- (5-nitro-2-oxo-1,2-di-hidro-3H-indol-3-ilideno)hidrazinil] -2-oxoetilfosfonato de dietila (7).....	24
3.4.8 [2(E/Z) -2- (piridin-3-ilmetileno) hidrazinil] -2- oxoetilfosfonato de dietila (8) .....	24
3.4.9 [2(E/Z) -2- (2-furilmetileno)hidrazinil] -2- oxoetilfosfonato de dietila (9).....	25
3.4.10 [2(E/Z) -2- (2-tienilmetileno)hidrazinil] -2-oxoetilfosfonato de dietila (10) .....	25
3.4.11 [2(E/Z) -2 - ({5- [3- (trifluorometil) fenil] -2-furil} metileno)hidrazinil] 2-oxoetilfosfonato de dietila (11).....	25
3.4.12 [2(E/Z) -2- (3-metoxibenzilideno)hidrazinil] -2- oxoetilfosfonato de dibutila (12).....	25
3.4.13 [2(E/Z) -2 - (5-metil-2-furilmetileno)hidrazinil] -2- oxoetilfosfonato de dibutila (13).....	25
3.4.14 [2(E/Z) -2- (2-furilmetileno)hidrazinil] -2- oxoetilfosfonato de dibutila (14) .....	25
3.4.15 [2(E/Z) -2- (2-tienilmetileno)hidrazinil] -2- oxoetilfosfonato de dibutila (15).....	25
3.4.16 [2(E/Z) -2- (5-nitro-2-oxo-1,2-di-hidro-3H-indol-3-ilideno)hidrazinil] -2-oxoetilfosfonato de dibutila (16) .....	25
3.4.17 [2(E/Z) -2 - (5-cloro-2-tienilmetileno)hidrazinil] -2- oxoetilfosfonato de dibutila (17).....	25
3.5. Ensaio biológico com fungos .....	26
3.5.1. Preparo das soluções e inoculação dos fungos. ....	26
3.6. Ensaio biológico com melanoma.....	28
3.6.1 Cultura de Células .....	28

3.6.2 Manutenção da Cultura B16F10.....	28
3.6.3 Preparo da Cultura para o experimento .....	28
3.6.4 Teste in vitro.....	28
3.6.5 Teste colorimétrico para quantificação de proliferação celular e aplicação em bioensaios .....	29
3.7. Ensaio para verificação da enzima acetilcolinesterase. ....	29
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>29</b>
4.1 Síntese dos fosfonoacetatos de dialquil etila. ....	30
4.1.1. Determinação estrutural do fosfonoacetato de trietila (I) e fosfonoacetato de dibutil etila (II). 31	
4.1.1.1. Análise por espectrometria de infravermelho.....	31
4.1.1.2. Análise por espectrometria de RMN <sup>1</sup> H.....	32
4.1.1.3. Análise por espectrometria de RMN <sup>13</sup> C.....	33
4.2. Síntese dos dialquifosfonil hidrazidas acéticas .....	36
4.2.1. Determinação estrutural do fosfonato de dietila - 2-hidrazino-2-oxietila (III) e 2-hidrazinil-2-oxoetilfosfonato de dibutila (IV) .....	36
4.2.1.1. Análise por espectrometria de infravermelho.....	36
4.2.1.2. Análise por espectrometria de RMN <sup>1</sup> H.....	37
4.2.1.3. Análise por espectrometria de RMN <sup>13</sup> C.....	38
4.2.1.4. Análise por espectrometria de RMN <sup>31</sup> P .....	39
4.3. Síntese das dialquifosfonilacilidrazonas.....	41
4.3.1. Determinação estrutural das dialquifosfonilacilidrazonas.....	47
4.3.1.1. Análise por espectrometria de infravermelho.....	47
4.3.1.2. Análise por espectrometria de RMN <sup>1</sup> H.....	47
4.3.1.3. Análise por espectrometria de RMN <sup>13</sup> C.....	55
4.3.1.4. Análise por espectrometria de RMN <sup>31</sup> P e RMN <sup>31</sup> P <sub>CPD</sub> .....	62
4.3.1.5. Análise por espectrometria de massas .....	63
4.6 Ensaio biológico com fungos .....	64
4.3 Ensaio em melanoma.....	68
4.4 Ensaio biológico com Acetilcolinesterase.....	69
<b>5. CONCLUSÃO.....</b>	<b>72</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>73</b>
<b>7. ANEXOS .....</b>	<b>83</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A agricultura está relacionada com o cultivo de plantas e outras formas biológicas destinadas não só a produção de alimentos como também de fibras e outros produtos necessários para a vida. A história e evolução da agricultura são caracterizadas por constantes desafios, devido às restrições para a expansão de terras e o aumento de sua produtividade além do atendimento à expansão do consumo (SILVA; COSTA, 2011).

A necessidade agropecuária de maior produção de alimentos em espaços cada vez menores levou à busca de tecnologias capazes de proporcionar maior rendimento por área e com isso houve a proliferação do uso de defensivos agrícolas (DAs) (YTOSHI *et al.*, 2010).

A utilização dos defensivos agrícolas se iniciou na década de 1920, quando ainda eram poucos conhecidos toxicologicamente e no Brasil passou a ser utilizado intensivamente na agricultura a partir da década de 1960. O Plano Nacional de Desenvolvimento (PND), em 1975, foi responsável pela abertura do Brasil ao comércio de defensivos agrícolas (YTOSHI *et al.*, 2010).

Os pesticidas são essenciais para a produção mundial agrícola, especialmente nas culturas de milho, trigo e soja. Eles incluem uma gama de diferentes famílias químicas (como organofosforados, piretróides, organoclorados e carbamatos) e desempenham um papel importante na agrícola (BORTOLOZO *et al.*, 2016; LIU *et al.*, 2016). Durante muito tempo, os pesticidas organoclorados foram usados no controle de pragas em campanhas de saúde agrícola e pública, tanto em campos quanto em áreas urbanas, mas na década de 70, houve a proibição desses compostos, no entanto, até a década de 1990, o seu comércio ainda era permitido em alguns países. No Brasil, a sua proibição ocorreu em duas etapas: em 1985, não eram permitidos para uso em aplicações agrícolas e, em 1998, foram proibidos em campanhas de saúde pública, com a proibição total ocorrendo somente em 2009 (OLIVEIRA *et al.*, 2016).

Os compostos organofosforados (OFs) foram descritos pela primeira vez no início do século 19 por Jean Pierre Boudet, quando ele gerou traços de “éter fosfórico” como um resultado da combinação de ácido fosfórico e álcool. No entanto, somente em 1848 que Franz Anton Voegeli criou o primeiro OF, o fosfato de trietila. Após 5 anos, Philippe de Clermont descrevia síntese do primeiro OF com propriedades anti-colinesterase, o pirofosfato de tetraetila (TEPP). Na década de 1930 os OF foram descritos como tóxicos para mamíferos e insetos, despertando o interesse militar e influenciando na sua evolução como agentes neurotóxicos, como o Sarin, Soman e Tabun, sintetizados por Gerhard Schrader, considerado o “pai de compostos OF modernos” (MARSILLACH *et al.*, 2013). Em adição à sua utilidade como produtos químicos para agricultura e agentes de guerra, os OF também têm sido utilizados na indústria como plastificantes, retardadores de chama, aditivos para combustíveis e lubrificantes, ou mesmo na medicina como agentes terapêuticos. De acordo com as tecnologias utilizadas na indústria, tricloreto de fósforo ( $\text{PCl}_3$ ) e oxicloreto de fósforo ( $\text{POCl}_3$ ) são materiais de partida para a síntese de compostos orgânicos contendo fósforo. Como resultado da utilização de métodos tradicionais para a síntese de OF, quantidades significativas de subprodutos difíceis de se manipular, tais como ácido clorídrico ou outros cloretos, são formados (KARGIN *et al.*, 2001; MARSILLACH *et al.*, 2013).

Como nas moléculas sintetizadas neste trabalho existe uma porção hidrazônica, descreveremos a seguir um breve apanhado dessa classe de compostos. As hidrazonas são amplamente estudadas por suas propriedades antimicrobianas, anti-cancerígena e anticonvulsivantes. Estas ganharam importância devido às suas diversas aplicações biológicas e clínicas e têm sido extensivamente estudadas como reagentes ou intermediários de reação, uma vez que eles podem facilmente sofrer várias reações de fechamento de anel. As hidrazonas possuem uma azometina  $-\text{N}=\text{CH}$  constituindo uma importante classe de compostos para o desenvolvimento de novos medicamentos (GOMATHI & GOPALAKRISHNAN,

2016). Estes compostos, que possuem tanto um grupo doador de elétrons, como um grupo de retirador de elétrons em extremidades opostas, são de fundamental importância na química de materiais, servindo como componentes importantes para muitas tecnologias avançadas. Além disso, as hidrazonas contêm dois átomos de nitrogênio de natureza diferente ligados que funcionam como espaçador. Estes fragmentos estruturais são os principais responsáveis pelas propriedades físicas e químicas das moléculas (RAWAT&SINGH, 2015).

A versatilidade e utilidade de N,N-dialquilhidrazonas como intermediários na síntese orgânica têm sido demonstradas em uma série de reações para formação de ligação C-C e, também, tem gerado considerável interesse no desenvolvimento de métodos brandos de transformação e quebra de dialquifosforilhidrazonas (FERNÁNDEZ *et al.*, 1993).

As acilidrazonas (-CO-NH-N=C) têm atraído atenção durante décadas devido às suas amplas aplicações que variam desde agentes medicinais, agroquímicos até materiais funcionais. Recentemente, muitos compostos que contêm esta porção química têm sido relatados por demonstrarem que a introdução deste farmacóforo pode resultar em aumento da potencial atividade antiviral, antibacteriana, antitumoral e antioxidante, além de serem agentes leishmanicida, anticonvulsivante, analgésico, anti-inflamatório, anti-plaquetário e antituberculose. Os derivados de acilidrazona também têm sido amplamente utilizados como ligantes para preparar vários complexos e sensores químicos que são foco para pesquisadores em materiais devido à sua ligação reversível da acilidrazona (BOUHADIR *et al.*, 2016; YU *et al.*, 2015).

A atividade biológica significativa das acilidrazonas e a dependência do seu modo de quelação com íons de metais de transição presentes nos sistemas vivos têm sido de interesse significativo. Alguns complexos de metais de transição de acilidrazonas também são conhecidos por fornecerem modelos úteis para a elucidação dos mecanismos de inibição da enzima. Potencialmente, eles agem como bons medicamentos orais para tratar as doenças genéticas, como a talassemia, um distúrbio sanguíneo que envolve quantidades de proteínas transportadoras de oxigênio abaixo dos níveis normais e que não possui cura (GUP *et al.*, 2015).

Como um dos focos principais deste trabalho também trata do combate de fungos pós-colheita, iniciar-se-á uma pequena revisão deste assunto.

Os agricultores dos países desenvolvidos e em desenvolvimento envidam grandes esforços no cultivo de culturas para consumo próprio ou para a geração de renda. As perdas pré-colheita geradas por ervas daninhas, doenças e insetos têm recebido grande atenção em termos de pesquisa científica e atividades de extensão, enquanto as perdas pós-colheita, em geral, têm recebido relativamente pouca atenção. Nas doenças pós-colheita, típicas de agentes causais, infectam os frutos após a colheita e necessitam, geralmente, de um ferimento para sua penetração (BROWN *et al.*, 2013; PARISI *et al.*, 2015). A deterioração pós-colheita resultante de patógenos fúngicos é um grande problema que afeta não só a qualidade como também o valor de comercialização de vegetais, gerando perdas econômicas substanciais devido a doenças pós-colheita em todo o mundo. Estima-se que nos países desenvolvidos, cerca de 20-25% das frutas e produtos hortícolas colhidos sejam afetados por patógenos durante o manejo pós-colheita. A antracnose causada por *Colletotrichum Gloeosporioides* é uma das principais doenças pós-colheita que atinge várias culturas, dentre elas a manga e mamão (XU *et al.*, 2017). A aplicação de pulverização generalizada de fungicidas visa reduzir este problema, no entanto, a crescente preocupação com a saúde ambiental e humana, tornou necessária a procura de meios alternativos para o controle de doenças (LI *et al.*, 2017; YANG *et al.*, 2017b).

Os testes de sensibilidade são indicados para qualquer organismo responsável por um processo infeccioso que exija terapia antimicrobiana, quando é impossível prever a sensibilidade desse organismo, mesmo conhecendo a sua identificação. Esses testes

geralmente são indicados quando o organismo causador pode apresentar resistência aos agentes antimicrobianos usados (NCCLS, 2003). Existem diferentes tipos de testes de susceptibilidade disponíveis, incluindo métodos de difusão em disco e micro diluição em caldo, bem como testes comerciais para a determinação da concentração inibitória mínima (MIC). O método de difusão em disco é o método mais comumente utilizado, principalmente devido ao seu baixo custo e simplicidade. Neste método, cada disco contendo um agente antimicrobiano irá formar uma zona de inibição onde o microrganismo não é capaz de crescer. O tamanho (diâmetro) da zona de inibição é utilizado para classificar as estirpes consideradas resistentes (R), o intermediário (I), ou sensível (S). O antibiograma confere os resultados dos testes de susceptibilidade *in vitro* realizados em um patógeno isolado (ANDREASSEN *et al.*, 2015; COSTA *et al.*, 2015).

Em relação a toxicidade de alguns compostos OF, a atividade da enzima hidrolítica acetilcolinesterase (AChE) é o principal marcador do metabolismo colinérgico que possibilita um controle temporal preciso da ativação sináptica através da hidrólise rápida de acetilcolina (ACh) em acetato e colina. O sistema colinérgico possui um papel crucial na função cognitiva, embora represente apenas 5-10% dos neurônios corticais e do hipocampo. A AChE está relacionada a várias funções cognitivas e pode desempenhar papéis importantes em distúrbios neurodegenerativos, incluindo a doença de Alzheimer (COMIM *et al.*, 2011).

O câncer, objeto também desse estudo, é uma doença de causa multifatorial que resulta principalmente de alterações genéticas, fatores ambientais e do estilo de vida. Mortes por câncer são predominantemente resultado de metástases, que são resistentes a terapias convencionais. As estratégias para tratamento do câncer normalmente são difíceis devido a composição heterogênea da maioria dos tumores e as terapias convencionais não têm como alvo todas as variedades de tumores, especialmente aquelas com características de células-tronco que, em muitos casos, possuem resistência as drogas testadas.

O melanoma cutâneo apresenta-se de forma crescente em populações de diversos países, por razões desconhecidas, criando consideráveis desafios nos diagnósticos clínicos e patológicos (HENDRIX *et al.*, 2016; WICK, 2016). A radiação UV, dividida em UVA, UVB e UVC (sendo esta última filtrada pela camada de ozônio), pode promover danos ao DNA. Os raios UVA, através da absorção de moléculas endógenas sensibilizadas pela radiação induz a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), já a UVB promove danos mais severos e diretos ao DNA pela formação de dímeros de pirimidina ciclobutano em timinas e citosinas adjacentes. Essas alterações atreladas a ineficiência dos mecanismos de reparo do DNA que as células tumorais apresentam, são alguns dos fatores que desencadeiam a formação do melanoma (MIRANDA, 2015). O melanoma é tumor maligno originário da proliferação anormal e desordenada dos melanócitos, que são células produtoras de melanina, substância que determina a cor da pele. Este pode se desenvolver na pele de qualquer parte do corpo, mas é mais propenso em locais como o tronco (local mais comum em homens), as pernas (local mais frequentemente nas mulheres), o pescoço e o rosto, ocorrendo também em partes como olhos, orelhas, trato gastrointestinal, membranas mucosas e genitais sendo um dos tumores mais perigosos, devido a capacidade de invadir qualquer órgão, inclusive cérebro e coração, criando metástases, sendo portanto um câncer com grande letalidade. O câncer cutâneo ou de pele, pode se apresentar de diferentes tipos: o câncer de pele melanoma, câncer de pele não melanoma, o carcinoma basocelular e o carcinoma espinocelular. O melanoma cutâneo é um tipo de câncer de pele que tem predominância em adultos brancos. Embora o câncer de pele seja o mais frequente no Brasil correspondendo a 25% de todos os tumores malignos registrados no país, este câncer representa apenas 4% das neoplasias malignas do órgão, apesar de ser o mais grave devido à sua alta possibilidade de metástase. Estima-se que há mais de 6 mil novos casos de melanoma por ano (ARAÚJO *et al.*, 2010; INCA, 2016; INSTITUTO ONCOGUIA, 2016).

Para o ano de 2014, foram estimados 5.890 novos casos de melanoma cutâneo no Brasil; sendo 2.960 em homens e 2.930 em mulheres. As maiores taxas de incidência foram estimadas na região sul. Nesse sentido, é importante o estudo de novos tratamentos que possam auxiliar no tratamento e na cura desta doença (MORENO *et al.*, 2015; SETLIK& CÁSSIO, 2015).

## **1.1 Revisão de Literatura**

### **1.1.1 Agricultura brasileira e a utilização de defensivos químicos**

A agricultura brasileira é um setor primário, que gera renda para o país. As mercadorias agrícolas têm sido o foco principal da produção e da exportação brasileira. Globalmente, o Brasil é atualmente um dos principais produtores e exportadores de alimentos sendo um dos maiores produtores de café, milho, soja, cana de açúcar (açúcar e etanol), plantas oleaginosas, laranja (fruta fresca e suco) e uvas (OLIVEIRA *et al.*, 2014).

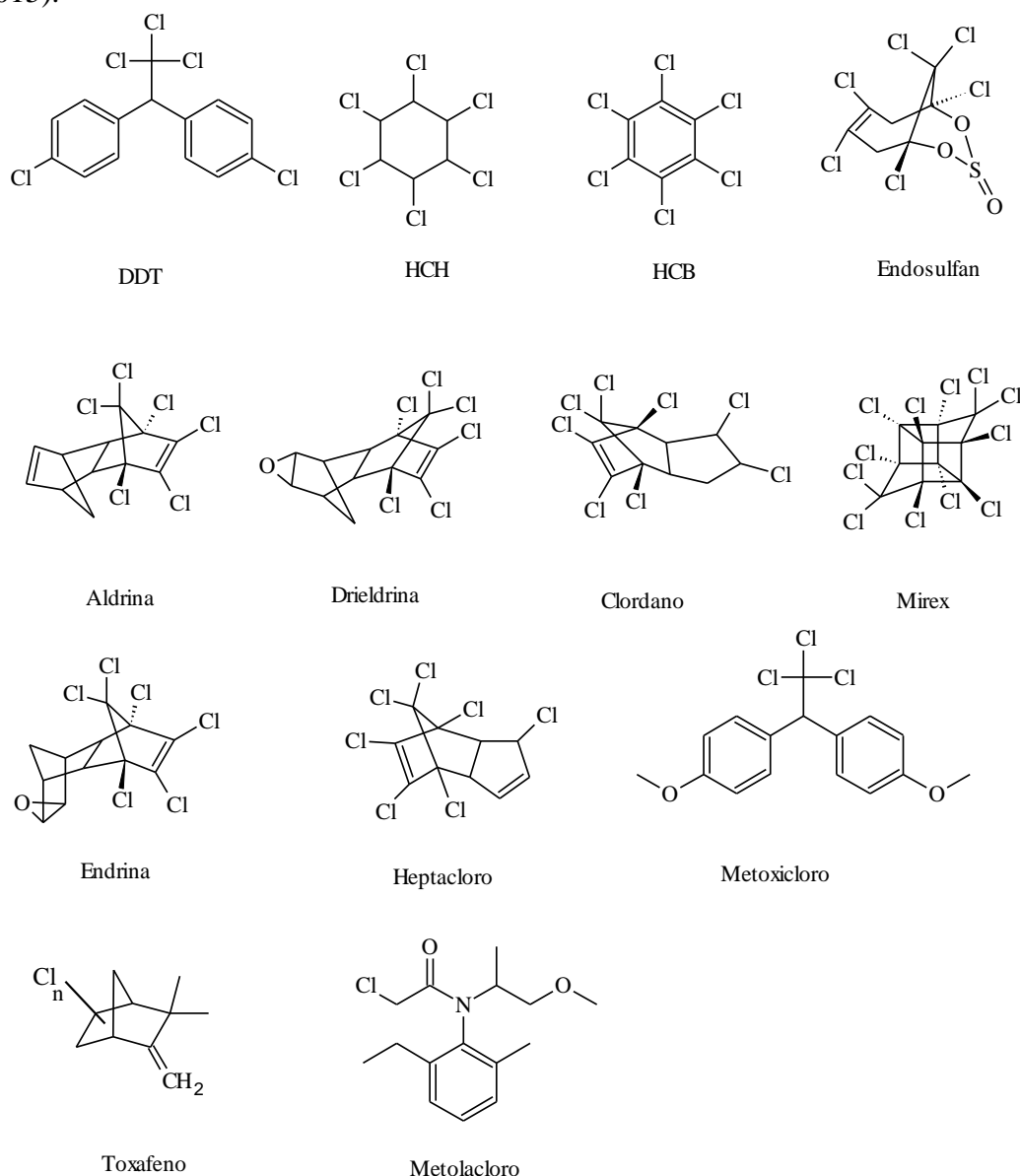
No Brasil são observadas profundas mudanças no processo tradicional da produção agrícola e nos impactos dessa atividade sobre o ambiente e a saúde humana a partir da década de 50, quando se iniciou a chamada “Revolução Verde”. Novas tecnologias, muitas delas baseadas no uso extensivo de agentes químicos, foram disponibilizadas aos agricultores aumentando a produtividade através do controle de doenças e proteção contra insetos e outras pragas (RIBAS; MATSUMURA, 2009).

Além de atender à crescente demanda mundial por alimentos, a agricultura também enfrenta pressões crescentes sobre o redução do seu impacto ambiental, especialmente em relação ao uso de pesticidas (KNAAK *et al.*, 2015).

O Brasil é especialista em cultivos em que o consumo de defensivos químicos tem grande importância, como soja, cana-de-açúcar, milho, arroz, citros, café, algodão, hortaliças e outras frutas. Contudo, os sucessivos aumentos na produtividade agrícola brasileira não teriam sido alcançados sem a correta e segura utilização dos defensivos agrícolas, setor que vem crescendo muito no país. O segmento vem apresentando faturamento crescente nos últimos anos, atingindo US\$ 11,454 bilhões em 2013, com alta de 18% em relação a 2012 (US\$ 9,7 bilhões). Os números colocam o Brasil na liderança no consumo mundial de agroquímicos, posição antes ocupada pelos Estados Unidos (ABIFINA, 2017). Em 2011, o Brasil passou a ser destaque global pois se tornou o maior mercado consumidor de um destes insumos, alcançando cerca de US\$ 8,5 bilhões/ano, se tornando assim o maior consumidor de pesticidas na América Latina (SANTOS, 2012; SILVA; COSTA, 2011). Embora a agricultura seja praticada pelo homem há mais de dez mil anos, o uso intensivo de defensivos químicos para o controle de pragas e doenças das lavouras data de um pouco mais de meio século. Ele teve origem após as grandes guerras mundiais, quando a indústria química fabricante de armas químicas encontraram na agricultura um novo mercado para os seus produtos (LONDRES, 2011).

Defensivos químicos, agrotóxicos, pesticidas, praguicidas são algumas das inúmeras denominações relacionadas a um grupo de substâncias químicas utilizadas no controle de pragas (animais e vegetais) e doenças de plantas. De um modo geral, o consumo desses agentes no meio rural é de herbicidas, inseticidas e fungicidas. Os herbicidas são os mais utilizados, no entanto, geralmente, a toxicidade deste grupo de substâncias é inferior à dos inseticidas. De acordo com propriedades químicas, pesticidas podem ser agrupados em 7 classes distintas, incluindo organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretróides, aminas, anilinas e compostos nitrogenados. Pesticidas organoclorados tradicionais muitas vezes se acumulam e persistem no ambiente. Os organofosforados e os carbamatos apresentam são, em sua maioria, inibidores da enzima acetilcolinesterase (OLIVEIRA-SILVA *et al.*, 2001; RIBAS& MATSUMURA, 2009; ZHENG *et al.*, 2016).

Apesar dos defensivos serem utilizados desde a segunda metade do século XIX, época em que surgiram os primeiros fungicidas, como enxofre, cobre, calda bordalesa ( $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{CaO}$  e  $\text{H}_2\text{O}$ ), nicotina, piretrinas, acetado de chumbo, acetatos mercuriais, entre outros, as inovações nesta área só surgiram a partir da introdução dos ditiocarbamatos. A década seguinte teve grande importância na trajetória da indústria de defensivos e, em particular, de inseticidas, pois houve a introdução do diclorodifeniltricloroetano (DDT), inspirando o desenvolvimento de vários organoclorados. Os pesticidas organoclorados tiveram uma ampla utilização em todo o mundo para controlar pragas agrícolas e doenças transmitidas por vetores. Entre os compostos clorados usados regularmente, o DDT, hexaclorociclohexano (HCH), hexaclorobenzeno (HCB), endosulfan, aldrina, dieldrina, clordano, mirex, endrina, heptacloro, metoxicloro, toxafeno e metolacloro, Figura 1, são considerados pesticidas orgânicos persistentes no ambiente, pois são compostos muito estáveis e sua meia-vida pode variar de alguns meses a vários anos, em alguns casos, décadas. Estimou-se que a degradação de DDT no solo varia de 4 a 30 anos, ao passo que outros organoclorados podem permanecer estáveis durante muitos anos após a sua utilização. A degradação destes compostos ocorre através de meios químicos, físicos, biológicos e microbiológicos (FILHO, 2004; YADAV *et al.*, 2015).

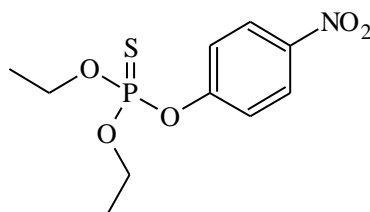


**Figura 1** - Estrutura química de compostos organoclorados persistentes no ambiente.



Embora a produção e a utilização da maioria desses compostos tenham sido proibidas na década de 1970 e 1980 nos países desenvolvidos, eles ainda são uma preocupação ambiental devido à sua elevada lipofilicidade e resistência à degradação, que primeiramente leva à bioacumulação na cadeia alimentar para em seguida, em tecidos e fluidos humanos. Devido às suas propriedades desreguladoras do sistema endócrino, suspeitou-se que esta classe de pesticidas possui efeitos adversos sobre a reprodução humana, onde alguns compostos têm sido considerados possivelmente carcinogênicos para humanos (SAUDI *et al.*, 2014).

Em virtude da toxicidade dos organoclorados, surgiram posteriormente os compostos organofosforados, tendo como principal produto o Paration, Figura 2, introduzido em 1944. Os OFs representam mais de 36% do total do mercado mundial de pesticidas químicos e são a classe mais utilizada de pesticidas para o controle de pragas agrícolas devido à sua elevada eficácia para o controle de insetos sugadores e mastigadores, garantindo a elevada produção de culturas e vegetais (FILHO, 2004; SHAPIRO *et al.*, 2016; YAN *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2014).



**Figura 2-**Paration (fossforotiotato de O, O-dietil-O-4-nitrofenila), pesticida organofosforados amplamente utilizado na agricultura.

### 1.1.2 Compostos de fósforos

A história de fósforo tem origem na busca da pedra filosofal, sendo Henning Brand o responsável pela descoberta e nomeação de fósforo elementar em 1669.

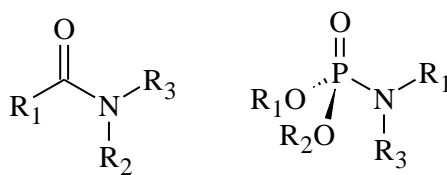
O elemento fósforo é essencial para a vida - plantas, animais e bactérias. Isto significa que o fósforo não tem substituto no cultivo e, conseqüentemente, na produção de alimentos (GIFFIN & MASUDA, 2011).

O fósforo é um recurso natural limitado. Presente na matéria orgânica, na comida que consumimos, ele ainda faz parte do nosso corpo, principalmente na estrutura óssea. Na agricultura, este nutriente tem sido aplicado em quantidades crescentes como fertilizantes químicos desde o início do século 20. Bioquimicamente, o fósforo é a base para toda a vida em nosso planeta. Seres humanos adultos contém aproximadamente 0,7 kg de fósforo, sobretudo nos ossos e dentes como os sais de fosfato de cálcio. A nível molecular, nas estruturas de polinucleotídeos de ADN e ARN, o fósforo forma as pontes fosfodiéster que ligam um nucleotídeo ao outro. O trifosfato de adenosina (ATP) é o principal transportador de energia química em células e os fosfolípidos, que contêm fósforo na forma de ácido fosfórico, são encontrados em membranas celulares e nas lipoproteínas do plasma sanguíneo (ASHLEY *et al.*, 2011; CORDELL *et al.*, 2009; GIFFIN & MASUDA, 2011).

A química de fósforo tem uma enorme importância em muitos setores distintos da indústria e da vida humana, sendo praticamente paralela à química do carbono em termos de complexidade e importância (PERUZZINI *et al.*, 2004).

A formação da ligação heteroátomo-fósforo é importante para a preparação de OFs. Muitas pesquisas foram conduzidas a fim de desenvolver novos processos e métodos para a síntese de compostos organofosforados com atividade biológica. Entre os OFs, fosforamidas (análogos de fósforo de amidas contendo um átomo de fósforo pentavalente tetraédrico) são

particularmente importantes, Figura 3. Eles são análogos estáveis de estado de transição tetraédricas de alta energia para muitas reações catalisadas por enzimas (KABOUDIN *et al.*, 2015).



Amidas

Fosforamidatos

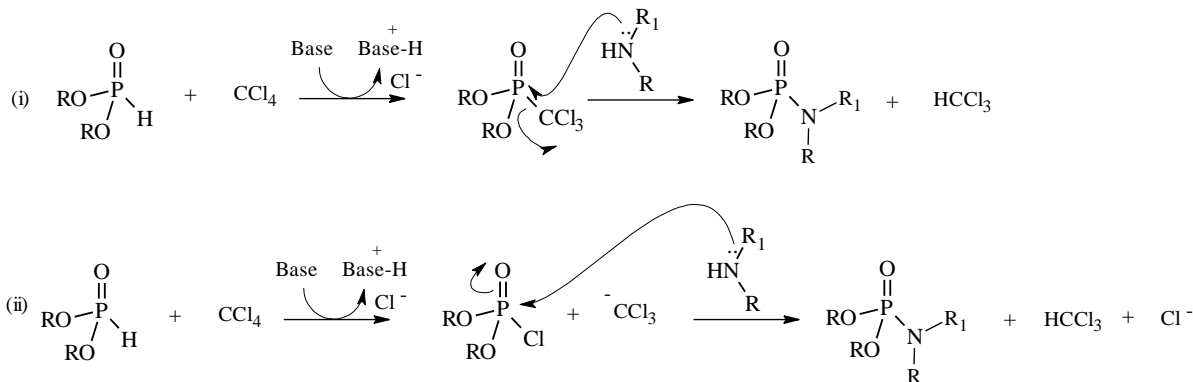
**Figura 3** - Estruturas de amidas e fosforamidatos.

A química de OFs está relacionada com o estudo de carbono orgânico e da porção de fósforo inorgânico. O interesse no estudo destes compostos está crescendo rapidamente devido à aplicação dos OFs em diversas áreas, como pesticidas, drogas, polímeros, perfumes, removedor de tinta, revestimento protetor e indústrias de automóvel. O rápido desenvolvimento neste estudo também ajudou a entender a bioquímica envolvendo estes compostos, como a síntese de DNA, que opera por meio do intermediário fosfito seguido por sua oxidação a fosfato, uma forma estável de composto OF, durante a síntese. O estudo de fosfatos (ésteres de ácido fosfórico) e as suas reações são particularmente importantes e servem como sistemas modelo na compreensão de muitas reações biológicas (JOSHI *et al.*, 2015).

Os compostos orgânicos de fósforo são intermediários valiosos na síntese orgânica. Eles são utilizados como componentes estruturais em produtos farmacêuticos, polímeros, materiais ópticos e compostos biologicamente ativos, e são intermediários chave para a preparação de ligantes de fosfina. O crescente interesse neste tipo de compostos e uma variedade de métodos foram desenvolvidos nos últimos anos para a sua preparação utilizando como reagente de fosforilação os fosfonatos P(O)-H. No entanto, trabalhos relatando o uso de P(O)-H são escassos (XIONG *et al.*, 2014).

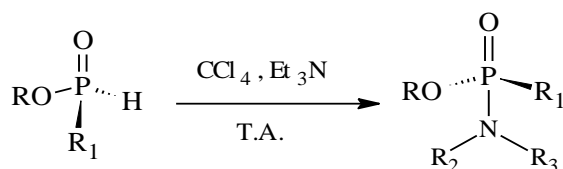
O método mais frequentemente utilizado para a sua preparação de compostos orgânicos de fósforo é tratar o P(O)-H com nucleófilos sob as condições da reação de Atherton-Todd, como apresentado no Esquema 1. A reação Atherton-Todd é um método de síntese clássica amplamente utilizado para a preparação de fosfatos e compostos de fósforo relacionados (LE CORRE *et al.*, 2014; XIONG *et al.*, 2014).

Apesar de estudos extensivos, o mecanismo da reação de Atherton-Todd não é totalmente compreendido. Atherton e Todd descobriu essa reação em 1945 e propôs um possível mecanismo que envolve um intermediário fosfonato triclorometila. Mais tarde, Steinberg investigou o mecanismo da reação de Atherton-Todd, em 1950, e confirmou a formação de intermediários de (RO)<sub>2</sub>P(O)Cl na reação (Esquema 1).



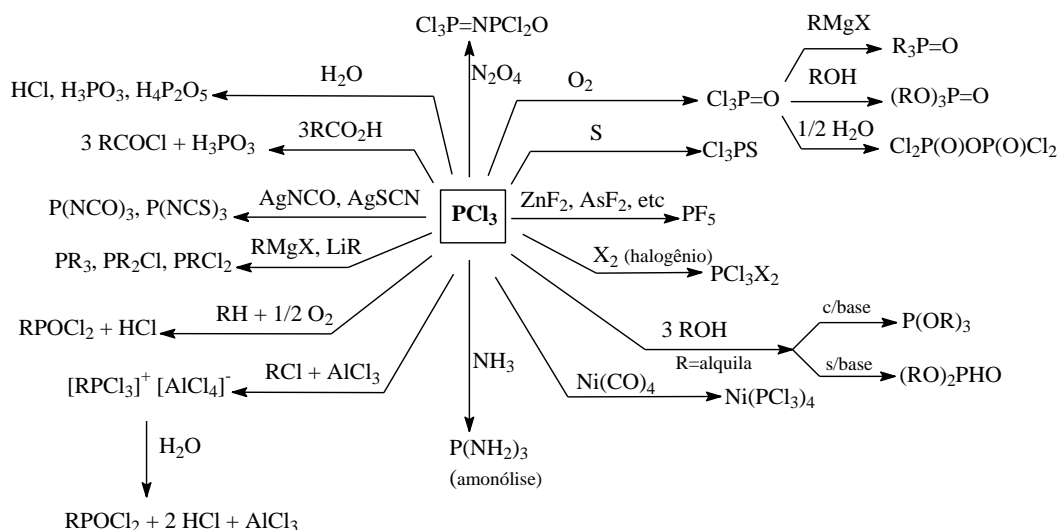
**Esquema 1** - Esquema de reação (i) e (ii) sugeridos por Atherton e Todd em 1945; adaptado de ATHERTON *et al.*, (1945).

Em 1985, Engel, também propôs um mecanismo plausível através de um intermediário de cloreto de fosforila pentacoordenado. Além disso, pouco se sabe sobre a estereoquímica da reação de Atherton-Todd. Em 1972, Mikolajczyk estudava a estereoquímica da reação de halogenetos de fósforo opticamente ativos com álcoois e aminas, e descobriu que a reação prosseguia com inversão de configuração no centro de fósforo. Em 1980, Inch investigou a estereoquímica e o mecanismo de formação e quebra de ligação do fósforo em alguns ésteres de fósforo cíclicos de cinco/seis membros. Em 2010, Xiong e colaboradores estudaram a reação de H-fosfinato com aminas nas condições de reação de Atherton e Todd. Com base na estrutura de raios X do produto de H-fosfinato opticamente ativo com amoníaco, deduziu-se que esta reação pode prosseguir com a inversão da configuração no centro de fósforo, conforme é mostrado no Esquema 2 (XIONG *et al.*, 2013).



**Esquema 2** - Inversão da configuração no centro de fósforo.

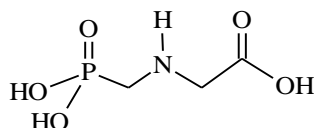
O material de partida para a produção industrial de compostos organofosforados é o fósforo branco,  $\text{P}_4$ , que se encontra prontamente disponível, é barato e altamente reativo. Em fábricas de produção, o fósforo branco reage com cloro gasoso gerando o tricloreto de fósforo ( $\text{PCl}_3$ ) um composto importante para reações utilizando substratos orgânicos apropriados (PERUZZINI *et al.*, 2004). Uma das maneiras mais simples para a síntese de fosfatos e fosfitos, é a reação entre o tricloreto de fósforo ( $\text{PCl}_3$ ) e álcool. Uma vez que, a reação que envolve o  $\text{PCl}_3$  como precursor, possui aplicações em várias fases de síntese, se apresentando como o reagente fosforado mais utilizado na síntese de OFs e demais compostos por ser extremamente reativo e possuir diversas aplicações sintéticas, Esquema 3 (COTTON; WILKINSON, 1988; JOSHI *et al.*, 2015; KORNEV *et al.*, 2015).



**Esquema 3** - Aplicações sintéticas do  $\text{PCl}_3$ .

Fósforo contendo modificações em sua estrutura possui especial importância, visto que melhoram a solubilidade e biodisponibilidade de compostos biologicamente ativos e drogas facilitando a entrega do farmacóforo ao alvo biológico. A inclusão do grupo fosfonato à estrutura piperidona resulta em aminofosfonatos, contendo piperidina, que podem ser considerados como análogos de ésteres de fósforo de aminoácidos tornam-se candidatos de drogas potenciais (MAKAROV *et al.*, 2015).

Os OFs ainda são importantes para as atividades agrícolas em todo o mundo, sendo uma família muito diversificada de produtos químicos orgânicos com muitos usos. A grande maioria dos OFs pode ser considerado como derivados de ácido fosfórico e incluem muitos resíduos heterocíclicos. O uso extensivo na agricultura é devido as muitas vantagens, tais como custo relativamente baixo, um largo espectro de atividade e alto impacto sobre insetos. De 76 pesticidas OFs comerciais, 58 são inseticidas, 7 são herbicidas, 5 fungicidas, 4 são nematocidas e 2 são reguladores de crescimento (CASIDA & QUISTAD, 2005). Estes compostos possuem diversidade de substituintes químicos e alvos bioquímicos. O uso do herbicida glifosato, Figura 4, nos Estados Unidos ultrapassa o de todos os outros pesticidas OFs e no Brasil, o glifosato é o ingrediente ativo com maior volume de vendas. A quantidade de uso de inseticidas OFs está diminuindo, mas a sua importância, provavelmente, vai continuar por décadas, devido a sua eficiência, baixa acumulação no meio ambiente e baixo custo (ANVISA, 2017; CASIDA & QUISTAD, 2005; CHEN *et al.*, 2016; GÜNGÖRDÜ *et al.*, 2013).

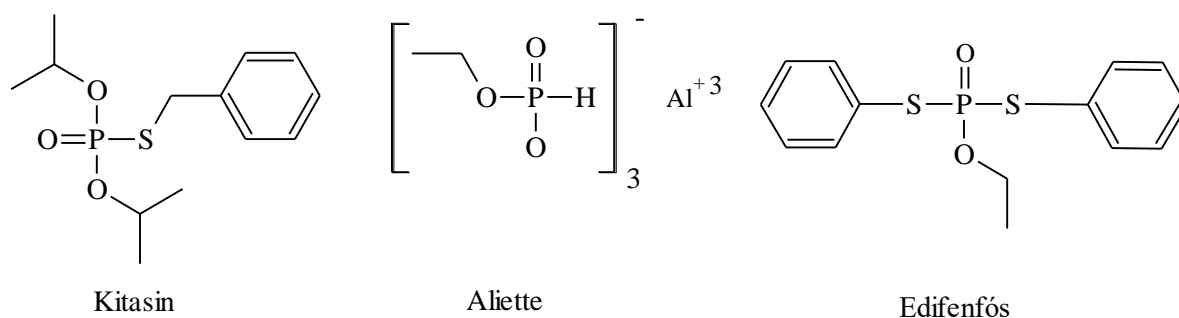


**Figura 4** - Estrutura do herbicida glifosato.

Muitos OFs podem ser hidrolisados na presença de água ou por enzimas específicas, resultando na desintoxicação. Inseticidas OFs são, principalmente, derivados do ácido ortofosfórico ou tiofosfórico, contendo geralmente dois grupos de substituintes alcóxi e um terceiro substituinte conhecido como o “grupo de saída”, que é deslocado quando o OF interage com hidrolases de serina promovendo sua inibição progressiva, tendo como principal

alvo a enzima AChE. Os OFs possuem muitos resíduos heterocíclicos; 12 tipos de compostos heterocíclicos estão descritos como pesticidas OF. Os resíduos heterocíclicos podem determinar a sua toxicidade, tal como os pesticidas, mas estes grupos, tais como benzimidazol, benzotiazol, benzoxazol, e piperazina exibem atividades farmacológicas versáteis, incluindo antimicrobianos, anti-helmínticos, anti-viral, analgésico local, e efeitos espasmolíticos (GÜNGÖRDÜ *et al.*, 2013; MARSILLACH *et al.*, 2013).

Os fungicidas OFs assumiram grande importância como agentes anti brusone. Brusone é causado pelo fungo *Pyricularia oryzae* é considerada a doença mais preocupante para a cultura de arroz, podendo provocar perdas de até 80%. O primeiro composto deste tipo foi o Kitazin (S-benzil-O,O-dietilfosforotioato) seguido por "Kitazin P" (S-benzilo O, O-diisopropil fosforotioato), "Hinosan" (nome comum Edifenfós) e "Conen" (S-benzilo O-butil S-etil fosforoditioato). O Kitazin é um fungicida desenvolvido para controle de brusone no arroz e outros fungos fitopatogênicos (MAEDA *et al.*, 1970). Um exemplo de fosfonato fungicida é Aliette [Tris (O-etil-fosfonato) de alumínio] Figura 5, comercializado em combinação com outro fungicida protetor, o Mikal, ativo contra *Alternaria excoziosis* e podridão negra nas culturas tropicais e temperadas. Diferentemente dos inseticidas, a atividade dos OFs não é devido à inibição da enzima AChE, mas à acilação de enzimas contendo grupos mercapto. Grandes progressos foram realizados nos últimos anos no desenvolvimento de diferentes tipos de fungicidas sistêmicos e sua utilidade na proteção das culturas é inegável (ADELOWO, 2012).



**Figura 5** - Estrutura dos fungicidas OFs Kitasin, Alliette e Edifenfós.

### 1.1.3 Hidrazonas

Como em nosso trabalho, os compostos sintetizados apresentam uma porção hidrazônica, faz-se necessária uma breve descrição dessa classe de compostos, uma vez que por si só, esta categoria apresenta diferentes tipos de atividades.

As hidrazinas e hidrazonas têm atraído considerável atenção de pesquisadores há muitos anos, pelo fato destas estruturas apresentarem diversas aplicações na área da saúde. As hidrazonas possuem atividades biológicas e farmacêuticas bem pronunciadas, tais como atividade antimicrobiana (antibacteriana, antifúngica, antiviral), anti-malária, anti-tumoral, anti-tuberculose, anti-inflamatório, anticonvulsivante, antiplaquetário sendo também um inibidor potencial para várias enzimas (ANBAZHAGAN & SANKARAN, 2015; GUPTA *et al.*, 2014).

As hidrazonas são moléculas importantes contendo grupo azometina (-N=CH), altamente reativos. Além disso, hidrazina e acilhidrazinas também são relatadas por serem o mais importante farmacóforo em drogas com ação anti-inflamatória, antinociceptivas e antiplaquetários. As hidrazinas que ocorrem naturalmente são escassas e poucas são conhecidas por suas funções biológicas (VELAYUTHAM PILLAI *et al.*, 2014; YADAGIRI *et al.*, 2014).

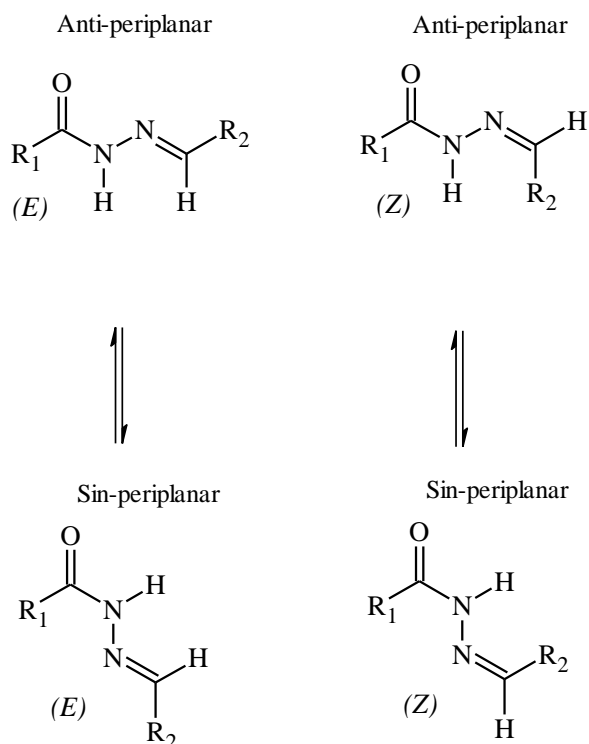
As hidrazonas heterocíclicas são compostos biologicamente ativos com uma vasta gama de atividade biológica. Hidrazonas e quelantes de metais de transição relacionados já

foram usados com sucesso para a regulação do equilíbrio de ferro no corpo, assim, elas podem servir como agentes terapêuticos no tratamento de doenças de sobrecarga de ferro, ou seja, a hemocromatose hereditária ou transfusional. Já o mecanismo de ação de hidrazonas como agentes anticancerígenos baseia-se na quelação de íons de metal, principalmente de ferro, importante na proliferação rápida tecidos tumorais. Outros mecanismos possíveis são a inibição de enzimas (ribonucleótido redutase, histona-desacetilase ou transferases de acila), a toxicidade de complexos de metal formado (sistemas redox que produzem espécies reativas de oxigênio tóxicas) bem como a intercalação do DNA. Seu mecanismo de ação ainda não é totalmente compreendido e necessita de uma investigação mais aprofundada (KAPLÁNEK *et al.*, 2015).

Os derivados de hidrazona têm sido intensivamente investigados como alvo para o desenvolvimento de drogas. Entre eles, acilidrazonas têm sido exploradas em vários campos de pesquisa, devido às suas propriedades farmacológicas amplas (BURGESON *et al.*, 2013). Os ligantes de acilidrazona e seus complexos metálicos possuem importância no aspecto químico bioinorgânica devido às suas propriedades estruturais e marcador, atividades biológicas, tais como antioxidantes, anti-inflamatória, antibacteriano e atividade antitumoral (YE *et al.*, 2014).

O grupo acilidrazona também tem sido utilizado como um ligante sensível a ácido para aplicações tais como a conjugação do anticorpo e de entrega de genes. A porção acilidrazona confere estabilidade às estruturas sendo um grupo mais estável do que uma imina regular devido às contribuições de ressonância (BURGESON *et al.*, 2013). O grupo *N*-acilidrazona é considerado uma porção privilegiada e única em química medicinal, uma vez que tem um potencial para interagir com diferentes alvos biológicos, incluindo proteases de cisteína parasitárias. O caráter farmacológico deste grupo foi identificado durante o desenvolvimento de alguns inibidores de cisteína protease, um conjunto de enzimas que degradam proteínas. A cruzafina, principal cisteína protease de *Trypanosoma cruzi*, vem sendo um alvo específico para a concepção de novos e seletivos agentes anti-chagas (CARVALHO *et al.*, 2012; COSTA *et al.*, 2014; SERAFIM *et al.*, 2014).

A estrutura de *N*-acilidrazona tem sido amplamente explorada em projetos que visam novos compostos bioativos com diferentes perfis farmacológicos. Devido ao conjunto de funções de amida e imina, esses compostos podem existir como estereoisômeros de ligação dupla C=N (*E/Z*) e como conformadores *sin*-periplanar e *anti*-periplanar sobre a ligação amida CO-NH (Esquema 4) (LOPES *et al.*, 2013).



**Esquema 4** - Estrutura geral e estereoquímica da acilidrazona.

#### 1.1.4 Fungos e doenças Pós-colheita

Relatórios da FAO mostram que 1/3 dos alimentos produzidos no mundo é desperdiçado. Isso significa que 100 kg/ano/pessoa e 680 bilhões de dólares são jogados fora só nos países industrializados. Hortaliças, raízes e tubérculos têm as maiores taxas de perdas, estimado em cerca de 45%, e a maior parte destes resíduos é produzida desde a colheita até o mercado. As alterações fisiológicas e bioquímicas nas mercadorias, assim como possíveis lesões na colheita e durante o armazenamento prolongado, pode favorecer o desenvolvimento de patógenos causadores de doenças, que são uma das causas mais importantes de perdas através da cadeia de suprimentos (CERRILLO *et al.*, 2017). Doenças que são causadas por microrganismos levam a grandes perdas pós-colheita e essa deterioração é responsável por grandes perdas de culturas hortifrutícolas após a colheita e durante o transporte e armazenamento. As perdas de colheita e deterioração da qualidade destes produtos são causadas principalmente por pragas, infecção microbiana, processos e condições ambientais, tais como calor, secas e manipulação imprópria após a colheita. A perda ocorre em todas ou pelo menos uma das atividades pós-colheita, como colheita, manuseio, armazenamento, processamento, embalagem, transporte e comercialização (EL-MOGY& ALSANIUS, 2012; KASSO& BEKELE, 2016). As espécies de *Colletotrichum* são patógenos de plantas economicamente importantes afetando uma vasta gama de hospedeiros vegetais e infectando pelo menos 1000 espécies de plantas. Considerada a doença mais grave nas regiões tropicais e subtropicais, a antracnose gera danos econômicos substanciais devido à perda de frutas e redução do valor comercial de frutos doentes limitando a produção, comercialização e exportação de frutas e hortaliças. Os sintomas mais comuns associados às infecções por *Colletotrichum* são lesões necróticas afundadas, nas quais são produzidas frequentemente massas de conídios laranja (BONETT *et al.*, 2010; BRAGANÇA *et al.*, 2016; HONG *et al.*, 2015; MIKULIC-PETKOVSEK *et al.*, 2013). A infecção inicia-se quando o patógeno penetra nos frutos ainda verdes, permanecendo inativo até o seu amadurecimento, podendo então,

apresentar grande quantidade de lesões devido à colonização do tecido do hospedeiro, Figura 6 (BONETT *et al.*, 2010).



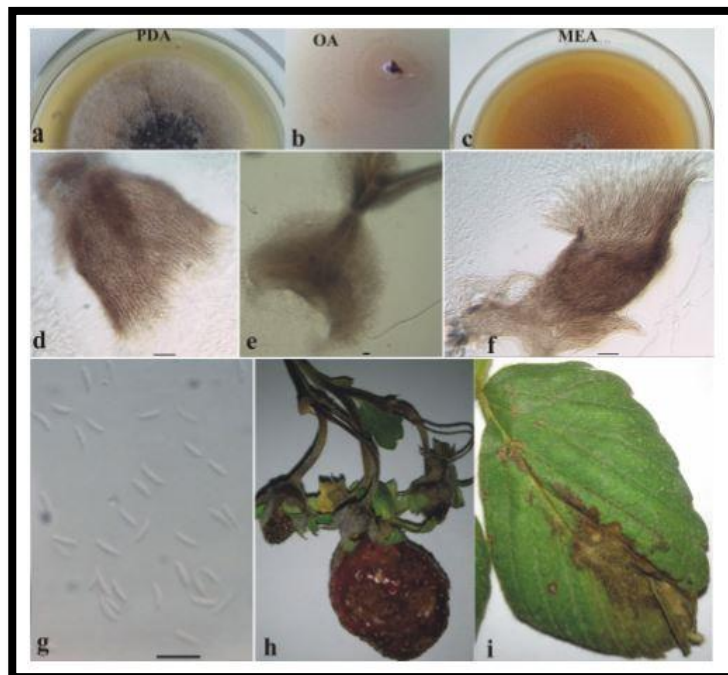
**Figura 6** - Morango com infecção por *Colletotrichum sp.*. Fonte: Syngenta

O gênero *Alternaria spp.* é um microrganismo de deterioração e inclui espécies patogênicas encontradas em uma grande variedade de plantas agronomicamente importantes, como cereais, oleaginosas, vegetais e frutas. Por ser um fungo latente que se desenvolve durante o armazenamento frio de frutas, torna-se visível durante o período de comercialização o que causa perdas econômicas substanciais, uma vez que os frutos doentes tornam-se não comercializáveis. Mais de 100 espécies de plantas foram afetadas por *Alternaria spp.* (CASTRO *et al.*, 2017; LORENZINI & ZAPPAROLI, 2014; PANE *et al.*, 2016; YANG *et al.*, 2017a).

Espécies dos gêneros dos coelomicetos *Chaetomella Fuckel* e *Pilidium Kunze* são frequentemente encontradas como fungos associados a plantas. Várias espécies são conhecidas por causar doenças de plantas como a podridão castanha-avermelhada de morango causada por *Pilidium concavum Kunze* (ROSSMAN *et al.*, 2004). *P. concavum*, é um novo fungo identificado no Brasil em pós-colheita de morango e este tornou-se o primeiro relato de *P. concavum* causando podridão em frutos de morango no Brasil. O fungo é sinanamorfo de *Hainesia lythi* (Desm.) Höhn, descrito anteriormente em frutos de morango na Polônia e já conhecido nos Estados Unidos. No Brasil, *H.lythi* somente é relatado causando mancha foliar em eucalipto (LOPES, 2011).

Entre 2012 e 2015, um novo patógeno fúngico foi isolado de frutas e folhas de morango nas regiões produtivas do Irã. O patógeno foi identificado como *P. concavum* com base na morfologia e análise de sequências ITS (espaçador transcrito interno), que é amplamente utilizado na taxonomia. Um teste de patogenicidade foi realizado em frutos e folhas e *P. concavum* foi reisolado confirmando os postulados de Koch. Este é o primeiro relatório de *P. concavum* como a causa da podridão castanha-amarronzada em morangueiros no Irã, Figura 7 (AYOUBI *et al.*, 2016). Em morango, os frutos infectados por *P.concavum* caracterizam-se por apresentarem lesões deprimidas marrons a bronzeadas, havendo fácil distinção entre tecido sadio e o doente que se destaca com facilidade. Sobre as lesões surge grande quantidade de esporodóquios e raramente se observa micélio (LOPES, 2011).





**Figura 7** - *Pilidium concavum* (CBS 139802) a. Colônia em Agar de Dextrose de Batata (PDA); b. Colônia em Agar de Farinha de Aveia (OA); c. Colônia em Agar de Extrato de Malte (MEA); d, e, f. *Conidiomata*; G. *Conidia*, h. Sintomas típicos de doença de morango em frutas e i. em folhas.

Um dos agentes patogênicos mais importantes do ponto de vista econômico, que infecta o fruto através de feridas ou lesões de casca, é o fungo *Penicillium digitatum* (Pers.:Fr.) Sacc., que causa mofo verde em citrus. Os citros são uma das culturas frutícolas mais importantes economicamente do mundo e particularmente sujeitas a perdas após a colheita, refletindo as condições de estresse biótico e abiótico. O fungo verde, resultante do *Penicillium digitatum*, é o principal responsável pela deterioração do pós-colheita dos citros, podendo atingir até 90% das perdas totais durante o armazenamento, acondicionamento, transporte e comercialização pós-colheita. Embora os fungos possam produzir micotoxinas, a produção de uma determinada micotoxina é limitada a um número limitado de espécies fúngicas e, em alguns casos, pode ser limitada a uma estirpe particular dentro de uma mesma espécie. As micotoxinas, metabólitos secundários de baixo peso molecular que são produzidos por fungos, apresentam efeito tóxico não somente para o homem, mas para outros vertebrados, além de alguns invertebrados, plantas e microrganismos. Durante muitos anos, fungicidas sintéticos têm sido utilizados para controlar esta doença (CERRILLO *et al.*, 2017; MAZIERO & BERSOT, 2010; NIU *et al.*, 2016; VILANOVA *et al.*, 2016). Algumas espécies do gênero *Penicillium* são reconhecidas por sua capacidade de produzir micotoxinas, sendo a ocratoxina A e a patulina as consideradas mais importantes do ponto de vista de saúde pública, devido à sua alta toxicidade e que os níveis acima dos regulados atualmente são frequentemente encontrados. A consequência disso é que eles não só afetam a saúde humana, mas igualmente resultam em graves perdas econômicas, especialmente em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento. (MAZIERO & BERSOT, 2010; PHOKU *et al.*, 2017).

### 1.1.5 Melanoma

Devido à parceria com o Instituto Gonçalo Moniz (Fiocruz Bahia) - Fundação Oswaldo Cruz, onde oportunamente realizou-se testes com as moléculas sintetizadas em células de melanoma, uma breve descrição deste se torna necessário.

Câncer de pele constitui uma importante causa de morte em todo o mundo, onde são estimados cerca de 80.000 mortes por ano a partir de 2010, destes, 49.000 mortes são devido ao melanoma, uma forma agressiva e invasiva de câncer da pele que surge da proliferação desregulada de melanócitos e pode ter metástase em uma forma mortal de câncer (PRÉVEL *et al.*, 2016). O melanoma é o tipo mais grave de câncer de pele, porque possui alta frequência de resistência a drogas e pode se espalhar mais cedo e mais rapidamente do que outros cânceres de pele (YE *et al.*, 2016). O principal fator causador de câncer de pele é a radiação ultravioleta (UV) que está associada à exposição excessiva ao sol. O risco do aparecimento desse tipo de câncer varia de acordo com as características de pele que o indivíduo apresenta, no entanto, não é somente o tipo de pele que faz com que o indivíduo desenvolva este tipo de câncer. Fatores como idade, gênero e o estilo de vida, aliados à exposição à luz solar também poderão desencadear o desenvolvimento da doença (MORENO *et al.*, 2015; SETLIK & CÁSSIO, 2015).

O melanoma é chamado assim devido a sua origem ser a partir de melanócitos. Estes desenvolvem a partir de células da crista neural como melanoblastos e migram para dentro da pele onde estão localizados tanto como células estaminais (como melanócitos para a protuberância) ou como melanócitos maduros (como na matriz do cabelo ou da membrana basal). No entanto, a quantidade de pigmento na lesão varia dando origem a um espectro de cor geralmente castanho escuro e preto. Há relatos de melanoma amelanóticos (ou hipopigmentada) em várias partes do corpo. Em vez de ser a cor habitual castanho/preto escuro, as lesões podem ser desprovidas de pigmento, aparecendo com cor rosa ou vermelha (BRISTOW; BOWER, 2016; ZHU *et al.*, 2016).

O tumor pode surgir em qualquer área da pele e pode ser categorizado em subtipos com base na histologia e características patológicas. Lesões decorrentes do pé e das mãos, particularmente das palmas, solas, ou dentro das unhas, são frequentemente denominados melanomas acral ou volar; uma referência à localização anatômica ao invés de seu subtipo. Embora nem todos os melanomas são classificáveis, os principais subtipos de melanoma que possam surgir sobre a pele são: Melanoma expansivo superficial (MES), Lentigo maligno-melanoma (LMM), melanoma nodular (MN) e acral melanoma lentiginoso, (AML), Figura 8 (BRISTOW; BOWER, 2016).



**Figura 8** - Na sequência: (a) MES - se espalha radialmente, tornando-se gradualmente vertical invasivo. No pé, a maioria dos melanomas deste subtipo é encontrada no dorso; (b) NM - afetando a unha. Melanoma mais agressivo que o MES, pois pode rapidamente tornar-se verticalmente invasivo. Esta lesão é mais comum em pacientes mais velhos; (c) AML - O subtipo mais raro da doença, porém mais comum no pé, particularmente na sola e na unha, podendo ocorrer na mesma taxa em todas as raças/tipos de pele.

Estudos recentes sugerem uma relação entre a pigmentação do tumor e risco de crescimento e metástase, com um melhor prognóstico para lesões levemente pigmentado ou amelanóticos. O prognóstico é favorável quando diagnosticado na fase inicial da doença cujo tratamento cirúrgico pode ser feito. No entanto, quando o prognóstico é tardio, resulta em metástase e a sobrevida de um ano é de 41-59%. As mortes por câncer predominantemente resultam de metástases, que são resistentes a terapias convencionais (CHANG *et al.*, 2016; HENDRIX *et al.*, 2016; KAPOOR *et al.*, 2016).

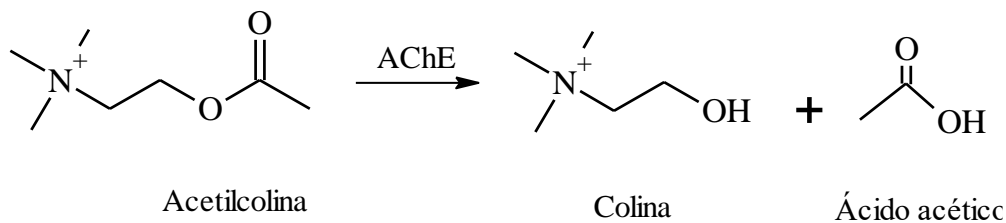
Embora a ressecção cirúrgica de tumores possa ser bem-sucedida em fases anteriores, o melanoma é fatal e intratável em casos de diagnóstico tardio. A maioria dos pacientes que são diagnosticados em estágio avançado tem sobrevivência global mediana curta. São urgentemente necessárias terapias eficazes contra o melanoma maligno. Embora várias moléculas de sinalização e alvos potenciais para tratamento tenham sido identificadas e fornecidas, os mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento de melanoma ainda não são totalmente claros. Por conseguinte, existe um interesse crescente em drogas que tenham capacidade de inibir a proliferação e iniciar o circuito apoptótico. São necessárias pesquisas para busca de novos medicamentos com atividade anti-tumoral para melanoma com baixa toxicidade. Os desafios atuais para diminuir os riscos de morte pelo melanoma incluem previsão de indivíduos que irão responder a terapias adjuvantes, bem como a detecção precoce de retorno da doença (CHANG *et al.*, 2016; JO *et al.*, 2016; LATCHANA *et al.*, 2016).

### 1.1.6 Acetilcolinesterase

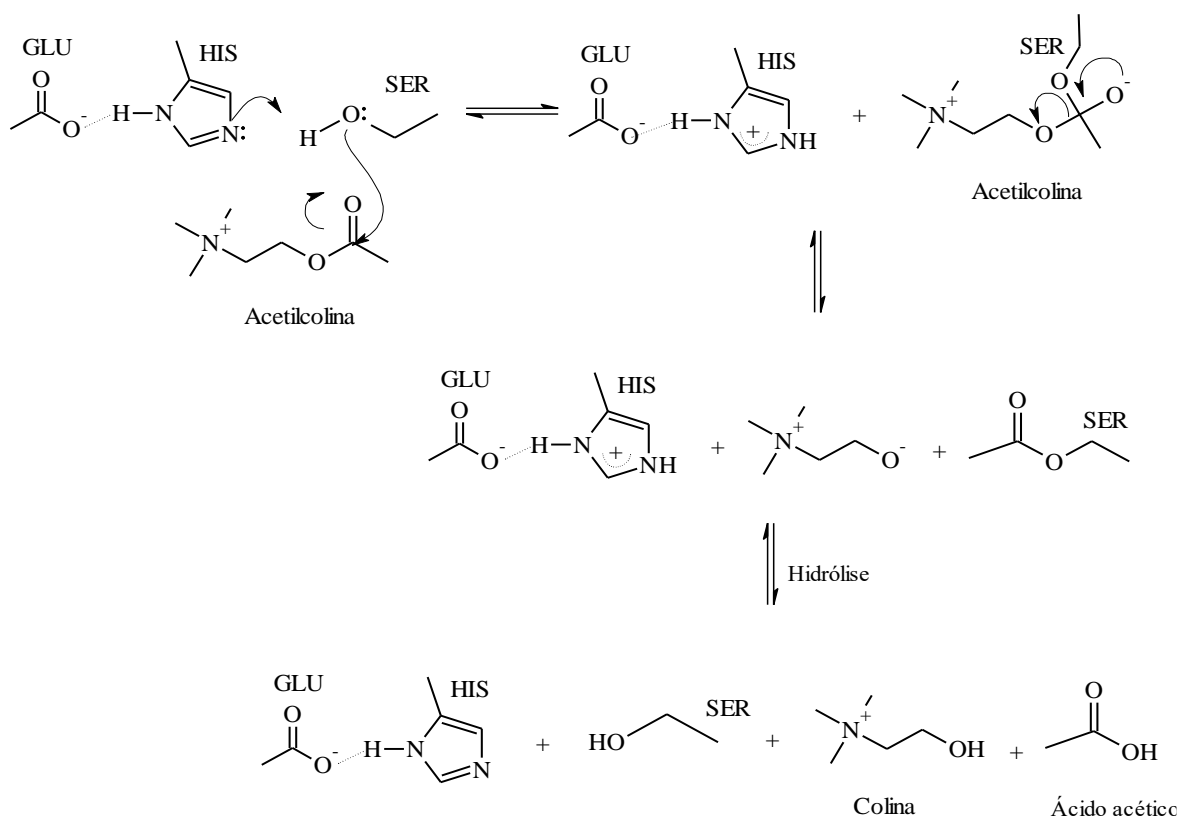
Pelo fato de alguns compostos organofosforados interagirem com a enzima acetilcolinesterase, presente também em mamíferos, faz-se necessária neste trabalho uma breve descrição desta interação.

Os inibidores da acetilcolinesterase são, geralmente, inseticidas orgânicos oriundos de síntese e se fazem representar pelos compostos organofosforados e carbamatos, sendo estas as substâncias mais utilizadas na agricultura, pecuária, infestações domésticas e programas de saúde pública, para o controle de vetores transmissores de doenças (SILVA, 2015). A acetilcolinesterase, AChE, ou acetilcolina acetil-hidrolase, é uma enzima que pertence à família das colinesterases, responsável pela finalização da transmissão dos impulsos nervosos nas sinapses colinérgicas através da hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh). O sistema colinérgico desempenha um papel crucial na função cognitiva, embora represente apenas 5-10% dos neurônios corticais e do hipocampo. Assim, o principal marcador do metabolismo colinérgico é a atividade da enzima hidrolítica AChE que possibilita um controle temporal preciso da ativação sináptica por meio da hidrólise rápida de ACh em colina (Ch) e ácido acético (COMIM *et al.*, 2011; PETRONILHO *et al.*, 2011). A AChE está presente no sistema nervoso central e periférico e é formada na região terminal dos neurônios, chamada de axônio terminal, permanecendo armazenada em vesículas sinápticas. Quando um impulso nervoso chega ao axônio terminal ela é liberada pelo neurônio para a região sináptica, onde é atraída pelos receptores colinérgicos que estão localizados no próximo neurônio. Quando a ACh interage com os receptores regenera o impulso nervoso no neurônio, levando assim a continuidade da transmissão. Após a transmissão do impulso nervoso é importante que o processo de interação da ACh com o receptor seja interrompido a fim de evitar o excesso de transmissão nervosa, que pode levar a problemas de funcionamento do corpo. A AChE, enzima presente no organismo recolhe o ACh e realiza uma forte modificação na sua estrutura molecular convertendo-a em colina (Ch), que é reabsorvida pelo primeiro neurônio para ser reconvertida em ACh, permitindo assim a sua reutilização na transmissão de impulsos nervosos. A modificação da ACh é um processo de hidrólise, Esquema 5, catalisado pela AChE. O mecanismo de hidrólise depende da adição de um resíduo de serina à carbonila do

substrato ACh conforme demonstrado no Esquema 6 (LAGO & COSTA, 2010; PETRONILHO *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2007).

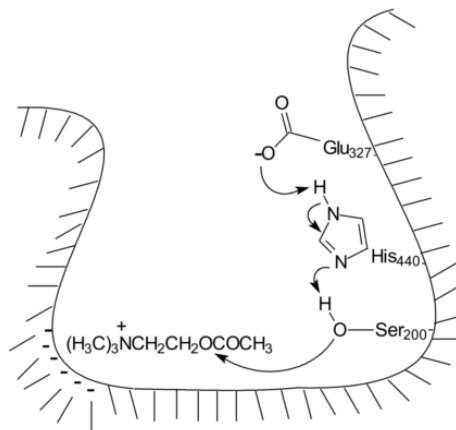


**Esquema 5** - Hidrólise da Ach pela AChE.



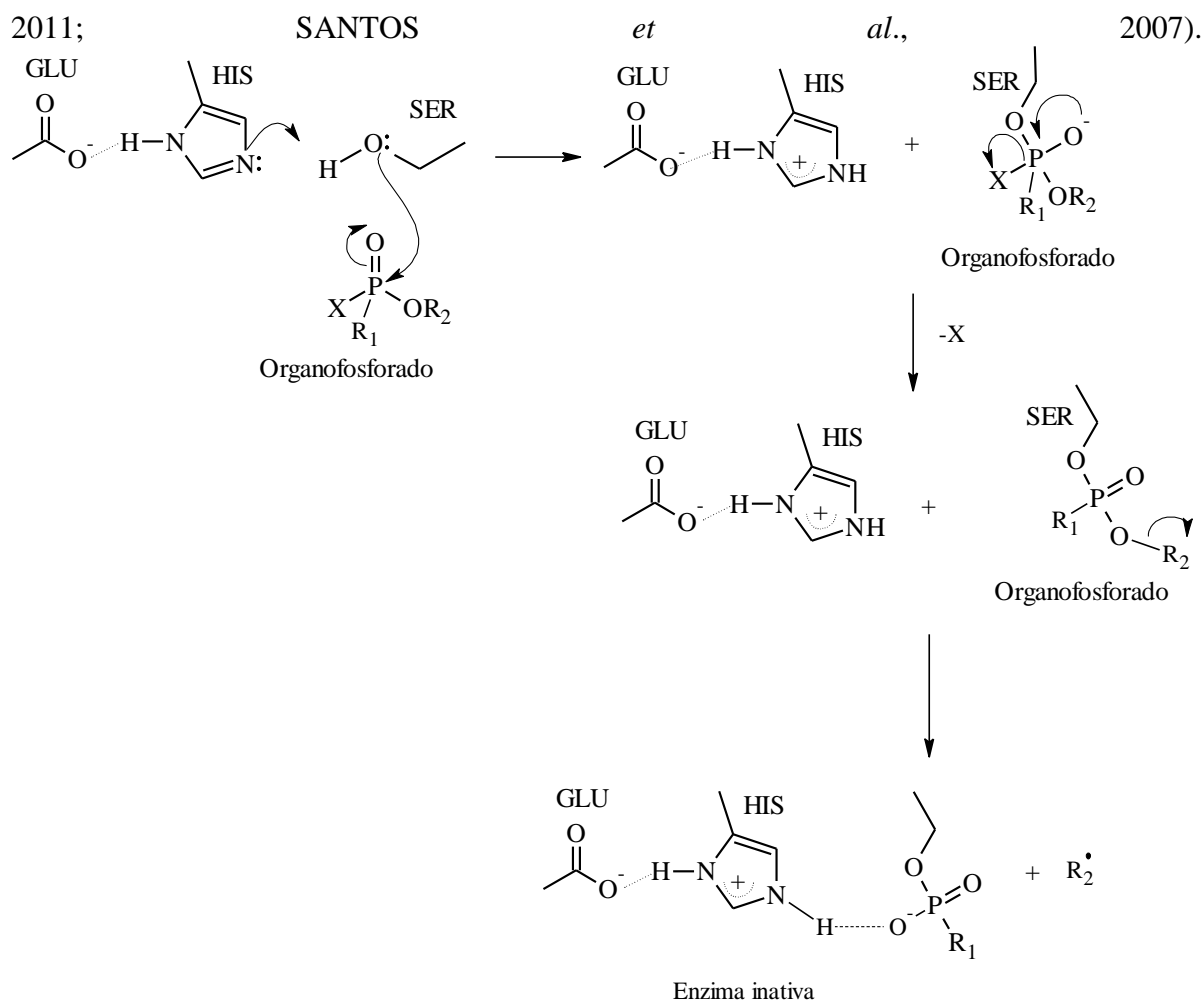
**Esquema 6** - Mecanismo de hidrólise da ACh.

A AChE possui alta eficiência catalítica, com capacidade de hidrolisar até  $6 \times 10^5$  moléculas de ACh por molécula de enzima por minuto. No seu sítio ativo existem três resíduos principais de aminoácidos que estão envolvidos diretamente no processo de hidrólise da ACh, a serina número 200 (Ser200), a histidina número 440 (His440) e o ácido glutâmico número 327 (Glu327), como mostrado na Figura 9. No sítio ativo também existe uma região aniônica, que interage com a parte catiônica da ACh e orienta este substrato para a posição necessária a fim de sofrer o processo de hidrólise (PETRONILHO *et al.*, 2011).



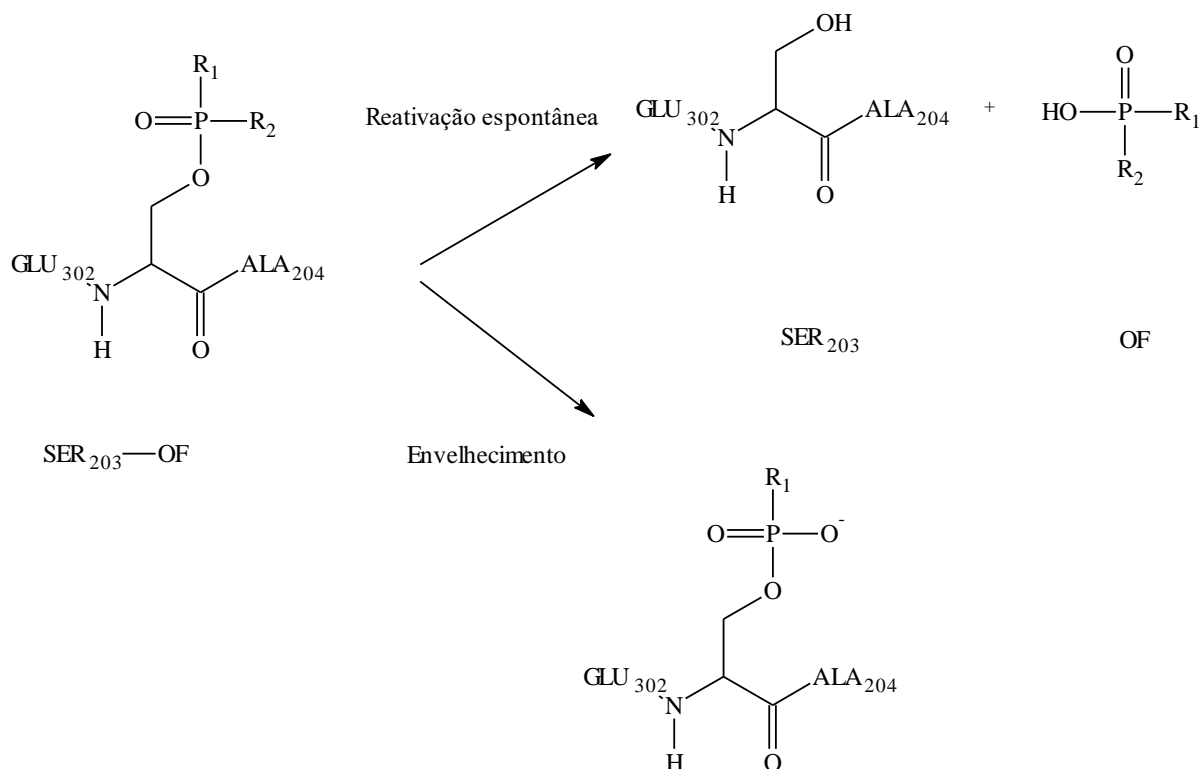
**Figura 9** - Figura simplificada do sítio ativo da AChE de *T. californicum*.. Fonte: PETRONILHO *et al.*, 2011.

Na presença de OF, este resíduo é prontamente fosforilado, Esquema 7. Ao contrário da enzima acetilada, a enzima fosforilada reage lentamente com água, o que permite a desalquilação do substituinte alcoxila ligado ao átomo de P (processo conhecido como "envelhecimento"). Os compostos OFs inativam a AChE devido a rápida fosforilação do centro catalítico da enzima. O resultado é o surgimento de uma forte ligação entre um resíduo da histidina protonada do sítio catalítico e o átomo de oxigênio negativamente carregado do inibidor. A histidina protonada não pode funcionar como um catalisador básico geral para a hidrólise da enzima fosforilada, necessária para a reativação da AChE, desse modo há a inibição da hidrólise do transmissor acetilcolina com conseqüente acúmulo da mesma, o que gera perturbação da transmissão colinérgica (ECKERT *et al.*, 2006; PETRONILHO *et al.*,



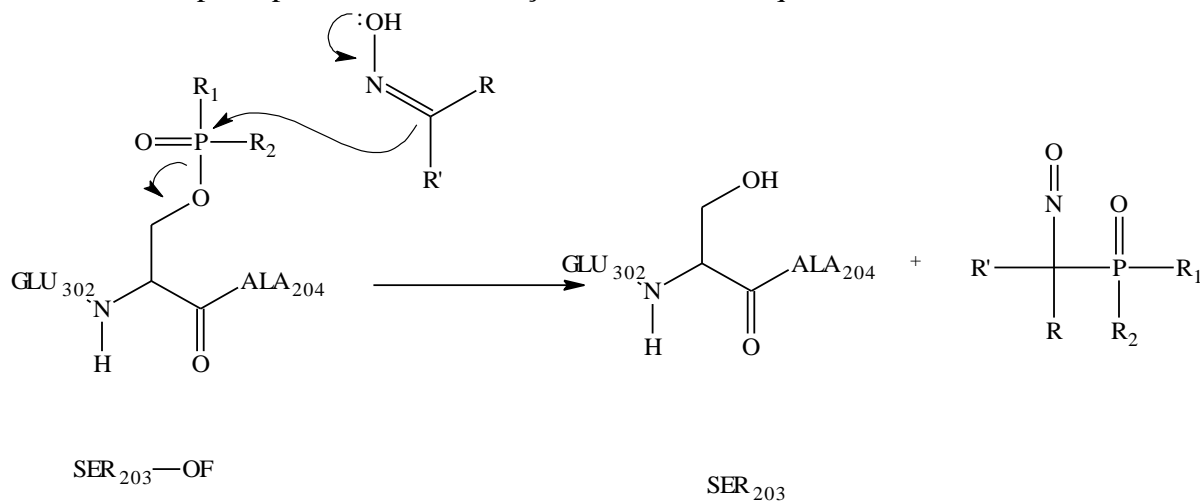
**Esquema 7** - Mecanismo clássico de inibição da AChE por inseticidas organofosforados.

Após a inibição da AChE por OF, dois processos podem acontecer: o envelhecimento da enzima ou a reativação espontânea da enzima (Esquema 8), podendo ser acelerada por várias ordens de grandeza com adição de um nucleófilo forte como a oxima. No entanto, a reação de reativação para a maioria dos complexos AChE-OF, sem a presença de oximas, ocorre a uma taxa insignificante, sendo portanto a reação de envelhecimento majoritária (MATOS, 2012).



**Esquema 8** - Reativação espontânea e do Envelhecimento, sendo, R o grupo alquil, O-alkil ou amida; R<sub>1</sub> o grupo O-alkil ou amida.

A fim de reverter os efeitos tóxicos dos OF medidas terapêuticas adicionais são indispensáveis. A desfosforilação da serina do sítio ativo da AChE é chamada reativação e é considerado o principal mecanismo de ação das oximas, Esquema 9.



**Esquema 9** - Reação de reativação do conjugado AChE-OF por uma oxima, sendo R o grupo alquil, O-alkil ou amida; R<sub>1</sub> o grupo O-alkil ou amida.

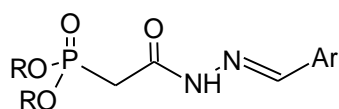
## 2. OBJETIVO

Objetivo geral:

Síntese de dialquilfosfonilacilidrazonas inéditas para verificação da potencial atividade fungicida e/ou antitumoral.

Objetivos específicos:

- ↪ Sintetizar as dialquilfosfonilacilidrazonas;
- ↪ Caracterizar dialquilfosfonilacilidrazonas através de RMN de  $H^1$  e  $C^{13}$  e  $P^{31}$ , infravermelho (IV) e espectroscopia de massas (EM);
- ↪ Avaliar as moléculas obtidas frente a fungos como *Pilidium* sp., *Alternaria* sp., *Penicilium* sp. e *Colletotrichum gloeosporioides*;
- ↪ Avaliar o potencial antitumoral das moléculas obtidas em células de melanoma e,
- ↪ Estudar a interação desses compostos com a enzima acetilcolinesterase (AChE).



Dialquilfosfonilacilidrazonas

**Figura 10** - Estrutura geral dos compostos sintetizados.



### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Considerações Gerais

As etapas de síntese e caracterização das dialquilfosfonilacilidrazonas, bem como o ensaio biológico com a enzima AChE foram realizados na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - Seropédica/RJ, nos laboratório de síntese orgânica e laboratório de bioquímica, onde o ensaio enzimático foi realizado pela professora Cristiane Martins Cardoso. A caracterização dos compostos foi realizada pelo técnico da universidade Maurício Lemos Matos. O ensaio com fungos patogênicos de pós-colheita foi no laboratório de Patologia Pós-Colheita da Embrapa Agroindústria de Alimentos - Rio de Janeiro/RJ enquanto o potencial antitumoral das moléculas obtidas em células de melanoma foi realizado no Laboratório de Biologia Parasitária (LBP) do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/Fundação Oswaldo Cruz (CPqGM-FIOCRUZ) - Salvador/BA.

✓ Para a síntese das dialquilfosfonilacilidrazonas e seus intermediários de reação foram utilizados, sem purificação prévia, solventes das marcas Tédia e Merck.

✓ Para a purificação dos compostos sintetizados, utilizou-se o Isolera™ Prime da Biotage. As condições de análise foram: Cartucho SNAP Ultra 10g - fase estacionária de sílica 25µm; modo de detecção de comprimento de onda; fluxo de 12 ml / min; correção da linha de base, leituras em monitor de UV1 em 254 nm e monitor de UV2 em 365 nm e limiar inicial 20 mAU.

✓ Os pontos de fusão, não corrigidos, foram determinados em aparelho da AAKER modelo PFMIIL.

✓ A remoção dos solventes foi feita em evaporador rotatório (Ika RV10 Control) com banho de aquecimento (HB 10 Control) e controlador de vácuo integrado;

Os aparelhos utilizados para a caracterização dos compostos foram:

✓ CG-MS - Cromatógrafo em fase gasosa acoplado a espectrômetro de massas, modelo QP2010 Plus - Shimadzu. As condições de análise foram: Coluna: HP-5 (30X0.25X0.25); temperatura 100 °C/1'-10 °C/min – 290 °C/20'; injetor 250°C (no modo Split 1:30); Fonte de Ions 250°C, Interface 310 °C. Gás carreador: Hélio (1.0 mL/min). IE: 70 eV.

✓ Espectrômetro de ressonância magnética nuclear de <sup>1</sup>H (500MHz) e <sup>1</sup>H (400MHz), <sup>13</sup>C (100MHz) e <sup>13</sup>C (50MHz) e <sup>31</sup>P (162MHz) Bruker modelos Avance III 500/Ultrashield 500 Plus e Avance II 400/ Ultrashield 400 Plus. Os espectros foram obtidos utilizando-se tetrametilsilano (TMS) ou o próprio solvente como referência interna para os núcleos de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C. Para o núcleo de <sup>31</sup>P, foi utilizado o ácido fosfórico 85% como referência externa. Os solventes deuterados foram especificados em cada caso, sendo os deslocamentos químicos medidos em ppm e as constantes de acoplamento em Hertz (Hz).

✓ Espectrômetro de infravermelho FT-IR VERTEX 70. Os espectros foram obtidos utilizando-se um filme sobre células de NaCl nas amostras líquidas e pastilhas de KBr nas amostras sólidas. As absorções foram medidas em centímetros recíprocos (cm<sup>-1</sup>).

✓ HPLC - Cromatógrafo líquido Shimadzu Prominecne (Shimadzu Corporation Kyoto, Japan) equipado com detector DAD (SPD\_M20A), forno de coluna (CTO-20A), bombas (LC-20 AT), controladora CBM-20A e injetor automático SIL-10AF.

## **3.2 Síntese dos fosfonoacetatos de dialquil etila**

### Procedimento Geral

Em um balão monotubulado de 50 mL, equipado com condensador de refluxo munido de um borbulhador, adicionou-se o  $\alpha$ -bromoacetato de etila e o fosfito de trietila ou tributila em pequeno excesso, de forma a garantir o total consumo de  $\alpha$ -bromoacetato de etila. A mistura reacional permaneceu sob refluxo e com agitação magnética, durante 6 horas a temperatura de 100 °C. Ao término da reação a solução foi submetida a vácuo no evaporador rotatório por 5 horas na temperatura de 80 °C a fim de se remover o excesso do reagente remanescente.

### **3.2.1 Fosfonoacetato de trietila (I).**

Utilizou-se 10g ( $6,0 \times 10^{-2}$  mol) de  $\alpha$ -bromoacetato de etila e 10 g ( $6,6 \times 10^{-2}$  mol) do fosfito de trietila com 10% de excesso. Obteve-se, após evaporação a pressão reduzida, 13,49g do produto com pureza adequada para as sínteses subsequentes, aspecto líquido e incolor, com 96% de rendimento.

### **3.2.2 Fosfonoacetato de dibutil etila (II).**

Utilizou-se 14,4g ( $8,6 \times 10^{-2}$  mol) de  $\alpha$ -bromoacetato de etila e 14,4 g ( $6,9 \times 10^{-2}$  mol) do fosfito de tributila com 4% de excesso. Obteve-se, após evaporação a pressão reduzida, 16,77g do produto com pureza adequada para as sínteses subsequentes, aspecto líquido e incolor, com 98% de rendimento.

## **3.3. Síntese das dialquilfosfonil hidrazidas acéticas**

### Procedimento Geral

Em um balão monotubulado de 50 mL, acoplado ao evaporador rotatório adicionou-se o fosfonoacetato de trietila e a hidrazina monoidratada (64%). A mistura reacional ficou sob vácuo a temperatura de 50 °C por 3 horas.

### **3.3.1 2-hidrazinil-2-oxoetilfosfonato de dietila (III)**

Utilizou-se 8,28g ( $3,70 \times 10^{-2}$  mol) de fosfonoacetato de trietila e 3,33g ( $6,66 \times 10^{-2}$  mol) da hidrazina monoidratada e em excesso de 15%. Obteve-se 7,53g do produto, um líquido denso e incolor com pureza adequada para as sínteses subsequentes, correspondendo ao rendimento bruto de 98%. Após este procedimento o produto ficou armazenado em baixa temperatura obtendo uma consistência mais densa.

### **3.3.2 2-hidrazinil-2-oxoetilfosfonato de dibutila (IV)**

Utilizou-se 10g ( $3,6 \times 10^{-2}$  mol) de fosfonoacetato de tributila e 3,2g ( $6,4 \times 10^{-2}$  mol) da hidrazina monoidratada e em excesso de 15%. Obteve-se 9,02g do produto, um líquido incolor, com pureza adequada para as sínteses subsequentes, correspondendo ao rendimento bruto de 95%.

## **3.4. Síntese das dialquilfosfonilacilidrazonas**

### Procedimento Geral

Em um balão monotubulado de 50 mL adicionou-se a fosforilidrazida solubilizada em 3 mL de EtOH, o aldeído correspondente previamente dissolvido em 3 mL de EtOH seguidos

de duas 2 gotas de HCl 37%. Manteve-se a mistura reacional sob agitação a temperatura ambiente. Terminado o tempo de reação, o meio reacional foi vertido em água destilada gelada e deixado em banho de gelo por meia hora para que ocorresse a precipitação. Ao término deste tempo o mesmo é filtrado a vácuo e seco ao ar. Nos casos em que não houve precipitação, adicionou-se gotas de solução de bicarbonato de sódio a 15 % até pH neutro. A solução aquosa resultante foi extraída com diclorometano (4x15 mL). Adicionou-se à fração orgânica Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, filtrar e em seguida evaporar no rotaevaporador.

#### **3.4.1 [2(E/Z) -2- (3-metoxibenzilideno)hidrazinil] -2-oxoetilfosfonato de dietila (1)**

Utilizou-se 0,33 g ( $2,4 \times 10^{-3}$  mol) de *m*-anissaldeído e 0,48 g ( $2,4 \times 10^{-3}$  mol) da dietoxifosfonil hidrazida acética. Obteve-se um sólido amarelo, com rendimento bruto de 76%.

#### **3.4.2 [2(E/Z) -2- (1,3-benzodioxol-4-ilmetileno)hidrazinil] -2- oxoetilfosfonato de dietila (2)**

Utilizou-se 0,36 g ( $2,4 \times 10^{-3}$  mol) de 2,3-(metilenodixi)benzaldeído 0,50 g ( $2,4 \times 10^{-3}$  mol) da dietoxifosfonil hidrazida acética. Obteve-se um sólido bege, com rendimento bruto de 20%.

#### **3.4.3 {2(E/Z) -2 - [(5-bromo-2-furil) metileno]hidrazinil} -2- oxoetilfosfonato de dietila (3)**

Utilizou-se 0,30 g ( $1,7 \times 10^{-3}$  mol) de 5-bromo-2-furaldeído e 0,36 g ( $1,7 \times 10^{-3}$  mol) da dietoxifosfonil hidrazida acética. Obteve-se um óleo marrom com rendimento bruto de 59%.

#### **3.4.4 {2(E/Z) -2 - [(5-metil-2-furil) metileno]hidrazinil} -2- oxoetilfosfonato de dietila (4)**

Utilizou-se 0,33 g ( $2,4 \times 10^{-3}$  mol) de 5-metilfurfural e 0,48 g ( $2,3 \times 10^{-3}$  mol) da dietoxifosfonil hidrazida acética. Obteve-se um óleo marrom com rendimento bruto de 76%.

#### **3.4.5 [2(E/Z) -2- (5-fluoro-2-oxo-1,2-di-hidro-3H-indol-3-ilideno)hidrazinil] -2-oxoetilfosfonato de dietila (5)**

Utilizou-se 0,39 g ( $2,4 \times 10^{-3}$  mol) de fluorisatina e 0,50 g ( $2,4 \times 10^{-3}$  mol) da dietoxifosfonil hidrazida acética. Obteve-se um sólido laranja com rendimento bruto de 77%.

#### **3.4.6 [2(E/Z) -2- (2-oxo-1,2-di-hidro-3H-indol-3-ilideno)hidrazinil] -2-oxoetilfosfonato de dietila (6)**

Utilizou-se 0,39 g ( $4,8 \times 10^{-3}$  mol) de isatina e 0,70 g ( $4,8 \times 10^{-3}$  mol) da dietoxifosfonil hidrazida acética. Obteve-se um sólido laranja com rendimento bruto de 76%.

#### **3.4.7 [(2E/Z) -2- (5-nitro-2-oxo-1,2-di-hidro-3H-indol-3-ilideno)hidrazinil] -2-oxoetilfosfonato de dietila (7)**

Utilizou-se 0,46 g ( $2,4 \times 10^{-3}$  mol) de nitroisatina e 0,50 g ( $2,4 \times 10^{-3}$  mol) da dietoxifosfonil hidrazida acética. Obteve-se um sólido laranja com rendimento bruto de 85%.

#### **3.4.8 [2(E/Z) -2- (piridin-3-ilmetileno) hidrazinil] -2- oxoetilfosfonato de dietila (8)**

Utilizou-se 0,5 g ( $4,8 \times 10^{-3}$  mol) de nicotinaldeído e 1g ( $4,8 \times 10^{-3}$  mol) da dietoxifosfonil hidrazida acética. Obteve-se um óleo amarelo com rendimento bruto de 43%.

#### **3.4.9 [2(E/Z) -2- (2-furilmetileno)hidrazinil] -2- oxoetilfosfonato de dietila (9)**

Utilizou-se 0,24 g ( $2,5 \times 10^{-3}$  mol) de furan-2-carboxialdeído e 0,53 g ( $2,5 \times 10^{-3}$  mol) da dietoxifosfonil hidrazida acética. Obteve-se um óleo marrom com rendimento bruto de 37%.

#### **3.4.10 [2(E/Z) -2- (2-tienilmetileno)hidrazinil] -2-oxoetilfosfonato de dietila (10)**

Utilizou-se 0,24 g ( $2,5 \times 10^{-3}$  mol) de 2-tiofenocarboxiladeído e 0,53 g ( $2,5 \times 10^{-3}$  mol) da dietoxifosfonil hidrazida acética. Obteve-se um óleo marrom com rendimento bruto de 35%.

#### **3.4.11 [2(E/Z) -2 - ({5- [3- (trifluorometil) fenil] -2-furil} metileno)hidrazinil] 2-oxoetilfosfonato de dietila (11)**

Utilizou-se 0,31 g ( $1,3 \times 10^{-3}$  mol) de 5-[2-(trifluorometil)-fenil] furfural e 0,26 g ( $1,3 \times 10^{-3}$  mol) da dietoxifosfonil hidrazida acética. Obteve-se um óleo marrom com rendimento bruto de 40%.

#### **3.4.12 [2(E/Z) -2- (3-metoxibenzilideno)hidrazinil] -2- oxoetilfosfonato de dibutila (12)**

Utilizou-se 0,26 g ( $1,9 \times 10^{-3}$  mol) de m-anisaldeído e 0,50 g ( $1,9 \times 10^{-3}$  mol) da dibutoxifosfonil hidrazida acética. Obteve-se um óleo amarelo, com rendimento bruto de 77%.

#### **3.4.13 [2(E/Z) -2 - (5-metil-2-furilmetileno)hidrazinil] -2- oxoetilfosfonato de dibutila (13)**

Utilizou-se 0,21 g ( $1,9 \times 10^{-3}$  mol) de 5-metilfurfural e 0,50 g ( $1,9 \times 10^{-3}$  mol) da dibutoxifosfonil hidrazida acética. Obteve-se um óleo marrom com rendimento bruto de 76%.

#### **3.4.14 [2(E/Z) -2- (2-furilmetileno)hidrazinil] -2- oxoetilfosfonato de dibutila (14)**

Utilizou-se 0,18 g ( $1,9 \times 10^{-3}$  mol) de furan-2-carboxialdeído e 0,50 g ( $1,9 \times 10^{-3}$  mol) da dibutoxifosfonil hidrazida acética. Obteve-se um óleo marrom com rendimento bruto de 68%.

#### **3.4.15 [2(E/Z) -2- (2-tienilmetileno)hidrazinil] -2- oxoetilfosfonato de dibutila (15)**

Utilizou-se 0,20 g ( $1,9 \times 10^{-3}$  mol) de 2-tiofenocarboxiladeído e 0,50 g ( $1,9 \times 10^{-3}$  mol) da dietoxifosfonil hidrazida acética. Obteve-se um sólido amarelo com rendimento bruto de 52%.

#### **3.4.16 [2(E/Z) -2- (5-nitro-2-oxo-1,2-di-hidro-3H-indol-3-ilideno)hidrazinil] -2-oxoetilfosfonato de dibutila (16)**

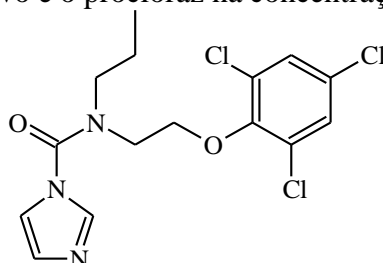
Utilizou-se 0,46 g ( $2,4 \times 10^{-3}$  mol) de nitroisatina e 0,50 g ( $2,4 \times 10^{-3}$  mol) da dietoxifosfonil hidrazida acética. Obteve-se um sólido laranja com rendimento bruto de 85%.

#### **3.4.17 [2(E/Z) -2 - (5-cloro-2-tienilmetileno)hidrazinil] -2- oxoetilfosfonato de dibutila (17)**

Utilizou-se 0,18 g ( $1,2 \times 10^{-3}$  mol) de 5-Cloro-2-tiofenocarboxaladeído e 0,32 g ( $2,0 \times 10^{-3}$  mol) da dietoxifosfonil hidrazida acética. Obteve-se um sólido amarelo com rendimento bruto de 52%.

### 3.5. Ensaio biológico com fungos

O teste de sensibilidade *in vitro*, conhecido como antibiograma por difusão em agar, foi realizado com objetivo de avaliar o efeito fungicida e/ou fungistático dos compostos obtidos (1-17) frente aos fitopatógenos pós-colheita de morango *Alternaria* sp., *Colletotrichum gloeosporioides*, *Penicillium* sp. e *Pilidium* sp.. Como padrão, utilizou-se o produto comercial Sportak® 450 EC cujo princípio ativo é o procloraz na concentração de 1,5 mg.L<sup>-1</sup>, Figura 11.

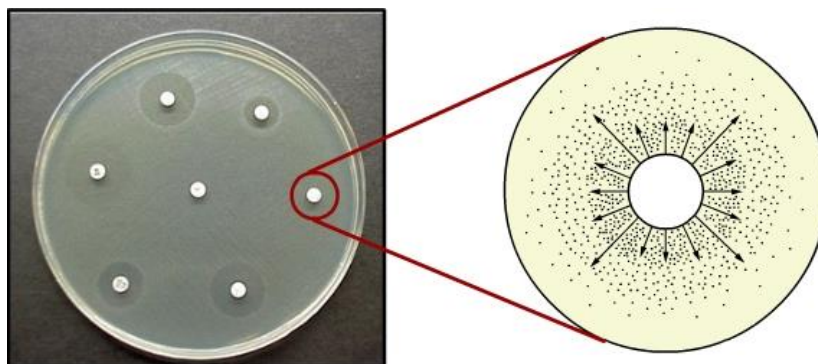


**Figura 11** - Estrutura do procloraz, princípio ativo do fungicida comercial Sportak®.

Para avaliar o desenvolvimento fúngico, foram utilizadas placas de Petri contendo os fungos *Alternaria* sp., *Colletotrichum gloeosporioides*, *Penicillium* sp. e *Pilidium* sp. cedidos pela micoteca da Fundação Oswaldo Cruz. O meio de cultura utilizado foi o BDA (Batata, Dextrose, Agar) normalmente utilizado para fungos.

#### 3.5.1. Preparo das soluções e inoculação dos fungos.

O antibiograma por difusão em ágar é a técnica destinada à determinação da sensibilidade bacteriana *in vitro* frente a agentes antimicrobianos, também conhecidos por Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos (TSA). O método descrito por Bauer e Kirby, em 1966 é conhecido por ser um dos métodos de sensibilidade mais simples e confiáveis. Inicialmente, o antibiograma é aplicado a bactérias para medir a susceptibilidade ou resistência destas frente a um antibiótico, mas o mesmo pode ser reproduzido em fungos. Este teste consiste em distribuir pequenos discos de papel contendo diferentes compostos em zonas distintas da placa de petri onde os fungos foram inoculados. Após alguns dias observa-se se houve crescimento fúngico em torno dos discos, medindo o halo de inibição, conforme ilustrado na Figura 12.



**Figura 12** - Princípio do teste suscetibilidade pela metodologia do disco-difusão.

O preparo da suspensão fúngica foi realizado adicionando-se 4mL de uma solução de 0,05% de tween 80 (agente tensoativo) em água, previamente esterilizada em autoclave, na placa de Petri contendo o fungo. Com a alça de Drigalski, raspou-se o meio de cultura contendo o micélio fúngico filtrando em seguida.

Fez-se a contagem de células fúngicas no microscópio, utilizando-se uma Câmara de Neubauer. Para tal, com uma pipeta Pasteur, coletou-se a suspensão fúngica preparada depositando cuidadosamente entre a câmara de Neubauer e a lamínula até preencher totalmente o volume da câmara sem deixar vaziar e/ou cair suspensão sobre a lamínula.

Após a colocação da amostra na câmara aguardou-se 5 minutos para haver a sedimentação das células e procedendo em seguida a contagem das células em microscópio. O cálculo da concentração de células foi realizado utilizando a fórmula abaixo:

$$n.º \text{ de células/mL} = \frac{n.º \text{ total de células}}{n.º \text{ de quadrantes contados}} \times f_{\text{diluição}} \times 25 \times 10^4$$

Após a realização da contagem de unidades propagativas, cada fungo foi semeado na placa espalhando 20µL da suspensão fúngica no meio de cultura com auxílio da alça de Drigalski de forma a inocular toda a placa, Figura 13.



**Figura 13** - Inoculação dos fungos.

A placa contendo a suspensão fúngica secou no fluxo laminar por aproximadamente 1h e então procedeu-se a distribuição dos discos para antibiograma colocando um disco no centro e quatro discos nas laterais, Figura 14.



**Figura 14** - Distribuição dos discos nas placas de petri.

Cada disco foi identificado por um número no fundo da placa, correspondendo a um tratamento. Com auxílio de uma pipeta automática, foi dispensado o volume 10µL de cada tratamento sobre o disco correspondente e identificado, como citado.

Os tratamentos foram constituídos pelos compostos sintetizados com concentração de 500 mg.L<sup>-1</sup>, o fungicida comercial Sportak ® (controle positivo-P) na concentração de 1,5mg.L<sup>-1</sup>, o branco contendo DMSO 1% em água (B - 18) e o controle negativo contendo somente o disco de antibiograma sem adição de nenhum composto (19). Cada tratamento era constituído por cinco repetições. Todas as placas foram lacradas com filme plástico e acondicionadas em câmara com 25°C ± 1°C.

Para o ensaio biológico com *Alternaria sp.* e *Penicillium sp.*, utilizou-se 4 discos distribuídos lateralmente como, indicado na Figura 14, em placa de Petri de 90x15mm, o

controle positivo ficou em uma placa separada. No ensaio com *Alternaria sp.*, houve a adição de um tratamento com um disco para antibiograma contendo cloranfenicol 30 Mcg (20), um antibiótico de amplo espectro. Para os demais fungos, esse tratamento foi excluído e utilizou-se placas de 49x12mm, contendo somente um disco de antibiograma por placa e 10µL de cada tratamento, contendo a mesma identificação utilizada no ensaio da *Alternaria sp.*. Sendo assim, o ensaio para alternaria foi constituído de 21 tratamentos enquanto para os demais fungos foram ao total 20 tratamentos. Após 3 dias de armazenamento, procedeu-se a medida do halo de inibição.

### **3.6. Ensaio biológico com melanoma.**

#### **3.6.1 Cultura de Células**

As células de melanoma murino da linhagem B16F10 usadas foram cedidas pelo Laboratório de Inflamação do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro IBCCF<sup>o</sup> - UFRJ e mantidas em meio RPMI 1640 contendo 10% de Soro Bovino Fetal (SBF), 10 µM de Gentamicina e 10µM de Fluconazol, à 37 °C e atmosfera a 5% de CO<sub>2</sub>.

#### **3.6.2 Manutenção da Cultura B16F10**

As células foram mantidas em meio RPMI 1640 contendo estreptomicina e penicilina e suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF). As garrafas foram mantidas em estufa a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>. As trocas dos meios de cultura são feitas dependendo da confluência das células nas garrafas: confluência abaixo de 30%, troca do meio a cada três dias; entre 40% e 80% a cada dois dias; acima de 80% todos os dias realizou-se a passagem da cultura. Para a passagem utiliza-se uma solução antiaderente de Tripsina/EDTA (Gibco®) diluída 1:1 em meio RPMI 1640, incubando sobre a cultura B16F10 por 10-15 minutos e observando, em microscópio invertido, o descolamento das células do substrato; após esse processo as células são centrifugadas a 200 G (força G) por 10 min à temperatura ambiente. O pellet formado foi resuspenso em meio RPMI 1640 suplementado. O pool de células foi dispensado em garrafas novas dependendo da necessidade de novas culturas pela equipe do laboratório.

#### **3.6.3 Preparo da Cultura para o experimento**

As culturas após a ação da Tripsina/EDTA e centrifugação foram homogeneizadas em 1mL em meio RPMI 1640 suplementado e foi realizada a contagem em câmara de Neubauer, utilizando a exclusão por coloração com o azul trypan (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

#### **3.6.4 Teste *in vitro***

Para realização dos experimentos as garrafas devem possuir cerca de 80% de confluência celular, apresentar boa morfologia e estar livre de contaminantes. As células foram incubadas na concentração de  $1 \times 10^5$  células/poço em placa com 96 poços e permaneceram durante a noite em estufa a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> para promover a aderência das células. Após esse período as células foram lavadas e incubadas com os compostos sintetizados na concentração de 0,1mM, DMSO 1% (BRANCO) e o controle contendo só o meio, por 24 h a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. A quantificação da proliferação celular foi feita de acordo com o protocolo descrito no tópico 3.5.2.5. O cálculo da porcentagem de inibição das células pelos compostos foi efetuado utilizando-se regressão não-linear no programa Prism 5.01 GraphPad.

### **3.6.5 Teste colorimétrico para quantificação de proliferação celular e aplicação em bioensaios**

Para o teste colorimétrico foi avaliada a relação entre o número de células e a absorvância, onde as células incubadas e posteriormente processadas seguindo o método descrito por (ISHAI-MICHAELI& ELDOR; VLODAVSKY, 1990) modificado. Descartou-se o sobrenadante dos poços cuidadosamente e lavou em seguida com Tampão fosfato-salino (PBS), duas vezes, à 37°C em pH 7,2. Após o tratamento, as células foram fixadas com metanol e depois de 15 minutos lavou-se com 100µL de PBS. Posteriormente, adicionou-se 50µL de azul de metileno 0,1% em tampão borato 0,1M, pH 8,7, para corar as células, permanecendo por 10 minutos. Após este procedimento, foram realizadas sucessivas lavagens com tampão borato 0,01M para a remoção completa do corante e adicionando-se 50µL de HCl 0,1M, deixando por mais 10 minutos. Finalizado o tempo, transferiu-se o conteúdo contendo HCl 0,1M e as células para outra placa de 96 poços. A densidade óptica de cada poço foi obtido a 655 nm usando o leitor de microplacas VersaMax™ Tunable Microplate Reader. Para realização das análises estatísticas utilizou-se o software Statistica, versão 8.0 da StatSoft Inc (EUA, 2007). Após a análise de variância, as médias, quando significativas ( $p < 0,05$ ), foram comparadas utilizando-se teste de Fisher (LSD) a 95% de probabilidade.

### **3.7. Ensaio para verificação da enzima acetilcolinesterase.**

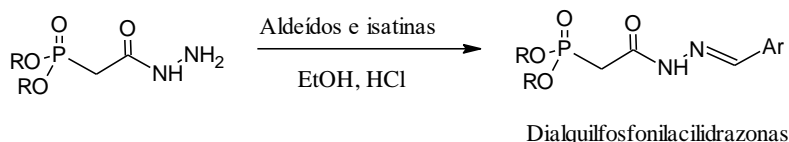
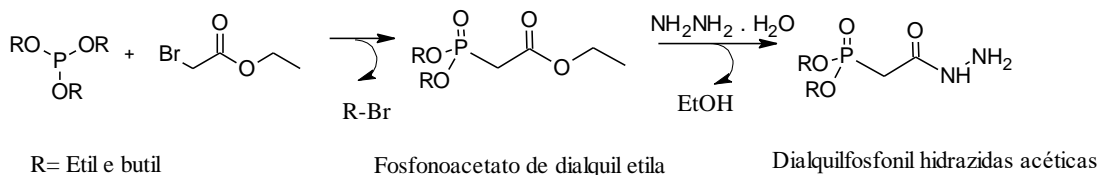
A análise da atividade acetilcolinesterase foi realizada pelo método de ELLMAN *et al.*, (1961). A acetilcolinesterase de camundongo (25 µL) foi adicionado aos poços de uma placa de 96 poços contendo 63 µL de tampão fosfato de sódio 0,1 M em pH 7,5, 100 µL DTNB (ácido 5,5'ditionitrobenzeno) na concentração de 0,32 mM, diluído em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,5 além dos compostos sintetizados (exceto para os grupos controle) com uma concentração final de 50 µM. Após 10 minutos de incubação a 25°C, tempo em que a acetilcolinesterase reage com o DTNB, a reação foi disparada com a adição de 10µL de iodeto de acetiltiocolina 1,5 mM (concentração final) obtendo assim um volume reacional de 220 µL. Posteriormente, fez-se uma nova incubação de 10 minutos a 25°C. A densidade ótica final dos meios reacionais foi medida a 412 nm. O coeficiente de absorvância molar utilizado foi de  $14,15 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ , como sugerido por EYER (2003). Os meios referentes ao ensaio dos brancos não tiveram adição de homogeneizado.

Este método é baseado na medida da velocidade de produção de tiocolina proveniente da hidrólise enzimática da acetilcolina e butirilcolina. A reação contínua da tiocolina formada com o DTNB libera o ânion amarelo 5-tio-2-nitrobenzoato, possibilitando a determinação da velocidade de produção de cor determinada em espectrofotômetro a 412nm a 25°C (CAMPAGNOLO *et al.*, 1995). As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software Statistica, versão 8.0 da StatSoft Inc (EUA, 2007). Após a análise de variância, as médias, quando significativas ( $p < 0,05$ ), foram comparadas utilizando-se teste de Fisher (LSD) a 95% de probabilidade.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

As dialquilfosfonilacilidrazonas foram obtidas a partir da rota sintética apresentada no Esquema 10.

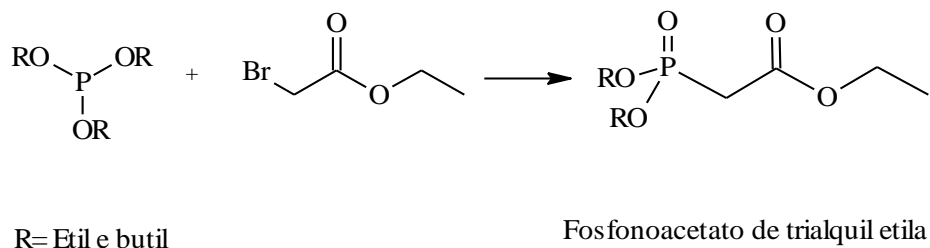




**Esquema 10** - Rota de síntese das dialquilfosfonilacilidrazonas.

#### 4.1 Síntese dos fosfonoacetatos de dialquil etila.

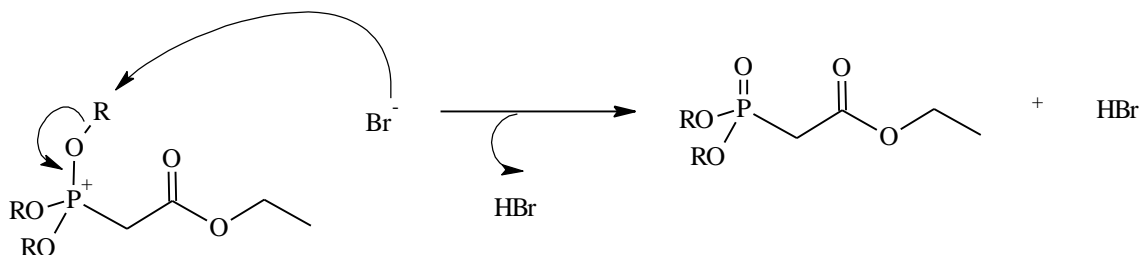
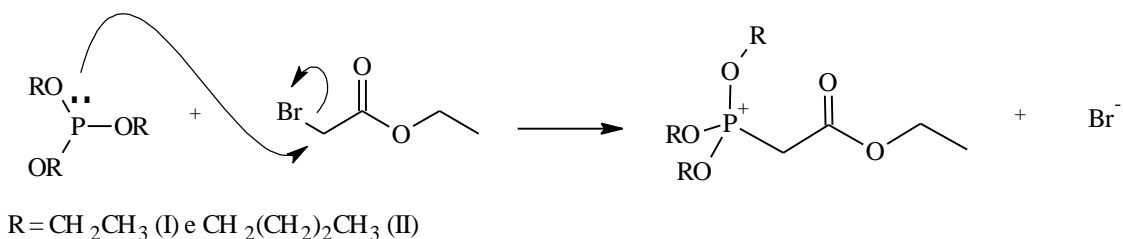
Um dos principais intermediários para a síntese das dialquilfosfonilacilidrazonas é o fosfonoacetato de dialquila e sua síntese foi realizada de acordo com o Esquema 11.



**Esquema 11**- Síntese dos fosfonoacetatos de dialquil etila: (I)R= Etil, (II) R= Butil.

Essa síntese ocorreu através da reação de Michaelis - Arbuzov em quantidades equimolares do triaquil fosfito e do  $\alpha$ -bromoacetato de etila, com liberação de brometo de etila, eliminado durante o transcorrer da reação devido ao baixo ponto de ebulição. A reação ocorre em torno de 6 horas a 100°C. Ao final da reação, obtém-se o produto final com altos rendimentos sob vácuo a 80°C.

Esta reação envolveu primeiramente o ataque nucleofílico do fósforo ao carbono ligado ao bromo com posterior saída do íon brometo, que posteriormente atacou o grupo alquila do intermediário formado gerando o fosfonato correspondente. No esquema 12, descrito a seguir, pode-se observar as etapas envolvidas no proposta de mecanismo de síntese dos fosfonoacetatos de dialquil etila.

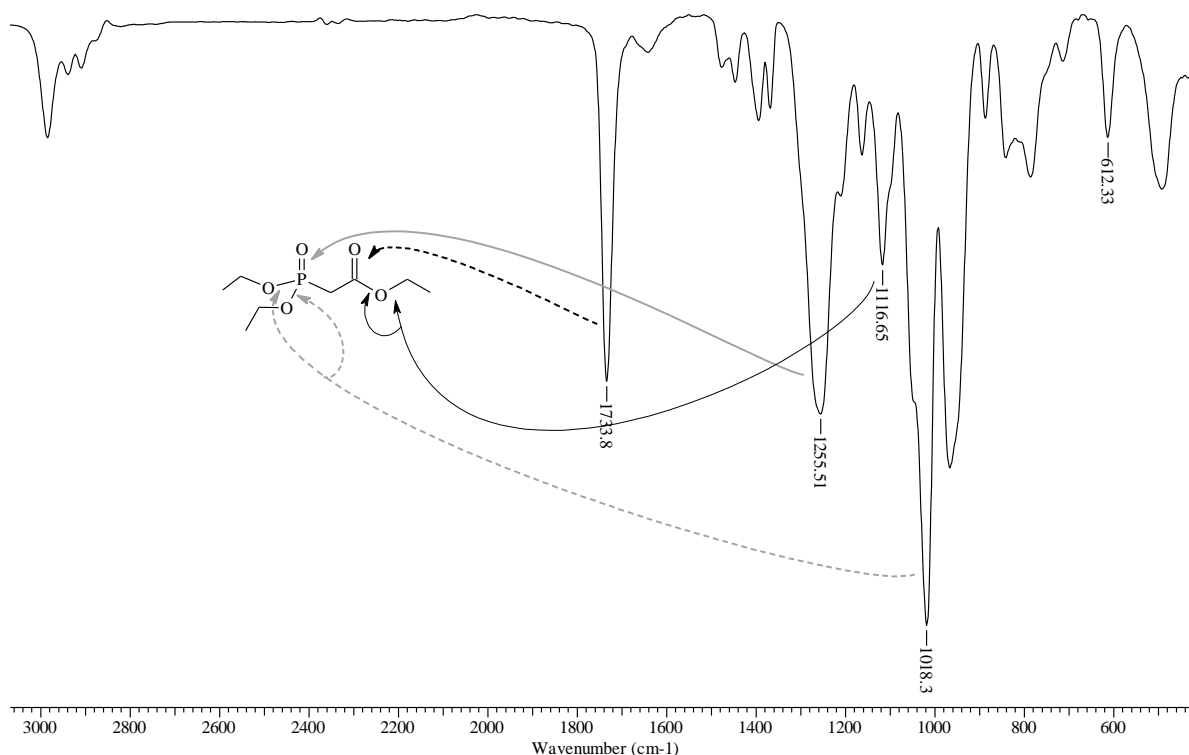


**Esquema 12** - Proposta de Proposta de mecanismo de síntese do fosfonoacetato de dialquil etila via reação de Michaelis - Arbuzov.

#### 4.1.1. Determinação estrutural do fosfonoacetato de trietila (I) e fosfonoacetato de dibutil etila (II).

##### 4.1.1.1. Análise por espectrometria de infravermelho

Segundo relatado por NOGUEIRA (2007), a presença de uma banda de estiramento de ligação P-C na faixa de 656-692 cm<sup>-1</sup> no espectro de infravermelho confirma a obtenção do produto. Uma banda intensa de 1734 cm<sup>-1</sup> é atribuída ao estiramento C=O. O estiramento P=O encontra-se variando entre 1272-1236 cm<sup>-1</sup>. Bandas referentes às absorções de estiramento das ligações C-O-C de éster (1211-1120 cm<sup>-1</sup>), P-O-C (1015-1025 cm<sup>-1</sup>) são igualmente importantes na caracterização do produto, Figura 15.



**Figura 15** - Bandas de IV características do fosfonoaceto de trietila.

Na Tabela 1 encontram-se as bandas que caracterizam os dois intermediários de reação para síntese das dietoxifosfonilacilidrazonas.

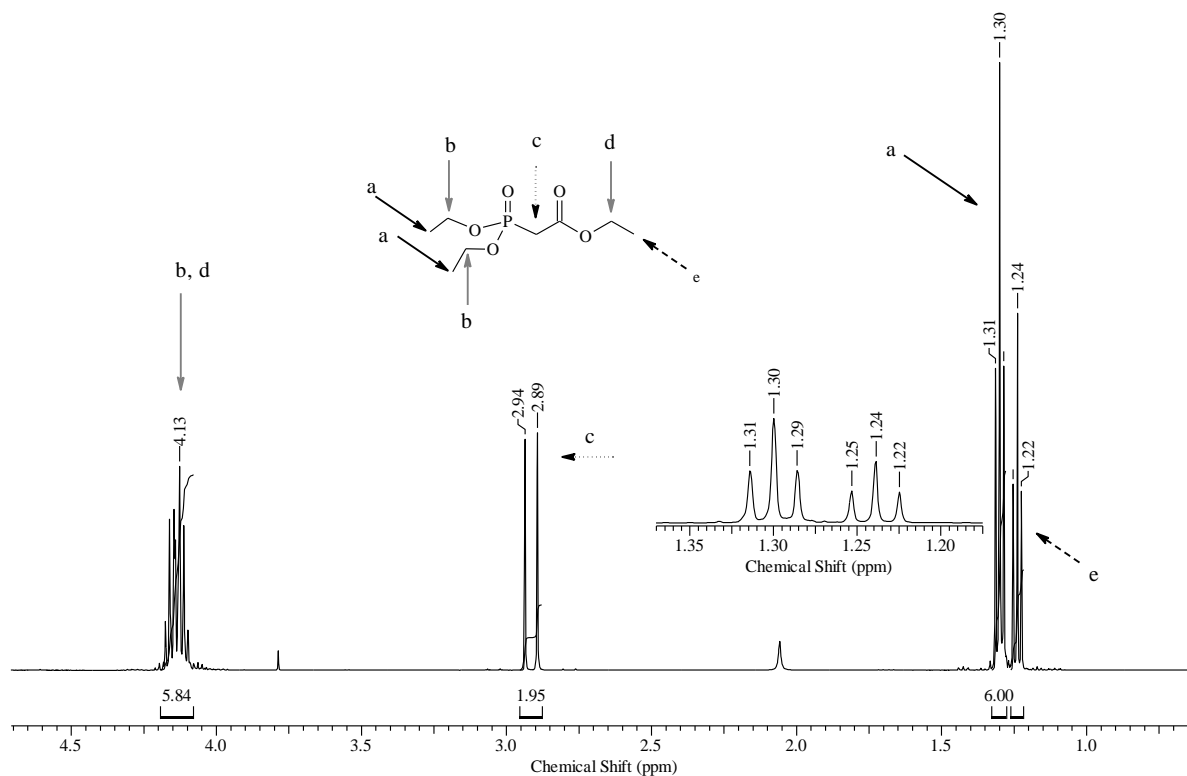
**Tabela 1** - Bandas de IV ( $\nu$ ) dos fosfonoacetatos de dialquil etila sintetizados.

Composto	C=O	P=O	C-O-C	P-O-C	P-C
I	1734	1256	1117	1018	612
II	1737	1266	1117	1023	614

Bandas de IV ( $\nu$ ) em  $\text{cm}^{-1}$ .

#### 4.1.1.2. Análise por espectrometria de RMN $^1\text{H}$

Nos espectros de RMN  $^1\text{H}$  dos intermediários I e II é possível observar um duplete característico cuja constante de acoplamento de 21,4 Hz, referente aos hidrogênios metilênicos com o fósforo, com deslocamento químico ( $\delta$ ) próximo de 3,0 ppm. No fosfonoacetato de trietila, os hidrogênios metílicos da cadeia etílica, da porção éster carboxílico apresentam deslocamento químico na mesma região dos hidrogênios da cadeia etílica da porção fosfonato, com  $\delta$  de aproximadamente 4,0 ppm para o sinal com multiplicidade duplo quarteto (d/q). No entanto, é possível distinguir os sinais com multiplicidade tripletos (t) referentes aos hidrogênios metílicos de ambas porções (éter e fosfonato), com  $\delta$  inferior a 1,5 ppm. Na Figura 16 estão os  $\delta$  e as multiplicidades dos hidrogênios dos fosfonoacetatos de trietila. Os resultados obtidos estão de acordo com o descrito por NOGUEIRA (2007), que obteve em seu trabalho o fosfonoacetato de trietila. Na Tabela 2 estão explicitados os deslocamentos químicos dos compostos I e II.

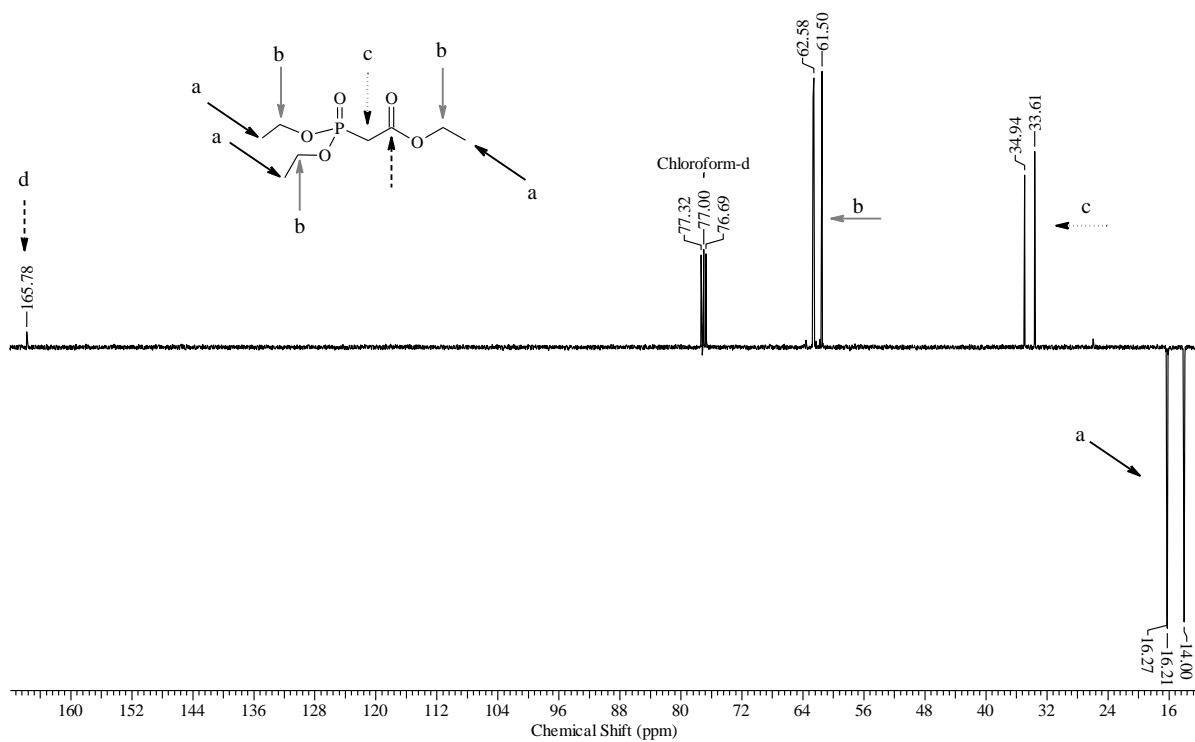


**Figura 16** - Dados de RMN- $^1\text{H}$  do fosfonoacetato de trietila (I).

#### 4.1.1.3. Análise por espectrometria de RMN $^{13}\text{C}$

No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do fosfonoacetato de trietila (I) é possível observar o acoplamento do fósforo com o carbono metilênico em torno de 34 ppm, com uma constante de acoplamento de aproximadamente 134 Hz que é característico deste composto. Outro sinal importante é o duplete da carbonila do éster centrado em 165 ppm. Esses resultados são corroborados por NOGUEIRA (2007), que obteve valores semelhantes para os seus intermediários de reação.

A Figura 17 apresenta os valores dos deslocamentos químicos e as multiplicidades dos carbonos do composto I e a Tabela 3 os  $\delta$ , multiplicidades dos compostos I e II sintetizados.



**Figura 17** - Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  do fosfonoacetato de trietila (I).

**Tabela 2** - Dados de RMN <sup>1</sup>H dos fosfonoacetatos de dialquil etila sintetizados.

I*	1,24 [t, 3H] <i>J</i> <sub>PH</sub> = 7,25 Hz	1,30 [t, 6H] <i>J</i> <sub>PH</sub> = 7,25 Hz	2,92 [d, 2H] <i>J</i> <sub>PH</sub> = 21,43 Hz	4,14 [d, 6H] <i>J</i> <sub>PH</sub> = 6,26 Hz	-	-	-	-
II**	1,12 [t, 3H] <i>J</i> <sub>PH</sub> = 6,94 Hz	-	2,78 [d, 2H] <i>J</i> <sub>PH</sub> = 21,44 Hz	4,03 [dq, 2H] <i>J</i> <sub>PH</sub> = 6,93 Hz	0,78 [t, 3H] <i>J</i> <sub>PH</sub> = 7,25 Hz	1,26 [dq, 4H] <i>J</i> <sub>PH</sub> = 7,56 Hz	1,51 [dq, 4H] <i>J</i> <sub>PH</sub> = 7,88 Hz	3,94 [dq, 4H] <i>J</i> <sub>PH</sub> = 6,62 Hz

Espectros realizados em \*DMSO e \*\* CDCl<sub>3</sub> como solvente.

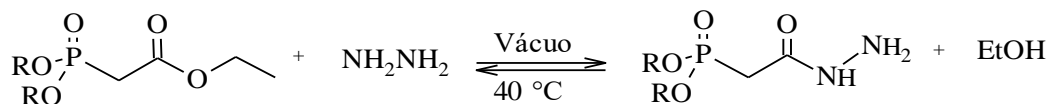
**Tabela 3** - Dados de RMN <sup>13</sup>C dos fosfonoacetatos de dialquil etila sintetizados.

I	14,00 [s, 1C]	16,24 [d, 2C]	33,61 [d, 1C] <i>J</i> <sub>PH</sub> = 134,10 Hz	61,50 [d, 1C]	62,61 [d, 1C]	165,75 [d, 1C]	-	-	-	-
II	14,00 [s, 1C]	-	34,79 [d, 1C] <i>J</i> <sub>PH</sub> = 134,10 Hz	61,50 [d, 1C]	-	165,80 [d, 1C]	16,10 [d, 2C]	18,58 [d, 2C]	32,28 [d, 2C]	63,34 [d, 2C]

Espectros realizados em CDCl<sub>3</sub> como solvente.

## 4.2. Síntese dos dialquilfosfonil hidrazidas acéticas

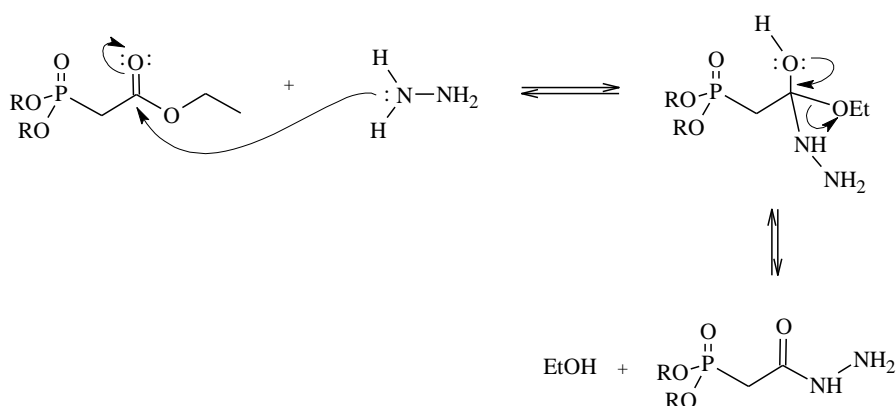
A síntese dos dialquilfosfonil hidrazidas acéticas ocorre sob vácuo a 50 °C. A reação se processa em aproximadamente 3 horas, período em que reagem quantidades equimolares de fosfonoacetato de dialquil etila e de hidrazina monoidratada com liberação de etanol. Este vai sendo eliminado durante a reação, deslocando assim o equilíbrio na direção dos produtos, segundo princípio de Le'Chatelier. O Esquema 13 apresenta a reação geral de formação dos compostos III e IV.



R= Etil (III) e butil (IV)

**Esquema 13** - Reação geral de formação dos doisdialquilfosfonil hidrazidas acéticas sintetizados.

O Esquema 14 mostra o mecanismo pelo qual ocorre a formação dos intermediários de reação III e IV.



**Esquema 14** - Proposta de mecanismo de síntese do fosfonato de dietila - 2-hidrazino-2-oxietila.

### 4.2.1. Determinação estrutural do fosfonato de dietila - 2-hidrazino-2-oxietila (III) e 2-hidrazinil-2-oxoetilfosfonato de dibutila (IV)

#### 4.2.1.1. Análise por espectrometria de infravermelho

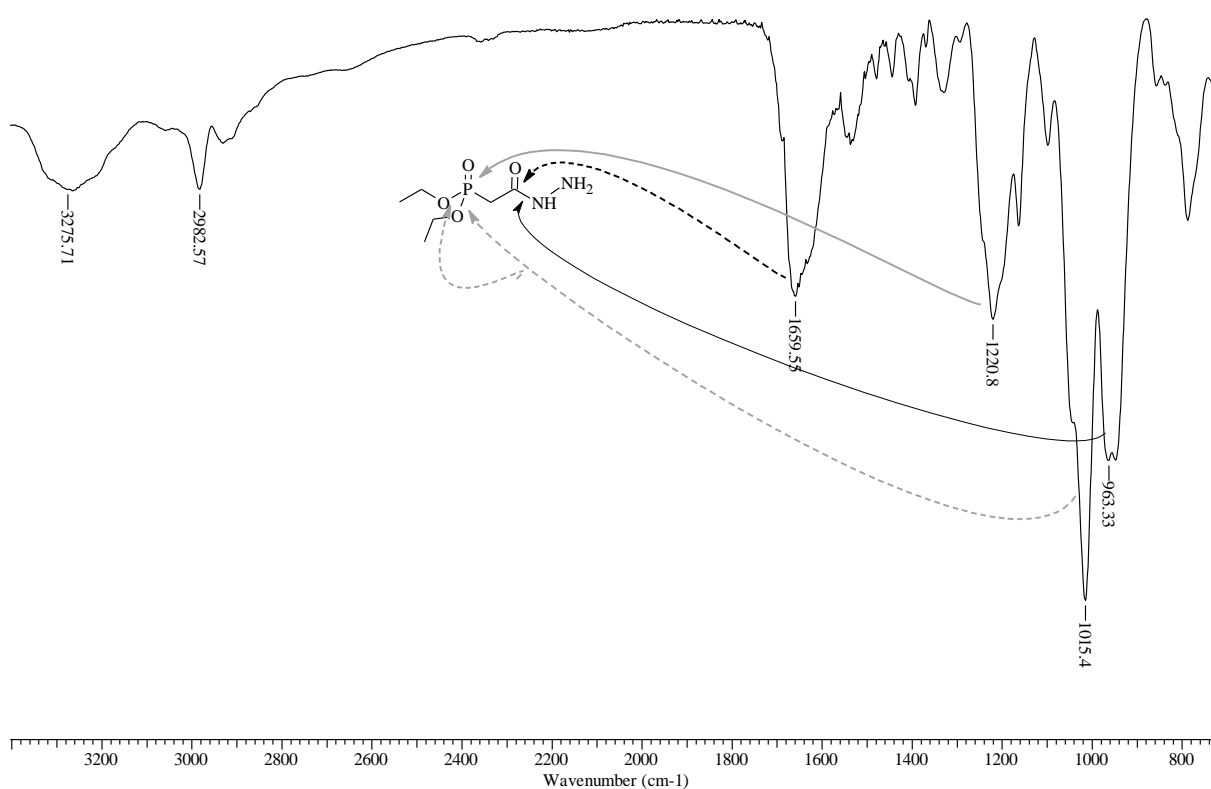
No espectro de infravermelho destes compostos, as principais absorções são referentes à banda de estiramento de C=O da carbonila de amida em torno de 1660 cm<sup>-1</sup> o que evidencia a formação da ligação C-N (Tabela 4). As vibrações de estiramento N-H ocorrem entre 3500 e 3300 cm<sup>-1</sup>. As aminas primárias possuem duas bandas, enquanto as secundárias apresentam uma única banda, sendo uma banda fraca em compostos alifáticos (PAVIA *et al.*, 2010). Evidenciou-se bandas de estiramento axial de ligação N-H em 3271 e 3283 cm<sup>-1</sup> (νNH<sub>2</sub>) além 2982 e 3283 (νNH) nos compostos III e IV, respectivamente. É possível ver ainda, estiramento

C-N que ocorre na faixa de 1350 a 1000 $\text{cm}^{-1}$ , confirmando a formação da fosforilacilidrazina. A Figura 18 mostra as principais bandas de absorção referentes a esta substância.

**Tabela 4** - Bandas de IV ( $\nu$ ) dos fosfonoacetatos de dialquil etila sintetizados.

Composto	C=O	P=O	P-O-C	C-N
III	1660	1221	1015	963
IV	1662	1220	1020	983

Bandas de IV ( $\nu$ ) em  $\text{cm}^{-1}$ .



**Figura 18** - Dados de infravermelho do 2-hidrazinil-2-oxoetilfosfonato de dietila (III).

#### 4.2.1.2. Análise por espectrometria de RMN $^1\text{H}$

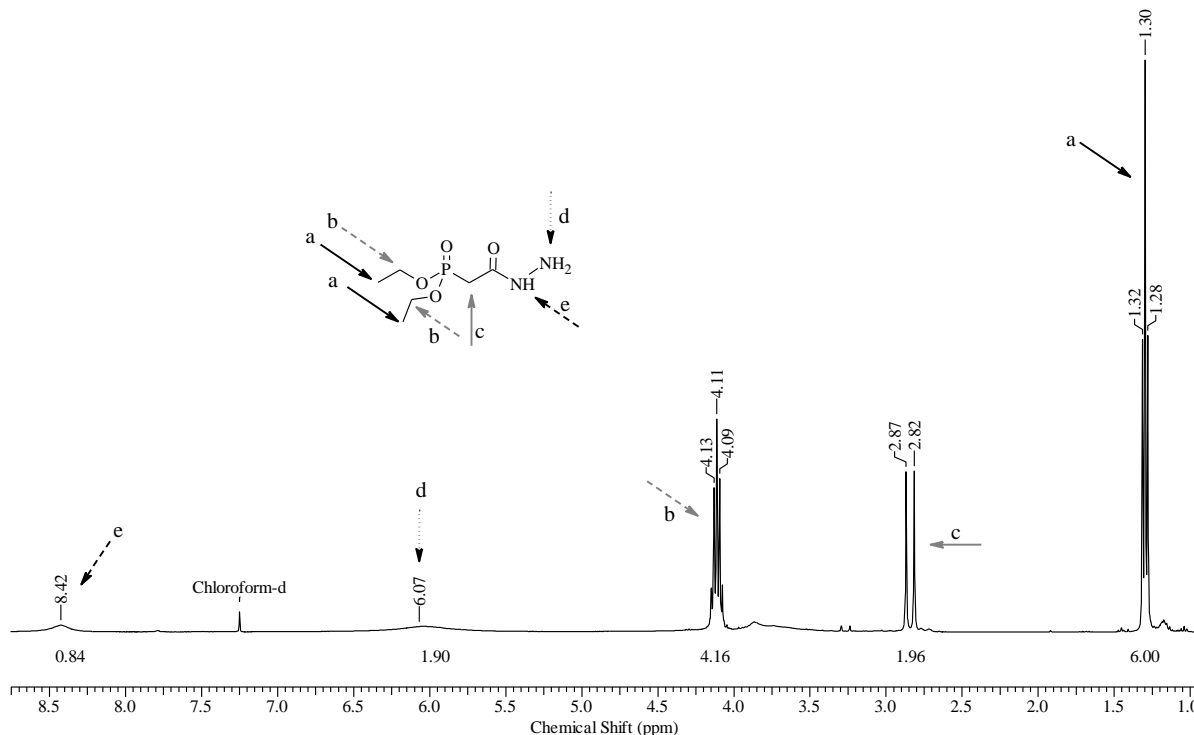
Podemos observar no espectro de RMN  $^1\text{H}$  do 2-hidrazinil-2-oxoetilfosfonato de dietila (III) um duplete de tripleto referentes aos hidrogênios metílicos, em 1,30 ppm e um duplete de quarteto em 4,11 ppm referentes ao hidrogênios metilênicos ligados ao oxigênio e acoplados com o fósforo. Outro sinal importante que confirma a estrutura do produto é o duplete em 2,84 ppm com constante de acoplamento dos hidrogênios com o fósforo de 21,08 Hz. Também é característico deste composto dois simpletos largos em 6,07 ppm ( $\text{NH}_2$ ) e 8,42 (NH) referente aos hidrogênios hidrazínicos, com integração para três hidrogênios. Um acoplamento hidrogênio-fósforo pode ser notado a uma distância de até quatro ligações.

Segundo relatado por GONÇALVES (2009), compostos contendo hidrogênio ligado a nitrogênio, às vezes, são totalmente ou parcialmente desacoplados, devido à troca dos hidrogênios com o solvente, logo não se observa o acoplamento desses com hidrogênios adjacentes, assim o sinal é um simpleto. O simpleto estreito e alto indica que a velocidade da



troca é rápida, o largo indica que a troca é moderada e o bem relaxado indica troca lenta. No caso dos nossos compostos, temos os dois últimos casos.

Na Figura 19 estão apresentados os dados referentes aos deslocamentos químicos e as multiplicidades do composto sintetizado (III).

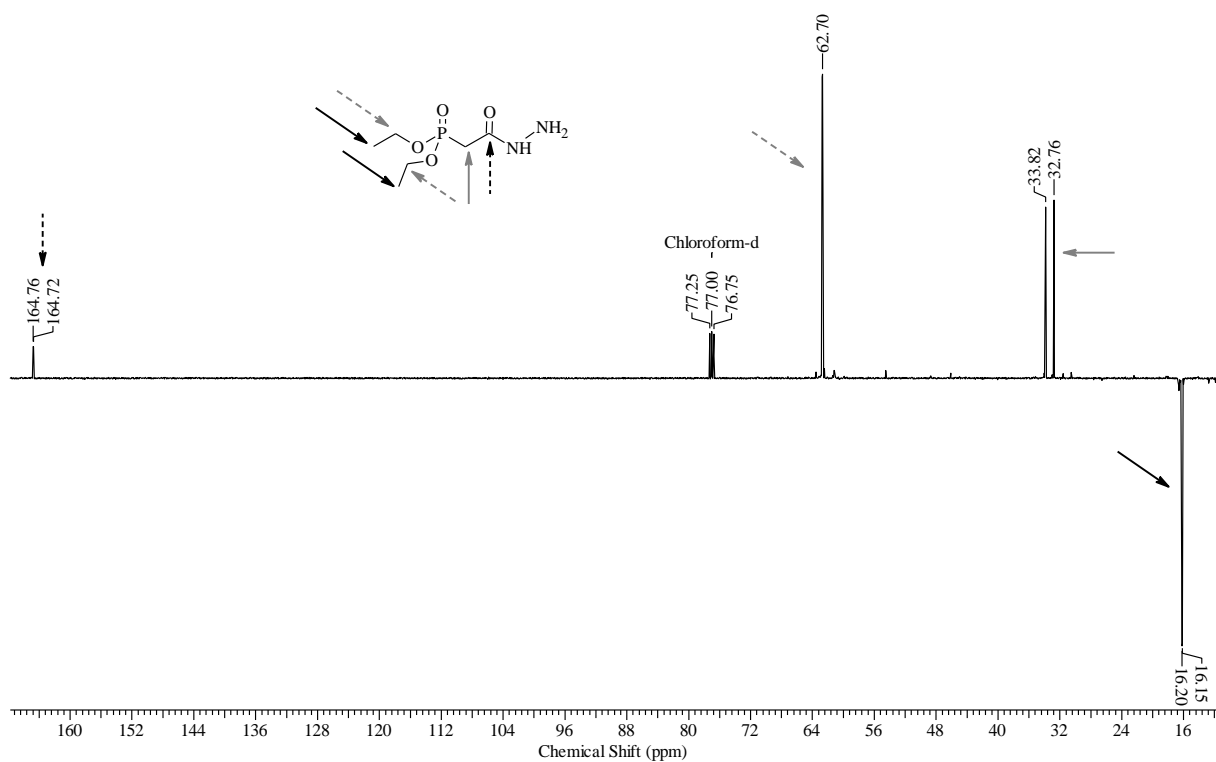


**Figura 19** - Dados de RMN  $^1\text{H}$  do 2-hidrazinil-2-oxoetilfosfonato de dietila (III).

Na Tabela 5, podemos observar os deslocamentos químicos e suas atribuições nos dois intermediários de reação, III e IV.

#### 4.2.1.3. Análise por espectrometria de RMN $^{13}\text{C}$

Os deslocamentos químicos de 33,29 e 31,95 ppm nos compostos III e IV, respectivamente, são referentes ao carbono metilênico ligado a fosforila, com o qual acopla com uma constante de acoplamento em torno de 133 Hz, característico desse composto, Tabela 6. A Figura 20 exhibe os valores dos deslocamentos químicos e as multiplicidades dos carbonos do 2-hidrazinil-2-oxoetilfosfonato de dietila (III).



**Figura 20** - Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  dietoxifosfonil hidrazida acética (III).

#### 4.2.1.4. Análise por espectrometria de RMN $^{13}\text{P}$

Os deslocamentos químicos obtidos através do RMN  $^{31}\text{P}$  (m) e  $^{31}\text{P}_{\text{CPD}}$  (s) em  $\text{CDCl}_3$  são de 22,31 e 22,71 ppm para os compostos III e IV, respectivamente. O fósforo acopla fortemente com os hidrogênios até 3 ligações. Podemos ver facilmente um  $J_{\text{P-H}}$  de 22Hz aproximadamente, acoplado a uma ligação.

**Tabela 5 - Dados de RMN <sup>1</sup>H das dialquilfosfonil hidrazidas acéticas sintetizados.**

III	1,30 [t, 6H] <i>J</i> <sub>PH</sub> = 7,03 Hz	2,84 [d, 2H] <i>J</i> <sub>PH</sub> = 21,08 Hz	4,11 [dq, 4H]	-	-	-	-	6,07 [s, largo 2H]	8,42 [s, largo 1H]
IV	-	2,78 [d, 2H] <i>J</i> <sub>PH</sub> = 21,17 Hz	-	0,83 [t, 6H] <i>J</i> <sub>PH</sub> = 7,25 Hz	1,30 [q, 4H]	1,56 [q, 4H]	3,99 [q, 4H]	4,35 [s, largo 2H]	8,65 [s, largo 1H]

Espectros realizados em CDCl<sub>3</sub> como solvente.

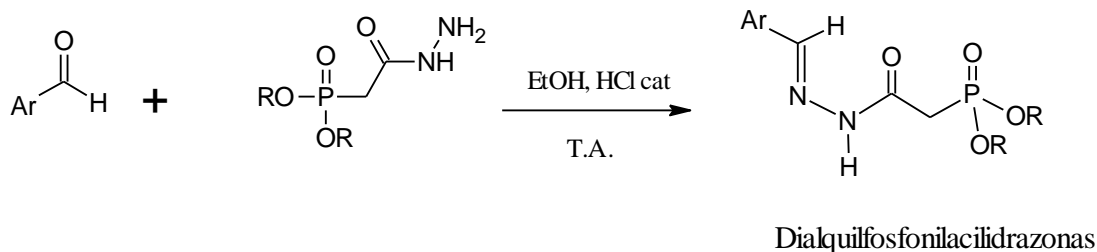
**Tabela 6 - Dados de RMN <sup>13</sup>C das dialquilfosfonil hidrazidas acéticas sintetizados.**

III	16,18 [d, 2C]	33,29 [d, 1C] <i>J</i> <sub>PH</sub> = 133,52 Hz	62,73 [d, 1C]	-	-	-	-	165,75 [d, 1C]	
IV	-	31,95 [d, 1C] <i>J</i> <sub>PH</sub> = 134,10 Hz	-	13,46 [d, 2C]	18,23 [d, 2C]	65,16 [d, 2C]	66,67 [d, 2C]	163,62 [d, 1C]	

Espectros realizados em CDCl<sub>3</sub> como solvente.

### 4.3. Síntese das dialquifosfonilacilidrazonas

A partir do intermediário chave, as dietoxifosfonil hidrazida acética, foram sintetizados 17 novos compostos, conforme apresentado no Esquema 15. Todos os derivados fosforilacilidrazônicos foram obtidos através da clássica condensação catalisada por ácido com os aldeídos heterocíclicos, isatina e derivados, à temperatura ambiente aproximada de 30°C, Figura 21.

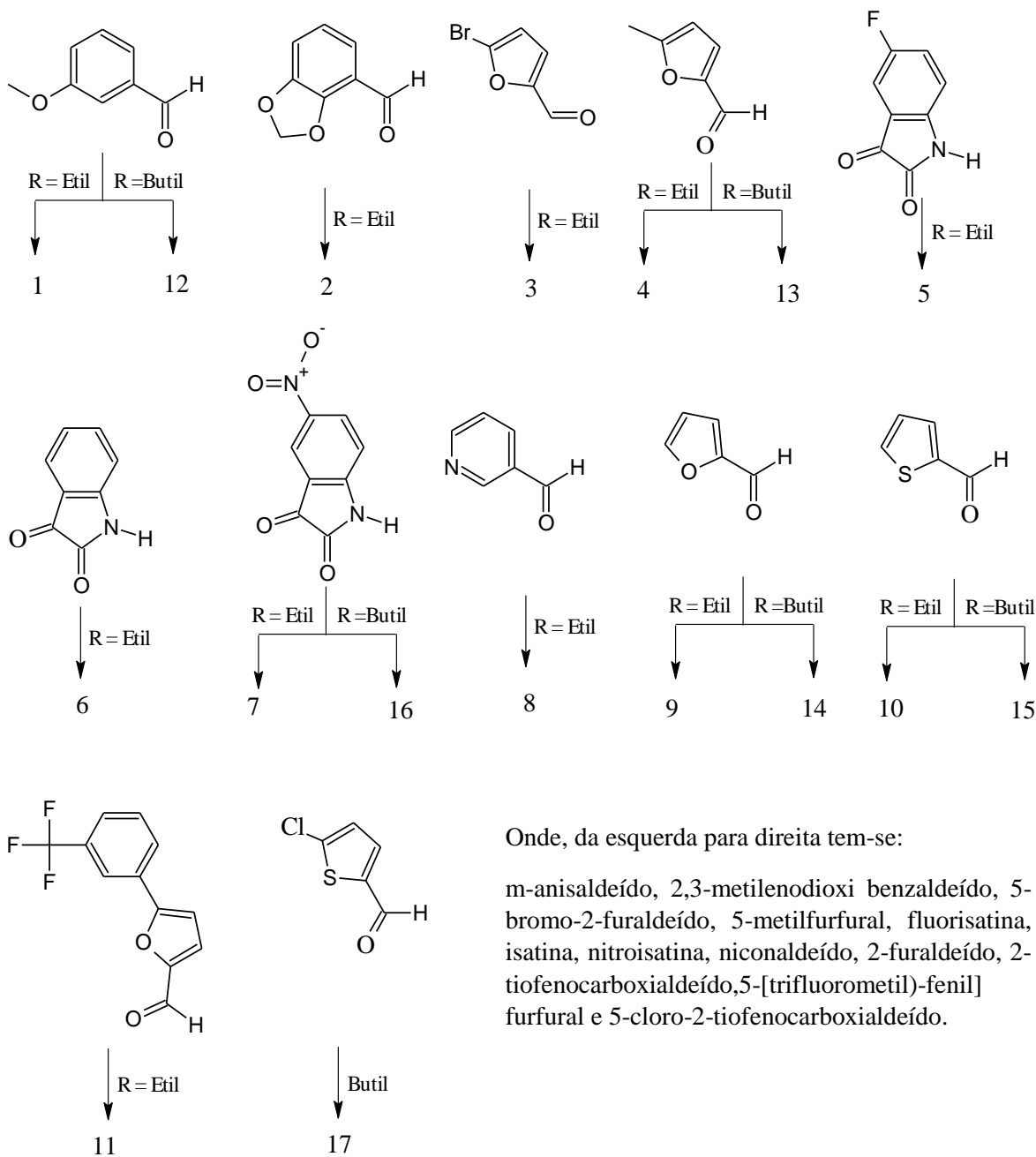


**Esquema 15** - Rota sintética geral das dialquifosfonilacilidrazonas.

A Tabela 7 apresenta resultados de massa molecular, rendimento, aspecto físico, pontos de fusão e pureza de cada dietoxifosfonilacilidrazonas sintetizada.

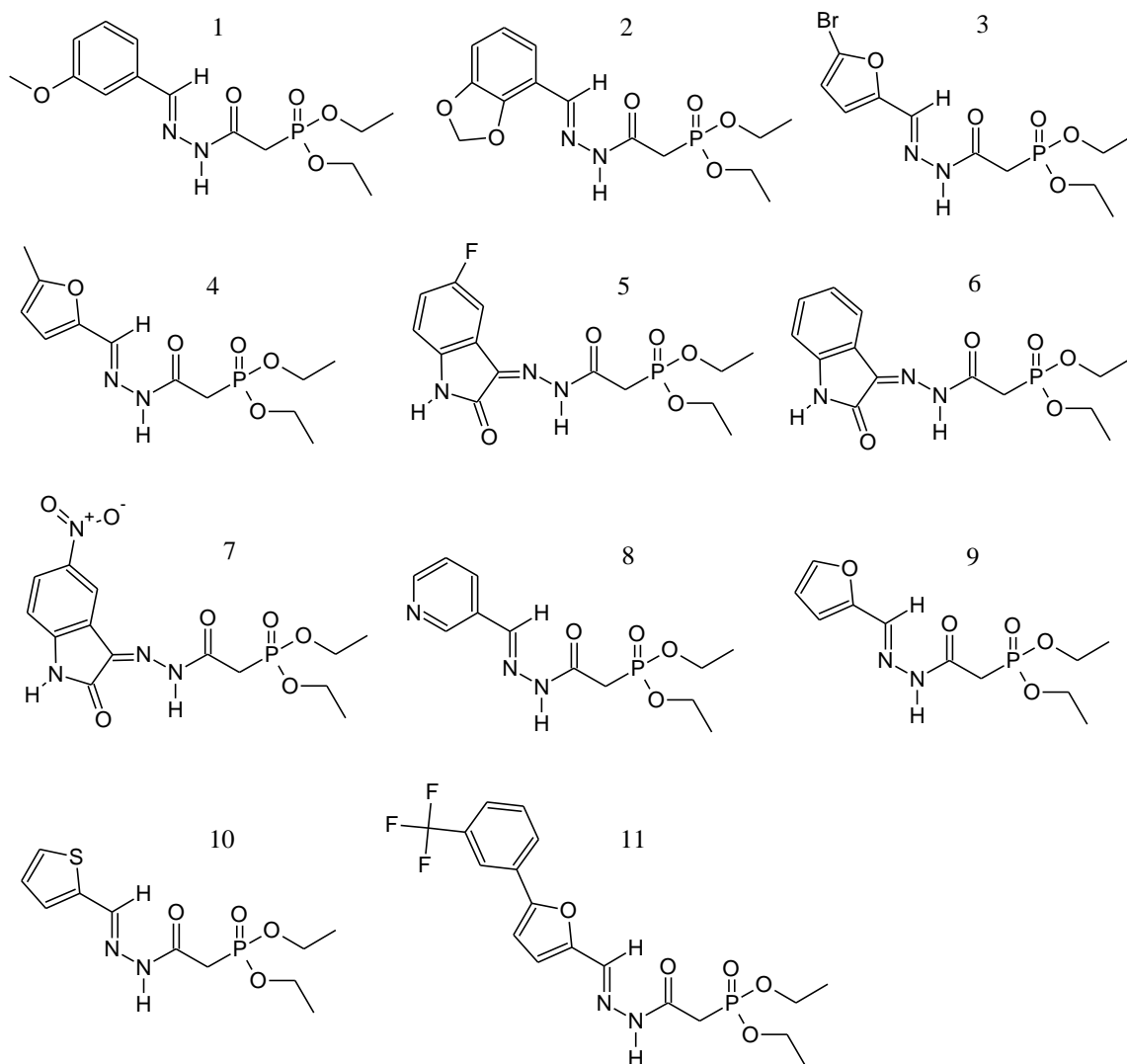
**Tabela 7** - Dados dos compostos sintetizados.

Composto	Massa molecular	Rendimento (%)	Aspecto físico	PF (°C)	Pureza (%)
1	328	76	Sólido amarelo	78-80	>99
2	342	20	Sólido bege	128-130	98
3	367	59	Óleo Marrom	-	70
4	302	76	Óleo Marrom	-	97
5	357	77	Sólido Laranja	128-130	>99
6	339	76	Sólido Laranja	110-112	92
7	384	85	Sólido Laranja	206-208	93
8	299	43	Óleo amarelo	-	36
9	288	37	Óleo Marrom	-	97
10	304	35	Óleo Marrom	-	>99
11	432	40	Óleo Marrom	-	77
12	384	77	Óleo amarelo	-	>99
13	358	76	Óleo Marrom	-	>99
14	344	68	Óleo Marrom	-	98
15	360	52	Sólido amarelo	78-80	>99
16	440	85	Sólido laranja	170-172	>99
17	395	52	Sólido amarelo	50-52	>99



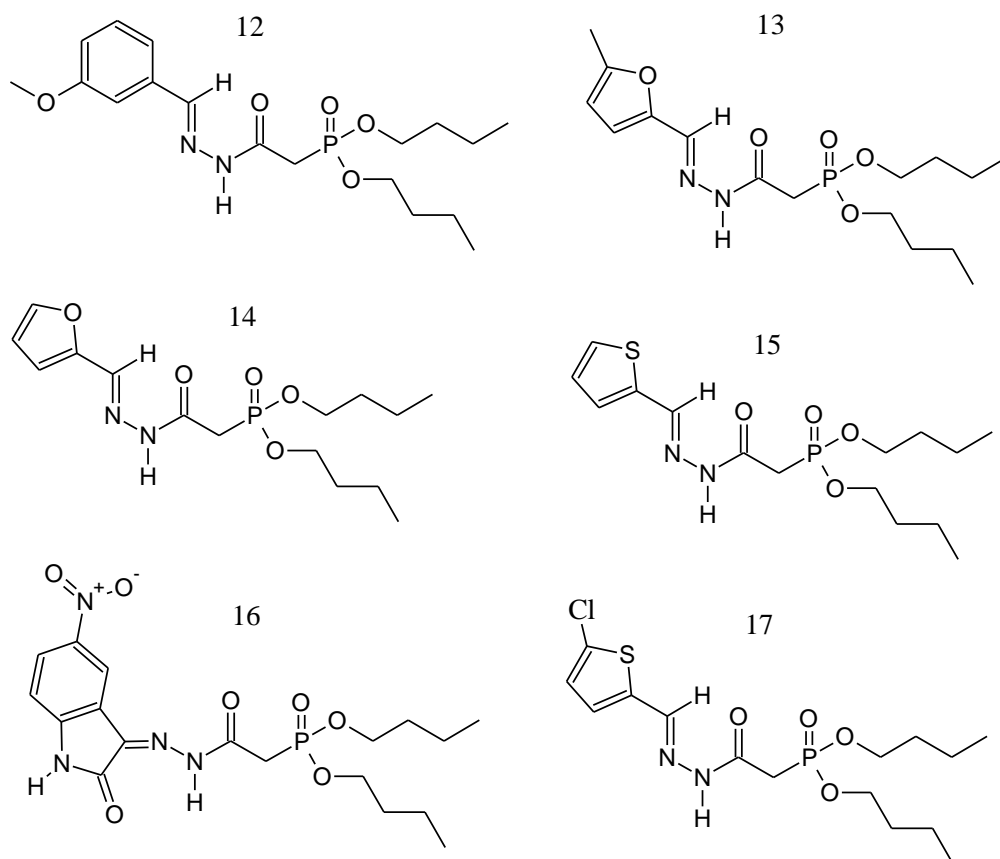
**Figura 21** - Aldeídos, isatinas e derivados utilizados para a sínteses de novos compostos.

A Figura 22 apresenta as estruturas dos compostos sintetizados derivados do intermediário III.



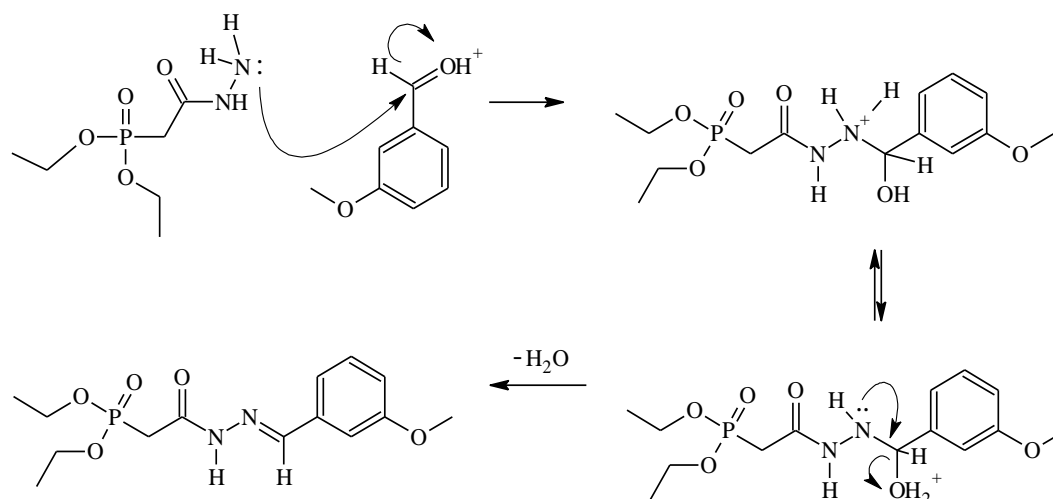
**Figura 22-** Compostos sintetizados a partir do 2-hidrazinil-2-oxoetilfosfonato de dietila (III) representados pelos estereoisômeros (*E*).

A Figura 23 apresenta as estruturas dos compostos sintetizados derivados do intermediário IV.



**Figura 23** - Compostos sintetizados a partir da 2-hidrazinil-2-oxoetilfosfonato de dibutila (IV) representados pelos estereoisômeros (*E*).

A proposta de mecanismo de síntese das dialquifosfonilacilidrazonas é mostrado no Esquema 16 descrito a seguir.



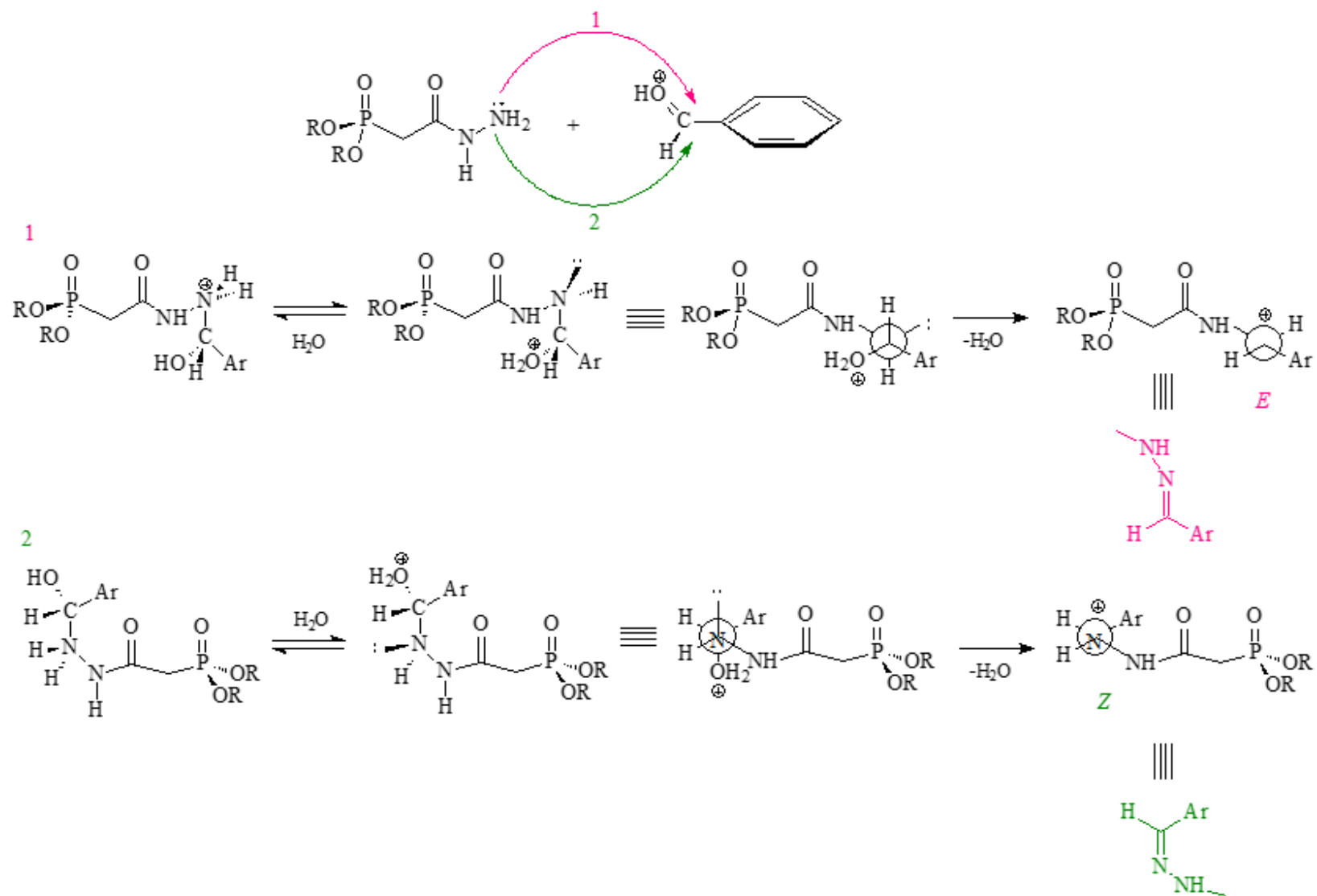
**Esquema 16** - Proposta de mecanismo de síntese dos compostos dialquifosfonilacilidrazonas demonstrado através do composto I.

Todos os produtos obtidos apresentaram uma mistura de diastereoisômeros e os ensaios realizados posteriormente ocorreram com a mistura. Segundo GONÇALVES (2009),

os compostos diastereoisoméricos são oriundos dos possíveis efeitos estéricos que ocorrem devido aos diferentes radicais ligados ao grupo carbonílico enantiotópico, através de reações assimétricas.

No Esquema 17 está explicitado o mecanismo simplificado desta síntese, o qual ilustra a formação dos dois diastereoisômeros *E* e *Z* devido a planaridade do aldeído, que permite o ataque do par de elétrons do nitrogênio hidrazínico ao carbono carbonílico em dois lados diferentes. A seletividade preferencial dos diastereoisômeros é decorrente desta aproximação. A disposição do radical mais volumoso tende a provocar o menor impedimento estérico, favorecendo a conformação anti-periplanar entre os pares de elétrons do átomo de nitrogênio e a molécula de água, grupo de saída, verificado na formação do diastereoisômero *E*. Na formação do diastereoisômero *Z*, a conformação anti-periplanar é dificultada pelo impedimento estérico ocasionado pela proximidade dos grupos volumosos.





**Esquema 17-** Provável mecanismo da mistura diastereoisomérica das dialquifosfonilacilidrazonas sintetizadas.

### 4.3.1. Determinação estrutural das dialquifosfonilacilidrazonas

#### 4.3.1.1. Análise por espectrometria de infravermelho

As dietoxifosfonil-N-acilarilidrazonas apresentam bandas características nas seguintes faixas: 3422 - 3111  $\text{cm}^{-1}$ , 1686 - 1601  $\text{cm}^{-1}$ , 1690-1640  $\text{cm}^{-1}$ , 1280 - 1272  $\text{cm}^{-1}$ , 924 - 1027  $\text{cm}^{-1}$ , correspondentes às vibrações axiais das ligações N-H, C=O, C=N, P=O, P-O-C, respectivamente. Também se observa nos espectros as bandas em torno de 860 - 736  $\text{cm}^{-1}$  correspondentes às vibrações das ligações C-H do anel aromático. A Tabela 8 mostra as principais bandas de absorção referentes a estes compostos.

**Tabela 8** - Dados de IV dos compostos sintetizados em  $\text{cm}^{-1}$ .

$$\text{(RO)}_2\overset{\text{O}}{\parallel}\text{P}-\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-\text{N}=\text{C}^*$$

\*C aldeído ou isatina e seus derivados

Composto	N-H	C=O	C=N	P=O	P-O-C	P-C
1	3069	1667	1609	1263	1013	788
2	3111	1683	1415	1235	1019	729
3	2984	1674	1609	1200	1015	789
4	3205	1667	1578	1233	1016	618
5	3100	1682	1599	1238	1022	616
6	3128	1682	1480	1149	1023	616
7	3105	1688	1596	1207	1025	746
8	3413	1679	1563	1236	1018	703
9	3447	1674	1576	1240	1015	749
10	3459	1667	1598	1223	1016	708
*11	-	-	-	-	-	-
12	3205	1677	1577	1240	1021	689
13	3178	1680	1558	1215	1017	792
14	3196	1677	1567	1228	1018	720
15	3197	1677	1567	1228	1019	720
16	3073	1684	1528	1219	1014	743
*17	-	-	-	-	-	-

\*Amostra insuficiente para realização desta análise.

ANBAZHAGAN & SANKARAN (2015), ao sintetizar novos 2-tiazolil hidrazonas, obtiveram nos espectros IR dos compostos sintetizados bandas largas menos intensas próximas de 3442-3282  $\text{cm}^{-1}$  atribuídas para o grupo  $\nu_{\text{N-H}}$ . As ligações C=N apresentaram bandas na região 1621-1566  $\text{cm}^{-1}$ . No trabalho realizado por TIMPERLEY *et al.*, (1999), as bandas de IV aparecem em 1292-1269 (P=O), 1038-1032 (P-OEt), condizentes com os valores obtidos neste trabalho.

#### 4.3.1.2. Análise por espectrometria de RMN $^1\text{H}$

Na Tabela 9 pode-se observar os deslocamentos químicos com os respectivos constantes de acoplamento ( $J$ ) dos compostos oriundos da reação entre o composto III com os aldeídos selecionados. A Figura 24 mostra as estruturas desses compostos e as assinalações feitas nos hidrogênios explicitados nos compostos. A Tabela 10 e a Figura 25 são relativos as mesmas informações referentes aos compostos oriundos a reação entre o composto III com a isatina e seus derivados. A Tabela 11 e a Figura 26, no entanto, exibem as informações sobre os compostos sintetizados a partir da reação do intermediário IV com a nitroisatina e os aldeídos selecionados.

Foram observados a presença de mistura diastereoisomérica (*E/Z*) devido à presença de dois dupletos entre 2,99 e 3,61 ppm, com  $J_{P-H}$  de aproximadamente 22 Hz referentes ao acoplamento dos hidrogênios metilênicos com o fósforo. São característicos destes compostos dois simpletos referentes aos hidrogênios imínicos na região de aromáticos (7,71-8,35 ppm), com maiores  $\delta$  para os compostos derivados da isatina 9,30-10,41 ppm, chegando a 11,92 ppm no composto 16. O composto 8, derivado do nicotinaldeído, apresentou  $\delta$  de 10,91-11,15 ppm. Provavelmente a presença do anel aromático desprotegeu o H imínico deste composto gerando sinal em campos mais altos.

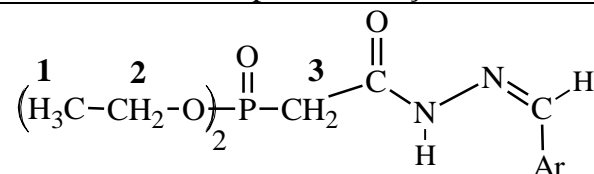
Observa-se também dois simpletos referentes aos hidrogênios amídicos 8,30-11,55 ppm, o que evidencia os diastereoisômeros. Novamente, esses  $\delta$  são maiores para os compostos derivados da isatina, 12,45 a 13,23 ppm. Não foi observado no espectro do composto 8 sinal do H amídico.

No trabalho realizado por ANBAZHAGAN & SANKARAN (2015), os prótons aromáticos das hidrazonas sintetizadas apareceram em torno de 7,18-7,89 ppm. Neste trabalho, foi observado variações de 6,23 a 8,79 ppm.

DA MATTA *et al.*, (2015), observaram nas análises de  $^1\text{H}$ -RMN, dois sinais característicos que confirmam a obtenção das dialquifosfonilacilidrazonas sintetizadas. Estes sinais correspondem ao hidrogênio imínico, com uma mudança química ( $\delta$ ) na faixa de 7,88-8,26 ppm. DA MATTA *et al.*, (2015) ainda observou que dois de seus compostos apresentaram um duplete adicional na região aproximadamente 12,8 ppm, com uma constante de acoplamento de aproximadamente 34 Hz, que é característica de uma ligação de hidrogênio intramolecular. Não foi observado em nenhum de nossos compostos, no entanto, podemos observar a duplicação dos sinais, o que indica a formação de uma mistura diastereoisomérica.

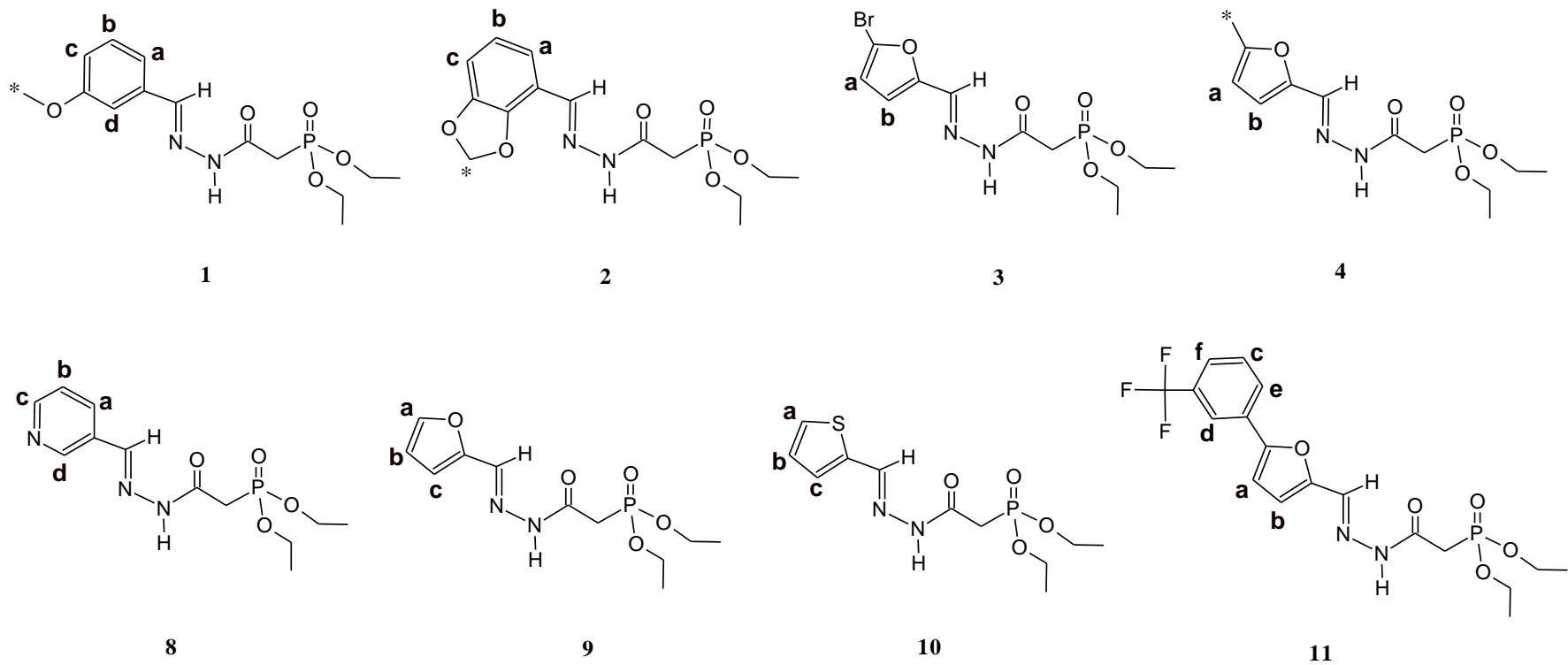
NOGUEIRA (2007), ao sintetizar dietoxifosfonilacilidrazonas também encontrou mistura de diastereoisômeros em seus compostos.

**Tabela 9** - Dados de  $\delta$  (ppm) de RMN  $^1\text{H}$  dos compostos sintetizados a partir da reação do intermediário III e aldeídos.



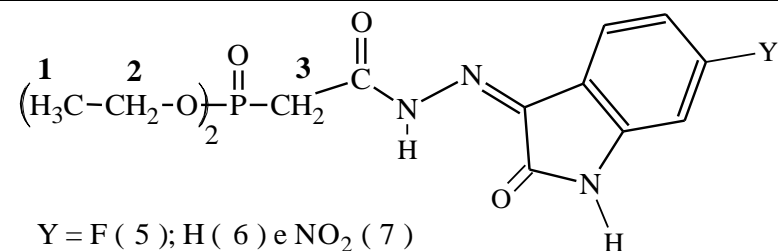
	CH <sub>3</sub> (1) [t, 12H]	CH <sub>2</sub> (3) [d, 4H]	CH <sub>2</sub> (2) [m, 8H]	*	H Aromáticos					N=CH [s, 2H]	NHN [s, 2H]
1	1,29 e 1,35 $J_{\text{PH}}=7,02$ e 7,28 Hz	3,05 e 3,52 $J_{\text{PH}}=21,08$ e 22,09 Hz	4,17	3,79 e 3,82 [s (CH <sub>3</sub> O), 6H]	6,91 <b>b</b>	7,19 <b>a</b> e <b>c</b>	7,28 <b>d</b> [d, 2H]	-	-	7,87 e 8,06	10,21 10,66
2**	1,19 e 1,23 $J_{\text{PH}}=6,93$ e 7,25 Hz	2,95 e 3,41 $J_{\text{PH}} = 22,07$ Hz	4,02	6,09 e 6,10 [s (OCH <sub>2</sub> O), 4H]	6,88 <b>b</b> [dt, 2H]	6,95 <b>a</b> [d, 2H]	7,23 <b>c</b> [d, 2H]	-	-	8,06 e 8,23	11,57 11,59
3	1,36 e 1,37 $J_{\text{PH}}=7,03$ Hz	3,09 e 3,52 $J_{\text{PH}}=20,83$ e 22,08 Hz	4,22	-	6,42 e 6,67 <b>a</b> [dt, 2H]	6,59 e 6,79 <b>b</b> [d, 2 H]	-	-	-	7,71 e 8,06	10,20 10,83
4**	1,19 e 1,22 $J_{\text{PH}}=6,94$ e 7,25 Hz	2,93 e 3,32 $J_{\text{PH}}=21,44$ Hz	4,03	2,30 e 2,31 [s (CH <sub>3</sub> C), 6H]	6,22 <b>a</b> [m, 2H]	6,75 e 6,78 <b>b</b> [d, 2H]	-	-	-	7,79 e 7,93	11,39
8	1,29 e 1,35 $J_{\text{PH}}=7,03$ e 7,28 Hz	3,06 e 3,51 $J_{\text{PH}}=21,33$ e 22,08 Hz	4,18	-	7,24 e 7,32 <b>b</b> [dd, 2H]	8,02 e 8,09 <b>a</b> [d, 2H]	8,54 e 8,57 <b>c</b> [dd, 2H]	8,73 e 8,79 <b>d</b> [s, 2H]	7,98 e 8,13 [s, 2H]	10,91 e 11,15	-
9**	1,19 e 1,23 $J_{\text{PH}}=7,03$ Hz	2,95 e 3,35 $J_{\text{PH}}=21,33$ e 21,84 Hz	4,03	-	6,61 <b>b</b> [m, 2H]	6,70 e 7,11 <b>c</b> [dd, 2H]	6,87 e 6,91 <b>a</b> [dd, 2H]	-	-	7,87 e 8,03	11,47 11,49
10**	1,31 e 1,34 $J_{\text{PH}}=7,03$ e 7,02 Hz	3,02 e 3,48 $J_{\text{PH}}=20,83$ e 22,08 Hz	4,18	-	7,02 <b>b</b> [m, 2H]	7,23 e 7,77 <b>c</b> [dd, 2H]	7,28 e 7,36 <b>a</b> [dd, 2H]	-	-	8,03 e 8,07	9,94 10,16
11	1,29 e 1,35 $J_{\text{PH}}=7,03$ e 7,03 Hz	2,99 e 3,50 $J_{\text{PH}}=20,83$ e 22,08 Hz	4,18	-	6,86 <b>a</b> [dd, 2H]	7,04 <b>b</b> [dd, 2H]	7,48 <b>c</b> [dt, 2H]	7,62 <b>d</b> [dt, 2H]	7,77 <b>e</b> [dd, 2H] 7,89 <b>f</b> [dd, 2H]	7,96 e 8,12	8,30 9,00

\*\*Resultados obtidos com DMSO como solvente, os demais resultados foram obtidos em CDCl<sub>3</sub>.



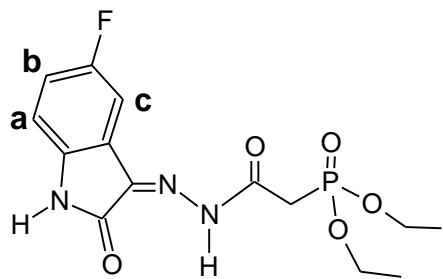
**Figura 24** - Compostos descritos na Tabela 9 e suas assinalações.

**Tabela 10** - Dados de  $\delta$  (ppm) de RMN  $^1\text{H}$  dos compostos sintetizados a partir da reação do intermediário III e isatinas.

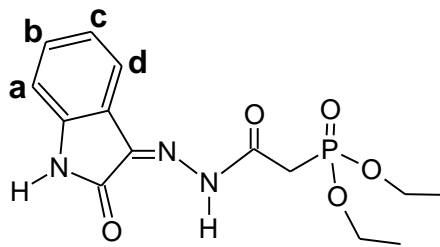


	CH <sub>3</sub> (1) [t, 12H]	CH <sub>2</sub> (3) [d, 4H]	CH <sub>2</sub> (2) [m, 8H]	H Aromáticos			NHC=O [s, 2H]	NHN [s, 2H]	
5	1,41 $J_{\text{PH}}=7,18$ Hz	3,18 e 3,61 $J_{\text{PH}}=21,58$ e 22,59 Hz	4,27	6,83 <b>a</b> [dd, (CCHCH), 2H]	7,01 <b>b</b> [m, (CHCHC), 2H]	7,14 <b>c</b> [dd (CCHC) 2H]	-	9,30 e 9,45	12,65 13,26
6	1,38 $J_{\text{PH}}=7,18$ Hz	3,15 e 3,57 $J_{\text{PH}}=22,07$ e 22,70 Hz	4,23	6,79 <b>a</b> [d, (CCHCH), 2H]	6,95 <b>c</b> [dd, (CHCHCH), 2H]	7,07 <b>b</b> [dd (CHCHCH) 2H]	7,17 e 7,31 <b>d</b> [d, (CHCHC), 2H]	9,63 e 9,78	12,62 13,23
7	1,44 $J_{\text{PH}}=6,91$ Hz	3,16 e 3,59 $J_{\text{PH}}=22,07$ e 22,70 Hz	4,28	6,95 <b>a</b> [d, (CCHCH), 2H]	8,16 <b>b</b> [d, (CHCHC), 2H]	8,20 <b>c</b> [s (CCHC) 2H]	-	10,41	12,45

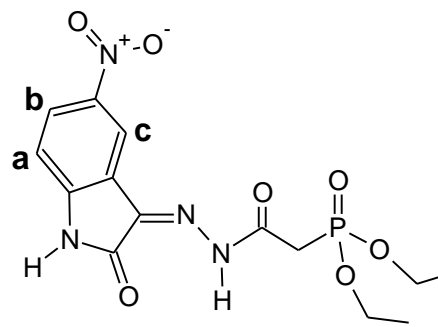
Resultados obtidos com CDCl<sub>3</sub> como solvente.



5



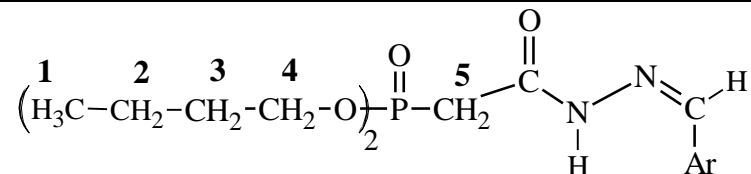
6



7

Figura 25 - Compostos descritos na Tabela 10 e suas assinalações.

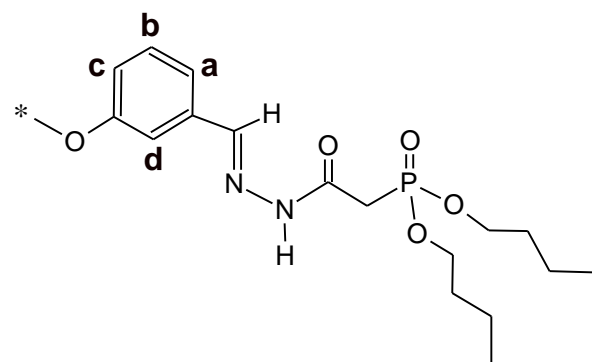
**Tabela 11** - Dados de  $\delta$  (ppm) de RMN  $^1\text{H}$  dos compostos sintetizados a partir da reação do intermediário IV com aldeídos e a nitroisatina.



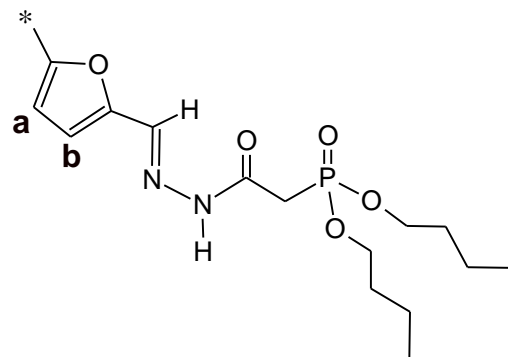
	CH <sub>3</sub> (1) [t, 12H]	CH <sub>2</sub> (2) [m, 8H]	CH <sub>2</sub> (3) [m, 8H]	CH <sub>2</sub> (4) [m, 8H]	CH <sub>2</sub> (5) [d, 4H]	*	H Aromáticos	N=CH [s, 2H]	NHN [s, 2H]		
12	0,80 e 0,87 $J_{\text{PH}}=7,53$ e 7,52 Hz	1,31	1,51	3,96	2,97 e 3,42 $J_{\text{PH}}=21,34$ e 22,09 Hz	3,77 e 3,78 [s, 6H]	6,99 <b>b</b> [t, 2H]	7,24 <b>a</b> e <b>c</b> [d, 4H]	7,33 <b>d</b> [d, 2H]	7,95 e 8,10	11,51 11,55
13	0,83 e 0,87 $J_{\text{PH}}=7,27$ e 7,53 Hz	1,31	1,53	3,97	2,93 e 3,31 $J_{\text{PH}}=21,34$ Hz	2,30 e 2,32 [s, 6H]	6,23 <b>a</b> [m, 2H]	6,75 e 6,78 <b>b</b> [d, 2H]	-	7,78 e 7,91	11,36 11,38
14	0,82 e 0,87 $J_{\text{PH}}=7,28$ Hz	1,31	1,53	3,97	2,95 e 3,38 $J_{\text{PH}}=21,33$ Hz	2,95 e 3,41	6,60 <b>b</b> [m, 2H]	6,87 e 6,91 <b>c</b> [dd, 2H]	7,79 e 7,82 <b>a</b> [dd, 2H]	7,87 e 8,02	11,45 11,47
15	0,83 e 0,87 $J_{\text{PH}}=7,28$ e 7,27 Hz	1,31	1,54	3,97	2,95 e 3,34 $J_{\text{PH}}=21,33$ e 21,84 Hz	3,09 e 3,52 $J_{\text{PH}}=20,83$ e 22,08 Hz	7,11 <b>b</b> [m, 2H]	7,42 e 7,47 <b>c</b> [dd, 2H]	7,63 e 7,66 <b>a</b> [dd, 2H]	8,17 e 8,35	11,46 11,51
16	0,81 e 0,86 $J_{\text{PH}}=7,28$ Hz	1,30	1,55	4,02	3,44 e 3,69 $J_{\text{PH}}=20,58$ e 22,09 Hz	2,93 e 3,32 $J_{\text{PH}}=21,44$ Hz	7,14 <b>a</b> [dd, 2H]	8,22 e 8,36 <b>c</b> [d, 2H]	8,30 e 8,42 <b>b</b> [dd, 2H]	<b>•11,92</b> [s, 2H]	12,42 12,83
17	0,89 e 0,92 $J_{\text{PH}}=7,53$ Hz	1,38	1,65	4,10	2,97 e 3,42 $J_{\text{PH}}=20,83$ e 22,09 Hz	3,06 e 3,51 $J_{\text{PH}}=21,33$ e 22,08 Hz	6,83 <b>b</b> [m, 2H]	6,99 e 7,03 <b>a</b> [dd, 2H]	-	7,86 e 8,21	10,00 10,38

Resultados obtidos com DMSO como solvente. \* $\delta$  (ppm) referente ao **H** do anel da isatina  $\text{NHC}=\text{O}$ , conforme estrutura apresentada na Tabela 10, visto que o composto 16 é o único nesta Tabela derivado da isatina e todos os demais são derivados de aldeído.

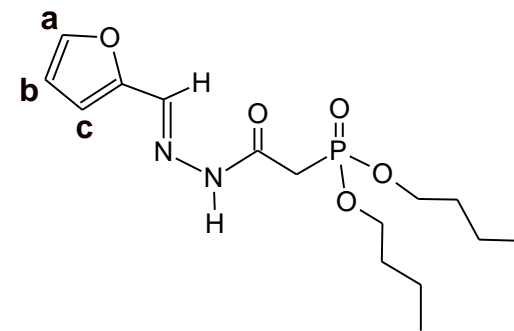




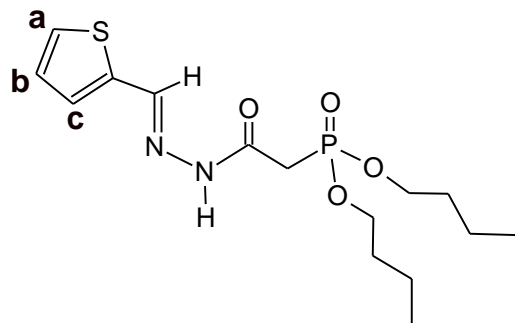
12



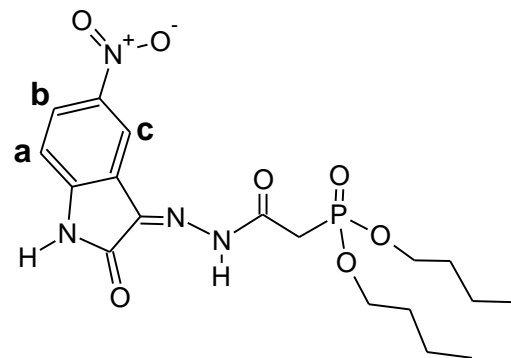
13



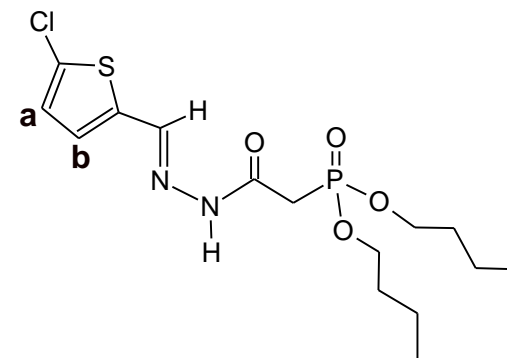
14



15



16



17

Figura 26 - Compostos descritos na Tabela 11 e suas assinalações.

No presente trabalho, não foram realizadas análises para comprovar a predominância do diastereoisômero *E*, visto que trabalhos anteriores do grupo, inclusive o realizado na dissertação de mestrado de BARBOZA (2010), comprovam a predominância do diastereoisômero *E* por estudo de Efeito Nuclear Overhouse (NOE)

KÜMMERLE *et al.*, (2009) após análise cuidadosa dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de novos derivados de N-acilidrazona demonstraram N-alquilação seletiva pela presença de um único sinal de hidrogênio imino variando de  $\delta$  8,3 a 8,6 ppm, atribuídos ao diastereômero (*E*), baseado em vários relatórios anteriores do grupo que descrevem a configuração de derivados N-acilidrazona bioativas, além de um único sinal de hidrogênio amídico variando de  $\delta$  11,6 a 11,7 ppm, condizentes com o ocorrido neste trabalho.

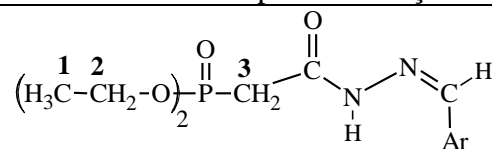
Ainda, SILVA *et al.*, (2005), após análise dos espectros RMN de  $^1\text{H}$  de novos derivados de acilidrazona detectaram a presença de um único sinal de hidrogênio imínico, atribuído ao diastereômero (*E*) com base em vários relatórios anteriores do seu grupo onde é descrito a configuração dos compostos de acilidrazona bioativas. Já CARVALHO *et al.*, (2012), que trabalharam com designer e síntese de novas (*E*) N-acil-hidrazonas-cinâmicas determinou a formação do isômero geométrico (*E*) através de difração de raios X.

A preferência pela formação de N-acilidrazonas pelo isômero (*E*) é comprovado por vários autores e seus grupos, como os descritos por DUARTE *et al.* (2007); FRAGA & BARREIRO (2006); LIMA *et al.* (2000) e RIBEIRO *et al.* (1998) bem como por trabalhos realizados pelo nosso grupo BARBOZA (2010); GONÇALVES (2009); NOGUEIRA (2007); RODRIGUES *et al.* (2010) e ZAMPIROLI (2009).

#### 4.3.1.3. Análise por espectrometria de RMN $^{13}\text{C}$

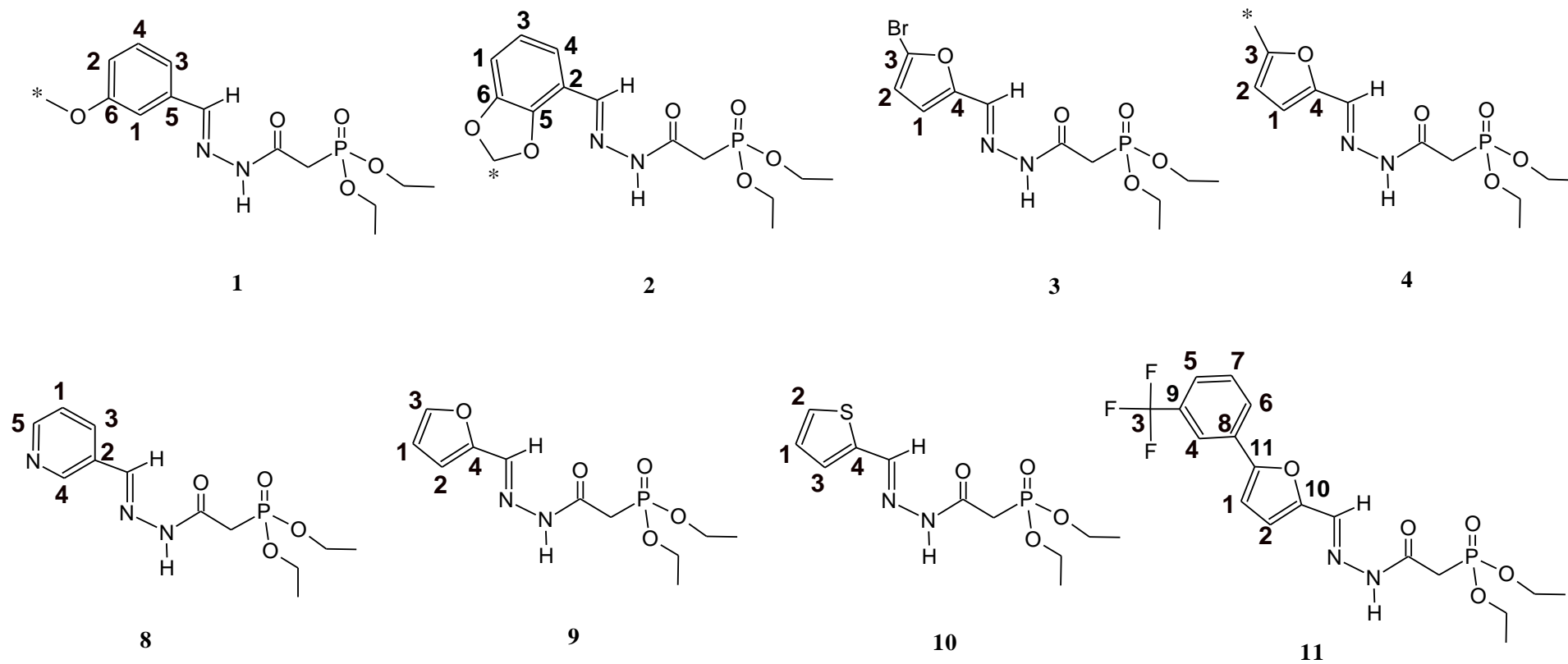
Na Tabela 12 pode-se observar os deslocamentos químicos com os respectivos constantes de acoplamento (*J*) dos compostos oriundos a reação entre o composto III com os aldeídos selecionados. A Figura 27 mostra as estruturas desses compostos e as assinalações feitas nos carbonos assinalados nos compostos. A Tabela 13 e a Figura 28 são relativas as mesmas informações referentes aos compostos oriundos a reação entre o composto III com a isatina e seus derivados. Já a Tabela 14 e a Figura 29 exibem as informações sobre os compostos sintetizados a partir da reação do intermediário IV com a nitroisatina e os aldeídos selecionados.

**Tabela 12** - Dados de  $\delta$  (ppm) de RMN  $^{13}\text{C}$  dos compostos sintetizados a partir da reação do intermediário III e aldeídos.



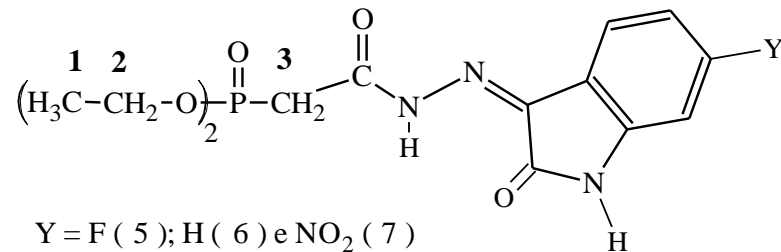
	CH <sub>3</sub> (1) [d, 2C]	CH <sub>2</sub> (3) [d, 2C]	CH <sub>2</sub> (2) [d, 2C]	* [s, 2C]	H Aromáticos						N=CH [s, 2C]	C=O [d, 2C]
					<u>1</u> [s, 2C]	<u>2</u> [s, 2C]	<u>3</u> [s, 2C]	<u>4</u> [s, 2C]	<u>5</u> [s, 2C]	<u>6</u> [s, 2C]		
1	16,30	32,03 e 34,29 <i>J</i> <sub>PC</sub> =133,32 e 130,25 Hz	62,61 63,25	55,29 e 55,36 (CH <sub>3</sub> O)	111,00 111,78	116,23 117,39	120,13 121,20	129,43 129,76	134,82 134,84	159,70 159,80	144,69 148,64	167,76 167,81
2	16,30	31,88 e 34,28 <i>J</i> <sub>PC</sub> =134,09 e 130,25 Hz	62,64 63,28	101,47 e 102,52 (OCH <sub>2</sub> O)	109,62 109,79	115,95	118,55 119,76	121,58 121,78	146,49 146,55	147,81 147,95	139,05 143,32	160,49 167,72
3	16,29	31,79 e 34,14 <i>J</i> <sub>PC</sub> =134,09 e 130,25 Hz	62,84 63,41	-	113,78 115,48	133,23 137,34	134,82 134,84	159,70 160,40	-	-	144,69 148,64	167,76 167,81
4	16,28	31,68 e 34,18 <i>J</i> <sub>PC</sub> =132,55 e 130,24 Hz	62,61 63,25	13,81 e 13,86 (CH <sub>3</sub> C)	108,31 108,35	115,30 116,14	134,41 138,30	155,71 155,71	-	-	147,25 147,30	NA
8	16,30	32,12 e 34,30 <i>J</i> <sub>PC</sub> =134,86 e 130,24 Hz	62,65 63,31	-	123,79 123,83	129,94 130,13	133,89 134,57	148,55 148,75	150,07 150,35	-	141,46 144,95	160,87 167,93
9	16,11 16,23	30,87 e 33,85 <i>J</i> <sub>PC</sub> =131,02 e 131,02 Hz	61,71 61,90	-	112,71 117,43	113,51 113,93	133,31 136,46	145,04 146,71	-	-	149,16 149,09	166,45
10	16,60	32,00 e 34,60 <i>J</i> <sub>PC</sub> =133,32 e 130,24 Hz	63,04 63,60	-	127,63 127,88	128,65 129,26	130,66 131,08	135,46 136,65	-	-	139,70 143,76	164,59 167,83
				<u>1</u> [s, 2C] <u>2</u> [s, 2C]	<u>3</u> [s, 2C]	<u>4</u> [s, 2C] <u>5</u> [s, 2C]	<u>6</u> [s, 2C]	<u>6</u> [s, 2C]	<u>7</u> [s, 2C] <u>9</u> [s, 2C]	<u>10</u> [s, 2C] <u>11</u> [s, 2C]	N=CH [s, 2C]	C=O [d, 2C]
11 <sup>**</sup>	16,21	31,03 e 32,10 <i>J</i> <sub>PC</sub> =132,61 e 133,52 Hz	63,36 66,94	112,15 112,52 114,84 115,16	122,70 124,87	126,50 126,74 127,50 128,41	129,98 130,31	131,79 134,43	138,39 149,38	152,01 152,11 160,40 160,64	139,79 143,41	167,87 168,12

<sup>\*\*</sup>Resultados obtidos com CDCl<sub>3</sub> como solvente. NA indica que o referido sinal não aparece no espectro.



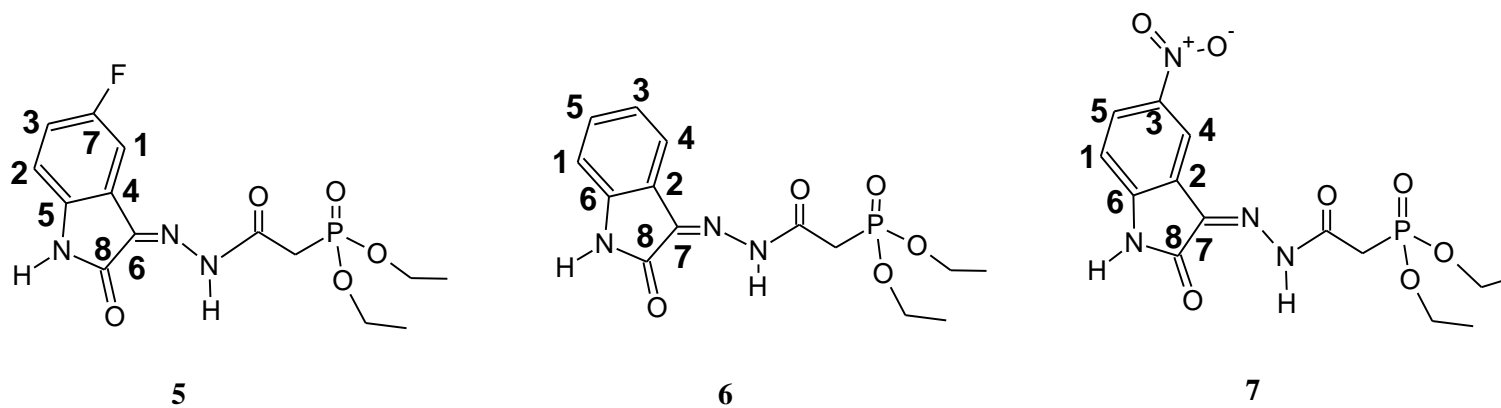
**Figura 27** - Compostos descritos na Tabela 12 e suas assinalações.

**Tabela 13** - Dados de  $\delta$  (ppm) de RMN  $^1\text{H}$  dos compostos sintetizados a partir da reação do intermediário III e isatinas.



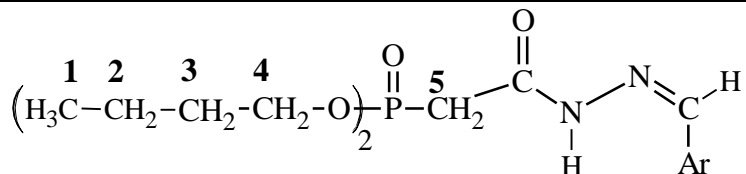
	CH <sub>3</sub> (1) [d, 2C]	CH <sub>2</sub> (3) [d, 2C]	CH <sub>2</sub> (2) [d, 2C]	H Aromáticos								C=O [d, 2C]
				1 [s, 2C]	2 [s, 2C]	3 [s, 2C]	4 [s, 2C]	5 [s, 2C]	6 [s, 2C]	7 [s, 2C]	8 [s, 2C]	
5	16,35	31,33 <i>J</i> <sub>PC</sub> =133,36 Hz	63,11 63,46	107,98 108,23	112,01 112,08	117,88 118,12	120,95 121,04	134,08 134,11	137,78 137,80	157,87 158,01	160,27	162,33 167,67
6	16,35	31,29 e 35,35 <i>J</i> <sub>PC</sub> =135,52 e 131,70 Hz	63,13 63,48	107,93 108,13	112,02 112,09	117,88 118,07	120,69 120,96	134,20 134,22	137,91 137,93	158,06 159,98	162,38	167,5916 7,64
7*	16,21	30,43 e 34,33 <i>J</i> <sub>PC</sub> =131,02 e 127,93Hz	62,1665, 65	110,10 111,51	112,23 116,01	120,51 120,78	123,16 126,55	132,79 135,46	142,13 142,86	143,60 147,70	162,45	162,82 167,92

\*Resultados obtidos com DMSO como solvente, os demais resultados foram obtidos em CDCl<sub>3</sub>.



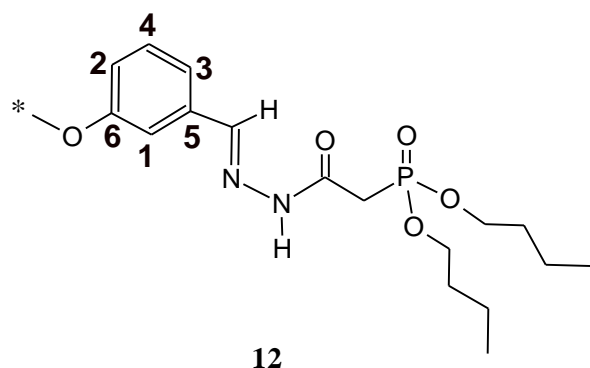
**Figura 28** - Compostos descritos na Tabela 13 e suas assinalações.

**Tabela 14** - Dados de  $\delta$  (ppm) de RMN  $^{13}\text{C}$  dos compostos sintetizados a partir da reação do intermediário IV com aldeídos e a nitroisatina.

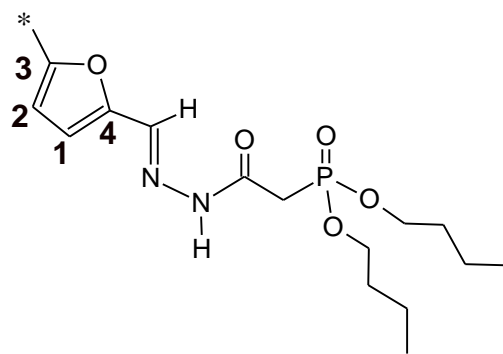


	CH <sub>3</sub> (1) [d, 2C]	CH <sub>2</sub> (5) [d, 2C]	CH <sub>2</sub> (2) [d, 2C]	CH <sub>2</sub> (3) [d, 2C]	CH <sub>2</sub> (4) [d, 2C]	* [s, 2C]	H Aromáticos						N=CH [s, 2C]	C=O [d, 2C]
							<u>1</u> [s, 2C]	<u>2</u> [s, 2C]	<u>3</u> [s, 2C]	<u>4</u> [s, 2C]	<u>5</u> [s, 2C]	<u>6</u> [s, 2C]		
12	13,87	31,72 $J_{\text{PC}}=128,70$ Hz	18,61	32,28 32,34	65,57 65,78	55,54 55,60	111,65 111,90	116,15 116,73	119,91 120,43	130,30 130,34	135,94 134,84	159,84 159,93	143,32 146,80	167,01 167,06
13	13,45	30,72 e 33,68 $J_{\text{PC}}=131,01$ e 131,79 Hz	18,20	31,88 31,94	65,21 65,39	31,88 31,91	108,531 08,58	115,21 115,64	147,31 147,63	154,36 154,63	-	-	133,34 136,24	160,38 166,28
14	13,40	30,85 e 33,66 $J_{\text{PC}}=130,$ 79 e 132,62 Hz	18,16	31,87 31,92	65,23 65,42	-	112,09 112,17	113,39 113,76	144,96 145,24	149,15 149,20	-	-	133,23 136,40	160,49 166,42
15	13,44	30,72 e 33,70 $J_{\text{PC}}=131,01$ e 131,78 Hz	18,19	31,88 31,93	65,19 65,37	-	127,85 127,90	128,44 129,02	138,27 141,69	138,76 138,81	-	-	130,49 131,17	166,14 166,19
17	13,41	30,79 e 33,72 $J_{\text{PC}}=130,79$ e 131,70 Hz	18,16	31,88 31,93	65,19 65,37	-	112,10 113,43	133,22 136,38	149,12 149,18	160,47 160,52	-	-	144,97 145,25	166,36 166,41
	CH <sub>3</sub> (1) [d, 2C]	CH <sub>2</sub> (5) [d, 2C]	CH <sub>2</sub> (2) [d, 2C]	CH <sub>2</sub> (3) [d, 2C]	CH <sub>2</sub> (4) [d, 2C]	H Aromáticos								C=O [d, 2C]
<u>1</u> [s, 2C]						<u>2</u> [s, 2C]	<u>3</u> [s, 2C]	<u>4</u> [s, 2C]	<u>5</u> [s, 2C]	<u>6</u> [s, 2C]	<u>7</u> [s, 2C]	<u>8</u> [s, 2C]		
16	13,39	30,30 $J_{\text{PC}}=131,01$ Hz	18,19	31,90	65,50 65,69	111,41 111,51	115,79 115,95	120,48	127,51	132,75	142,81	147,66	162,77	167,89

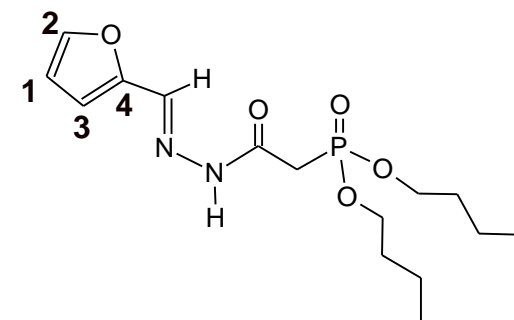
Resultados obtidos em DMSO como solvente. NA indica que o referido sinal não aparece no espectro. O composto 16 é composto derivado da reação com a nitroisatina.



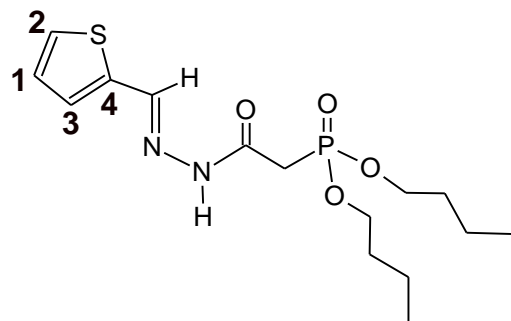
12



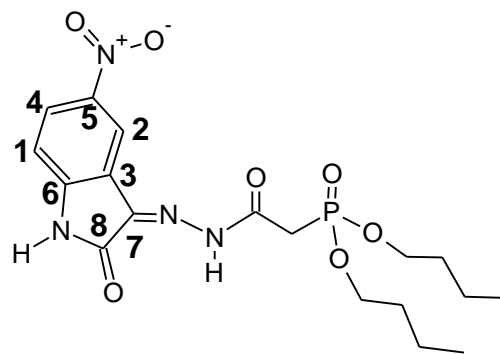
13



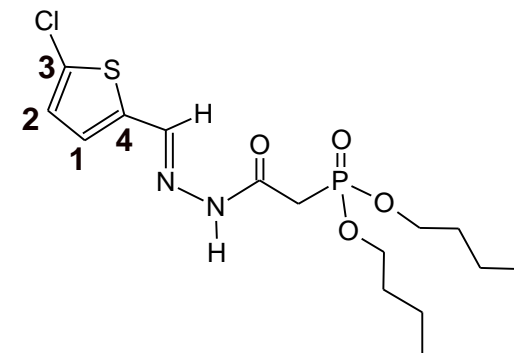
14



15



16



17

**Figura 29** - Compostos descritos na Tabela 14 e suas assinalações.



Segundo o observado por DA MATTA *et al.*, (2015), no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  das dialquifosforilhidrazonas, o sinal que caracteriza estes compostos estão relacionados ao carbono imínico, (-NHN=CH-Ar), que tem uma mudança química na faixa de 136 a 145 ppm. O mesmo ocorre com as dialquifosfonilacilhidrazonas cujo  $\delta$  varia de 130,49 a 149,16 ppm.

Segundo trabalhos realizados por CUNHA *et al.*, (2003), a atribuição da configuração (*E*) à ligação dupla de hidrazona de seus compostos foi realizada pela comparação de  $\delta$  com dados anteriores obtidos pelo grupo do seu laboratório. O próton hidrazônico -CH=N no isômero (*E*) ocorre a 8,25-8,71 ppm e o átomo de carbono imínico aparece a 145,2-150,7 ppm nos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$ , condizente com os valores obtidos em nosso trabalho.

#### 4.3.1.4. Análise por espectrometria de RMN $^{31}\text{P}$ e RMN $^{31}\text{P}_{\text{CPD}}$

Os espectros de RMN  $^{31}\text{P}$  e RMN  $^{31}\text{P}_{\text{CPD}}$  dos compostos foram analisados e como esperado, apresentaram dois sinais na região de 19,95 a 22,40 ppm o que confirma a coexistência dos diastereoisômeros (*E/Z*), já observados através dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$ . Na Tabela 15 estão descritos os sinais obtidos para cada composto.

**Tabela 15** -  $\delta$  (ppm) em  $\text{CDCl}_3$ .

Compostos	RMN $^{31}\text{P}$ (m/m) (acoplado)	RMN $^{31}\text{P}_{\text{CPD}}$ (s/s) (desacoplado)
1	21,20 e 22,40	21,20 e 22,40
2	21,23 e 22,33	21,23 e 22,33
3	20,98 e 22,09	20,98 e 22,09
4	21,24 e 22,29	16,47 e 17,56*
5	19,95 e 20,10	19,94 e 20,08
6	20,08 e 20,19	20,04 e 20,19
7	20,20 e 20,58	20,20 e 20,58
8	21,15 e 22,09	21,13 e 22,09
9	21,49 e 21,80	21,49 e 21,80
10	21,15 e 22,35	21,16 e 22,35
11	21,27 e 22,12	21,26 e 22,12
12	21,57 e 21,92	21,57 e 21,92
13*	21,63 e 21,91	21,63 e 21,91
14	21,48 e 21,80	-
15*	21,49 e 21,87	21,49 e 21,87
16*	20,66 e 20,17	20,66 e 20,17
17*	20,51 e 21,28	20,49 e 21,26

\*Resultados obtidos com DMSO como solvente, os demais resultados foram obtidos em  $\text{CDCl}_3$ .

Na Tabela 16 pode-se observar a proporção dos diastereoisômeros na mistura obtidas através dos resultados dos espectros de RMN  $^1\text{H}$ .

**Tabela 16** - Proporção dos diastereoisômeros na mistura.

Compostos	Mistura Diastereisomérica	Compostos	Mistura Diastereisomérica
1	1:0,6	10	1:0,5
2	1:0,6	11	1:0,3
3	1:0,3	12	1:0,6
4	1: 0,5	13	1:0,75
5	1:0,4	14	1:0,7
6	1:0,4	15	1:0,9
7	1:0,6	16	1:0,4
8	1:0,8	17	1:0,4
9	1:0,7	-	-

## 4.3.1.5. Análise por espectrometria de massas

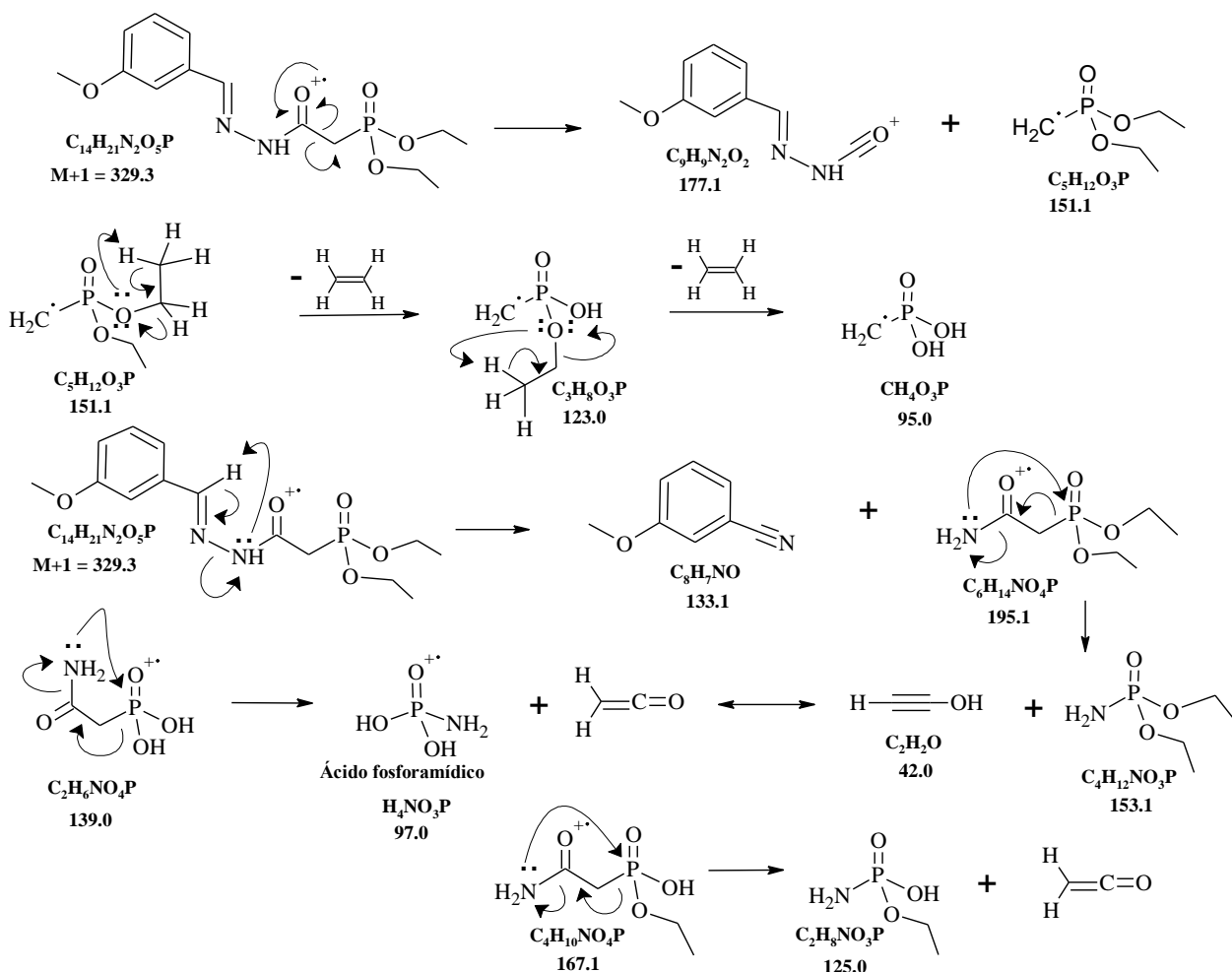
Na Tabela 17 estão os dados referentes a fragmentos dos composto sintetizados.

**Tabela 17** - Dados de massas dos compostos sintetizados. MM (massa molecular).

Compostos	MM	m/z (%)
1	328	329 (3), 195 (14), 177 (50), 151 (64), 125 (92), 123 (100), 109 (52), 97 (46), 81 (31), 59 (35).
2	342	343 (4), 195 (32), 168 (50), 164 (50), 151 (77), 125 (100), 97 (50), 81 (38), 59 (39).
3	367	169 (35), 151 (33), 141 (15), 123 (100), 105 (29), 97 (64), 81 (49), 65 (35).
4	302	303 (5), 302 (22), 168 (22), 151 (31), 125 (38), 124 (100), 123 (45), 109 (37), 97 (20), 81 (26), 59 (13).
5	357	357 (5), 329 (18), 281 (11), 207 (17), 179 (37), 152 (86), 151 (40), 123 (100), 81 (55), 65 (17).
6	339	329 (18), 281 (9), 207 (14), 205 (17), 179 (37), 152 (85), 123 (100), 81 (53), 65 (17).
7	384	*
8	299	300 (1), 179 (<1), 152 (12), 120 (100), 109 (22), 92 (59), 65 (12).
9	288	289 (<1), 195 (13), 179 (14), 151 (45), 152 (25), 123 (68), 110 (100), 81 (36), 59 (14).
10	304	305 (4), 195 (30), 151 (77), 123 (100), 109 (72), 81 (47), 59 (31).
11	432	433 (1), 254 (100), 237 (53), 168 (42), 151 (57), 109 (37), 79 (19).
12	384	385 (1), 255 (13), 196 (14), 177 (33), 140 (88), 123 (100), 97 (86), 57 (21).
13	358	359 (6), 196 (11), 153 (14), 140 (72), 124 (100), 97 (52), 41 (23).
14	344	345 (2), 196 (14), 153 (17), 140 (70), 123 (94), 110 (100), 97 (55), 57 (21).
15	360	361 (2), 196 (23), 153 (24), 140 (91), 123 (100), 97 (77), 57 (23).
16	440	*
17	395	395 (1), 196 (20), 160 (38), 140 (84), 123 (100), 97 (62), 57 (22).

\*Não teve resultado no espectro de massas.

No Esquema 18 é descrito a provável fragmentação do composto 1 que foi eleito como modelo para as outras fragmentações, por se tratarem de moléculas similares, obviamente, considerando os fragmentos característicos de cada molécula sintetizada.

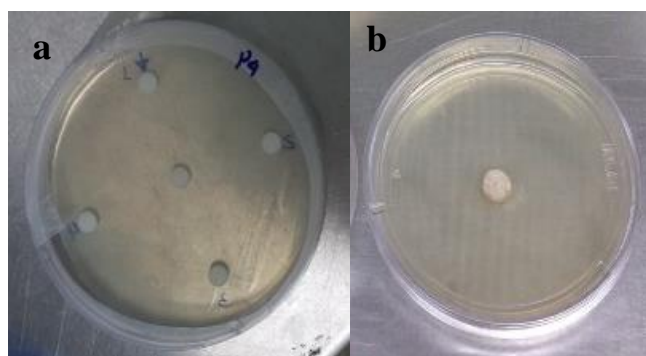


**Esquema 18** - Provável fragmentação do composto 1.

A formação do fragmento de massa  $m/z = 97$  está presente na maioria dos compostos sintetizados e refere-se a formação do ácido fosforoamídico decorrente de três rearranjos análogos ao de McLafferty (NOGUEIRA, 2007).

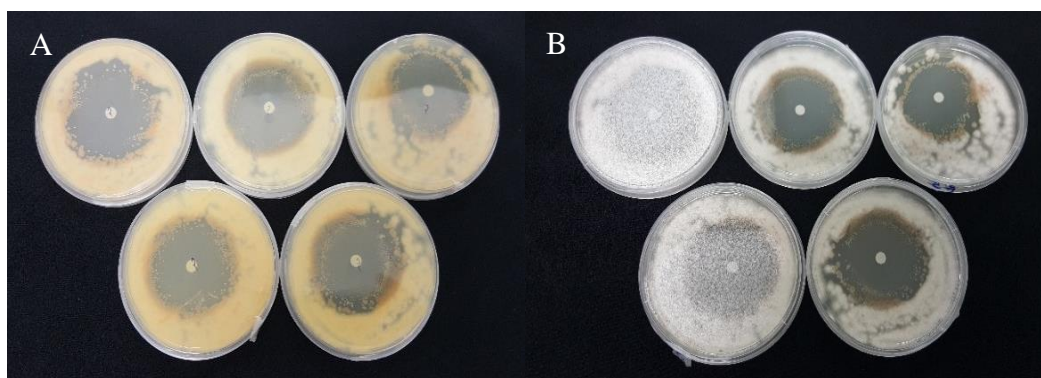
#### 4.6 Ensaio biológico com fungos

O teste de disco-difusão em ágar fornece resultados qualitativos. O seu princípio básico é a difusão do antimicrobiano na superfície do ágar, a partir de um disco impregnado com o mesmo antimicrobiano (Figura 30).



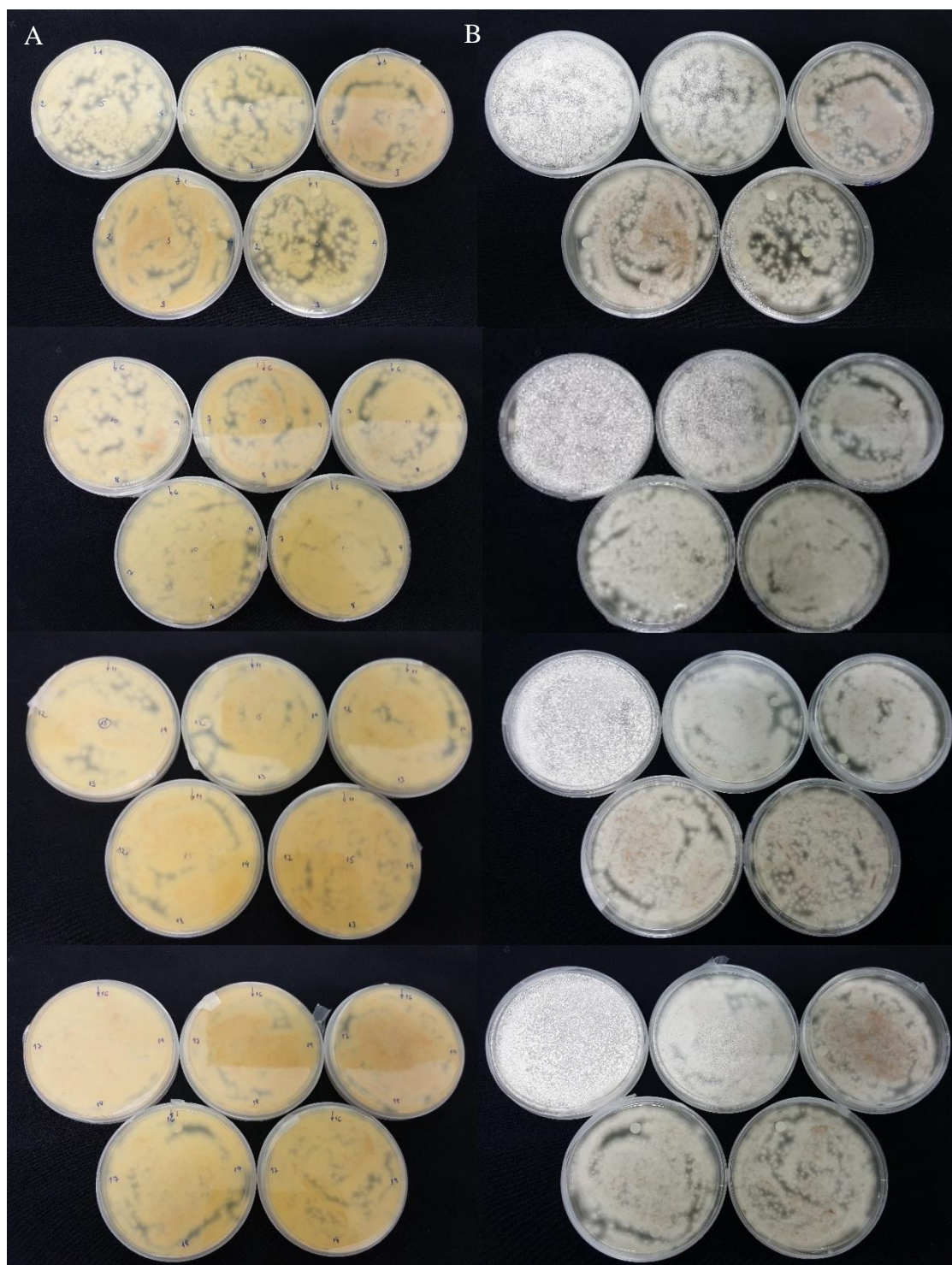
**Figura 30** - Teste de disco: difusão em meio sólido (BDA), a) para *Alternaria* sp. e *Penicillium* sp., b) para os demais fungos.

Após o período de incubação, com exceção do controle positivo, contendo  $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de procloraz, nenhum tratamento formou halo de inibição, indicando que nem o solvente interferiu no crescimento fúngico tão pouco nenhum dos produtos sintetizados, Figura 31.



**Figura 31** - Halo de inibição formado pelo controle positivo após o crescimento fúngico durante 3 dias a  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  de *Penicillium* sp.. Fundo (A) e frente (B) da placa, respectivamente.

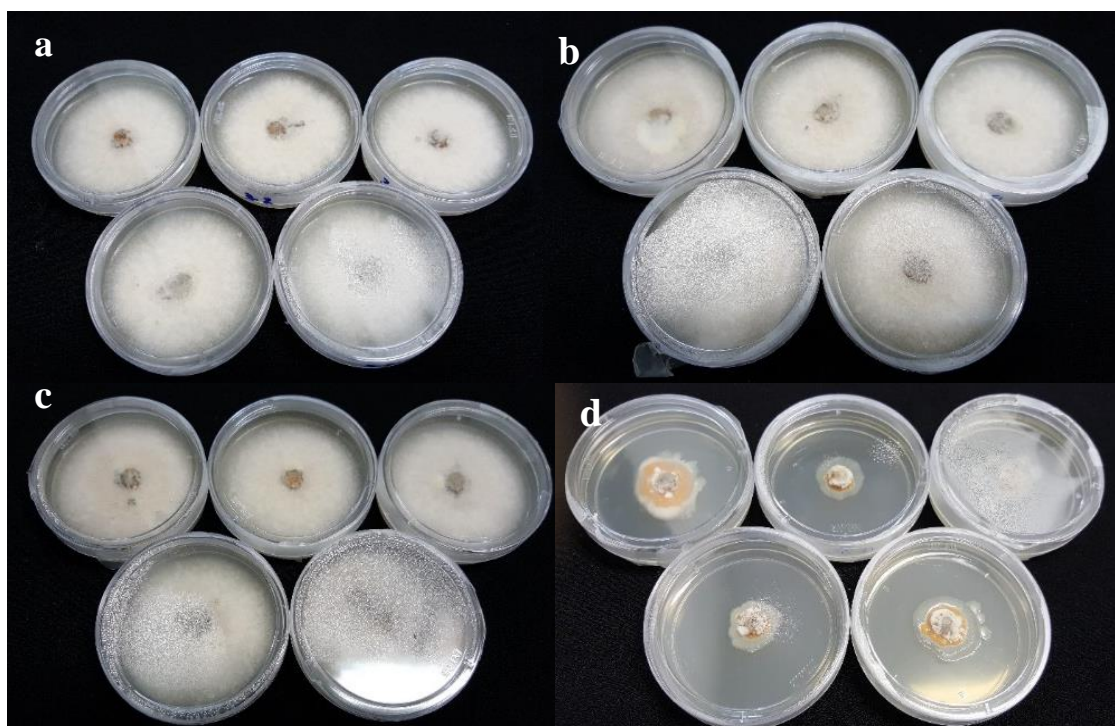
Os fungos cresceram por toda a placa como pode-se observar nas Figura 32. O mesmo comportamento foi observado com o fungo *Alternaria* sp..



**Figura 32** - Tratamentos testados sem formação do halo de inibição após o crescimento fúngico durante 3 dias a  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  do fungo *Penicillium* sp.. Fundo (A) e frente (B) da placa, respectivamente.

O ensaio com o *Penicillium* sp. foi repetido, utilizando-se placas de 49x12mm, contendo somente um disco com unidade propagativa do fungo para verificar o crescimento fúngico. Nota-se que somente o controle positivo inibiu o crescimento fúngico, Figura 33.





**Figura 33** - Repetição do ensaio com fungo *Penicillium* sp. com um tratamento por placa onde observa-se a não formação do halo de inibição após 3 dias a  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . a) Tratamento 3; b) tratamento 11; c) tratamento Branco e d) Tratamento controle positivo.

Os ensaios realizados com os fungos *Pilidium* sp. e *Colletrotrichum gloeosporioides* apresentaram os mesmos resultados, indicando que nenhum dos compostos sintetizados apresentou efeito fungicida nos fungos testados.

NAGARAJU *et al.*, 2012 relataram que o fungicida OF tolclofos-metil é eficaz no controle de doenças fúngicas transmitidas pelo solo causadas pela infecção de fungos *basidiomicetos*, enquanto o Edifenfos tem ação seletiva contra a brusone em arroz, ambos com o enxofre em suas estruturas, sendo o primeiro um tiosforado. A ação dos mesmos é conferida por atuarem na biossíntese de fosfolipídios, o que prejudica a síntese da membrana celular e leva tanto à inibição da germinação de esporos quanto ao crescimento do micélio fúngico. Assim, aparentemente, nenhum dos compostos testados, nem aqueles que possuem átomo de enxofre em sua estrutura, pareceu afetar a biossíntese de fosfolipídios.

ADELOWO (2012) descreveu que tal como muitos fungicidas OFs, os fosfonatos sintetizados em seu trabalho que apresentaram atividade fungicida provavelmente interferiram na síntese de quitina da membrana celular do fungo. A interferência foi possível pela natureza polar do grupo  $\text{P}=\text{O}$  dos fosfonatos, facilitando a passagem dos fosfonatos através da membrana celular do fungo.

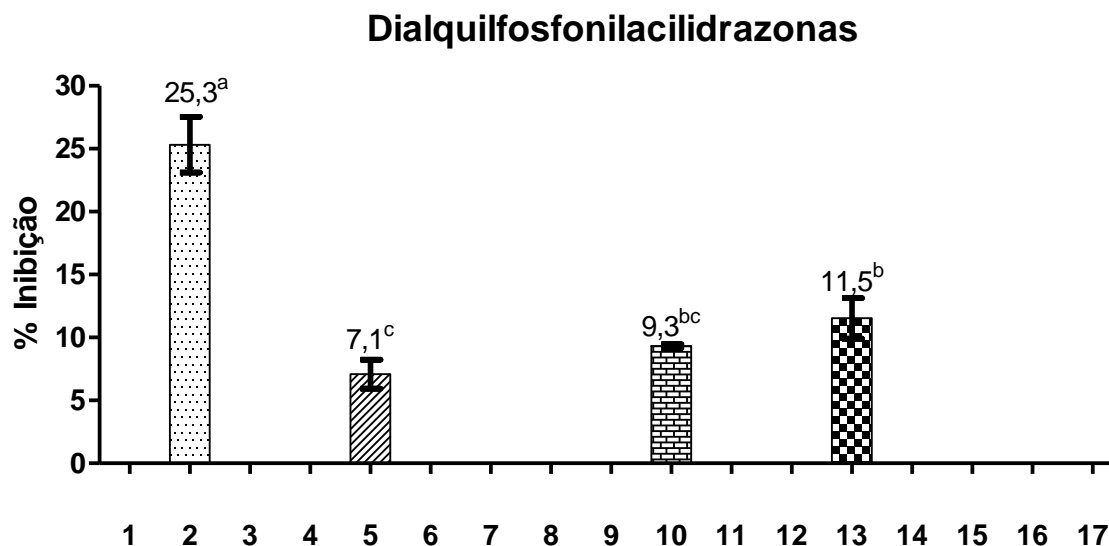
MOURÃO *et al.* (2003) no entanto enfatizam que um produto pode não inibir o crescimento fúngico por conta de alguns fatores como: i) desenvolvimento de via metabólica alternativa que evite alguma reação normalmente inibida pelo pesticida; ii) produção de uma enzima alterada para funcionar em benefício da célula, mas não sendo afetada pelo pesticida; iii) síntese de uma enzima, em excesso, ultrapassando a quantidade que pode ser inativada pelo antimicrobiano; iv) dificuldade do defensivo agrícola em penetrar na célula, por alguma alteração da membrana citoplasmática e v) à modificação estrutural das nucleoproteínas ribossômicas.

ZAMPIROLI *et al.* (2014) realizaram um trabalho onde alguns dos seus compostos, todos derivados de isatina, apresentaram alta potencial fungicida em *Rhizoctonia solani* e *Fusarium oxysporum*. Um deles, possui estrutura semelhante ao composto 6 e 16, também derivados da isatina. No entanto, os compostos sintetizados por ZAMPIROLI *et al.* (2014) são dialquilfosforilidrazonas (presença da ligação (P-N), enquanto os realizados neste trabalho são dialquilfosfonilacilidrazonas, ou seja, há presença de uma carboxila, tendo então a formação de uma ligação (P-C).

Assim acredita-se que, aparentemente, a presença do grupo acila interferiu negativamente na atividade fungicida uma vez que as dialquilfosforilidrazonas sintetizadas por BARBOZA (2010) apresentavam estruturas que se assemelham aos sintetizados no presente trabalho e quase todas apresentaram potencial atividade fungicida em maior ou menor porcentagem. No entanto, os compostos aqui relatados não apresentaram qualquer atividade nos fungos testados.

### 4.3 Ensaio em melanoma

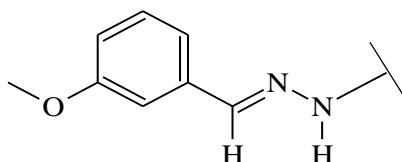
Inicialmente, foi realizado um screening dos compostos sintetizados na concentração de 0,1mM a fim de avaliar se algum deles apresentava atividade anticarcinogênica em tumor de melanoma. Os resultados de inibição das células de melanoma estão descritos na Figura 34. Dentre as amostras, os compostos 2 e 13 se apresentaram como os melhores resultados dentre os demais, no entanto com baixa inibição. De acordo com CONGIU & ONNIS (2013), os derivados de hidrazona têm sido intensamente investigados como alvo para desenvolvimento de fármacos e as acilidrazonas foram exploradas em vários campos de pesquisa devido às suas características farmacológicas abrangentes, inclusive várias acilidrazonas foram testadas quanto à atividade antitumoral. Contudo as moléculas sintetizadas neste trabalho apresentaram baixa atividade ou nenhuma.



**Figura 34** - Gráfico com as % de inibição do melanoma com os respectivos desvios padrão dos compostos sintetizados. \*Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si a 95% de probabilidade, pelo teste de LSD.

YADAGIRI *et al.*, (2014) relataram que o grupo funcional hidrazida-hidrazona (-CO-NH-N=CH) exibe atividades farmacológicas significativas, dentre elas, anti-tumoral. Em seu

trabalho foi realizado ensaio biológico em 4 diferentes células de câncer humano: cervical, pancreático, mama e neuroblastoma (HeLa, MIA PaCa, MDA-MB-231 e IMR32). Dos compostos testados, alguns exibiram uma potente atividade antiproliferativa com valores de GI50 inferiores a 0,01  $\mu$ M em linhas celulares de câncer humano MIA PaCa, MDA-MB-231 e IMR32, dentre eles, o composto nomeado 5b cuja porção hidrazona é a mesma do composto 1 e 12 do presente trabalho, Figura 35. No entanto, os compostos 1 e 12 não apresentaram atividade em melanoma.

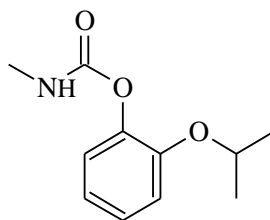


**Figura 35** - Estrutura comum aos compostos 1 e 12 do presente trabalho e do composto 5b de YADAGIRI *et al.* (2014).

BOUHADIR *et al.* (2016) relatam em seu trabalho que derivados de acilidrazonas são conhecidas por sua atividade antitumoral, dentre outras atividades biológicas. Ainda, CONGIU & ONNIS, (2013) relataram que várias acilidrazonas tem sido testadas quanto à atividade antitumoral.

#### 4.4 Ensaio biológico com Acetilcolinesterase

Assim como os OFs, os carbamatos (ésteres do ácido carbâmico) são os mais importantes inibidores da AChE e por isso são conhecidos como inibidores seletivos da atividade da AChE e chamados de agentes anticolinesterase. Então, como padrão de inibição da enzima AChE utilizou-se o Propoxur (Baygon) (2-isopropoxifenil metilcarbamato), um inseticida da classe dos carbamatos introduzido em 1959, Figura 36.



**Figura 36** - Estrutura química do inseticida carbamato Propoxur.

A amostra Propoxur foi o controle positivo, ou seja, composto utilizado como inibidor da enzima AChE. O Propoxur teve uma inibição da enzima de 90,74%, Tabela 18. O mecanismo de inibição da AChE por carbamatos ocorre por meio da formação de um complexo enzima-inibidor (reversível) e posterior carbamilação. A presença destes compostos impede a enzima de hidrolisar a ACh, que em excesso, causa uma síndrome colinérgica. O envenenamento por carbamato se manifesta por uma crise colinérgica clinicamente indistinguível do envenenamento por OFs (AKINER, 2014; GUILOSKI *et al.*, 2010).



**Tabela 18** - % de inibição da enzima AChE pelos compostos sintetizados.

Amostra	Inibição enzimática %
Controle	0,0 <sup>i</sup>
Propoxur	91,3 <sup>b</sup>
1	53,5 <sup>b</sup>
2	0,0 <sup>i</sup>
3	0,0 <sup>i</sup>
4	7,5 <sup>h</sup>
5	45,6 <sup>c</sup>
6	34,5 <sup>f</sup>
7	0,0 <sup>i</sup>
8	0,0 <sup>i</sup>
9	96,3 <sup>a</sup>
10	8,6 <sup>h</sup>
11	80,8 <sup>c</sup>
12	91,1 <sup>b</sup>
13	92,3 <sup>ab</sup>
14	35,3 <sup>f</sup>
15	36,7 <sup>f</sup>
16	0,0 <sup>i</sup>
17	20,1 <sup>g</sup>
Branco	0,0 <sup>i</sup>

\*Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si a 95% de probabilidade, pelo teste de LSD.

Os compostos 2, 3, 7, 8 e 16 não inibiram a enzima. Os compostos 7 e 16 se diferenciam em sua estrutura somente pelo radical alquila, sendo o etil no composto 7 e butil no composto 16, inferindo que o radical, neste caso, não influi na inibição, mesmo tendo observado que dentre os compostos que não inibiram a AChE, somente um, composto 16, possui o radical butil em sua estrutura.

Segundo descrito no trabalho conduzido por BARBOZA (2010), o processo de inibição da AChE depende muito da estrutura química do OF inibidor. Levando em consideração que a interação entre a AChE e inibidor OF envolve somente o sítio esterásico formando um complexo bastante estável, essa estabilidade está fundamentalmente relacionada com a estrutura química do OF.

Observou-se que os compostos 9 e 10, ambos com radical etil e diferença na sua estrutura devido a presença de um átomo de O ou de S, advindo do aldeído utilizado na síntese, tiveram grande diferença na inibição da enzima. O composto 9, com oxigênio na estrutura, inibiu fortemente a AChE, sendo inclusive o composto 9, o composto com maior porcentagem de inibição enquanto o composto 10 teve 8,6% de inibição. O mesmo não foi observado quanto ao radical butil, onde os compostos 14 e 15, mantem a mesma diferença entre si, em relação aos aldeídos utilizados mas que inibiram a enzima na mesma porcentagem.

Ainda, verificou-se também que compostos sintetizados a partir do mesmo aldeído mas com radicais alquilas diferentes, como é o caso dos compostos 1 e 12, ambos oriundos do *m*-anisalaldeído e dos compostos 4 e 13, oriundos do 5-metilfurfural, tiveram resultados distintos. Enquanto a variação nos compostos 1 e 12 foi de aproximadamente 53% para 90%, respectivamente, uma diferença mais marcante é vista entre os compostos 4 e 13 que variaram

de 8 a 91 % de inibição enzimática, o que demonstra uma falta de relação entre os aldeídos e grupos alquilas utilizadas.

Ainda, pode-se observar, que compostos como 15 e 17, cuja diferença encontra-se na presença de um átomo de cloro na estrutura do composto 17, a inibição foi levemente menor no composto clorado.

Os compostos 9 e 13 inibiram a enzima em porcentagens superiores ao padrão Propuxur, enquanto os compostos 11 e 12 apresentaram porcentagens de inibição próximas ao do Padrão. GUILOSKI *et al.* (2010) relata que a dinâmica da interação da AChE e os OFs e carbamatos depende da afinidade do composto pela enzima.

Segundo AKINER (2014) estudos bioquímicos revelaram que a AChE insensível (iAChE), que tem como alvo o local de inseticidas OFs e carbamatos, tem gerado a resistência a inseticidas em muitas espécies de mosquitos. Foram detectadas formas de iAChE em espécies de mosquitos, tais como *Aedes albopictus*, *Anopheles gambiae*, *An. Sacharovi* e *Culex pipiens*, em muitas áreas.

De acordo com PETRONILHO *et al.* (2011), a inibição da AChE humana tem várias importantes aplicações em tratamentos médicos, especialmente na doença de Alzheimer (AD), uma doença que causa a diminuição da atividade dos neurônios colinérgicos, problema que pode ser tratado aumentando a quantidade do neurotransmissor ACh, sendo que a melhor maneira de aumentar a concentração de ACh é pela inibição da AChE.

ISLAM *et al.*, (2018) descreveram que estudos clínicos de longo prazo apontam que os fármacos inibidores da AChE reduzem igualmente o declínio cognitivo, funcional e comportamental na AD e os benefícios são mantidos com o tratamento e dependentes da dose. Os inibidores AChE de uso comum aprovados para uso clínico incluem donepezil, galantamina, tacrina e rivastigmina. No entanto, esses inibidores têm vários efeitos colaterais que vão desde perda de apetite, vômitos, diarreia, azia, dor de cabeça, entre outros. Devido à segurança, eficácia e toxicidade, é necessário desenvolver novos inibidores da AChE.

## 5. CONCLUSÃO

1. No presente trabalho foram sintetizadas, com sucesso, 17 dialquifosfonilacilidrazonas, todas caracterizadas pelas técnicas de RMN de  $H^1$  e  $C^{13}$  e  $P^{31}$ , infravermelho (IV) e espectroscopia de massas (EM);

2. Os compostos obtidos são misturas diastereoisoméricas, com predominância pelo diastereoisômero *E*.

3. Nenhum dos compostos sintetizados exibiu atividade fungicida nos fungos pós-colheita testados: *Pilidium* sp., *Alternaria* sp., *Penicilium* sp. e *Colletotrichum gloeosporioides*;

4. Observou-se que somente os compostos 2, 13 e 10 possuem atividade carcinogênica em melanoma. Entretanto, esta atividade pode ser considerada como pouco pronunciada;

5. Em relação a toxicidade desses compostos a enzima AChE verificou-se que os OFs 2, 3, 7, 8 e 16 não inibiram a enzima, não apresentando então, atividade anticolinesterásica. No entanto, os demais compostos são inibidores da enzima em porcentagens variáveis, desde as baixas inibições até as inibições fortes, onde o composto 9 inclusive inibiu mais do que o padrão utilizado, propoxur. Com estes resultados, estudos que conduzam a utilização dessa molécula como potencial fármaco para doença de Alzheimer pode ser alvo de nova linha de pesquisa;

6. O composto 2 não inibiu a atividade enzimática e foi o composto com maior atividade em células tumorais de melanoma.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIFINA. **Defensivos Agrícolas.** Disponível em: <<http://www.abifina.org.br/segmentos.php?sc=3&ssc=4>>. Acesso em: 15 nov. 2017.
- ADELOWO, F. E. Synthesis , Characterization and Fungicidal Activity of Some Dialkyl Alkylphosphonates and Dialkyl Phenylphosphonates. *Ijrras*, v. 12, n. July, p. 107–114, **2012**.
- AKINER, M. M. Malathion and Propoxur Resistance in Turkish Populations of the *Anopheles maculipennis* Meigen (Diptera: Culicidae) and Relation to the Insensitive Acetylcholinesterase. *Turkiye Parazitol Derg*, v. 38, p. 111–115, **2014**.
- ANBAZHAGAN, R.; SANKARAN, K. R. Design, synthesis, computational calculation and biological evaluation of some novel 2-thiazolyl hydrazones. *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy*, v. 135, p. 984–93, 25 jan. **2015**.
- ANDREASSEN, S., ZALOUNINA, A., PAUL, M., SANDEN, L., & LEIBOVICI, L. Interpretative reading of the antibiogram--a semi-naïve Bayesian approach. *Artificial intelligence in medicine*, v. 65, n. 3, p. 209–17, dez. **2015**.
- ANVISA. **Agrotóxicos.** Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 15 nov. 2017.
- ARAÚJO, C. B. DE, MAIA, P. C. G. G. S., TRIGUEIRO, G. P., SIQUEIRA, N. N. DE, & SOUSA, M. N. A. DE. Conhecimentos, atitudes e práticas acerca da detecção do câncer de próstata. *Revista Saúde Pública Santa Catarina*, v. 23, n. 1, p. 88–93, **2010**.
- ASHLEY, K.; CORDELL, D.; MAVINIC, D. A brief history of phosphorus: from the philosopher's stone to nutrient recovery and reuse. *Chemosphere*, v. 84, n. 6, p. 737–46, ago. **2011**.
- ATHERTON, F. R.; OPENSHAW, H. T.; TODD, A. R. Studies on phosphorylation. Part II. The reaction of dialkyl phosphites with polyhalogen compounds in presence of bases. A new method for the phosphorylation of amines. *Journal of the Chemical Society*, p. 660–663, **1945**.
- AYOUBI, N.; SOLEIMANI, M. J.; ZARE, R. *Pilidium Concavum* , causing tan-brown rot on strawberry in Iran. *Journal of Plant Pathology*, v. 98, n. 3, p. 667–669, **2016**.
- BARBOZA, H. T. G., SOARES, A. G., ZAMPIROLI, L. S., NOGUEIRA, A. J. M., & DACOSTA, J. B. N. **Síntese e Caracterização de Novas fosforilidrazonas com potencial atividade fungicida** *Sociedade Brasileira de Química (SBQ)*, **2004**.
- BARBOZA, H. T. G. Síntese de novas fosforilidrazonas heterocíclicas para controle de patógenos pós-colheita de mamão (*Carica papaya* L.). [s.l.] Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, **2010**.
- BONETT, L. P., ALMEIDA, M., AQUINO, T. F. DE, & BERNARDI-WENZEL, J. Caracterização morfofocultural e infecção cruzada de *Colletotrichum gloeosporioides* agente causal da antracnose de frutos e hortalças em pós-colheita. *Ambiência*, v. 6, n. 3, p. 451–463, **2010**.
- BORTOLOZO, F. R., AGUIAR, T. R., HANSEL, F. A., ROSA FILHO, E. F., PARRON, L. V., & FROEHNER, S. Peatland as a natural sink for pesticides from no-till systems in subtropical climate. *Agricultural Water Management*, v. 163, p. 19–27, jan. **2016**.
- BOUHADIR, K. H., KOUBEISSI, A., MOHSEN, F. A., EL-HARAKEH, M. D., CHEAIB, R., YOUNES, J., AZZI, G. & EID, A. A. Novel carbocyclic nucleoside analogs suppress

glomerular mesangial cells proliferation and matrix protein accumulation through ROS-dependent mechanism in the diabetic milieu. II. Acylhydrazone-functionalized pyrimidines. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, v. 26, n. 3, p. 1020–4, 1 fev. **2016**.

BRAGANÇA, C. A. D., DAMM, U., BARONCELLI, R., MASSOLA JÚNIOR, N. S., & CROUS, P. W. Species of the *Colletotrichum acutatum* complex associated with anthracnose diseases of fruit in Brazil. *Fungal Biology*, v. 120, n. 4, p. 547–561, **2016**.

BRISTOW, I.; BOWER, C. Melanoma of the Foot. *Clinics in podiatric medicine and surgery*, v. 33, n. 3, p. 409–22, jul. **2016**.

BROWN, P. R.; MCWILLIAM, A.; KHAMPHOUKEO, K. Post-harvest damage to stored grain by rodents in village environments in Laos. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 82, p. 104–109, **2013**.

BURGESON, J. R., GHARAIBEH, D. N., MOORE, A. L., LARSON, R. A., AMBERG, S. M., BOLKEN, T. C., HRUBY, D.E., DAI, D. Lead optimization of an acylhydrazone scaffold possessing antiviral activity against Lassa virus. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, v. 23, n. 21, p. 5840–3, 1 nov. **2013**.

CAMPAGNOLO, E.; SILVA, A. C. M. DA; BALBO, S. Obesidade Hipotalâmica: A Atividade Colinesterásica do Pâncreas. *Akrópolis - Revista de Ciências Humanas da UNIPAR*, v. 3, n. 10, p. 26–30, **1995**.

CARVALHO, S. A., FEITOSA, L. O., SOARES, M., COSTA, T. E. M. M., HENRIQUES, M. G., SALOMÃO, K., DE CASTRO, S.L., KAISER, M., BRUN, R., WARDELL, J.L., WARDELL, S.M.S.V., TROSSINI, G.H.G., ANDRICOPULO, A.D., DA SILVA, E.F., FRAGA, C.A.M. Design and synthesis of new (E)-cinnamic N-acylhydrazones as potent antitrypanosomal agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 54, p. 512–521, **2012**.

CASIDA, J. E.; QUISTAD, G. B. Serine hydrolase targets of organophosphorus toxicants. *Chemico-biological interactions*, v. 157–158, p. 277–83, 15 dez. **2005**.

CASTRO, J. C., ENDO, E. H., DE SOUZA, M. R., ZANQUETA, E. B., POLONIO, J. C., PAMPHILE, J. A., ... ABREU FILHO, B. A. DE. Bioactivity of essential oils in the control of *Alternaria alternata* in dragon fruit (*Hylocereus undatus* Haw.). *Industrial Crops and Products*, v. 97, p. 101–109, **2017**.

CERRILLO, J. L., PALOMARES, A. E., REY, F., VALENCIA, S., PALOU, L., & PÉREZ-GAGO, M. B. Ag-zeolites as fungicidal material: Control of citrus green mold caused by *Penicillium digitatum*. *Microporous and Mesoporous Materials*, v. In press, **2017**.

CHANG, X., ZHANG, H., LIAN, S., & ZHU, W. miR-137 suppresses tumor growth of malignant melanoma by targeting aurora kinase A. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 475, n. 3, p. 251–6, 1 jul. **2016**.

CHEN, W.; LIU, Y.; JIAO, B. Dissipation behavior of five organophosphorus pesticides in kumquat sample during honeyed kumquat candied fruit processing. *Food Control*, v. 66, p. 87–92, ago. **2016**.

COMIM, C.M., MORAZ, T., ABREU, I., FRAGA, D.B., GHEDIM, F. V., MILDNER, N., TUON, L., VAINZOF, M., ZUGNO, A.I., QUEVEDO, J. Reduction of acetylcholinesterase activity in the brain of mdx mice. *Neuromuscular Disorders*, v. 21, n. 5, p. 359–362, **2011**.

CONGIU, C.; ONNIS, V. Synthesis and biological evaluation of novel acylhydrazone derivatives as potential antitumor agents. *Bioorganic & medicinal chemistry*, v. 21, n. 21, p.

6592–9, 1 nov. **2013**.

CORDELL, D.; DRANGERT, J.-O.; WHITE, S. The story of phosphorus: Global food security and food for thought. *Global Environmental Change*, v. 19, n. 2, p. 292–305, maio **2009**.

COSTA, F. N., BRAZ, D., FERREIRA, F. F., DA SILVA, T. F., BARREIRO, E. J., LIMA, L. M., COLAÇO, M.V., KUPLICH, L. & BARROSO, R. C. Synchrotron X-ray powder diffraction data of LASSBio-1515: A new N-acylhydrazone derivative compound. *Radiation Physics and Chemistry*, v. 95, p. 292–295, fev. **2014**.

COSTA, L.F.R., DA SILVA, E.S., NORONHA, V.T., VAZ-MOREIRA, I., NUNES, O.C., ANDRADE, M.M. DE. Development of an automatic identification algorithm for antibiogram analysis. *Computers in biology and medicine*, v. 67, p. 104–15, 1 dez. **2015**.

COTTON, F. A.; WILKINSON, G. *Advanced Inorganic Chemistry*. 5th. ed. New York: Wiley, **1988**.

DA MATTA, C.B.B., DE QUEIROZ, A.C., SANTOS, M.S., ALEXANDRE-MOREIRA, M.S., GONÇALVES, V.T., DEL CISTIA, C. DE N., SANT'ANNA, C.M.R., DACOSTA, J.B.N. Novel dialkylphosphorylhydrazones: Synthesis, leishmanicidal evaluation and theoretical investigation of the proposed mechanism of action. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 101, p. 1–12, **2015**.

DUARTE, C.D., TRIBUTINO, J.L.M., LACERDA, D.I., MARTINS, M. V., ALEXANDRE-MOREIRA, M.S., DUTRA, F., BECHARA, E.J.H., DE-PAULA, F.S., GOULART, M.O.F., FERREIRA, J., CALIXTO, J.B., NUNES, M.P., BERTHO, A.L., MIRANDA, A.L.P., BARREIRO, E.J., FRAGA, C.A.M. Synthesis, pharmacological evaluation and electrochemical studies of novel 6-nitro-3,4-methylenedioxyphenyl-N-acylhydrazone derivatives: Discovery of LASSBio-881, a new ligand of cannabinoid receptors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 15, n. 6, p. 2421–2433, **2007**.

ECKERT, S., EYER, P., MÜCKTER, H., & WOREK, F. Kinetic analysis of the protection afforded by reversible inhibitors against irreversible inhibition of acetylcholinesterase by highly toxic organophosphorus compounds. *Biochemical Pharmacology*, v. 72, n. 3, p. 344–357, jul. **2006**.

EL-MOGY, M. M.; ALSANIUS, B. W. Cassia oil for controlling plant and human pathogens on fresh strawberries. *Food Control*, v. 28, n. 1, p. 157–162, **2012**.

ELLMAN, G.L., COURTNEY, K.D., VALENTINO ANDRES, J., FEATHERSTONE, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, v. 7, p. 88–95, **1961**.

EYER, P. The Role of Oximes in the Management of Organophosphorus Pesticide Poisoning. *Toxicological Reviews*, v. 22, n. 3, p. 165–190, **2003**.

FERNÁNDEZ, R., GASCH, C., LASSALETTA, J.-M., LLERA, J.-M., & VÁZQUEZ, J. Simple and efficient conversion of N,N-dimethylhydrazones and aldehydes to nitriles. *Tetrahedron Letters*, v. 34, n. 1, p. 141–144, jan. **1993**.

FILHO, E. L. B. Impactos Ambientais Ocasionados pelo Uso de Defensivos Agrícolas: a Escassez de Pesquisas no Programa Nacional de Pesquisa Agropecuária Brasileiro. *XLII Congresso da Sociedade Brasileira de Economia e Sociologia Rural*, p. 20, **2004**.

FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. Medicinal Chemistry of N-Acylhydrazones : New Lead-Compounds of Analgesic , Antiinflammatory and Antithrombotic Drugs. *Current Medicinal*

*Chemistry*, v. 13, p. 167–198, **2006**.

GIFFIN, N. A.; MASUDA, J. D. Reactivity of white phosphorus with compounds of the p-block. *Coordination Chemistry Reviews*, v. 255, n. 11–12, p. 1342–1359, jun. **2011**.

GOMATHI, G.; GOPALAKRISHNAN, R. A hydrazone Schiff base single crystal (E)-Methyl N'-(3,4,5-trimethoxybenzylidene) hydrazine carboxylate: Physicochemical, in vitro investigation of antimicrobial activities and molecular docking with DNA gyrase protein. *Materials Science and Engineering: C*, v. 64, p. 133–138, jul. **2016**.

GONÇALVES, V. T. Novas dialquilfosforilidrazonas: Síntese, Caracterização e Avaliação da Atividade Biológica. [s.l.] Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, **2009**.

GUILOSKI, I. C., SILVA, E. G. DA, NISHIKAWA, C. M., & SILVA DE ASSIS, H. C. DA. Atividade da colinesterase em cérebro e músculo de *Corydoras paleatus* (Pisces, Teleostei) expostos ao carbaril. *Revista Acadêmica, Ciências Agrárias e Ambientais*, v. 8, n. 4, p. 461–468, **2010**.

GÜNGÖRDÜ, A., SIRECI, N., KÜÇÜKBAY, H., BIRHANLI, A., & OZMEN, M. Evaluation of in vitro and in vivo toxic effects of newly synthesized benzimidazole-based organophosphorus compounds. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 87, p. 23–32, **2013**.

GUP, R.; GÖKÇE, C.; AKTÜRK, S. Copper (II) complexes with 4-hydroxyacetophenone-derived acylhydrazones: synthesis, characterization, DNA binding and cleavage properties. *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy*, v. 134, p. 484–92, 5 jan. **2015**.

GUPTA, V. K., SINGH, A. K., BHARDWAJ, S., & BANDI, K. R. Biological active novel 2,4-dinitro phenyl hydrazones as the colorimetric sensors for selective detection of acetate ion. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 197, p. 264–273, jul. **2014**.

HENDRIX, M. J. C., SEFTOR, E. A., SEFTOR, R. E. B., CHAO, J.-T., CHIEN, D.-S., & CHU, Y.-W. Tumor cell vascular mimicry: Novel targeting opportunity in melanoma. *Pharmacology & therapeutics*, v. 159, p. 83–92, mar. **2016**.

HONG, K., GONG, D., ZHANG, L., HU, H., JIA, Z., GU, H., & SONG, K. Transcriptome characterization and expression profiles of the related defense genes in postharvest mango fruit against *Colletotrichum gloeosporioides*. *Gene*, v. 576, n. 1, p. 275–283, **2015**.

INCA. **INCA - Câncer - Tipo - Pele Melanoma**. Disponível em: <[http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele\\_melanoma/definicao](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_melanoma/definicao)>. Acesso em: 17 maio. 2016.

INSTITUTO ONCOGUIA. **Sobre o Câncer de Pele Melanoma - Instituto Oncoguia**. Disponível em: <<http://www.oncoguia.org.br/conteudo/sobre-o-cancer/551/138/>>. Acesso em: 18 maio. 2016.

ISHAI-MICHAELI, R.; ELDOR, A.; VLODAVSKY, I. Heparanase activity expressed by platelets, neutrophils, and lymphoma cells releases active fibroblast growth factor from extracellular matrix. *Cell regulation*, v. 1, n. 11, p. 833–42, **1990**.

ISLAM, M. M., ROHMAN, M. A., GURUNG, A. B., BHATTACHARJEE, A., AGUAN, K., & MITRA, S. Correlation of cholinergic drug induced quenching of acetylcholinesterase bound thioflavin-T fluorescence with their inhibition activity. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 189, p. 250–257, **2018**.

JO, A. R., JEONG, H.-S., KIM, M.-K., YUN, H.-Y., BAEK, K. J., KWON, N. S., & KIM, D.-

- S. Geranylgeranylacetone induces apoptosis via the intrinsic pathway in human melanoma cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 82, p. 15–19, ago. **2016**.
- JOSHI, P. R., RAMANATHAN, N., SUNDARARAJAN, K., & SANKARAN, K. Gas phase reaction of phosphorus trichloride and methanol: Matrix isolation infrared and DFT studies. *Journal of Molecular Structure*, v. 1100, p. 80–87, nov. **2015**.
- KABOUDIN, B.; KAZEMI, F.; HABIBI, F. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@MgO nanoparticles as an efficient recyclable catalyst for the synthesis of phosphoramidates via the Atherton–Todd reaction. *Tetrahedron Letters*, v. 56, n. 46, p. 6364–6367, nov. **2015**.
- KAPLÁNEK, R., JAKUBEK, M., RAK, J., KEJÍK, Z., HAVLÍK, M., DOLENSKÝ, B., FRYDRYCH, I., HAJDÚCH, M., KOLÁŘ, M., BOGDANOVÁ, K., KRÁLOVÁ, J., DŽUBÁK, P., KRÁL, V. Caffeine-hydrazones as anticancer agents with pronounced selectivity toward T-lymphoblastic leukaemia cells. *Bioorganic chemistry*, v. 60, p. 19–29, jun. **2015**.
- KAPOOR, A., BENIWAL, V., BENIWAL, S., MATHUR, H., & KUMAR, H. S. Management of uveal tract melanoma: A comprehensive review. *Journal of the Egyptian National Cancer Institute*, v. 28, n. 2, p. 65–72, jun. **2016**.
- KARGIN, Y. M., BUDNIKOVA, Y. H., MARTYNOV, B. I., TURYGIN, V. V., & TOMILOV, A. P. Electrochemical synthesis of organophosphorus compounds with P-O, P-N and P-C bonds from white phosphorus. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 507, n. 1–2, p. 157–169, jul. **2001**.
- KASSO, M.; BEKELE, A. Post-harvest loss and quality deterioration of horticultural crops in Dire Dawa Region, Ethiopia. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, v. In press, **2016**.
- KNAAK, N., WIEST, S. L. F., SOARES, W., & FIUZA, L. M. Natural products : insecticidal and antimicrobial activity. n. i, p. 328–335, **2015**.
- KORNEV, A. N., ZOLOTAREVA, N. V., SUSHEV, V. V., CHERKASOV, A. V., & ABAKUMOV, G. A. Interaction of phosphorus trichloride with triethylamine. *Mendeleev Communications*, v. 25, n. 3, p. 236–238, maio **2015**.
- KÜMMERLE, A.E., RAIMUNDO, J.M., LEAL, C.M., DA SILVA, G.S., BALLIANO, T.L., PEREIRA, M.A., DE SIMONE, C.A., SUDO, R.T., ZAPATA-SUDO, G., FRAGA, C.A.M., BARREIRO, E.J. Studies towards the identification of putative bioactive conformation of potent vasodilator arylidene N-acylhydrazone derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 44, n. 10, p. 4004–4009, **2009**.
- LAGO, M. C. DO; COSTA, R. C. B. DA. **Agente de Nervos VX - Mecanismo de Ação**. Disponível em: <<https://agentedenervosvx.wordpress.com/seccao-3/>>. Acesso em: 23 mar. 2017.
- LATCHANA, N., GANJU, A., HOWARD, J. H., & CARSON, W. E. MicroRNA dysregulation in melanoma. *Surgical Oncology*, v. 25, n. 3, p. 184–189, set. **2016**.
- LE CORRE, S. S., BERCHEL, M., COUTHON-GOURVÈS, H., HAELTERS, J. P., & JAFFRÈS, P. A. Atherton-Todd reaction: Mechanism, scope and applications. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, v. 10, p. 1166–1191, **2014**.
- LI, J., LEI, H., SONG, H., LAI, T., XU, X., & SHI, X. 1-methylcyclopropene (1-MCP) suppressed postharvest blue mold of apple fruit by inhibiting the growth of *Penicillium expansum*. *Postharvest Biology and Technology*, v. 125, p. 59–64, **2017**.



LIMA, P. C., LIMA, L. M., DA SILVA, K. C. M., LEDA, P. H. O., DE MIRANDA, A. L. P., FRAGA, C. A. M., & BARREIRO, E. J. Synthesis and analgesic activity of novel N-acylarylhydrazones and isosters, derived from natural saffrole. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 35, n. 2, p. 187–203, **2000**.

LIU, J., TONG, L., LI, D., MENG, W., SUN, W., ZHAO, Y., & YU, Z. Comparison of two extraction methods for the determination of 135 pesticides in *Corydalis Rhizoma*, *Chuanxiong Rhizoma* and *Angelicae Sinensis Radix* by liquid chromatography-triple quadrupole-mass spectrometry. Application to the roots and rhizomes of China. *Journal of Chromatography B*, mar. **2016**.

LONDRES, F. Agrotóxicos no Brasil-um guia para ação em defesa da vida. [s.l.: s.n.].

LOPES, A. B., MIGUEZ, E., KÜMMERLE, A. E., RUMJANEK, V. M., FRAGA, C. A. M., & BARREIRO, E. J. Characterization of amide bond conformers for a novel heterocyclic template of N-acylhydrazone derivatives. *Molecules*, v. 18, n. 10, p. 11683–11704, **2013**.

LOPES, U. P. Podridões Pós-Colheita Em Morango : Etiologia E Minas Gerais-Brasil. [s.l.: s.n.].

LORENZINI, M.; ZAPPAROLI, G. Characterization and pathogenicity of *Alternaria* spp. strains associated with grape bunch rot during post-harvest withering. *International Journal of Food Microbiology*, v. 186, p. 1–5, **2014**.

MAEDA, T., ABE, H., KAKIKI, K., & MISATO, T. Studies on the Mode of Action of Organophosphorus Part II . Accumulation treated of an Amino Mycelia Kitazin Sugar Derivative oryzae on Kitazin of *Pyricularia*. v. 34, n. 5, p. 700–709, **1970**.

MAKAROV, M. V.; SKVORTSOV, E. A.; BREL, V. K. Synthesis of diethyl (aryl)(4-oxopiperidin-1-yl)methylphosphonates. *Mendeleev Communications*, v. 25, n. 3, p. 232–233, maio **2015**.

MARSILLACH, J., HSIEH, E. J., RICHTER, R. J., MACCOSS, M. J., & FURLONG, C. E. Proteomic analysis of adducted butyrylcholinesterase for biomonitoring organophosphorus exposures. *Chemico-biological interactions*, v. 203, n. 1, p. 85–90, 25 mar. **2013**.

MATOS, K. S. Aspectos moleculares da reativação da acetilcolinesterase inibida por ciclosarin e carbofurano. [s.l.] Universidade Federal de Lavras, **2012**.

MAZIERO, M. T.; BERSOT, L. D. S. Micotoxinas em alimentos produzidos no Brasil. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, v. 12, n. 1, p. 89–99, **2010**.

MIKULIC-PETKOVSEK, M., SCHMITZER, V., JAKOPIC, J., CUNJA, V., VEBERIC, R., MUNDA, A., & STAMPAR, F. Phenolic compounds as defence response of pepper fruits to *Colletotrichum coccodes*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 84, n. 1, p. 138–145, **2013**.

MIRANDA, A. F. S. Miranda, Anderson Fontes Suzart. [s.l.] Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, **2015**.

MORENO, M.; CONTE, B.; MENEGAT, E. Diferenças Clínico-Epidemiológicas entre Pacientes Masculinos e Femininos com Diagnóstico de Melanoma Cutâneo no Oeste de Santa Catarina Clinical-Epidemiological Differences Between Male and Female Patients Diferencias Clínicas y Epidemiológicas entre Pac. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 61, n. 1, p. 15–21, **2015**.

MOURÃO, S. A., VILELA, E. F., ZANUNCIO, J. C., ZAMBOLIM, L., & TUELHER, E. S.

Seletividade de defensivos agrícolas ao fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana*. *Neotropical Entomology*, v. 32, n. 1, p. 103–106, **2003**.

NAGARAJU, P. M., SANGANALMATH, P. U., KEMPARAJU, K., & MOHAN, B. M. Evaluation of separation parameters for selected organophosphorus fungicides of forensic importance by RP-HPTLC. *Acta Chromatographica*, v. 24, n. 2, p. 253–262, **2012**.

NCCLS. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard-Eighth Edition**. Pennsylvania: [s.n.]. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/servicosade/manuais/clsi/clsi\\_OPASM2-A8.pdf](http://www.anvisa.gov.br/servicosade/manuais/clsi/clsi_OPASM2-A8.pdf)>.

NIU, Y., ZHANG, T., ZHU, Y., YUAN, Y., WANG, S., LIU, J., & LIU, D. Isolation and characterization of a novel mycovirus from *Penicillium digitatum*. *Virology*, v. 494, p. 15–22, **2016**.

NOGUEIRA, A. J. M. Novas dietoxifosfonil-N-acilarilidrazonas e dialquilfosforilidrazonas com potencial atividade biológica. [s.l.] Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, **2007**.

NOGUEIRA, A. J. M., LIMA, M. E. F. DE, DACOSTA, J. B. N., ALVES, E. S. S., ANJOS, D. O. DOS, VANNIER-SANTOS, M. A., & LANFREDI-RANGEL, A. Síntese, caracterização e estudo da atividade inibitória de novas dialquilfosforilarilidrazonas sobre o crescimento de tripanossomatídeos. *Química Nova*, v. 34, n. 8, p. 1365–1369, **2011**.

OLIVEIRA-SILVA, J. J., ALVES, S. R., MEYER, A., PEREZ, F., SARCINELLI, P. DE N., MATTOS, R. DE C. O. DA C., & MOREIRA, J. C. Influência de fatores socioeconômicos na contaminação por agrotóxicos, Brasil. *Revista de Saúde Pública*, v. 35, n. 2, p. 130–135, **2001**.

OLIVEIRA, A. H. B., CAVALCANTE, R. M., DUAVÍ, W. C., FERNANDES, G. M., NASCIMENTO, R. F., QUEIROZ, M. E. L. R., & MENDONÇA, K. V. The legacy of organochlorine pesticide usage in a tropical semi-arid region (Jaguaribe River, Ceará, Brazil): Implications of the influence of sediment parameters on occurrence, distribution and fate. *The Science of the total environment*, v. 542, n. Pt A, p. 254–63, 15 jan. **2016**.

OLIVEIRA, C. M., AUAD, A. M., MENDES, S. M., & FRIZZAS, M. R. Crop losses and the economic impact of insect pests on Brazilian agriculture. *Crop Protection*, v. 56, p. 50–54, fev. **2014**.

OLIVEIRA, T.L., MUNHOZ, A.C.M., LEMES, B.M., MINOZZO, B.R., NEPEL, A., BARISON, A., FÁVERO, G.M., CAMPAGNOLI, E.B., BELTRAME, F.L. Antitumoural effect of *Synadenium grantii* Hook f. (Euphorbiaceae) latex. *Journal of ethnopharmacology*, v. 150, n. 1, p. 263–9, 28 out. **2013**.

PANE, C., FRATIANNI, F., PARISI, M., NAZZARO, F., & ZACCARDELLI, M. Control of *Alternaria* post-harvest infections on cherry tomato fruits by wild pepper phenolic-rich extracts. *Crop Protection*, v. 84, p. 81–87, **2016**.

PARISI, M. C. M.; HENRIQUE, C. M.; PRATI, P. Doenças Pós-Colheita: Um Entrave na Comercialização. *Pesquisa & Tecnologia*, v. 12, n. 2, p. 1–5, **2015**.

PAVIA, D. L., LAMPMAN, G. M., KRIZ, G. S., & VYVYAN, J. R. Introdução à Espectroscopia. 4º. ed. [s.l.] CENGAGE, **2010**.

PERUZZINI, M., ABDREIMOVA, R. R., BUDNIKOVA, Y., ROMEROSA, A., SCHERER, O. J., & SITZMANN, H. Functionalization of white phosphorus in the coordination sphere of transition metal complexes. *Journal of Organometallic Chemistry*, v. 689, n. 24, p. 4319–4331, nov. **2004**.

PETRONILHO, E. D. C.; PINTO, A. C.; VILLAR, J. D. F. Acetilcolinesterase: Alzheimer e guerra química. *Ciência e Tecnologia*, p. 3–14, **2011**.

PHOKU, J. Z., BARNARD, T. ., POTGIETER, N., & DUTTON, M. F. Mycotoxigenic potentials of the genera: *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* isolated from houseflies (*Musca domestica* L.). *Acta Tropica*, v. 168, p. 29–36, **2017**.

PRÉVEL, C., PELLERANO, M., GONZÁLEZ-VERA, J.A., HENRI, P., MEUNIER, L., VOLLAIRE, J., JOSSERAND, V., MORRIS, M.C. Fluorescent peptide biosensor for monitoring CDK4/cyclin D kinase activity in melanoma cell extracts, mouse xenografts and skin biopsies. *Biosensors & bioelectronics*, v. 85, p. 371–380, 22 abr. **2016**.

RAWAT, P.; SINGH, R. N. Synthesis, spectral and chemical reactivity analysis of 2,4-dinitrophenyl hydrazone having pyrrole moiety. *Journal of Molecular Structure*, v. 1097, p. 214–225, out. **2015**.

RIBAS, P. P.; MATSUMURA, A. T. S. A química dos agrotóxicos : impacto sobre a saúde e meio ambiente. *Revista Liberato, Novo Hamburgo*, v. 10, n. 14, p. 149–158, **2009**.

RIBEIRO, I. G., DA SILVA, K. C. M., PARRINI, S. C., DE MIRANDA, A. L. P., FRAGA, C. A. M., & BARREIRO, E. J. Synthesis and antinociceptive properties of new structurally planned imidazo[1,2-a]pyridine 3-acylarylhydrazone derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 33, n. 3, p. 225–235, **1998**.

RODRIGUES, J. M., SANT'ANNA, C. M., RUMJANEK, V. M., & DACOSTA, J. B. N. Diastereoselective Synthesis of New Dialkylphosphorylhydrazones. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*, v. 185, n. 1, p. 40–56, jan. **2010**.

SANTOS, G. R. DOS. Características, Sistema de Registros de Produtos e Concorrência no Mercado de Agrotóxicos no Brasil. *Radar*, p. 7–17, **2012**.

SANTOS, V. M. R. DOS, DONNICI, C. L., DACOSTA, J. B. N., & CAIXEIRO, J. M. R. Compostos organofosforados pentavalentes: histórico, métodos sintéticos de preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais. *Química Nova*, v. 30, n. 1, p. 159–170, fev. **2007**.

SAOUDI, A., FRÉRY, N., ZEGHNOUN, A., BIDONDO, M.-L., DESCHAMPS, V., GÖEN, T., GARNIER, R., GULDNER, L. Serum levels of organochlorine pesticides in the French adult population: the French National Nutrition and Health Study (ENNS), 2006-2007. *The Science of the total environment*, v. 472, p. 1089–99, 15 fev. **2014**.

SERAFIM, R.A.M., GONÇALVES, J.E., DE SOUZA, F.P., DE MELO LOUREIRO, A.P., STORPIRTIS, S., KROGH, R., ANDRICOPULO, A.D., DIAS, L.C., FERREIRA, E.I. Design, synthesis and biological evaluation of hybrid bioisoster derivatives of N-acylhydrazone and furoxan groups with potential and selective anti-*Trypanosoma cruzi* activity. *European journal of medicinal chemistry*, v. 82, p. 418–25, 23 jul. **2014**.

SETLIK, J.; CÁSSIO, R. D. S. O uso da terapia fotodinâmica como tratamento alternativo para o câncer de pele do tipo não- melanoma. *Revista Saúde e Desenvolvimento*, v. 7, n. 4, p. 195–206, **2015**.

SHAPIRO, G.D., DODDS, L., ARBUCKLE, T.E., ASHLEY-MARTIN, J., ETTINGER, A.S., FISHER, M., TABACK, S., BOUCHARD, M.F., MONNIER, P., DALLAIRE, R., MORISSET, A.-S., FRASER, W. Exposure to organophosphorus and organochlorine pesticides, perfluoroalkyl substances, and polychlorinated biphenyls in pregnancy and the association with impaired glucose tolerance and gestational diabetes mellitus: The MIREC

Study. *Environmental research*, v. 147, p. 71–81, 4 fev. **2016**.

SILVA, A. G., ZAPATA-SUDO, G., KUMMERLE, A. E., FRAGA, C. A. M., BARREIRO, E. J., & SUDO, R. T. Synthesis and vasodilatory activity of new N-acylhydrazone derivatives, designed as LASSBio-294 analogues. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 13, n. 10, p. 3431–3437, **2005**.

SILVA, M. F. DE O. E; COSTA, L. M. DA. A indústria de defensivos agrícolas. *Cadernos BNDS Setorial*, v. 35, p. 233–276, **2011**.

SILVA, S. M. S. DA. Intoxicações por inibidores da acetilcolinesterase: etiologia, diagnóstico e tratamento. Coimbra: Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, **2015**.

TIMPERLEY, C. M., MORTON, I. J., WATERS, M. J., & YARWOOD, J. L. The synthesis and reactions of dialkyl fluoroalkyl phosphates. *Journal of Fluorine Chemistry*, v. 96, n. 1, p. 95–100, jun. **1999**.

VELAYUTHAM PILLAI, M.; RAJESWARI, K.; VIDHYASAGAR, T. Stereoselective synthesis, spectral and antimicrobial studies of some cyanoacetyl hydrazones of 3-alkyl-2,6-diarylpiperidin-4-ones. *Journal of Molecular Structure*, v. 1076, p. 174–182, nov. **2014**.

VILANOVA, L., TEIXIDÓ, N., TORRES, R., USALL, J., VIÑAS, I., & SÁNCHEZ-TORRES, P. Relevance of the transcription factor PdSte12 in *Penicillium digitatum* conidiation and virulence during citrus fruit infection. *International Journal of Food Microbiology*, v. 235, p. 93–102, **2016**.

WICK, M. R. Cutaneous melanoma: A current overview. *Seminars in Diagnostic Pathology*, abr. **2016**.

XIONG, B., ZHOU, Y., ZHAO, C., GOTO, M., YIN, S.-F., HAN, L.-B. Systematic study for the stereochemistry of the Atherton–Todd reaction. *Tetrahedron*, v. 69, n. 45, p. 9373–9380, nov. **2013**.

XIONG, B., ZHOU, Y., ZHAO, C., GOTO, M., YIN, S.-F., & HAN, L.-B. Base-promoted O-deprotonation/alkylation reaction of P(O)–OH compounds with alkyl halides. *Tetrahedron*, v. 70, n. 47, p. 9057–9063, nov. **2014**.

XU, X., LEI, H., MA, X., LAI, T., SONG, H., SHI, X., & LI, J. Antifungal activity of 1-methylcyclopropene (1-MCP) against anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) in postharvest mango fruit and its possible mechanisms of action. *International Journal of Food Microbiology*, v. 241, p. 1–6, **2017**.

YADAGIRI, B., HOLAGUNDA, U. D., BANTU, R., NAGARAPU, L., GUGULOTH, V., POLEPALLY, S., & JAIN, N. Rational design, synthesis and anti-proliferative evaluation of novel benzosuberone tethered with hydrazide-hydrazones. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, v. 24, n. 21, p. 5041–4, 1 nov. **2014**.

YADAV, I. C., DEVI, N. L., SYED, J. H., CHENG, Z., LI, J., ZHANG, G., & JONES, K. C. Current status of persistent organic pesticides residues in air, water, and soil, and their possible effect on neighboring countries: a comprehensive review of India. *The Science of the total environment*, v. 511, p. 123–37, 1 abr. **2015**.

YAN, X., LI, H., HAN, X., & SU, X. A ratiometric fluorescent quantum dots based biosensor for organophosphorus pesticides detection by inner-filter effect. *Biosensors & bioelectronics*, v. 74, p. 277–83, 15 dez. **2015**.

YANG, J., SUN, C., ZHANG, Y., FU, D., ZHENG, X., & YU, T. Induced resistance in tomato

fruit by  $\gamma$ -aminobutyric acid for the control of alternaria rot caused by *Alternaria alternata*. *Food Chemistry*, v. 221, p. 1014–1020, **2017a**.

YANG, Q., WANG, H., ZHANG, H., ZHANG, X., APALIYA, M. T., ZHENG, X., & MAHUNU, G. K. Effect of *Yarrowia lipolytica* on postharvest decay of grapes caused by *Talaromyces rugulosus* and the protein expression profile of *T. rugulosus*. *Postharvest Biology and Technology*, v. 126, p. 15–22, **2017b**.

YE, T., ZHU, S., ZHU, Y., FENG, Q., HE, B., XIONG, Y., ZHAO, L., ZHANG, Y., YU, L., YANG, L. Cryptotanshinone induces melanoma cancer cells apoptosis via ROS-mitochondrial apoptotic pathway and impairs cell migration and invasion. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 82, p. 319–326, ago. **2016**.

YE, X.-P., ZHU, T.-F., WU, W.-N., MA, T.-L., XU, J., ZHANG, Z.-P., WANG, Y., JIA, L. Syntheses, characterizations and biological activities of two Cu(II) complexes with acylhydrazone ligand bearing pyrrole unit. *Inorganic Chemistry Communications*, v. 47, p. 60–62, set. **2014**.

YTOSHI, F., MACKENZIE, S., GIRO, R., MACKENZIE, M., ROBERTO, M., & SANTOS, D. O. S. A logística reversa e as embalagens vazias de defensivos agrícolas no Brasil. **2010**.

YU, X.; SHI, L.; KE, S. Acylhydrazone derivatives as potential anticancer agents: Synthesis, bio-evaluation and mechanism of action. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, v. 25, n. 24, p. 5772–6, 15 dez. **2015**.

ZAMPIROLI, L. S. Dialquilfosforilidrazonas derivadas de isatinas n-substituídas com potencial atividade biológica. [s.l.] Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, **2009**.

ZAMPIROLI, L. S., LEMOS, M. J. DE, GONÇALVES, V. T., SOUZA, M. A. A. DE, SOUZA, S. R. DE, RUMJANEK, V. M., & DACOSTA, J. B. N. Synthesis, characterization, and biological activity of a new class of dialkylphosphorylhydrazone derivatives of isatin. *Química Nova*, v. 37, n. 6, p. 989–995, **2014**.

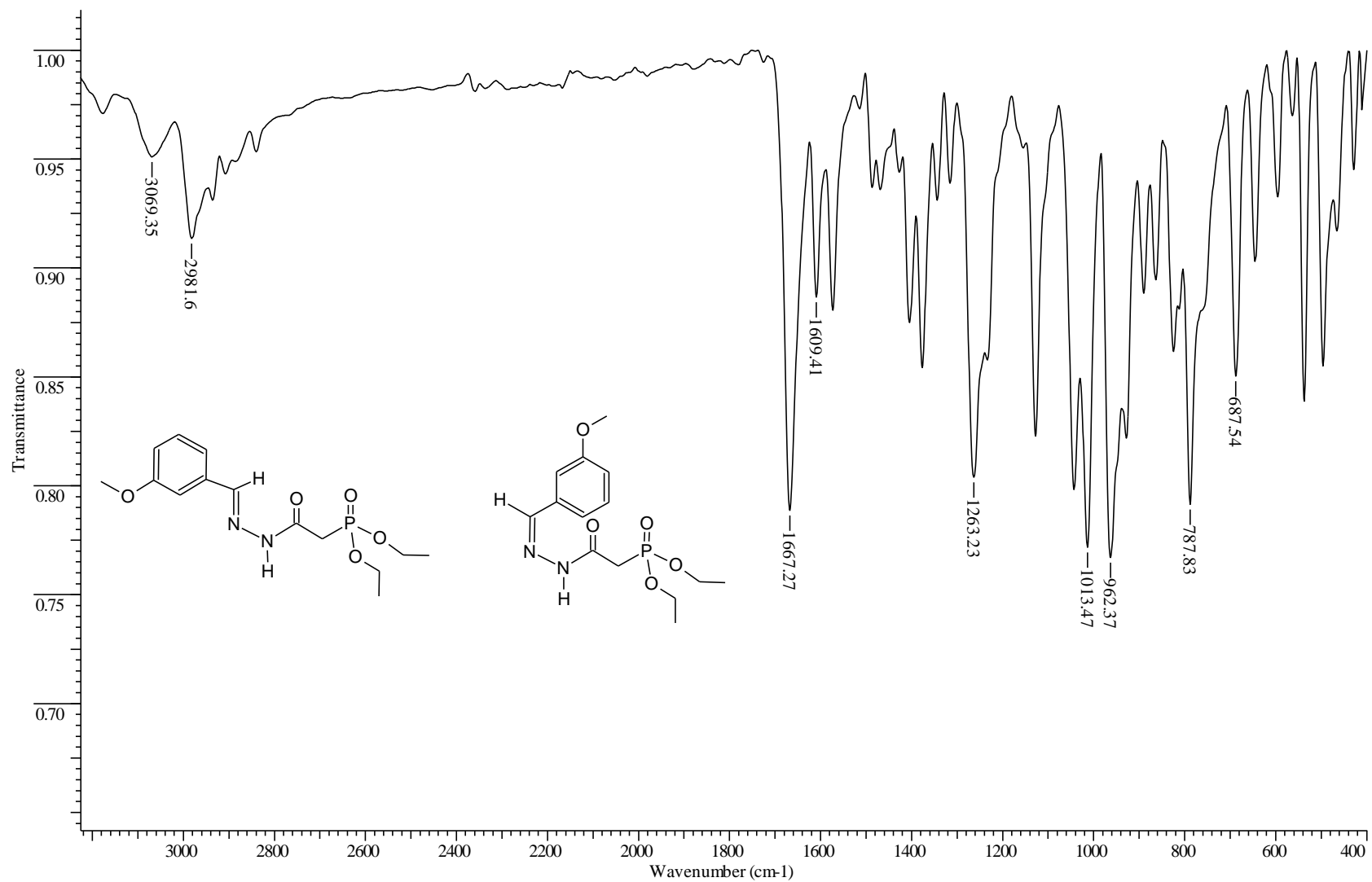
HANG, Y.-H., XU, D., LIU, J.-Q., & ZHAO, X.-H. Enhanced degradation of five organophosphorus pesticides in skimmed milk by lactic acid bacteria and its potential relationship with phosphatase production. *Food chemistry*, v. 164, p. 173–8, 1 dez. **2014**.

ZHENG, S., CHEN, B., QIU, X., CHEN, M., MA, Z., & YU, X. Distribution and risk assessment of 82 pesticides in Jiulong River and estuary in South China. *Chemosphere*, v. 144, p. 1177–92, fev. **2016**.

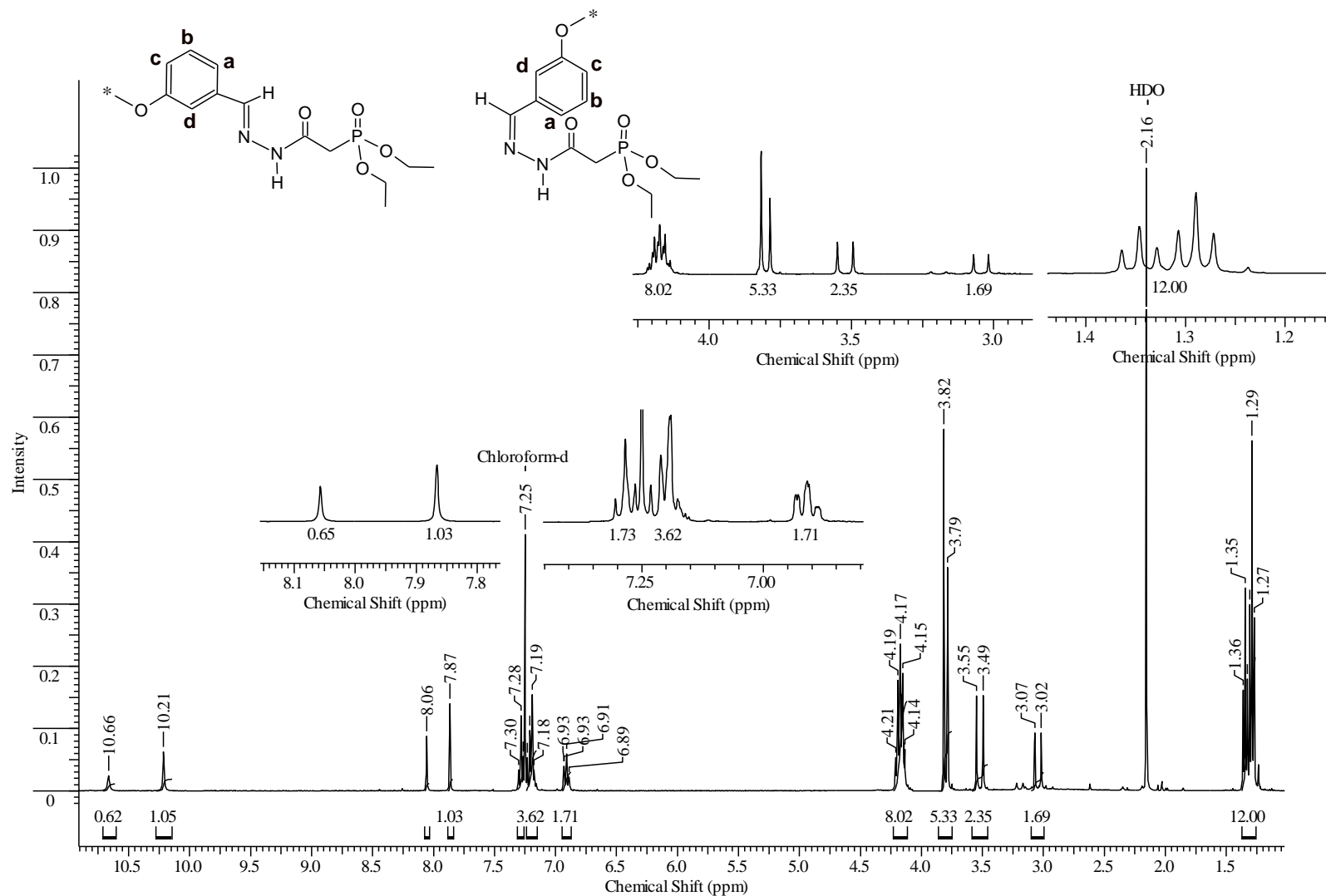
ZHU, G., YI, X., HAFERKAMP, S., HESBACHER, S., LI, C., GOEBELER, M., GAO, T., HOUBEN, R., SCHRAMA, D. Combination with  $\gamma$ -secretase inhibitor prolongs treatment efficacy of BRAF inhibitor in BRAF-mutated melanoma cells. *Cancer letters*, v. 376, n. 1, p. 43–52, 28 jun. **2016**.

## 7. ANEXOS

Os compostos intermediários para a obtenção das dialquifosfonilacilidrazonas já são conhecidos e seus espectros de infravermelho (IV) e RMN de  $H^1$  encontram-se em referências de trabalhos realizados pelo grupo, dentre eles (NOGUEIRA, 2007). Portanto, os anexos conterão informações somente sobre os compostos sintetizados visto que estes são inéditos na literatura.

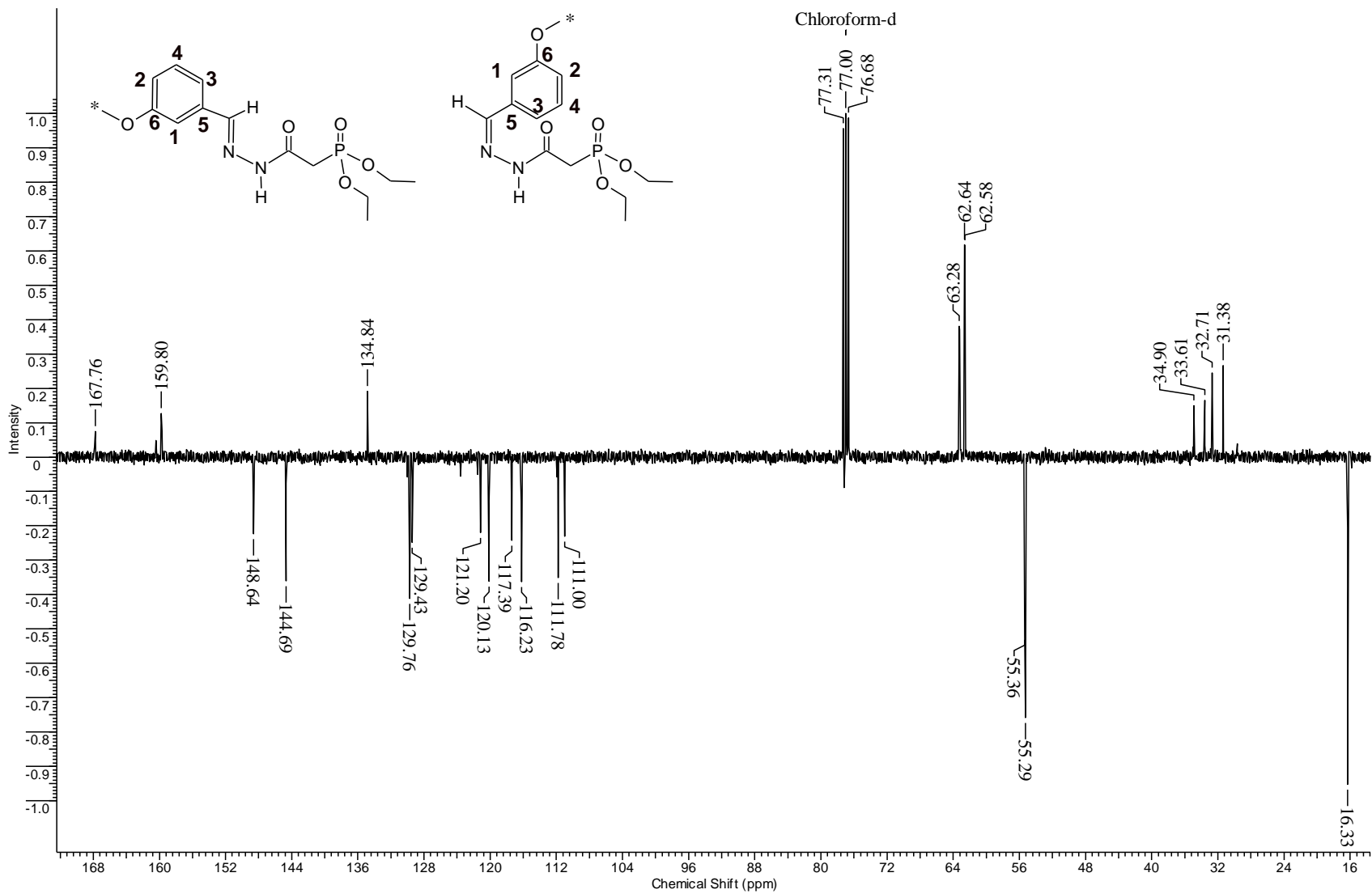


**Figura 37** - Espectro de IV (Célula de NaCl) - [2(*E/Z*)-2-(3-metoxibenzilideno)hidrazinil]-2-oxoetilfosfonato de dietila (1).

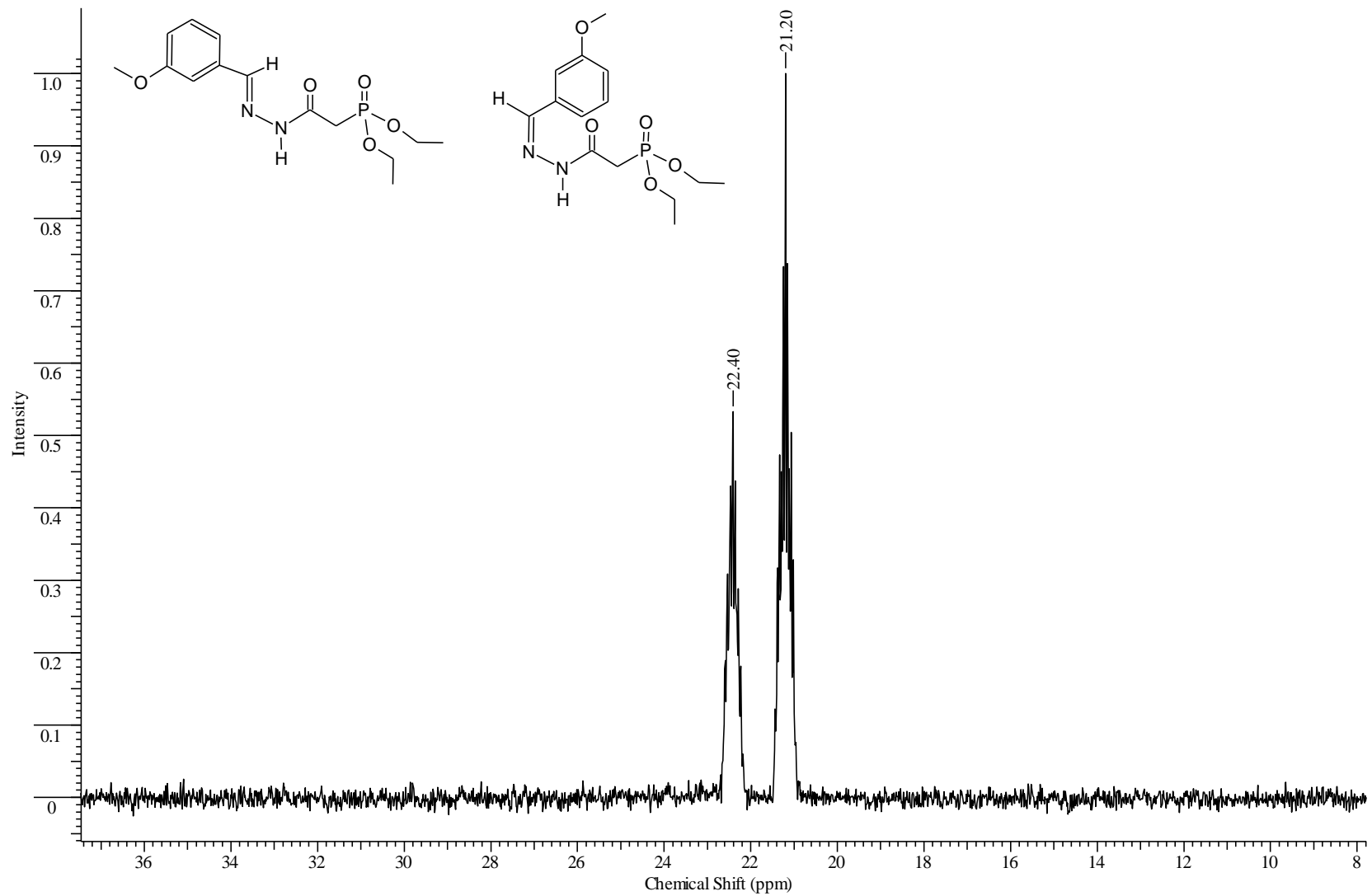


**Figura 38** - Espectro de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) - [2(E/Z)-2-(3-metoxibenzilideno)hidrazinil]-2-oxoetilfosfonato de dietila (1).

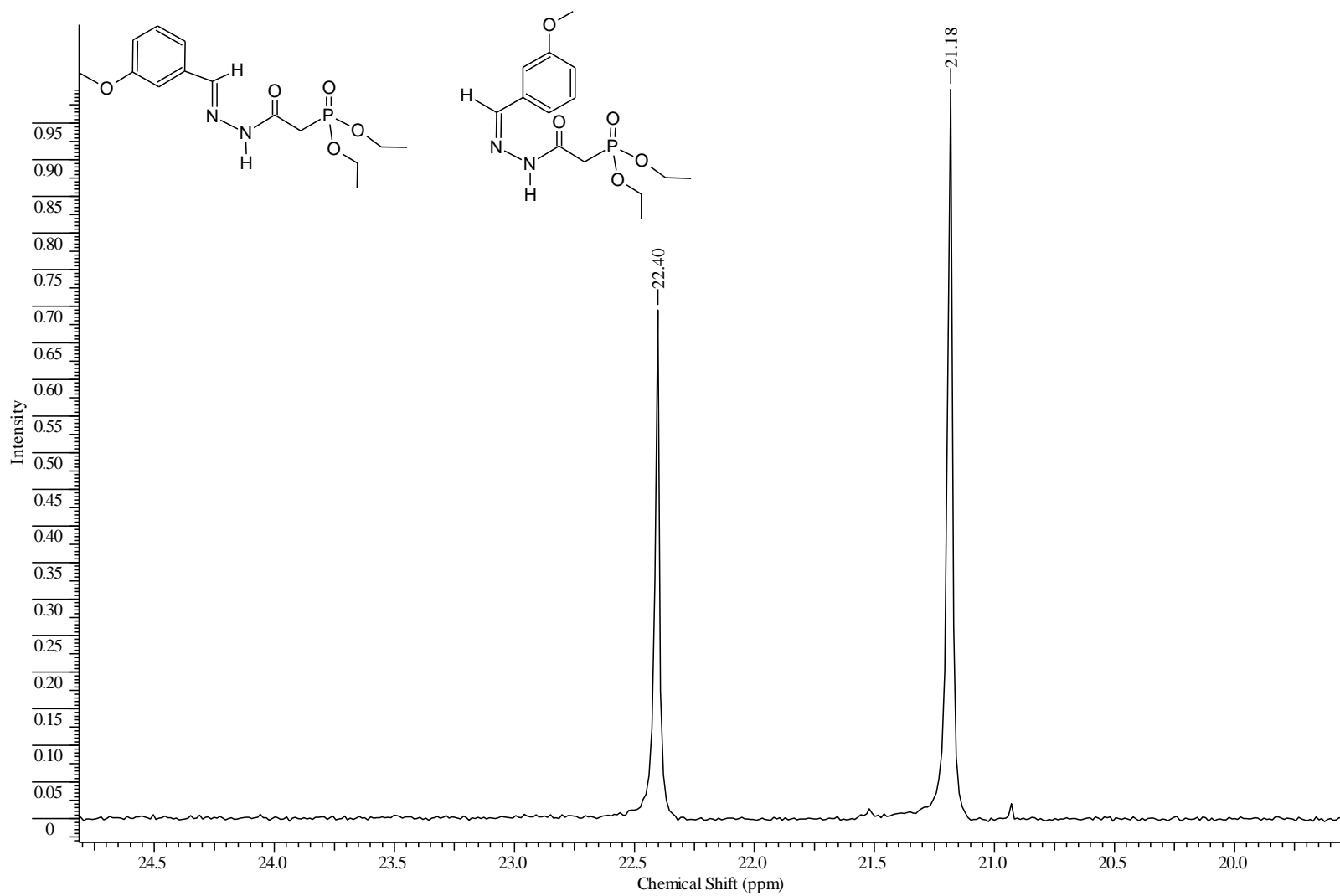




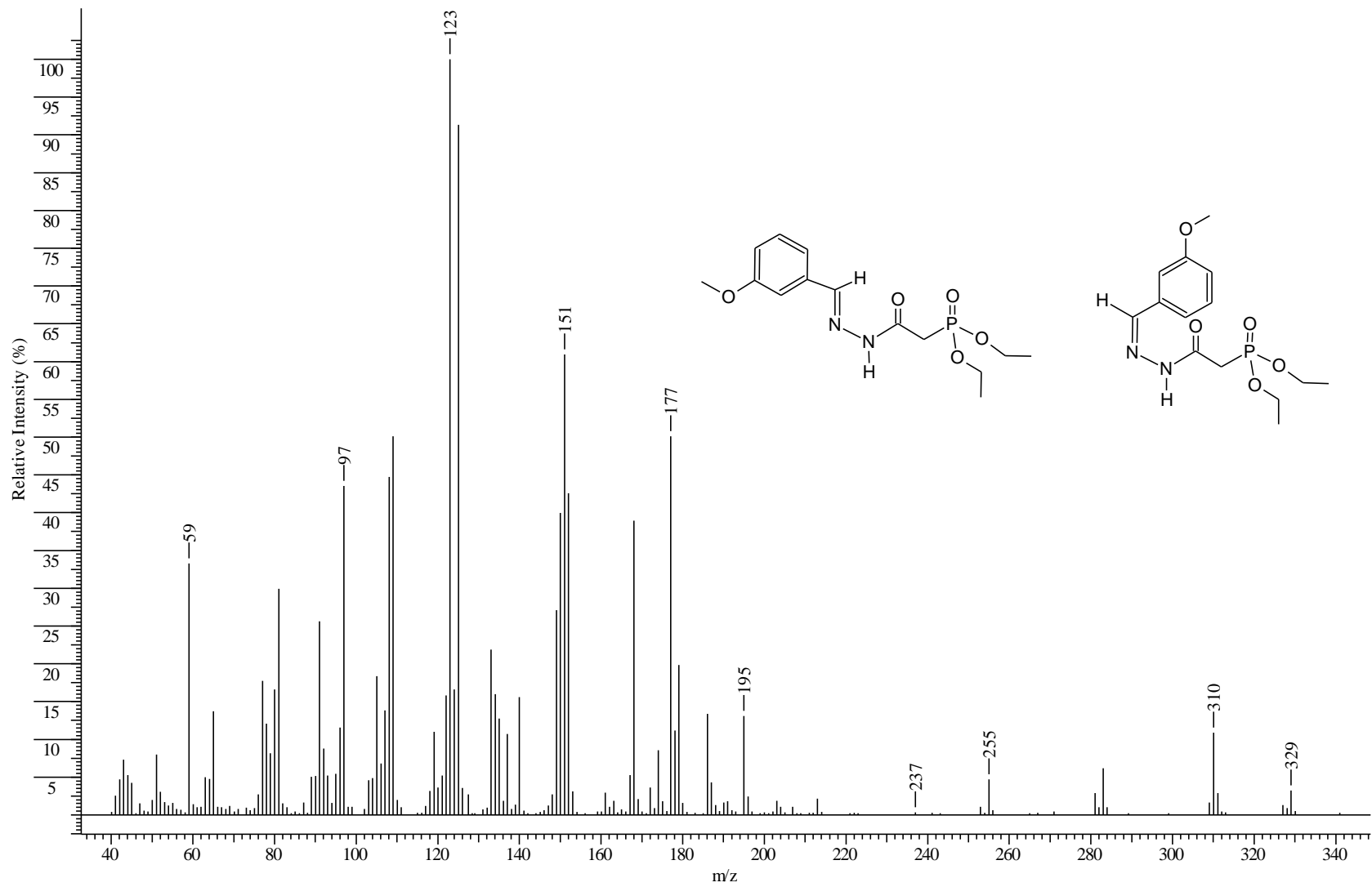
**Figura 39** - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) - [2(E/Z)-2-(3-metoxibenzilideno)hidrazinil]-2-oxoetilfosfonato de dietila (1).



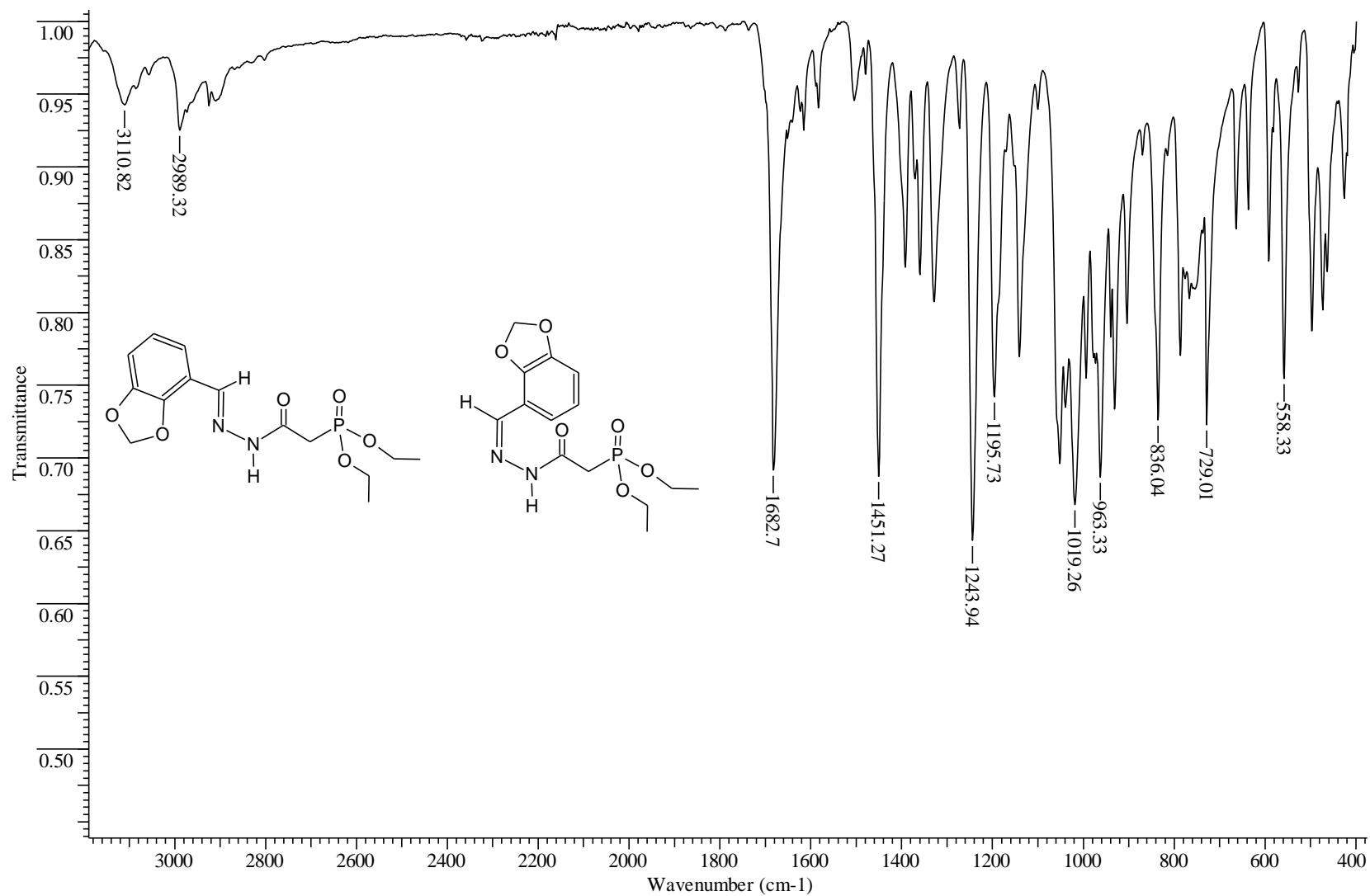
**Figura 40** - Espectro de RMN  $^{31}\text{P}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) - [2(E/Z)-2-(3-metoxibenzilideno)hidrazinil]-2-oxoetilfosfonato de dietila (1).



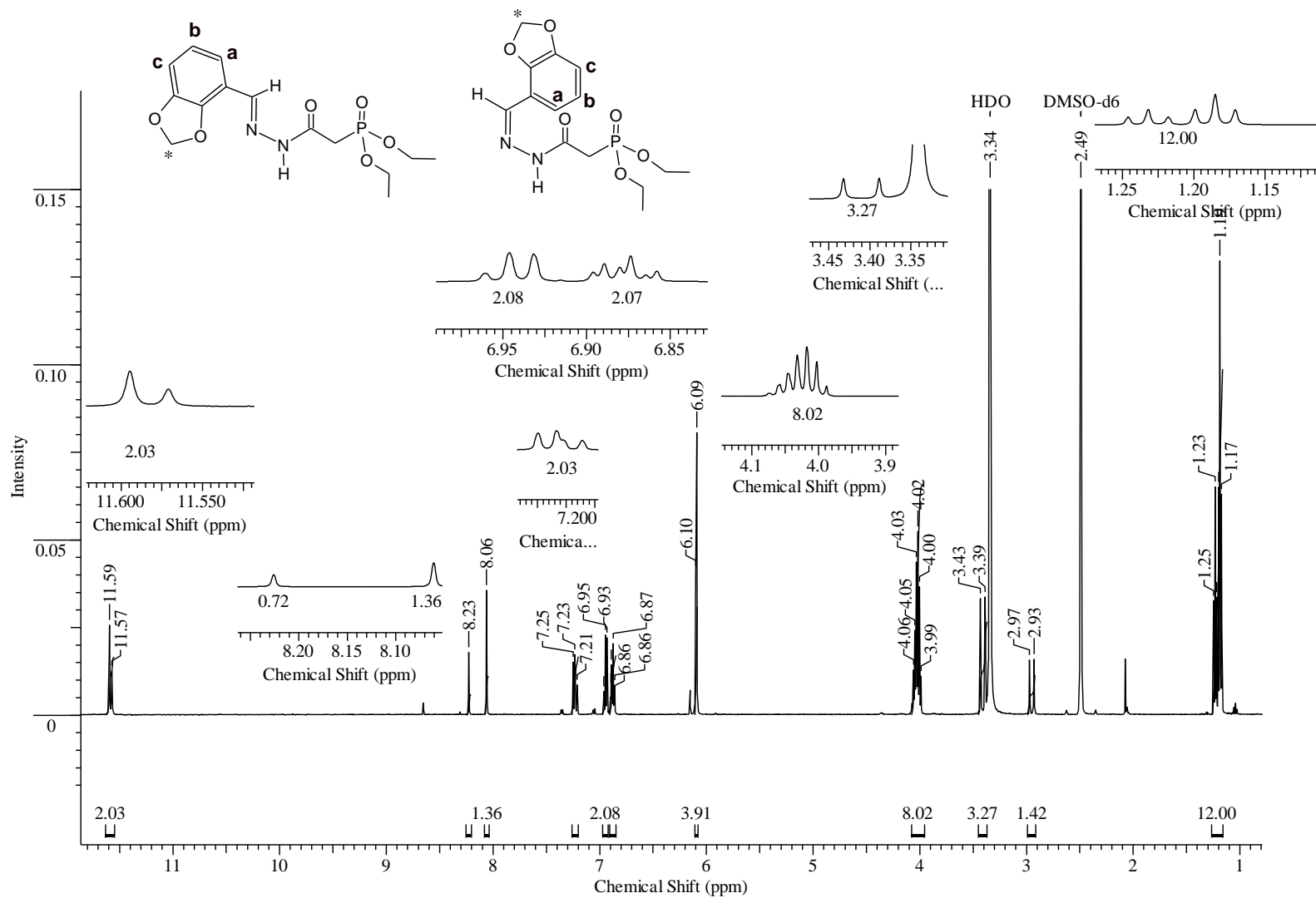
**Figura 41** - Espectro de RMN  $^{31}\text{P}_{\text{CPD}}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) - [2(E/Z) -2- (3-metoxibenzilideno)hidrazinil] -2-oxoetilfosfonato de dietila (1).



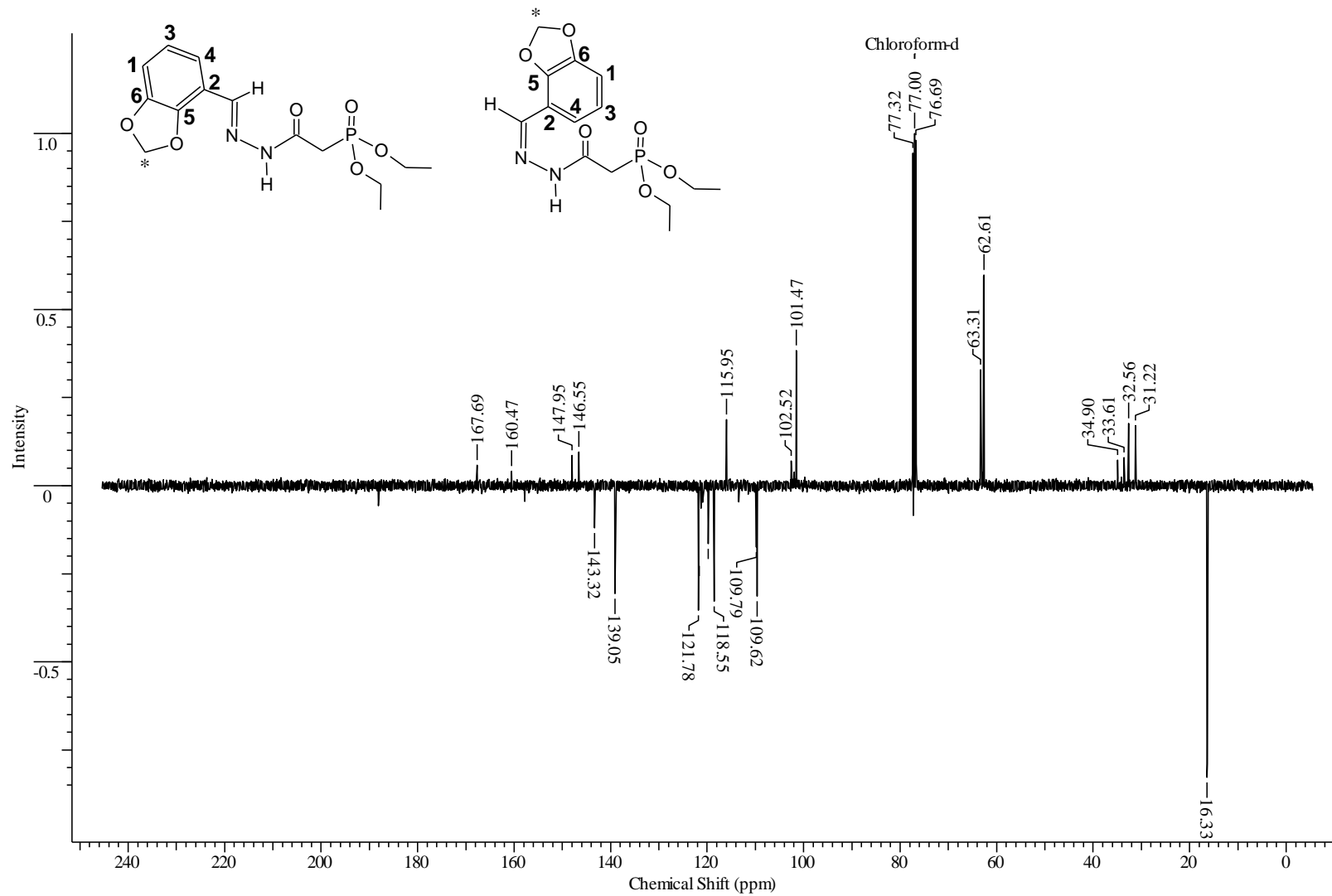
**Figura 42** - Espectro de Massas - [2(*E/Z*)-2-(3-metoxibenzilideno)hidrazinil]-2-oxoetilfosfonato de dietila (1).



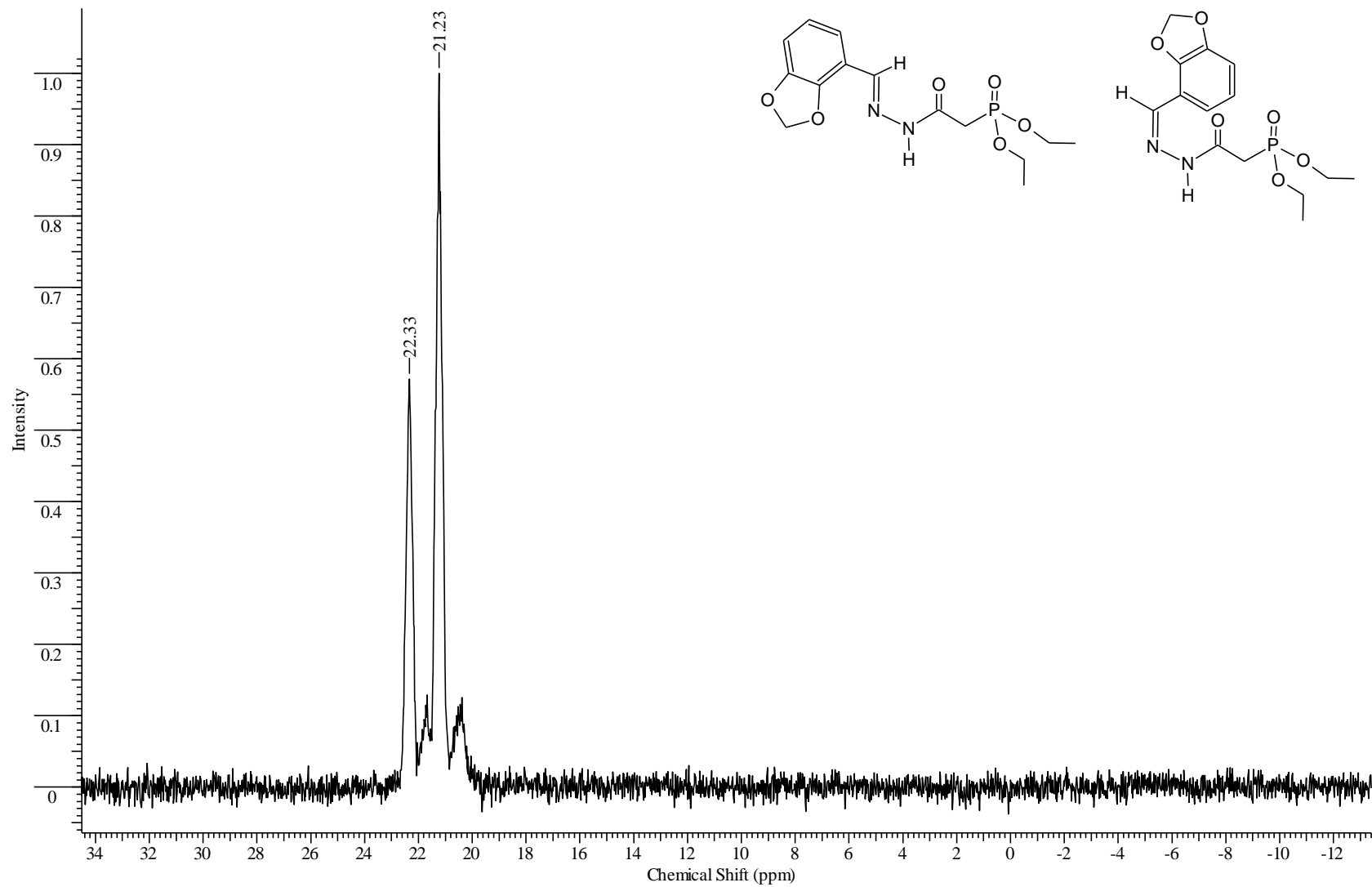
**Figura 43** - Espectro de IV (Célula de NaCl) - [2(*E/Z*)-2-(1,3-benzodioxol-4-ilmetileno)hidrazinil]-2-oxoetilfosfonato de dietila (2).



**Figura 44** - Espectro de RMN  $^1\text{H}$ (DMSO) - [2(*E/Z*)-2-(1,3-benzodioxol-4-ilmetileno)hidrazinil]-2-oxoetilfosfonato de dietila (2).

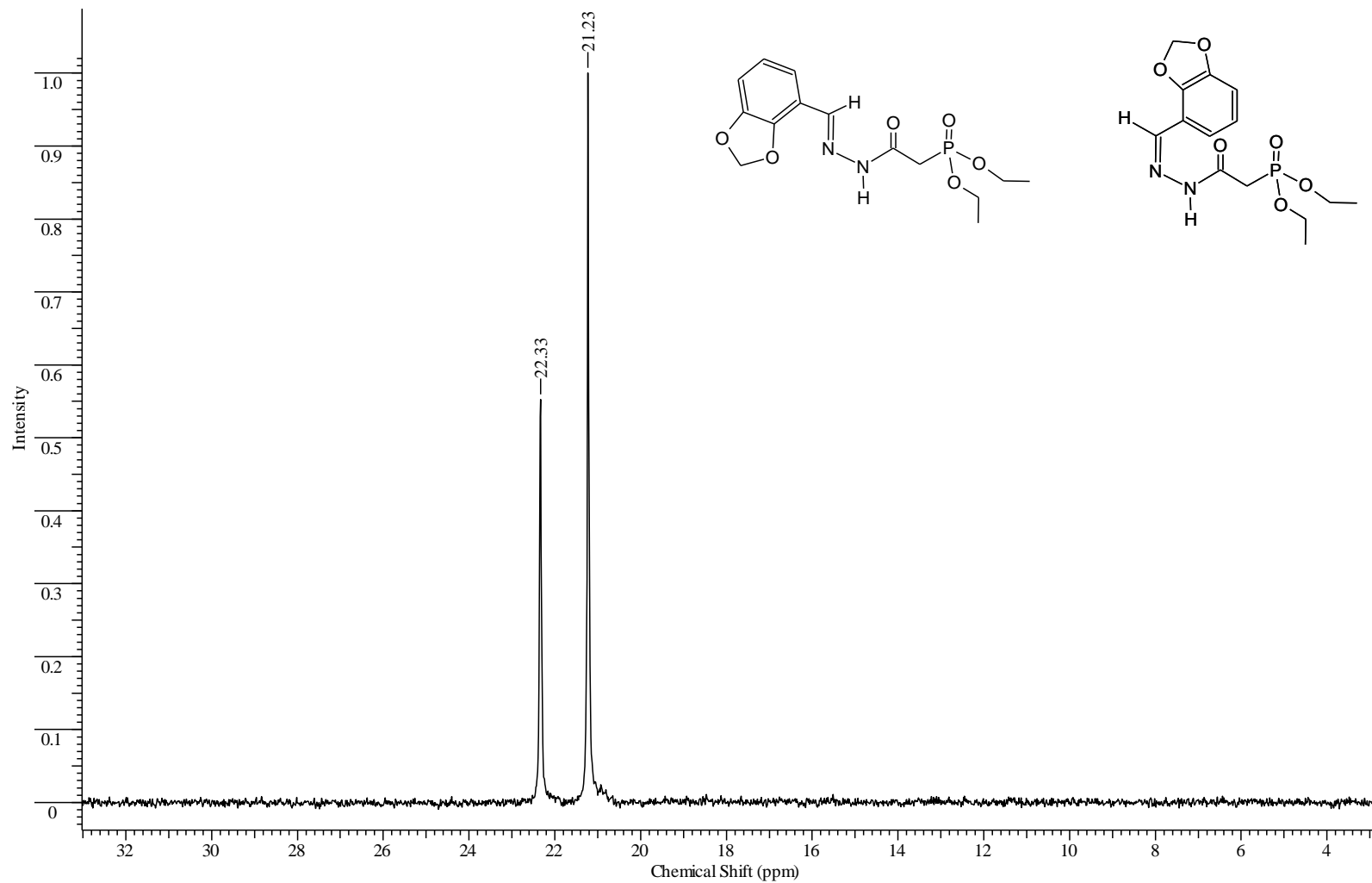


**Figura 45** - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) - [2(*E/Z*)-2-(1,3-benzodioxol-4-ilmetileno)hidrazinil]-2-oxoetilfosfonato de dietila (2).

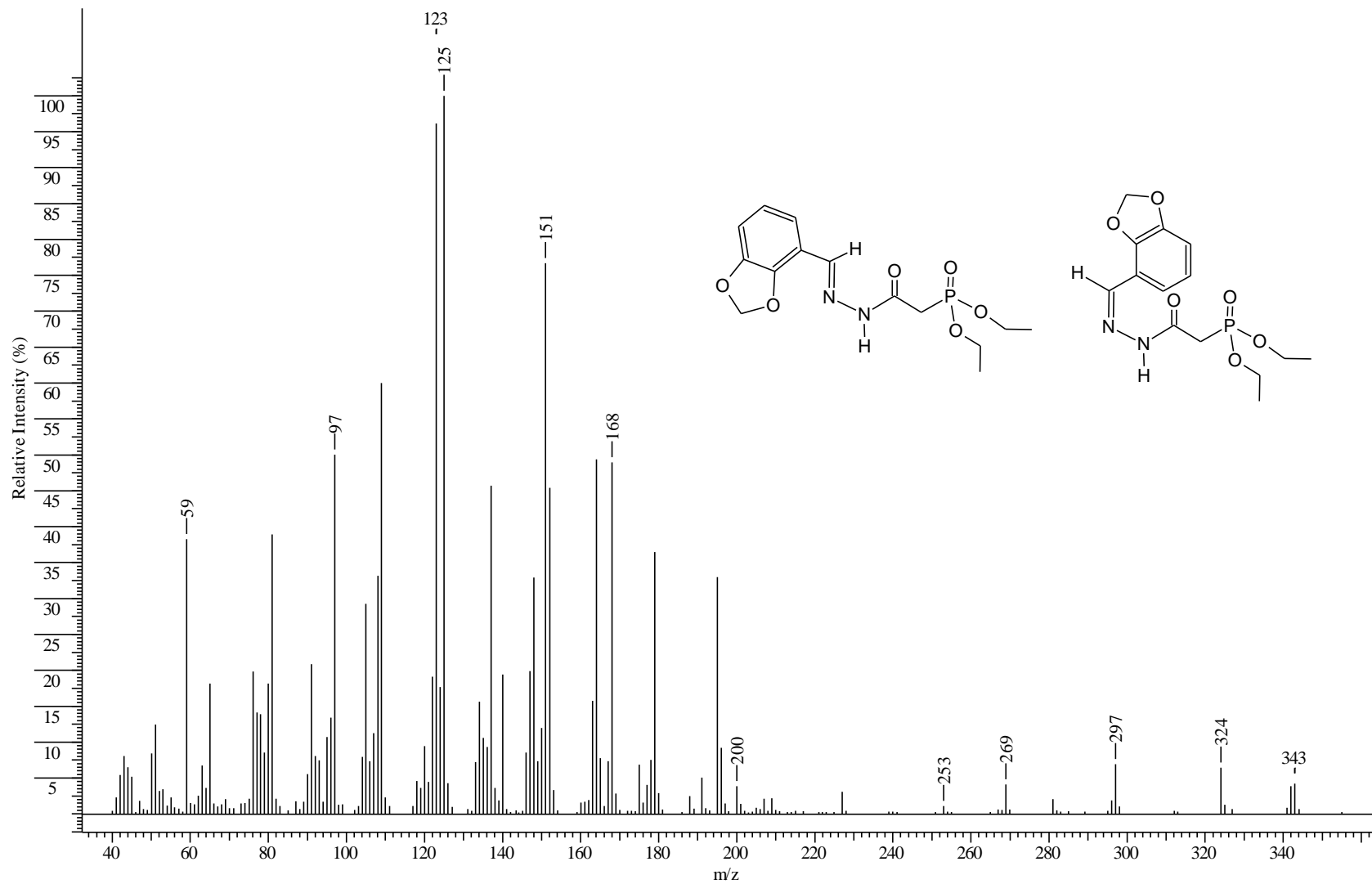


**Figura 46** - Espectro de RMN  $^{31}\text{P}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) - [2(*E/Z*)-2-(1,3-benzodioxol-4-ilmetileno)hidrazinil]-2-oxoetilfosfonato de dietila (2).

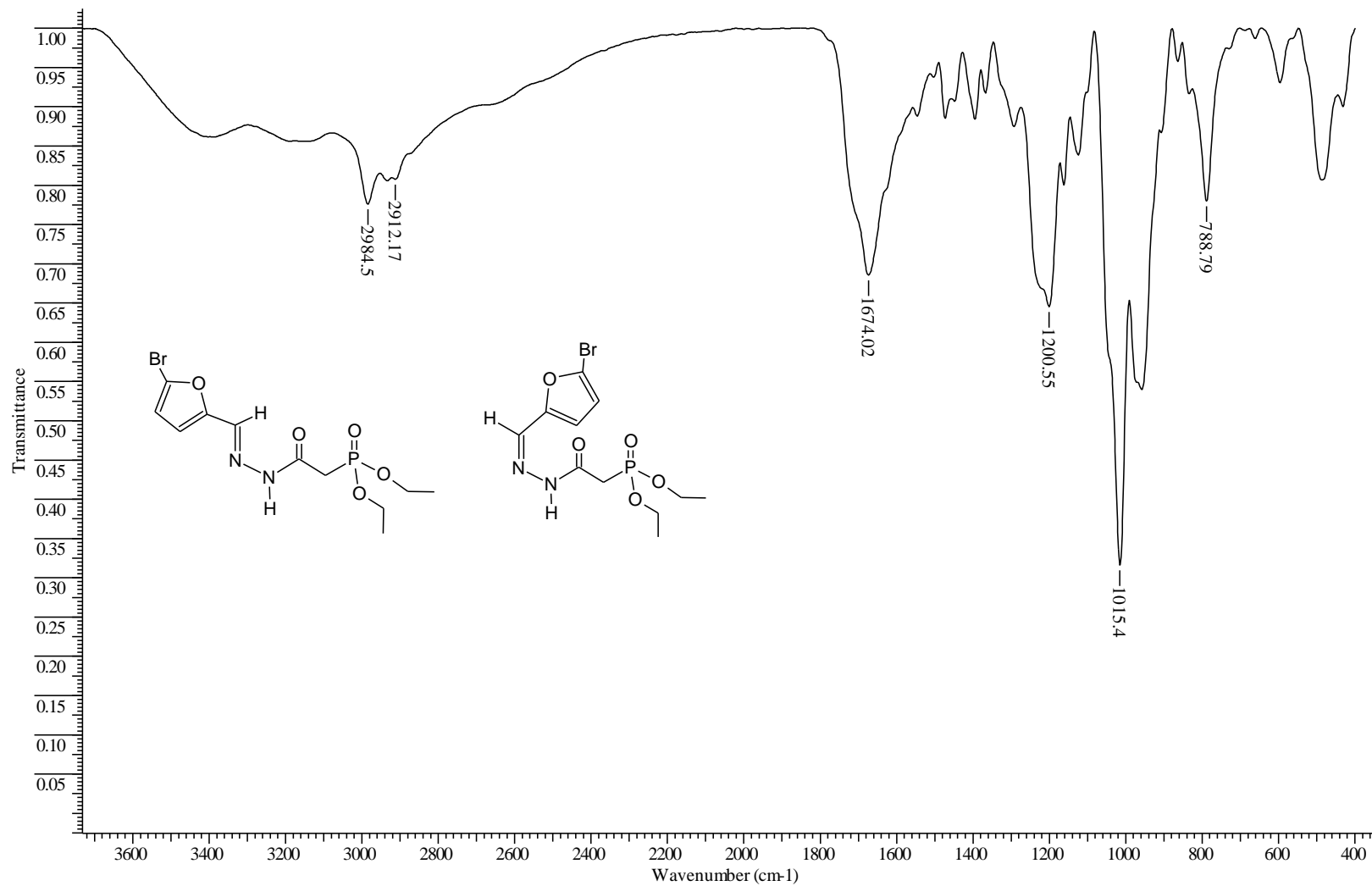




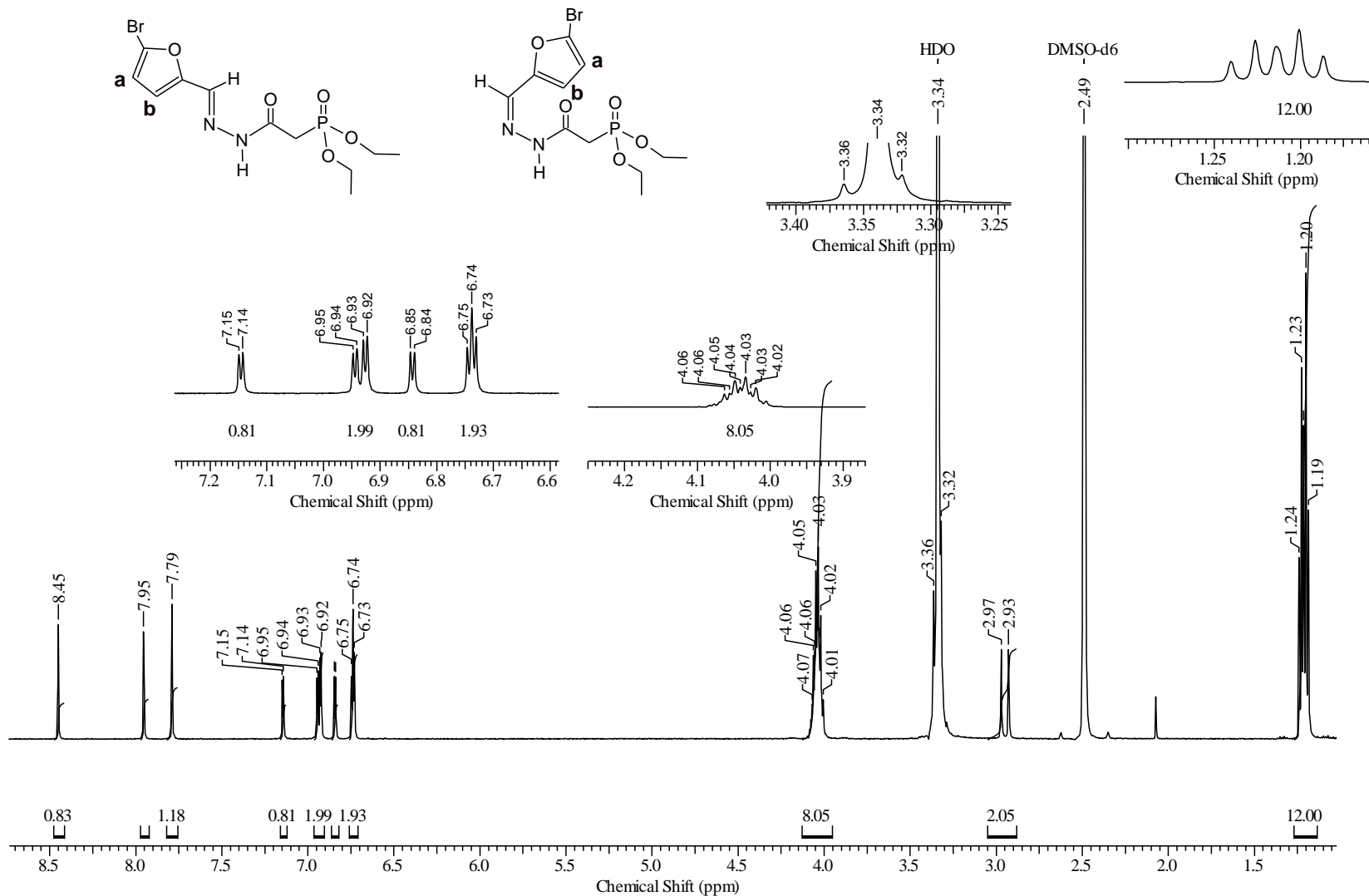
**Figura 47** - Espectro de RMN  $^{31}\text{P}_{\text{CPD}}(\text{CDCl}_3)$  - [2(*E/Z*)-2-(1,3-benzodioxol-4-ilmetileno)hidrazinil]-2-oxoetilfosfonato de dietila (2).



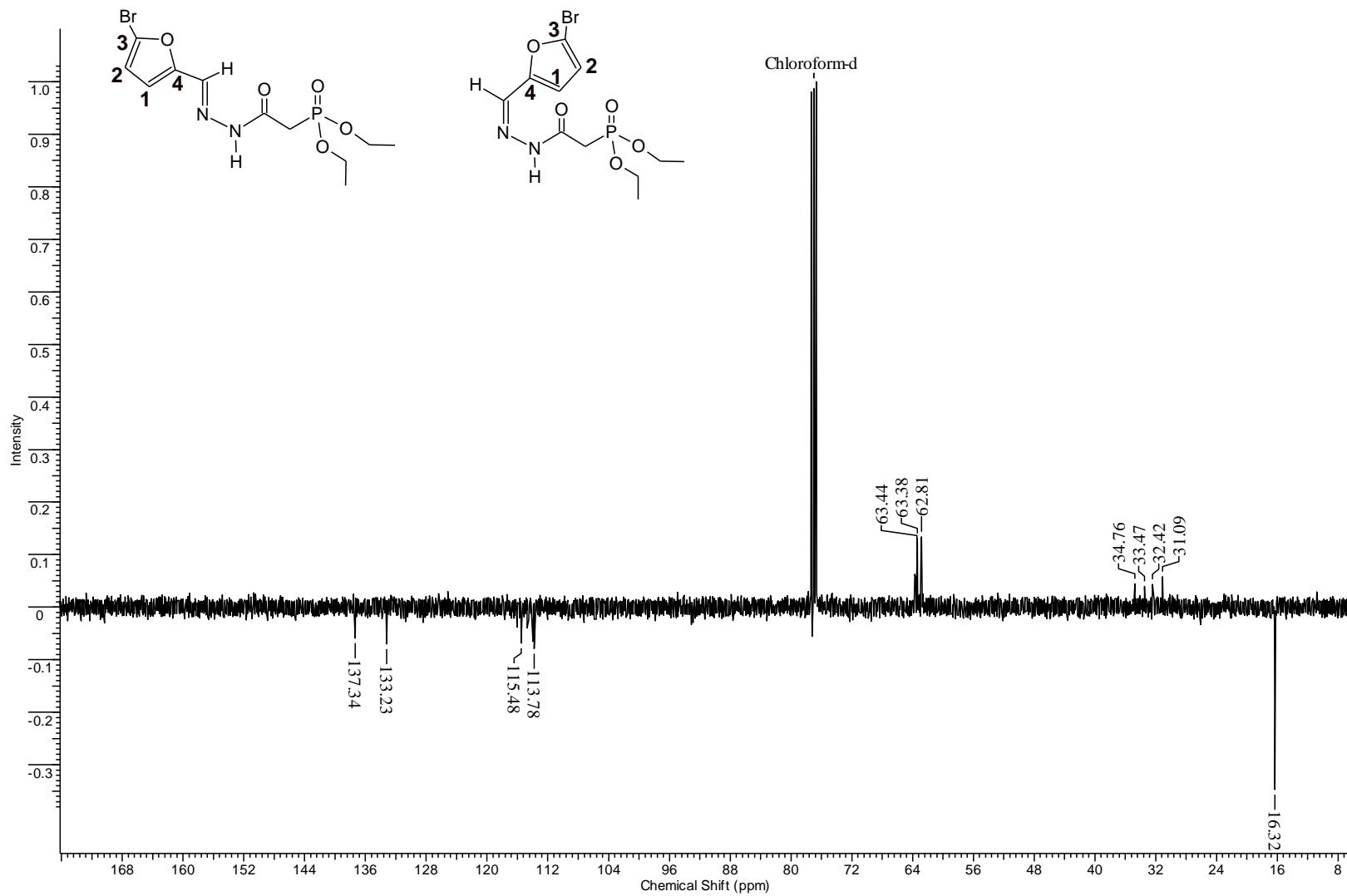
**Figura 48** - Espectro de massas - [2(*E/Z*)-2-(1,3-benzodioxol-4-ilmetileno)hidrazinil]-2-oxoetilfosfonato de dietila (2).



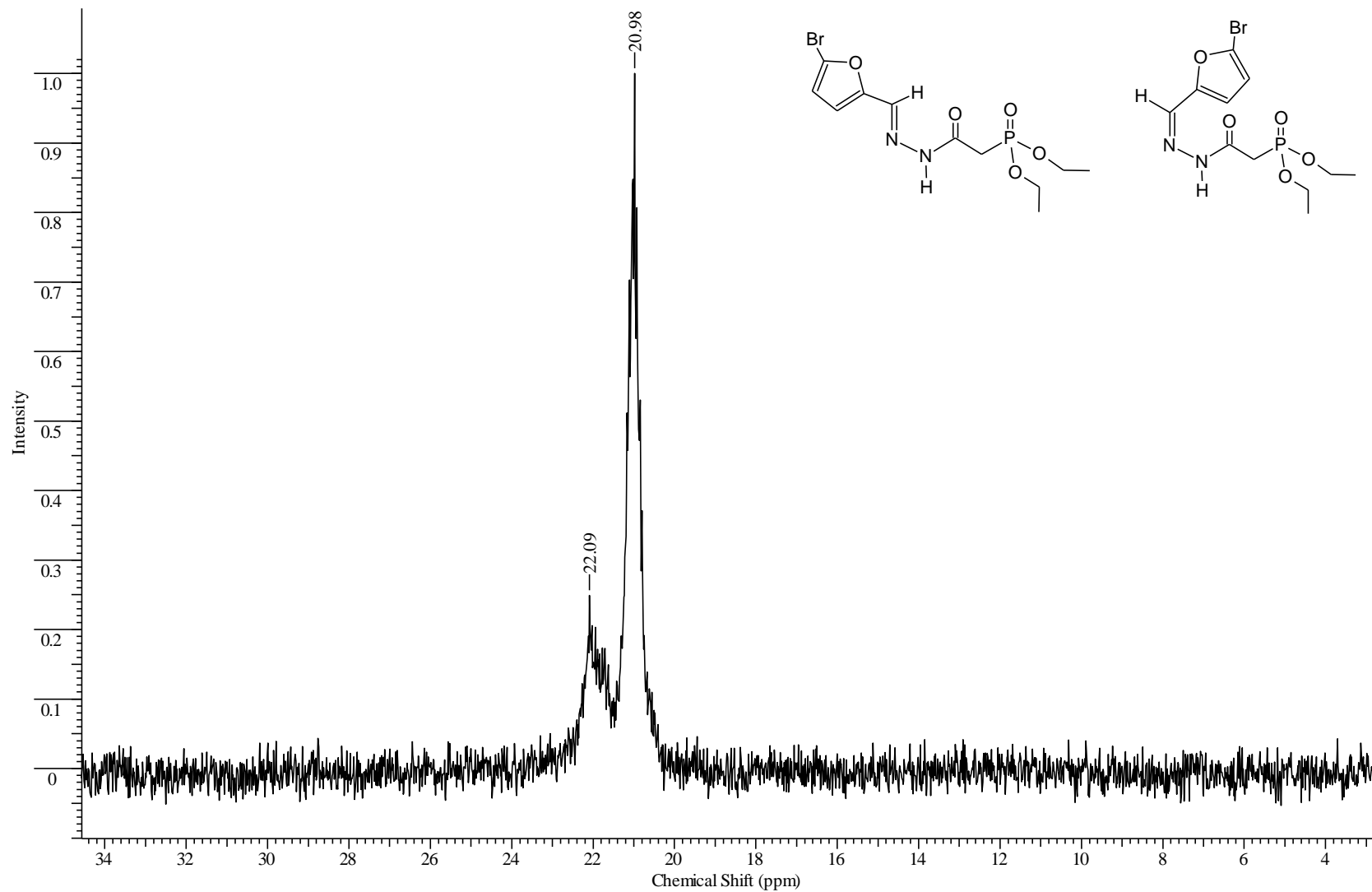
**Figura 49** - Espectro de IV (Célula de NaCl) - {2(*E/Z*) -2 - [(5-bromo-2-furil) metileno]hidrazinil} -2- oxoetilfosfonato de dietila (3).



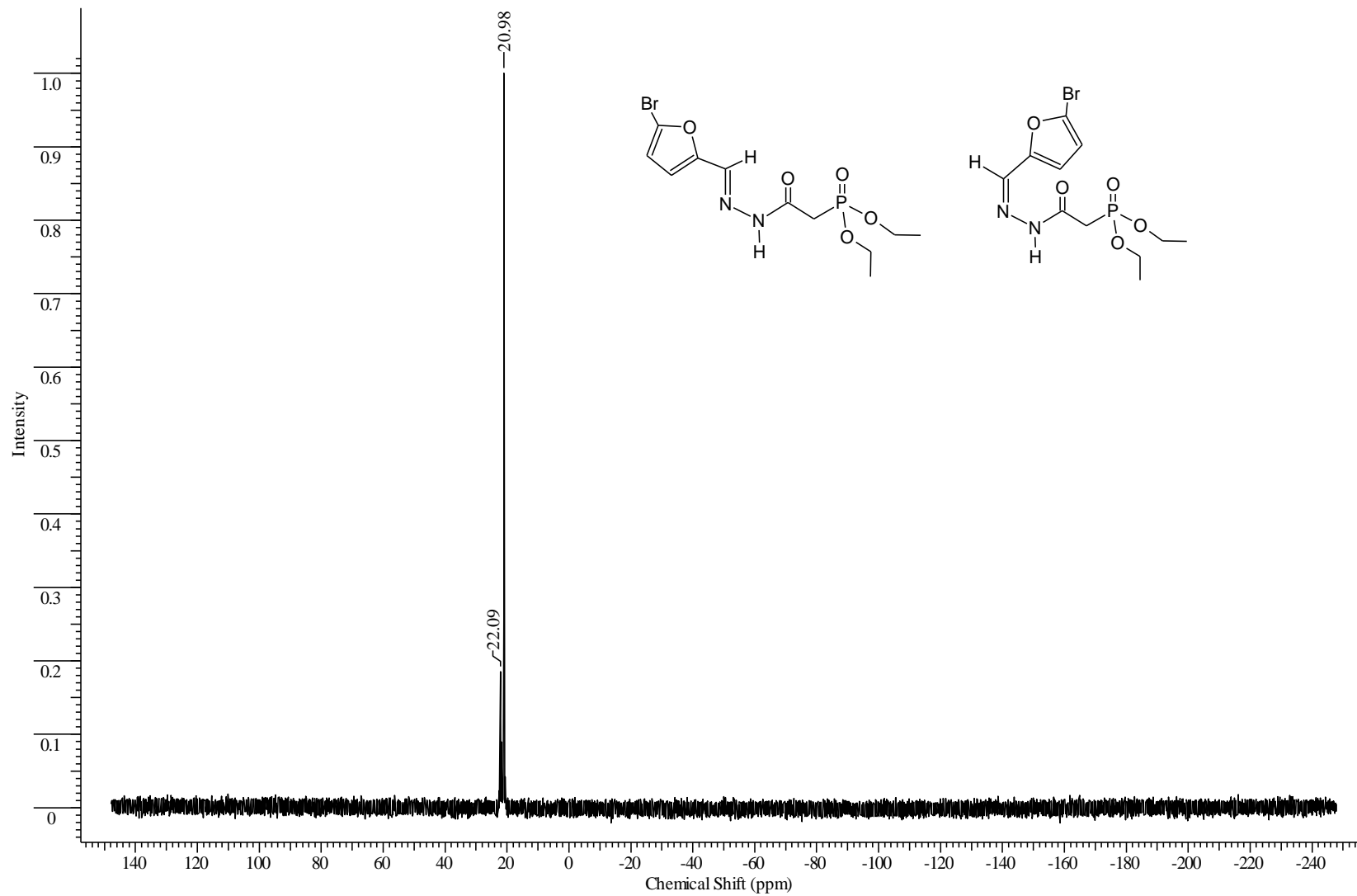
**Figura 50** - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (DMSO) - {2(*E/Z*) - 2 - [(5-bromo-2-furil) metileno]hidrazinil} -2- oxoetilfosfonato de dietila (3).



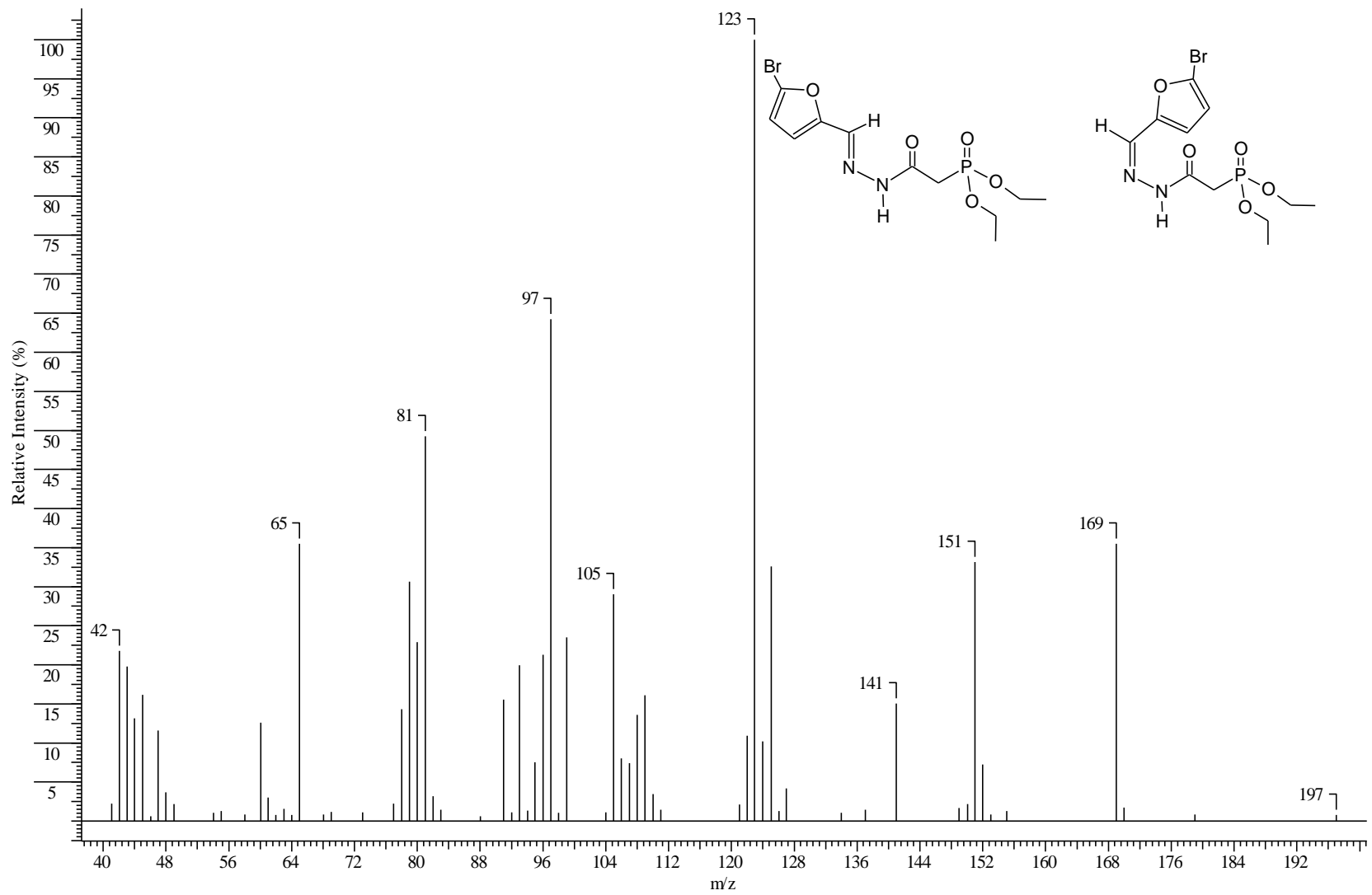
**Figura 51** - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) -  $\{2(E/Z) - 2 - [(5\text{-bromo-2-furil) metileno}]hidrazinil\} - 2\text{- oxoetilfosfonato de dietila (3)}$ .



**Figura 52** - Espectro de RMN  $^{31}\text{P}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) - {2(E/Z) - 2 - [(5-bromo-2-furil) metileno]hidrazinil} -2- oxoetilfosfonato de dietila (3).

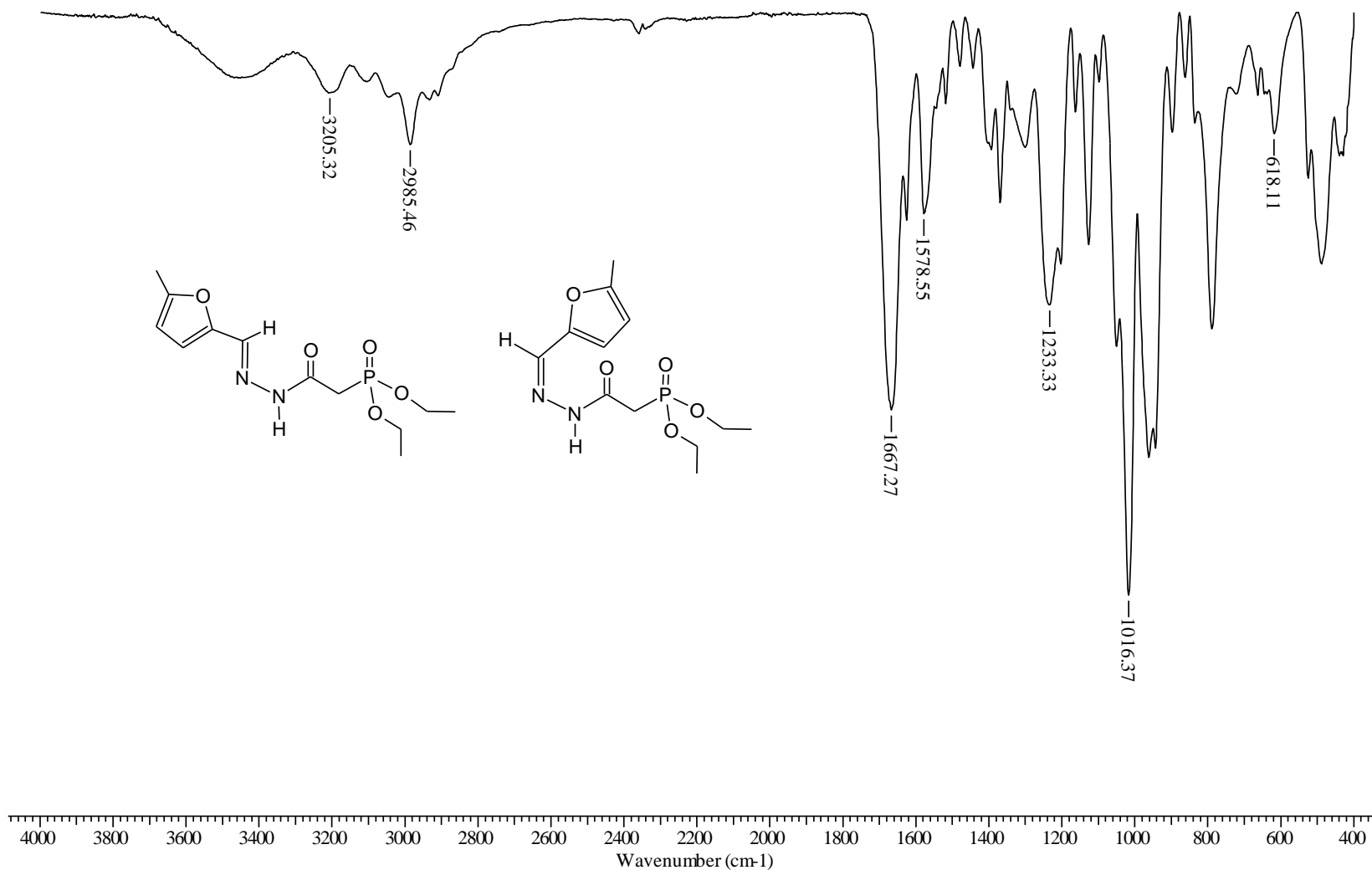


**Figura 53** - Espectro de RMN  $^{31}\text{P}_{\text{CPD}}(\text{CDCl}_3)$  - {2(*E/Z*) -2 - [(5-bromo-2-furil) metileno]hidrazinil} -2- oxoetilfosfonato de dietila (3).

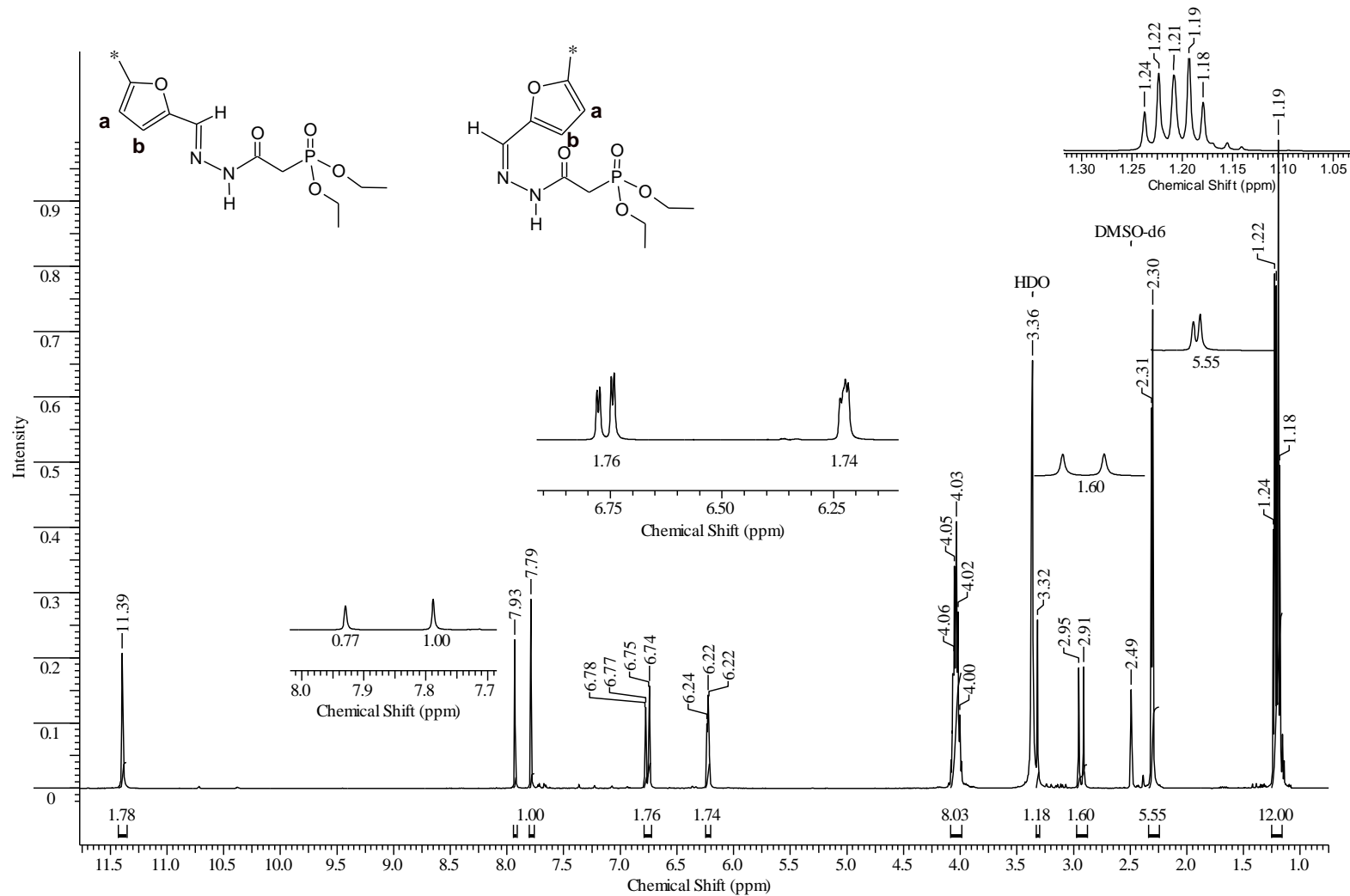


**Figura 54** - Espectro de Massas - {2(*E/Z*)-2 - [(5-bromo-2-furil) metileno]hidrazinil} -2- oxoetilfosfonato de dietila (3).

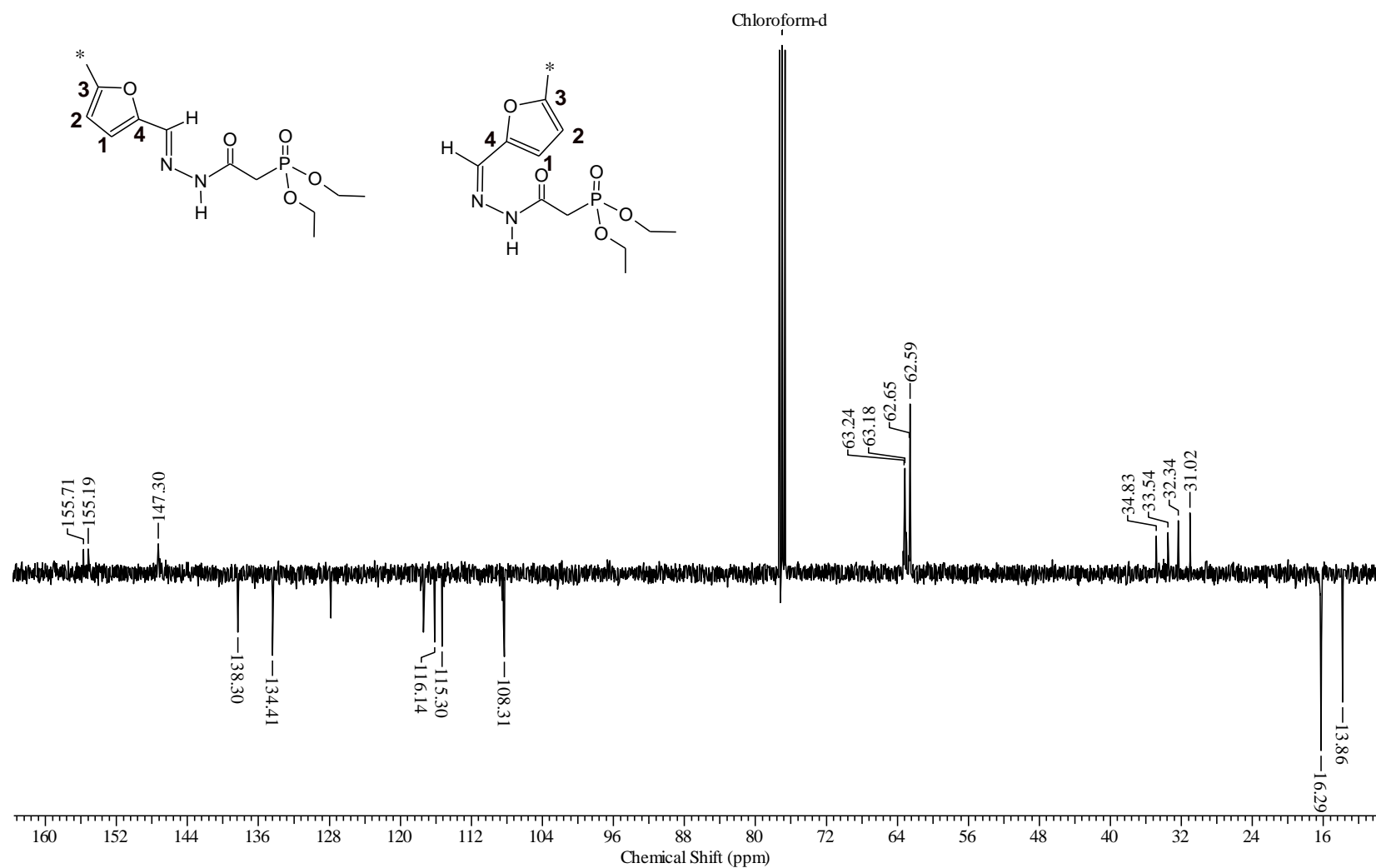




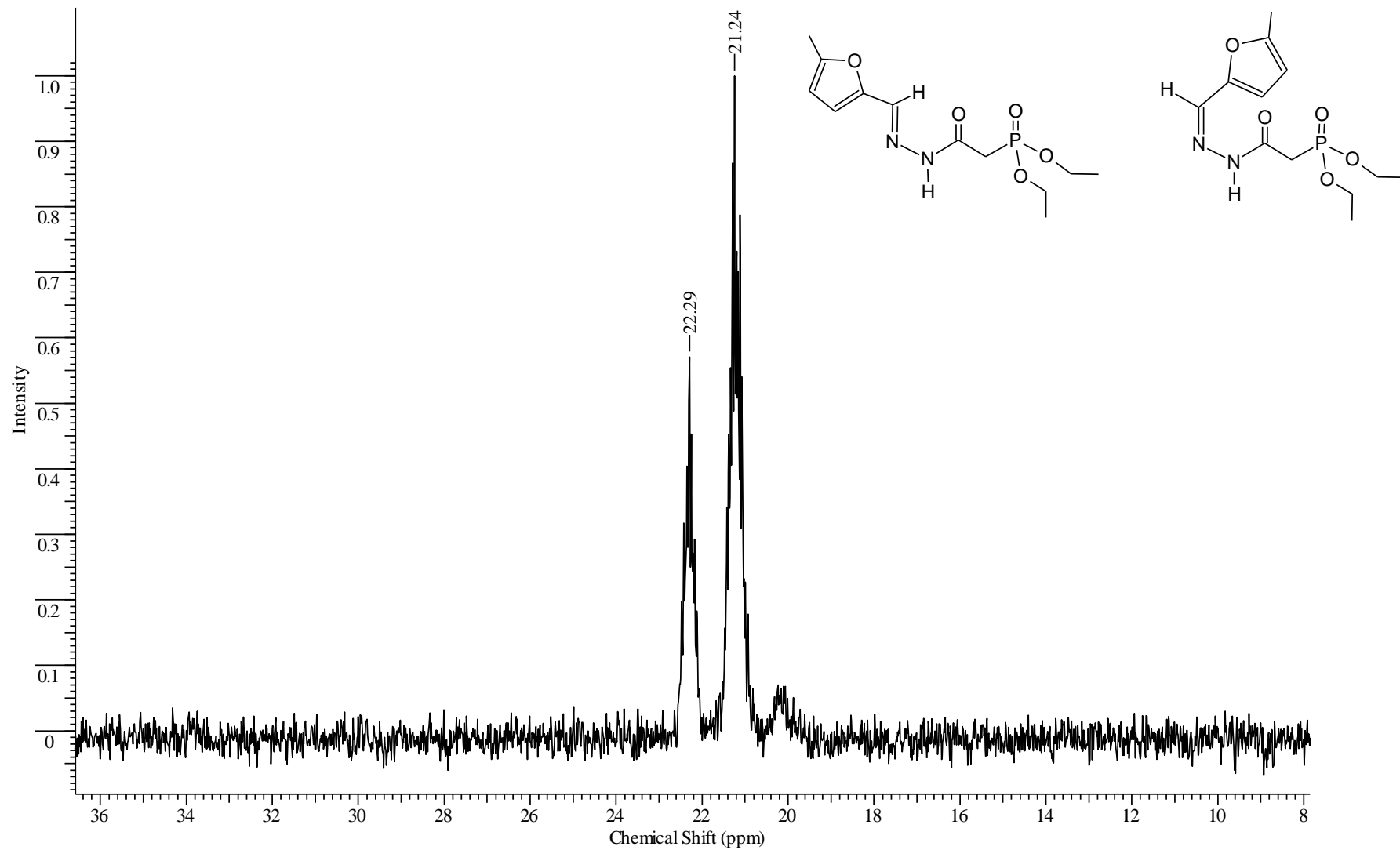
**Figura 55** - Espectro de IV (Célula de NaCl) - {2(*E/Z*)-2 - [(5-metil-2-furil) metileno]hidrazinil} -2- oxoetilfosfonato de dietila (4).



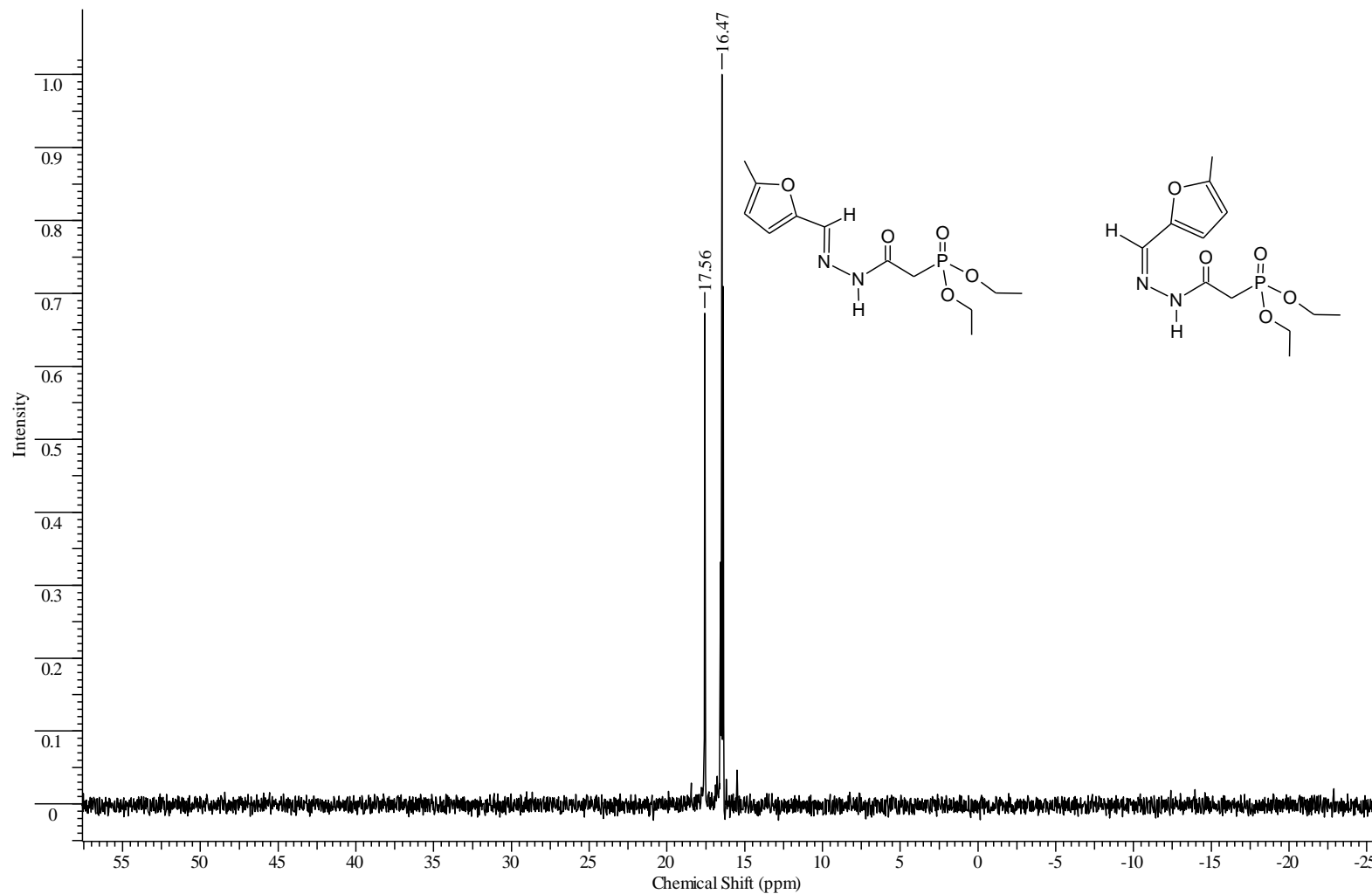
**Figura 56** - Espectro de RMN <sup>1</sup>H (DMSO) - {2(E/Z)-2-[(5-metil-2-furil) metileno]hidrazinil}-2-oxoetilfosfonato de dietila (4).



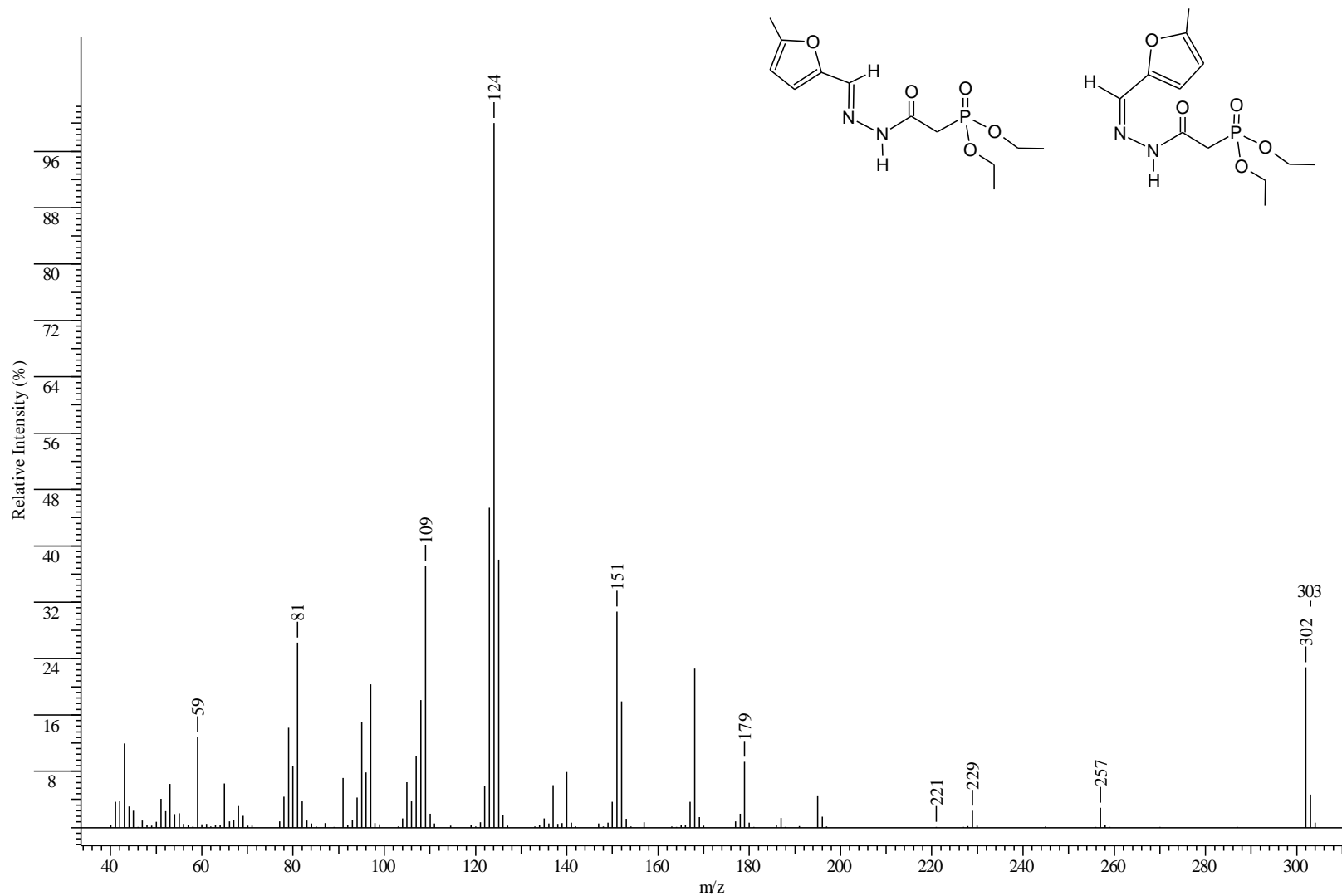
**Figura 57** - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) - {2(*E/Z*) -2 - [(5-metil-2-furil) metileno]hidrazinil} -2- oxoetilfosfonato de dietila (4).



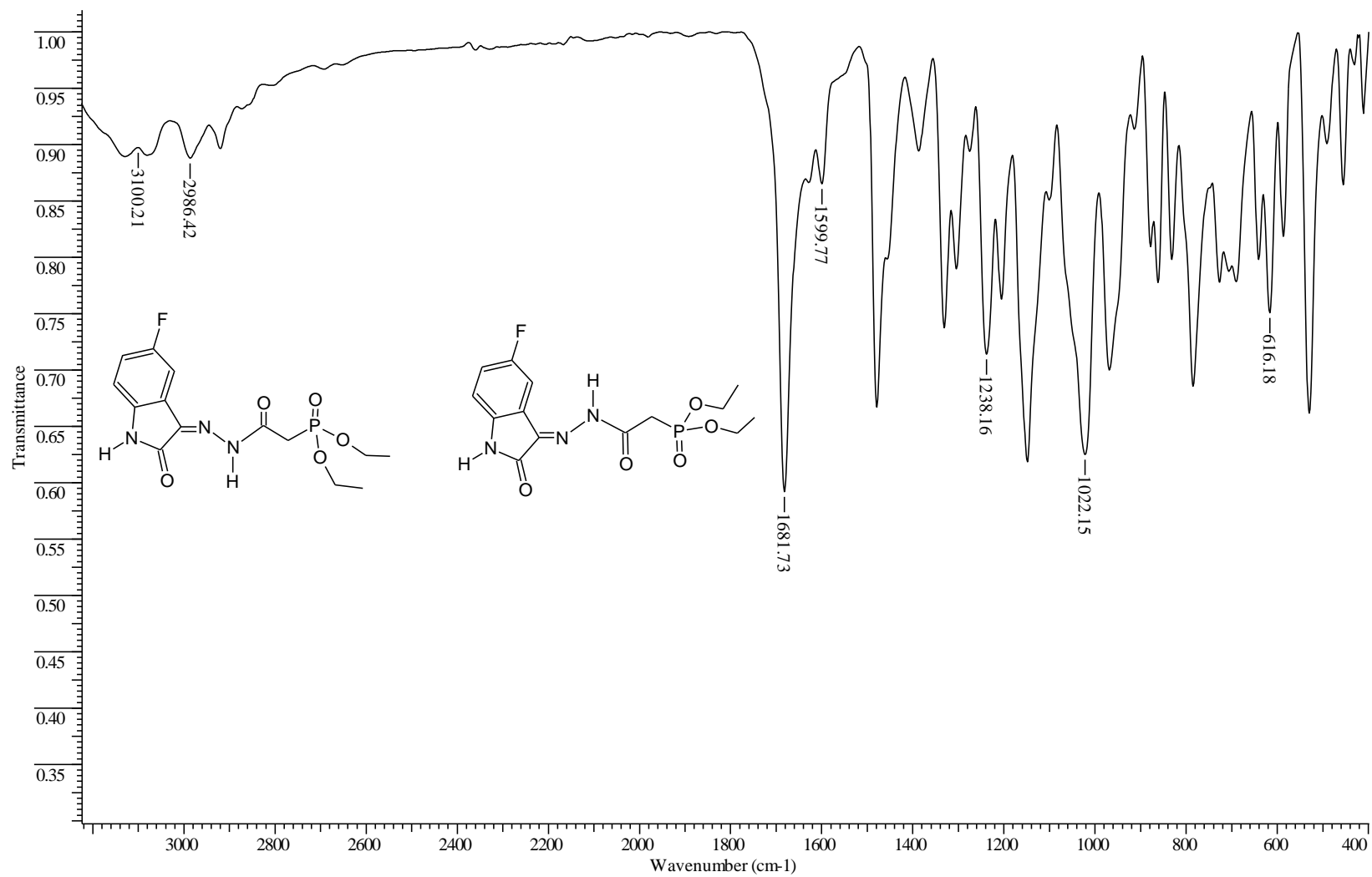
**Figura 58** - Espectro de RMN  $^{31}\text{P}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) - {2(*E/Z*) -2 - [(5-metil-2-furil) metileno]hidrazinil} -2- oxoetilfosfonato de dietila (4).



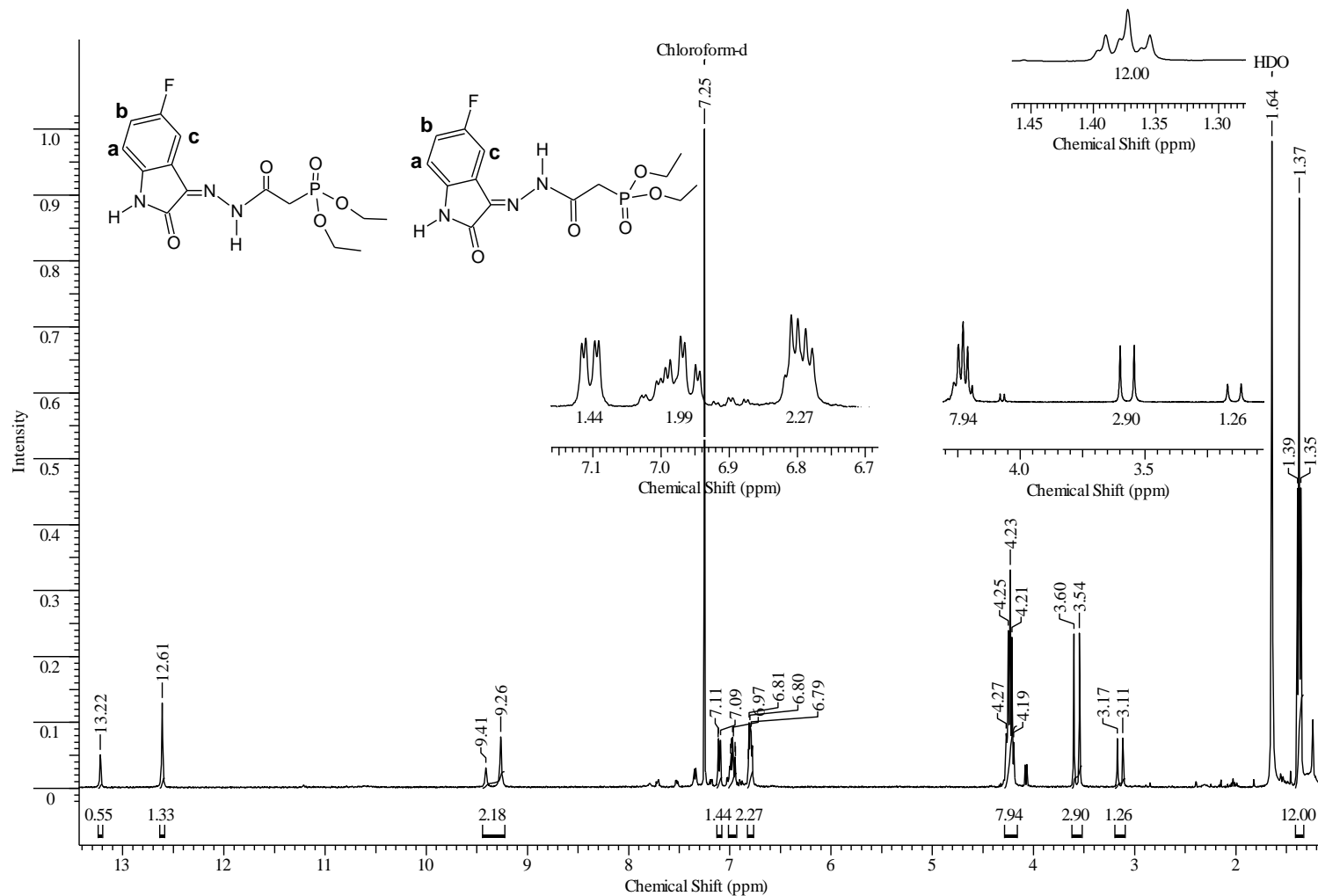
**Figura 59** - Espectro de RMN  $^{31}\text{P}_{\text{CPD}}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) - {2(*E/Z*) -2 - [(5-metil-2-furil) metileno]hidrazinil} -2- oxoetilfosfonato de dietila (4).



**Figura 60** - Espectro de Massas - {2(*E/Z*)-2-[(5-metil-2-furil) metileno]hidrazinil}-2-oxoetilfosfonato de dietila (4).

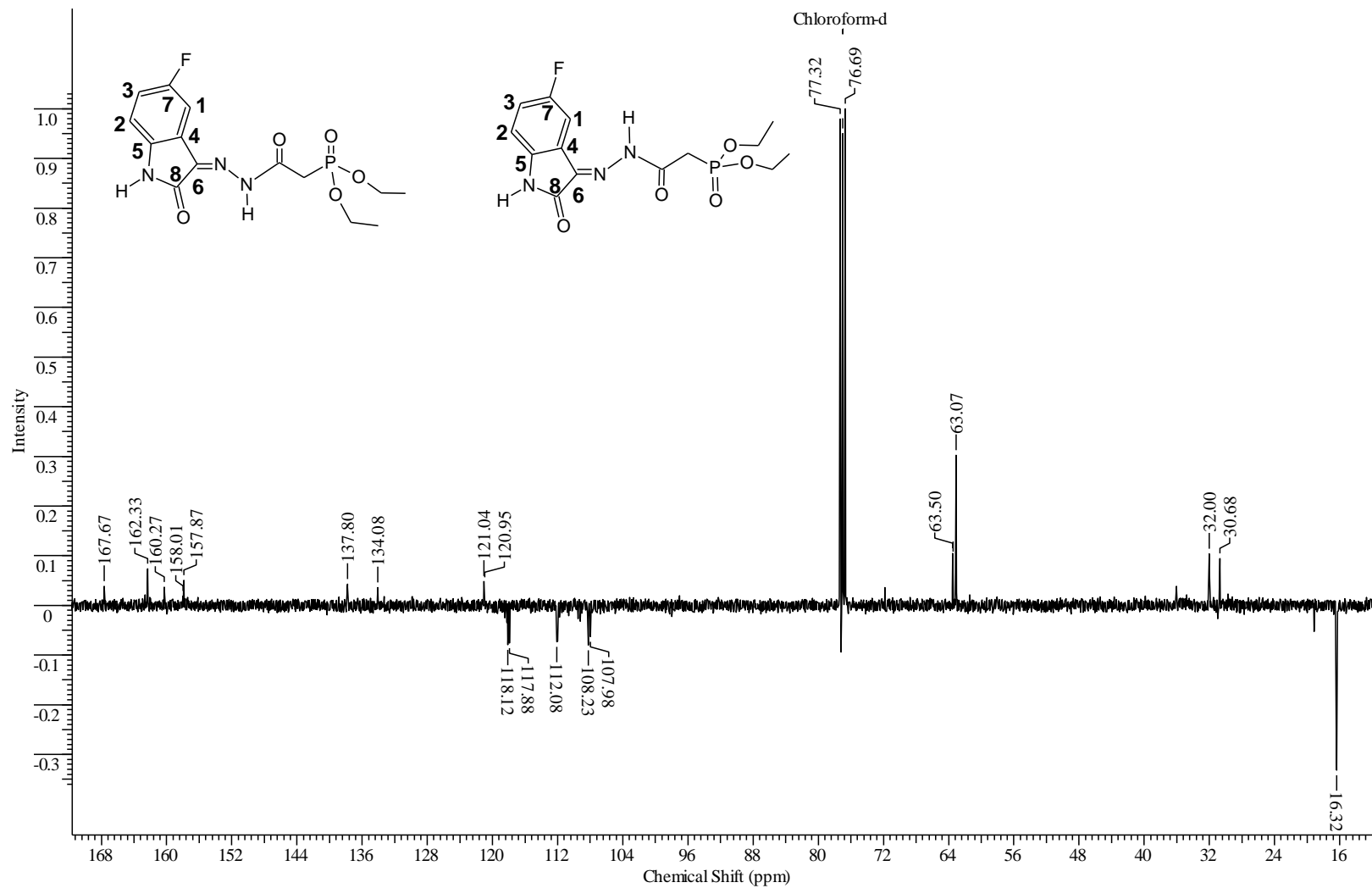


**Figura 61** - Espectro de IV (Célula de NaCl) - [2(*E/Z*) -2- (5-fluoro-2-oxo-1,2-di-hidro-3H-indol-3-ilideno)hidrazinil] -2- oxoetilfosfonato de dietila (5).

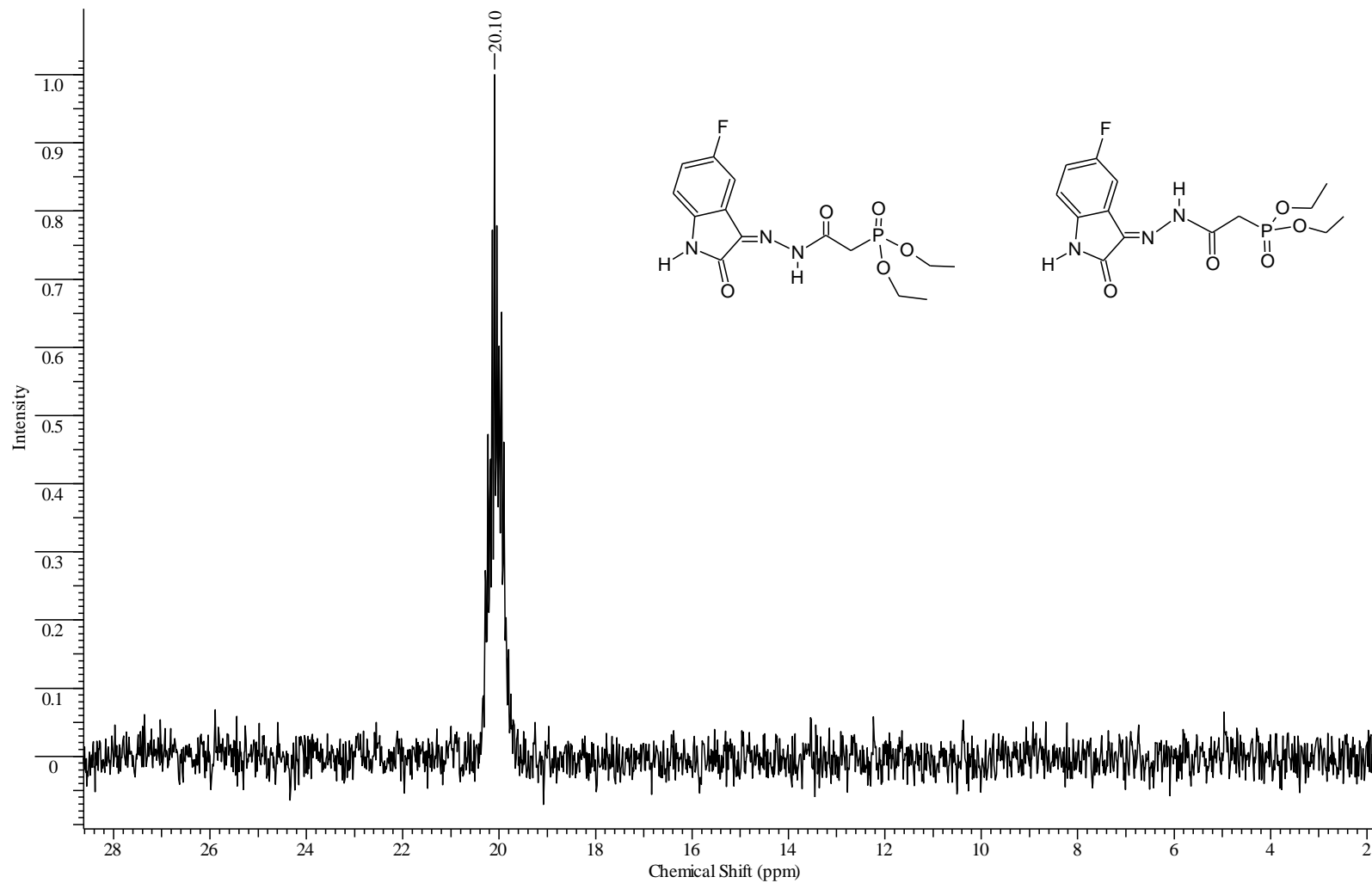


**Figura 62** - Espectro de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) - [2(*E/Z*)-2-(5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-3H-indol-3-ilideno)hidrazinil]-2-oxoetilfosfonato de dietila (5).

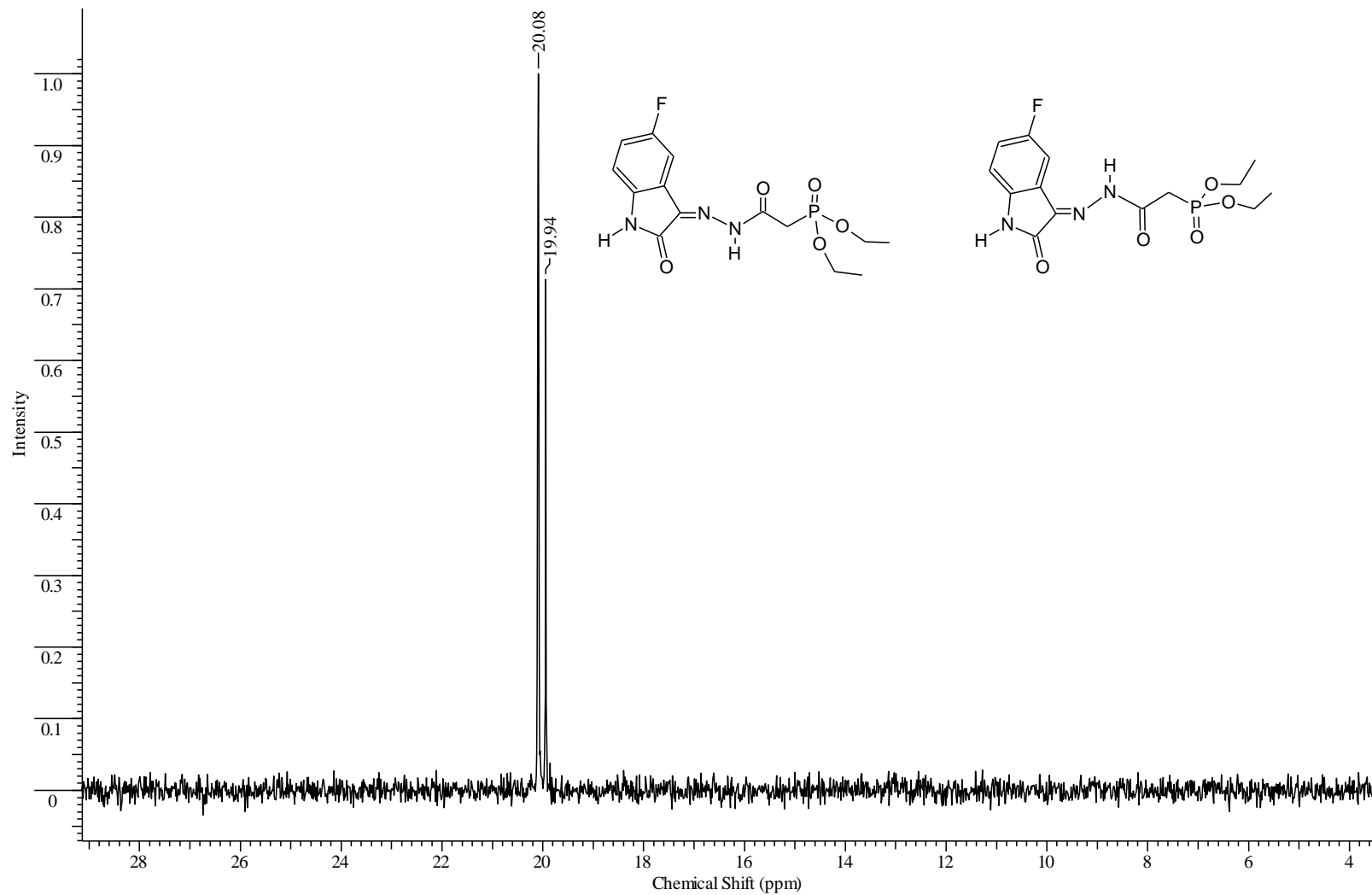




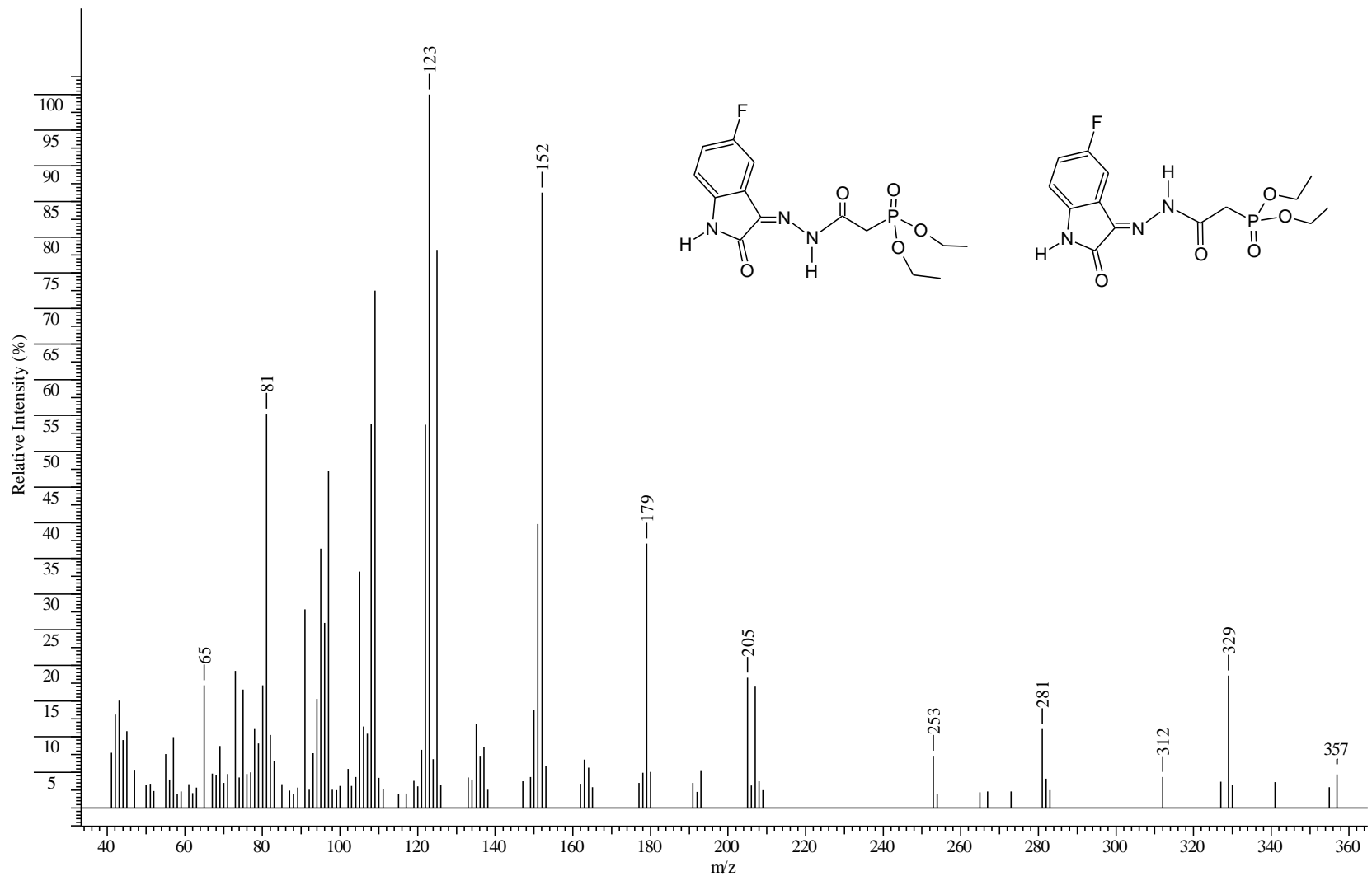
**Figura 63** - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) - [2(*E/Z*)-2-(5-fluoro-2-oxo-1,2-di-hidro-3H-indol-3-ilideno)hidrazinil]-2-oxoetilfosfonato de dietila (5).



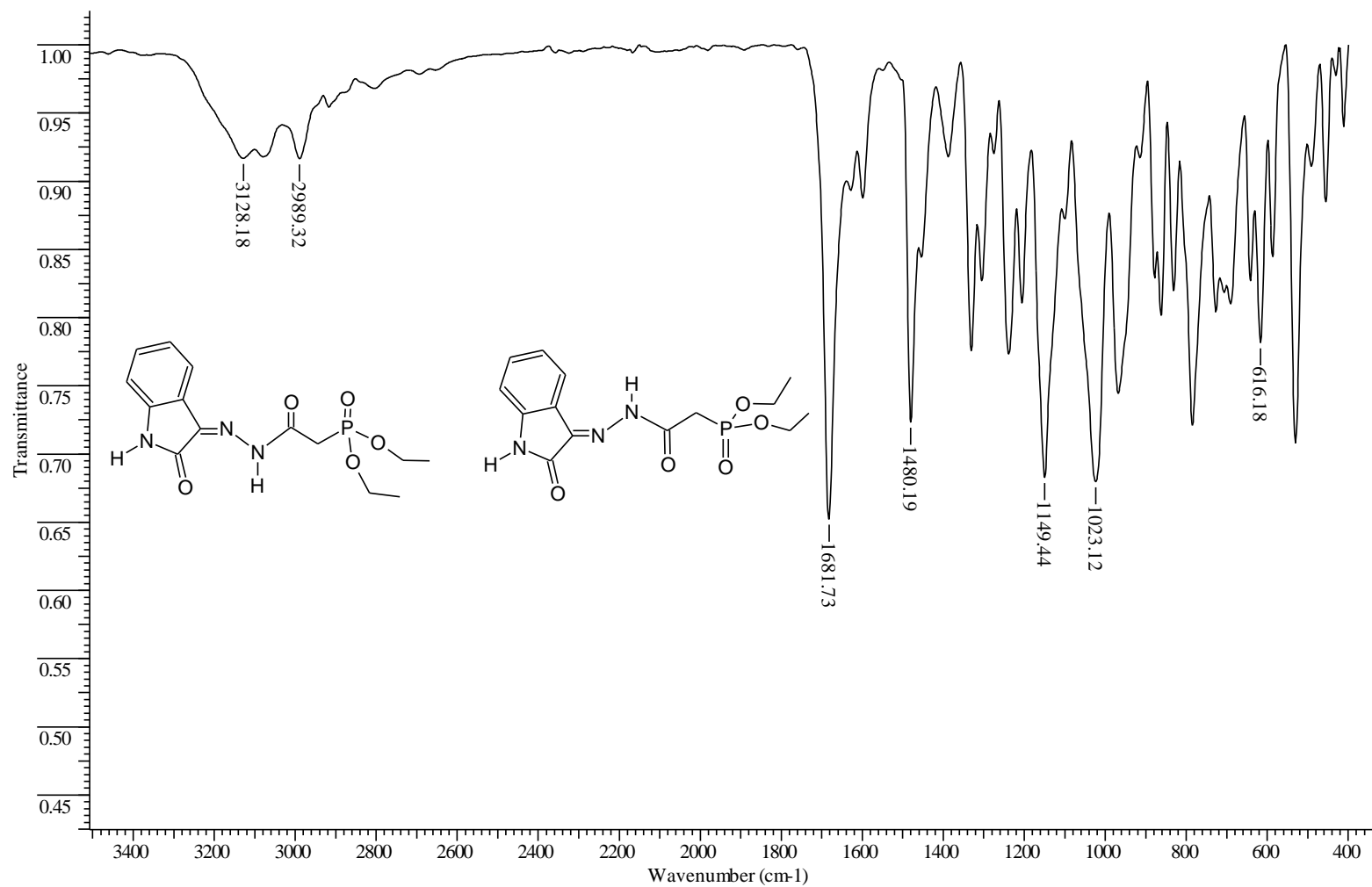
**Figura 64** - Espectro de RMN  $^{31}\text{P}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) - [2(*E/Z*)-2-(5-fluoro-2-oxo-1,2-di-hidro-3H-indol-3-ilideno)hidrazinil]-2-oxoetilfosfonato de dietila (5).



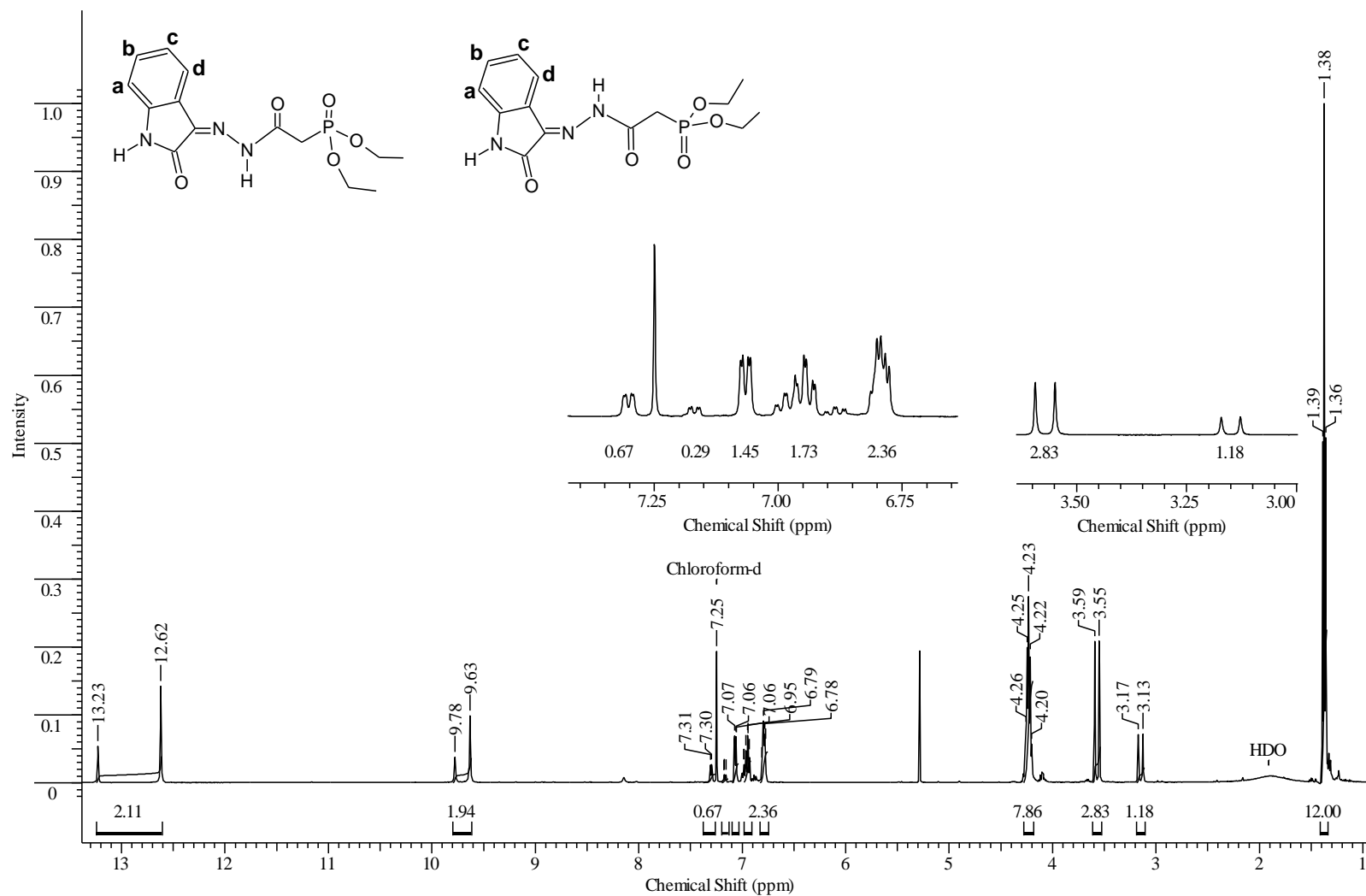
**Figura 65** - Espectro de RMN  $^{31}\text{P}_{\text{CPD}}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) - [2(E/Z) -2- (5-fluoro-2-oxo-1,2-di-hidro-3H-indol-3-ilideno)hidrazinil] -2- oxoetilfosfonato de dietila (5).



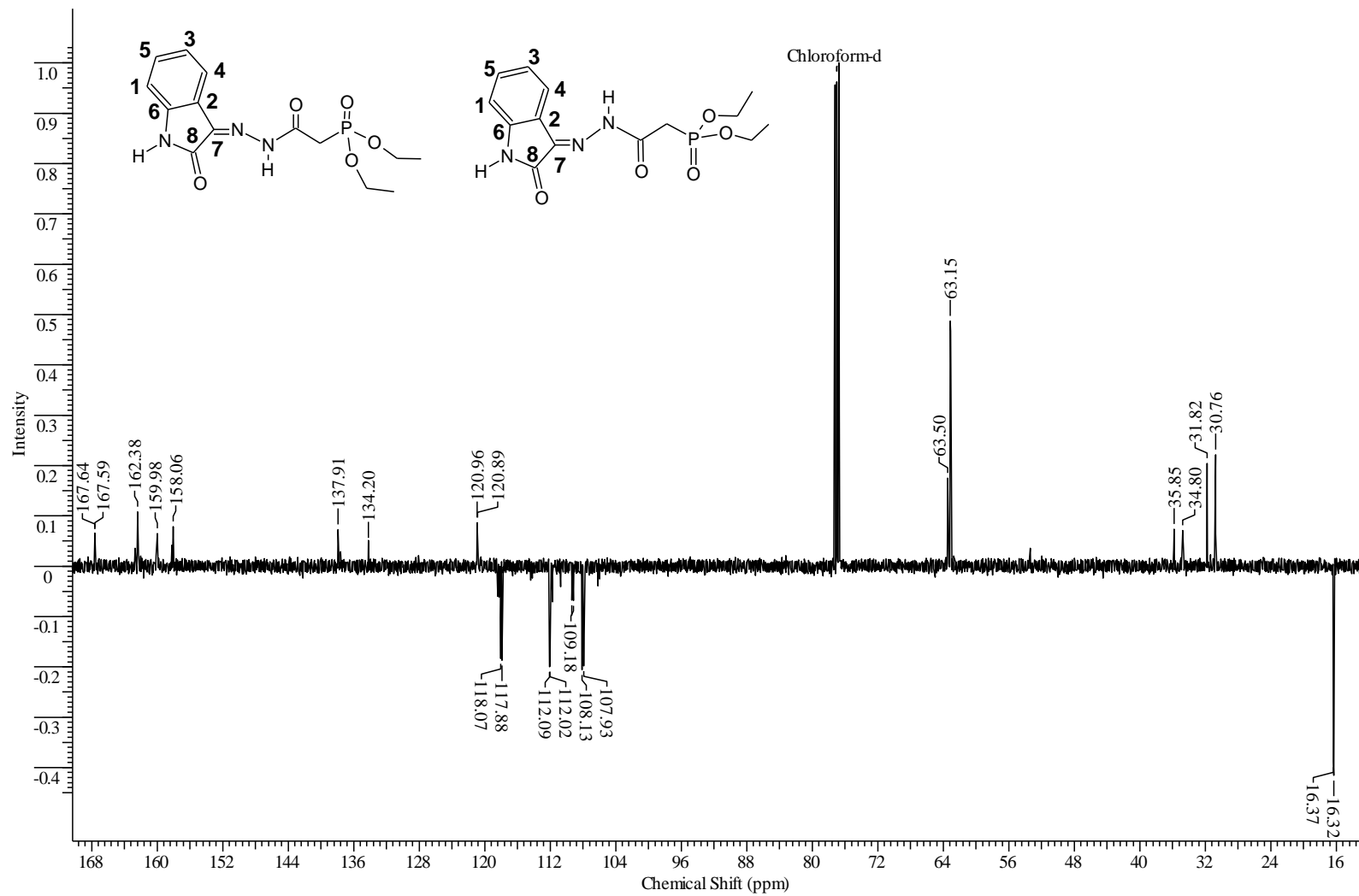
**Figura 66** - Espectro de Massas - [2(E/Z)-2-(5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-3H-indol-3-ilideno)hidrazinil]-2-oxoetilfosfonato de dietila (5).



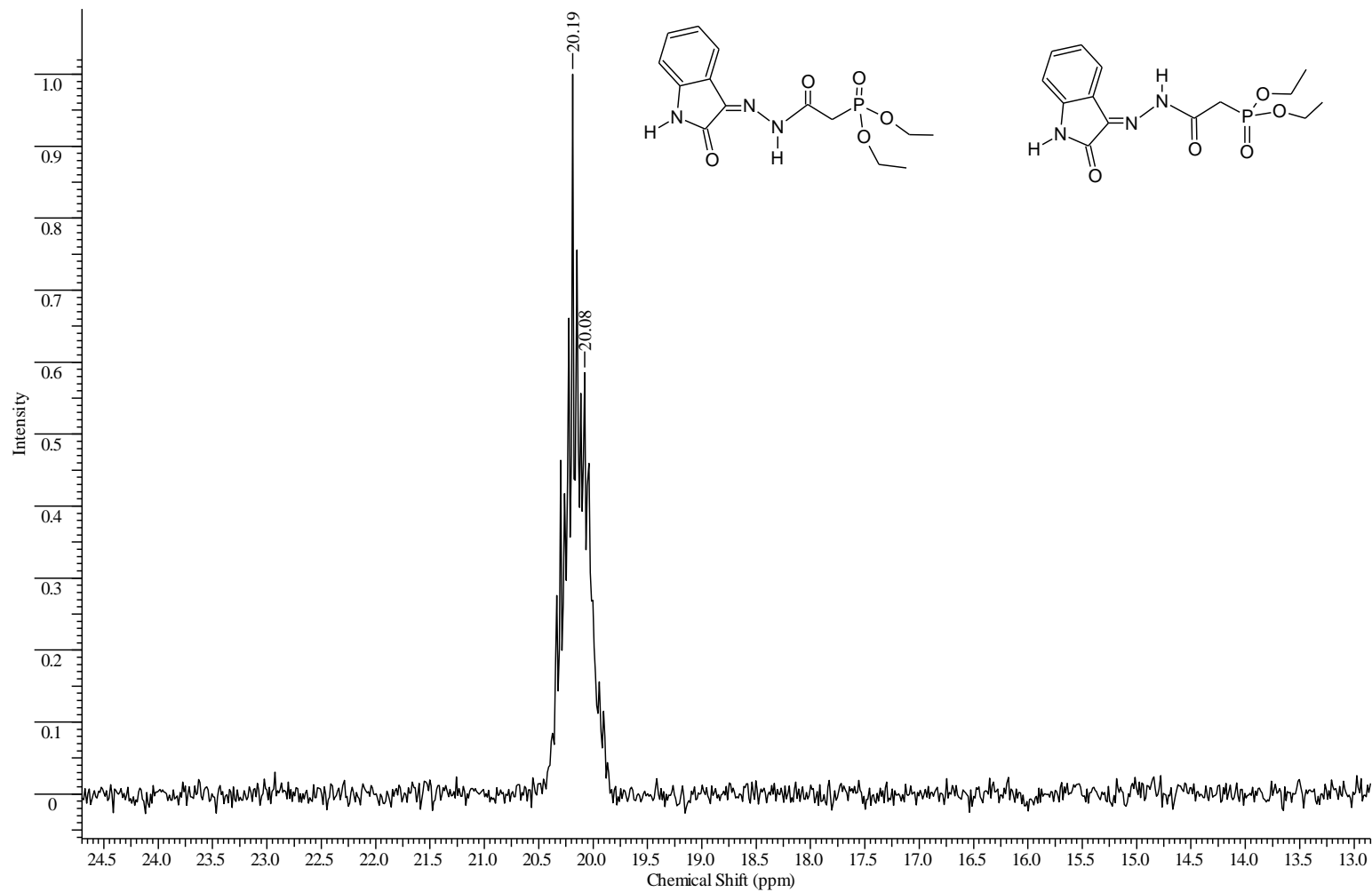
**Figura 67** - Espectro de IV (Célula de NaCl) - [2(*E/Z*)-2- (2-oxo-1,2-di-hidro-3H-indol-3-ilideno)hidrazinil] -2-oxoetilfosfonato de dietila (6).



**Figura 68** - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) - [2(*E/Z*)-2-(2-oxo-1,2-dihidro-3H-indol-3-ilideno)hidrazinil]-2-oxoetilfosfonato de dietila (6).

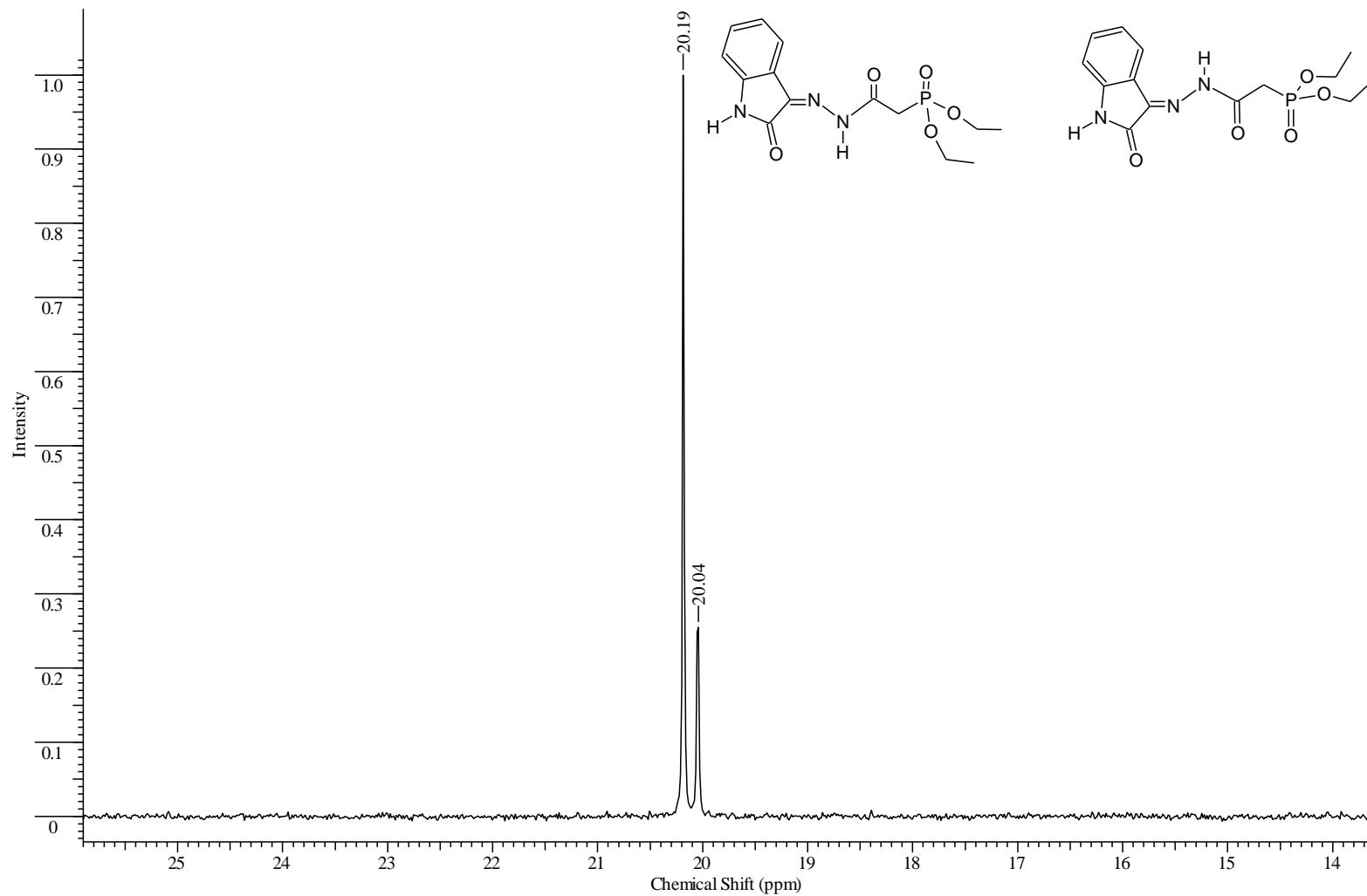


**Figura 69** - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) - [2(*E/Z*)-2-(2-oxo-1,2-di-hidro-3H-indol-3-ilideno)hidrazinil]-2-oxoetilfosfonato de dietila (6).

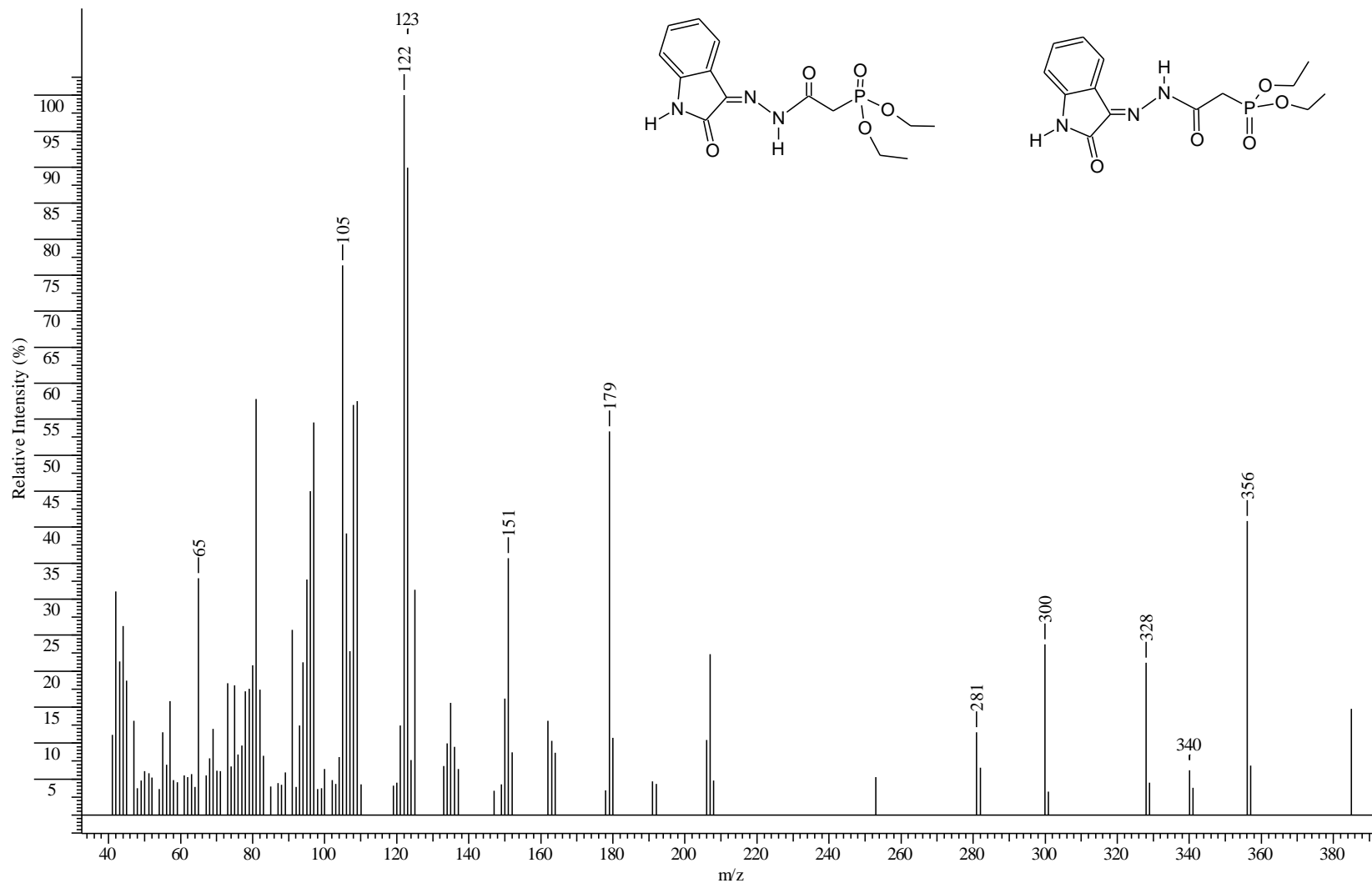


**Figura 70** - Espectro de RMN  $^{31}\text{P}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) - [2(E/Z) -2- (2-oxo-1,2-di-hidro-3H-indol-3-ilideno)hidrazinil] -2-oxoetilfosfonato de dietila (6).

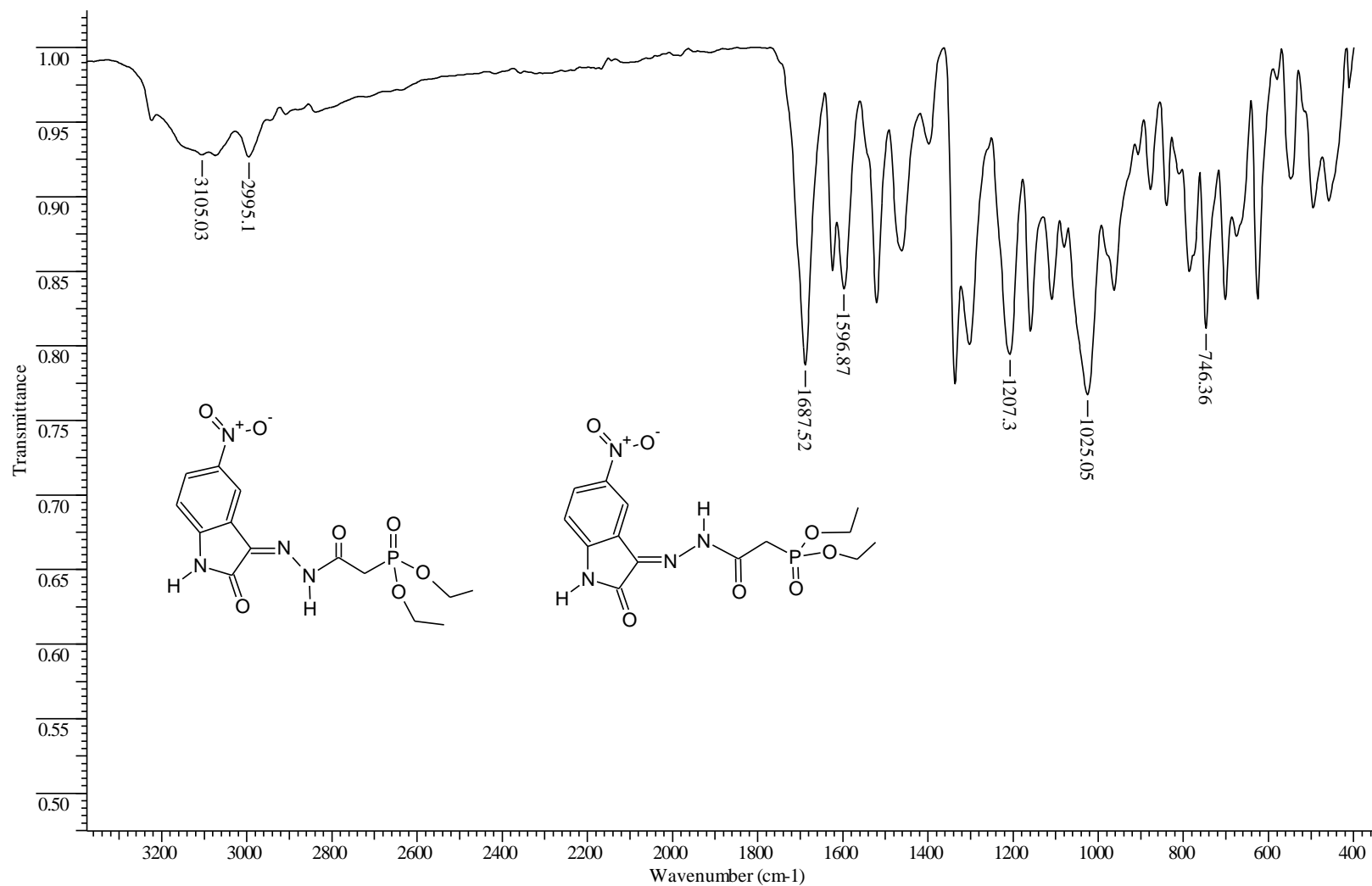




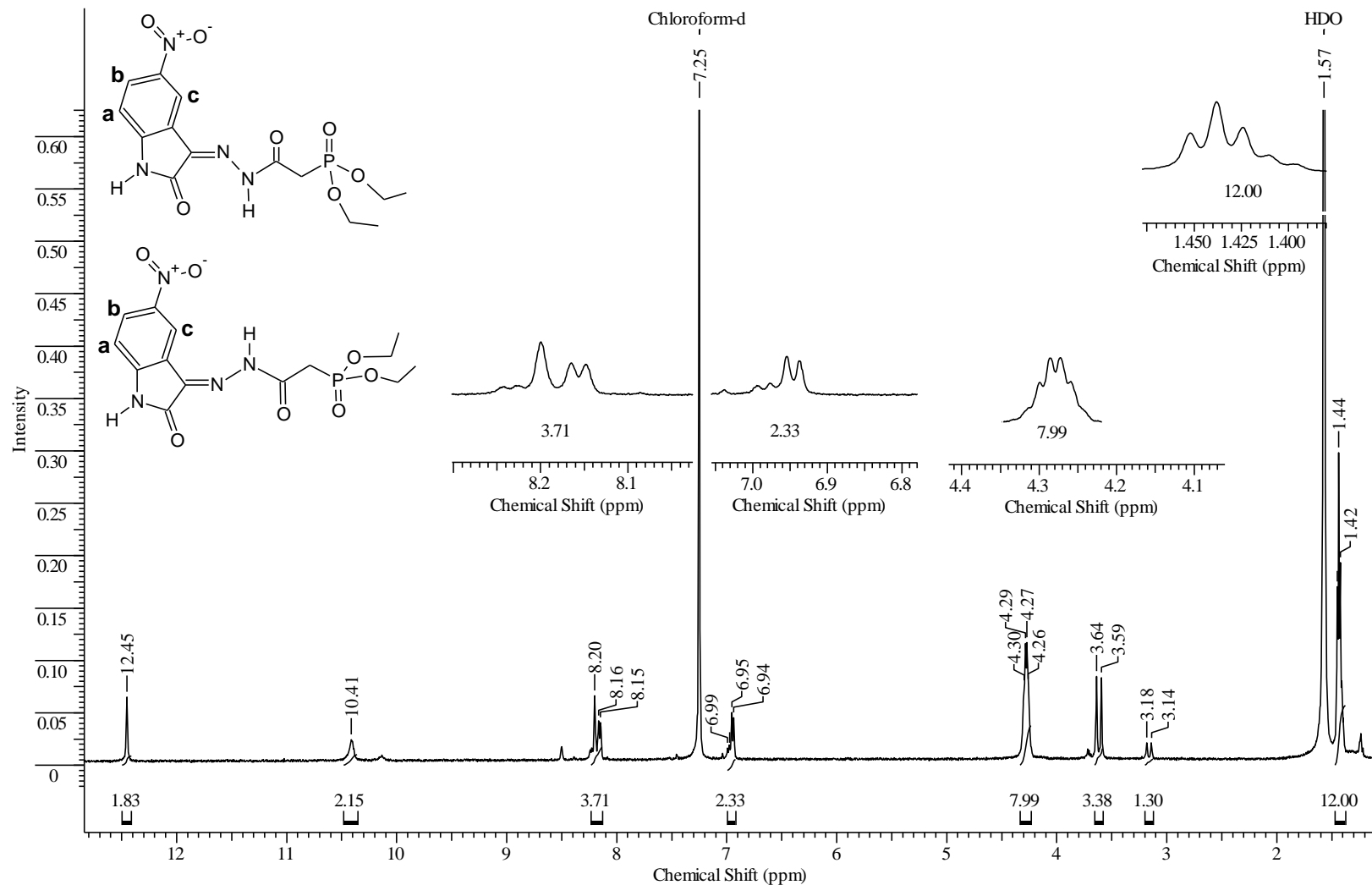
**Figura 71** - Espectro de RMN  $^{31}\text{P}_{\text{CPD}}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) - [2(*E/Z*) -2- (2-oxo-1,2-di-hidro-3H-indol-3-ilideno)hidrazinil] -2-oxoetilfosfonato de dietila (6).



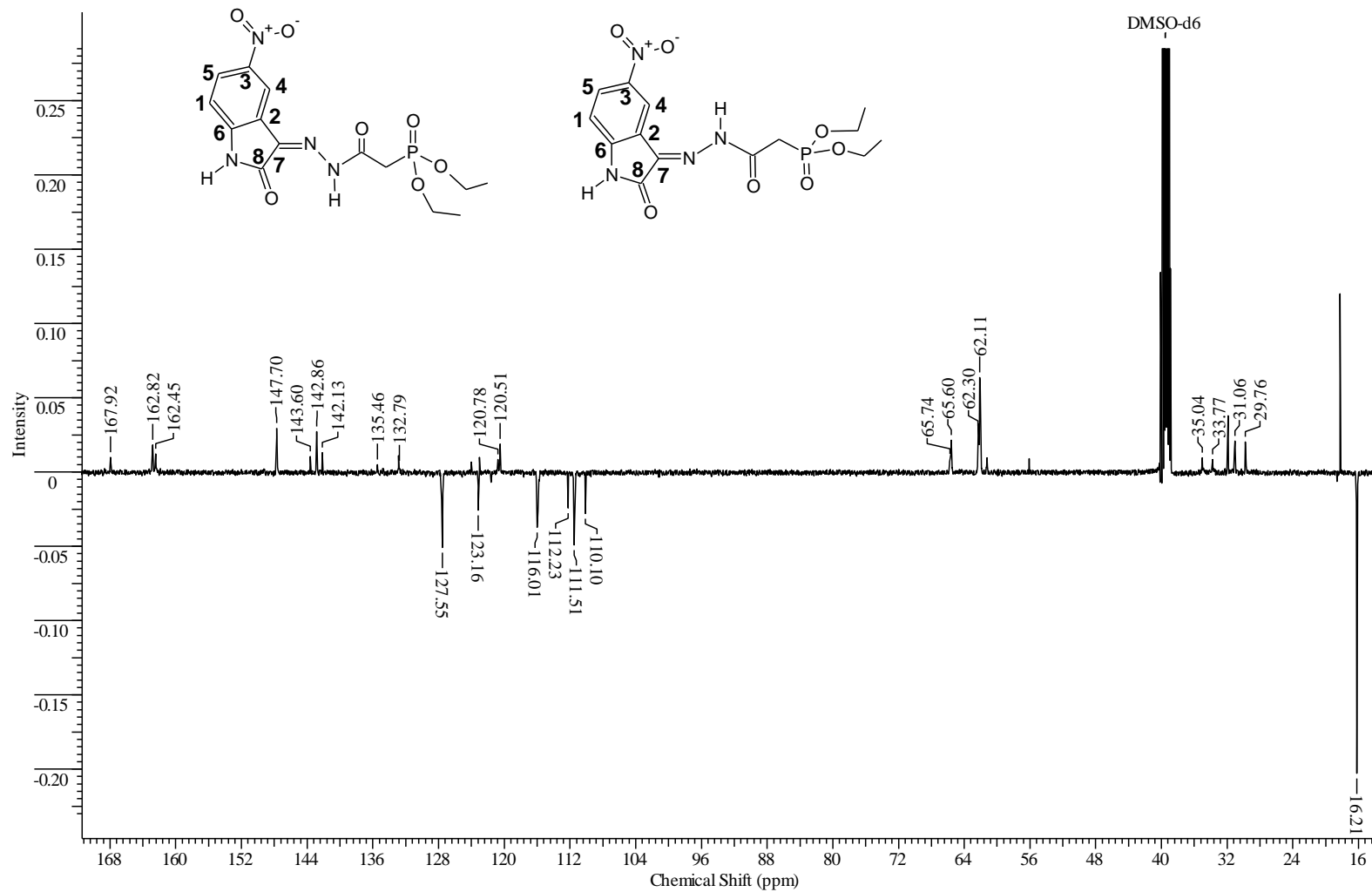
**Figura 72** - Espectro de Massas - [2(E/Z)-2-(2-oxo-1,2-dihidro-3H-indol-3-ilideno)hidrazinil]-2-oxoetilfosfonato de dietila (6).



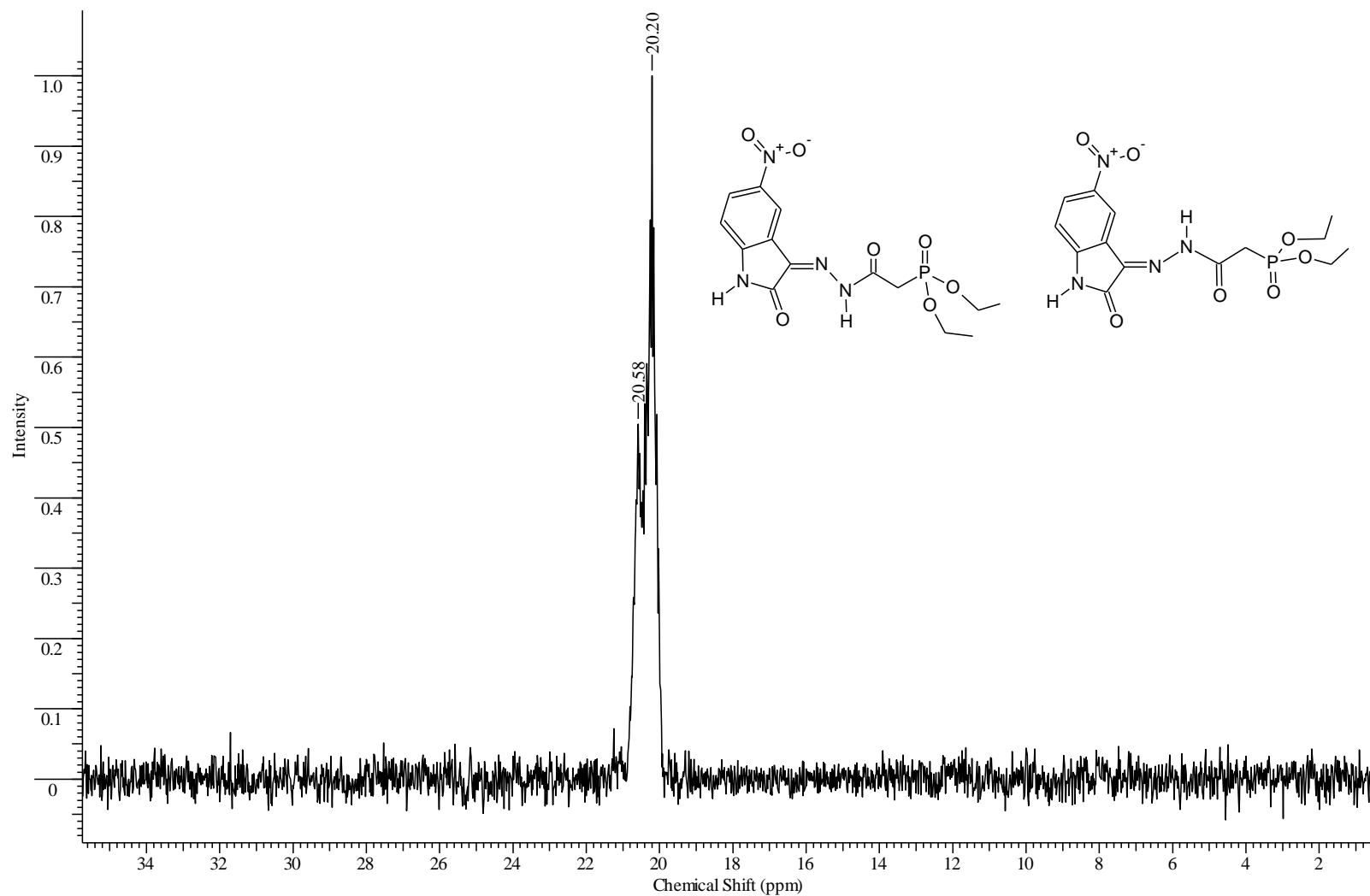
**Figura 73** - Espectro de IV (Célula de NaCl) - [(2*E/Z*) -2- (5-nitro-2-oxo-1,2-di-hidro-3H-indol-3-ilideno)hidrazinil] -2- oxoetilfosfonato de dietila (7).



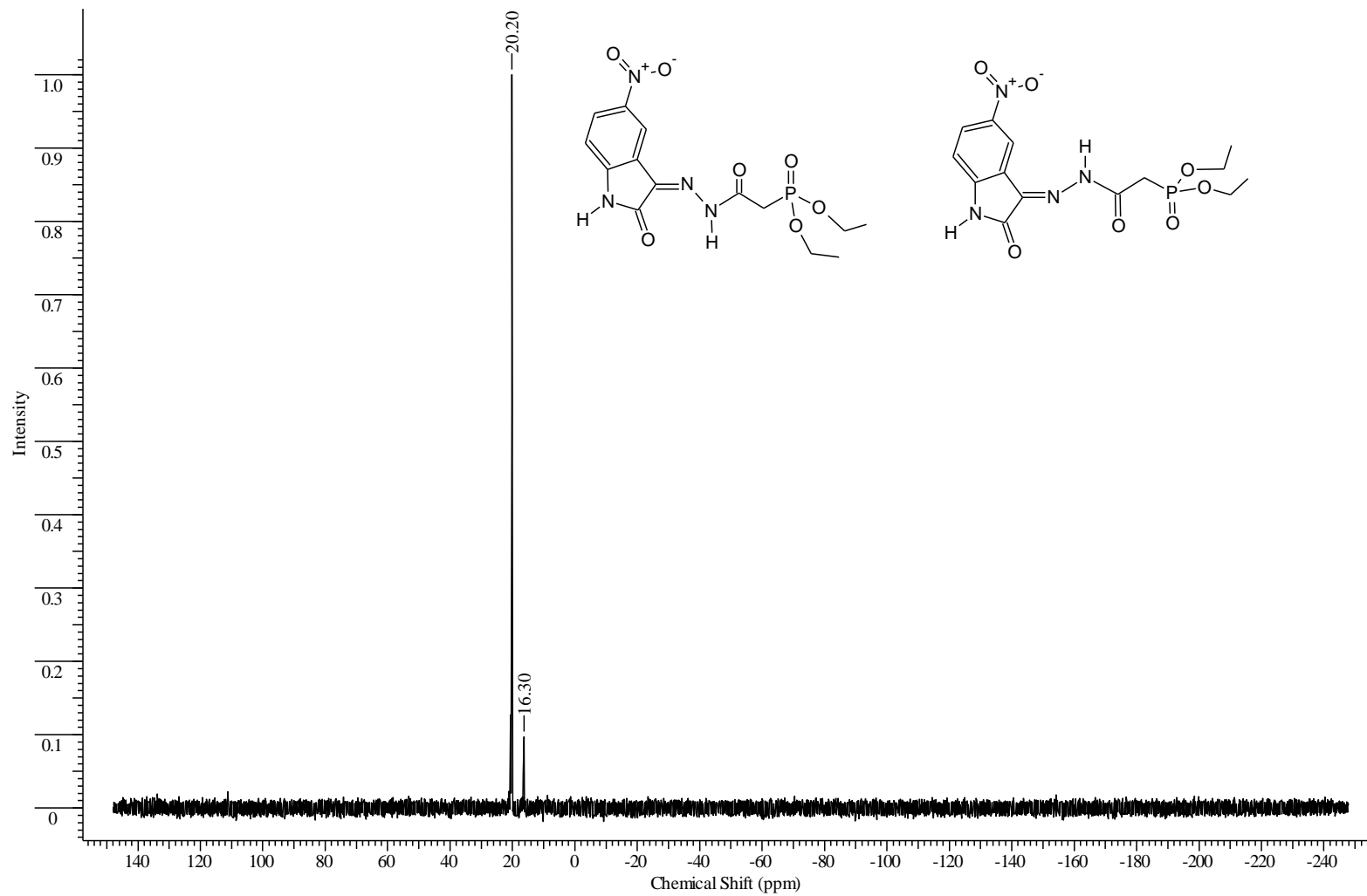
**Figura 74** - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) - [(*E/Z*)-2-(5-nitro-2-oxo-1,2-di-hidro-3H-indol-3-ilideno)hidrazinil]-2-oxoetilfosfonato de dietila (7).



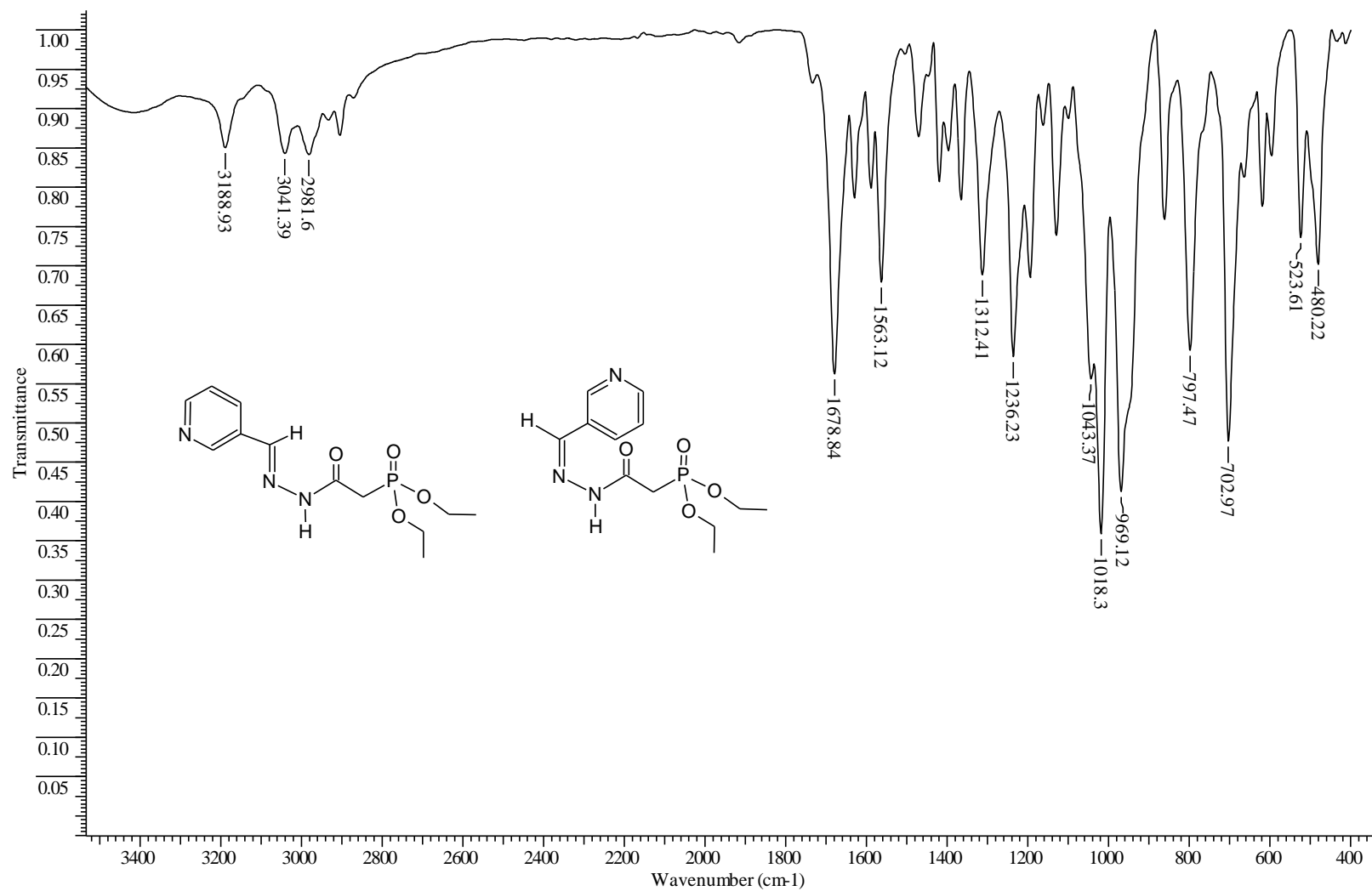
**Figura 75** - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO) - [(2E/Z)-2-(5-nitro-2-oxo-1,2-dihidro-3H-indol-3-ilideno)hidrazinil]-2-oxoetilfosfonato de dietila (7).



**Figura 76** - Espectro de RMN  $^{31}\text{P}$  (DMSO) - [(2E/Z) -2- (5-nitro-2-oxo-1,2-di-hidro-3H-indol-3-ilideno)hidrazinil] -2- oxoetilfosfonato de dietila (7).

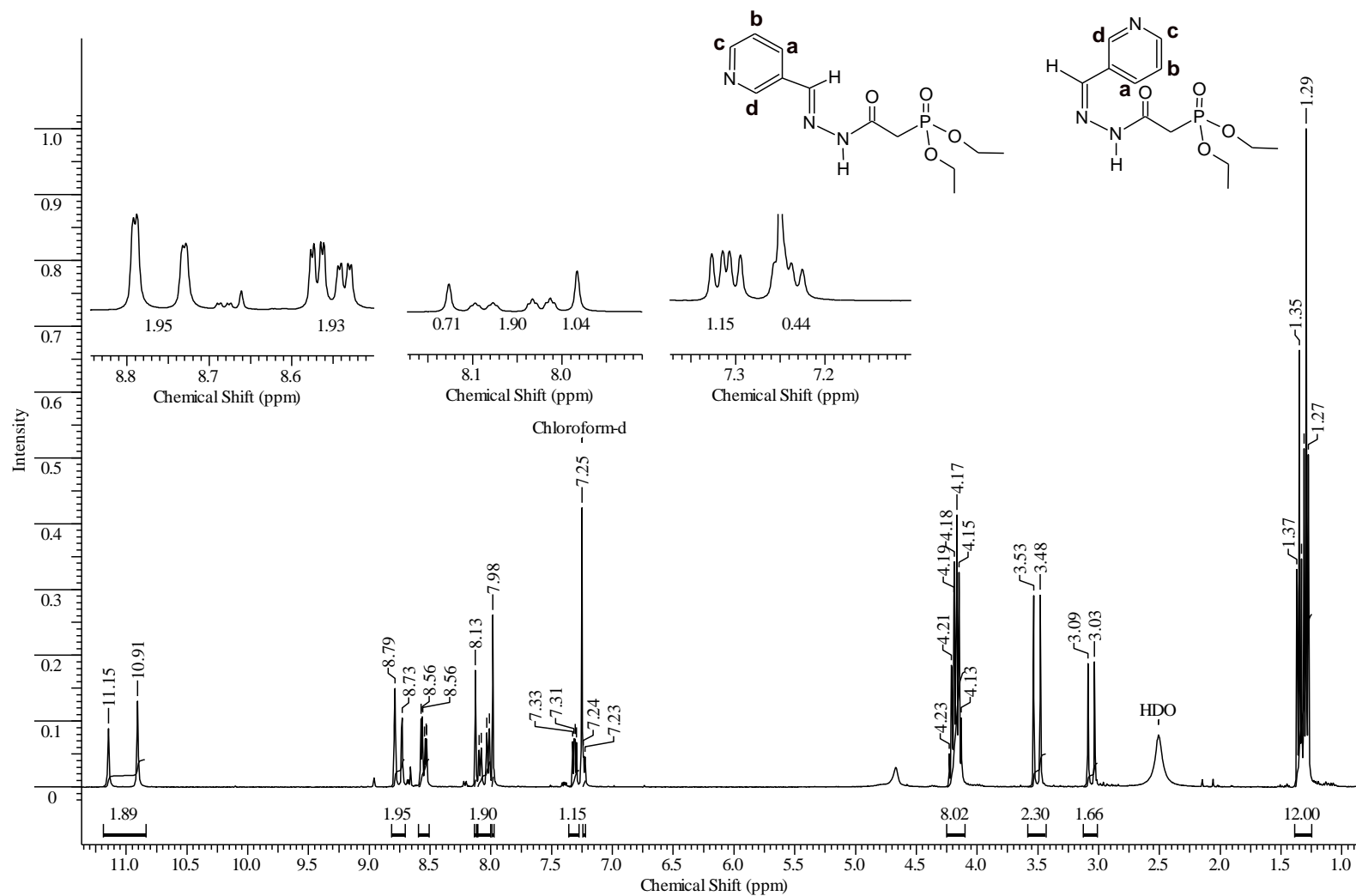


**Figura 77** - Espectro de RMN  $^{31}\text{P}_{\text{CPD}}$  (DMSO) - [(2E/Z) -2- (5-nitro-2-oxo-1,2-di-hidro-3H-indol-3-ilideno)hidrazinil] -2- oxoetilfosfonato de dietila (7).

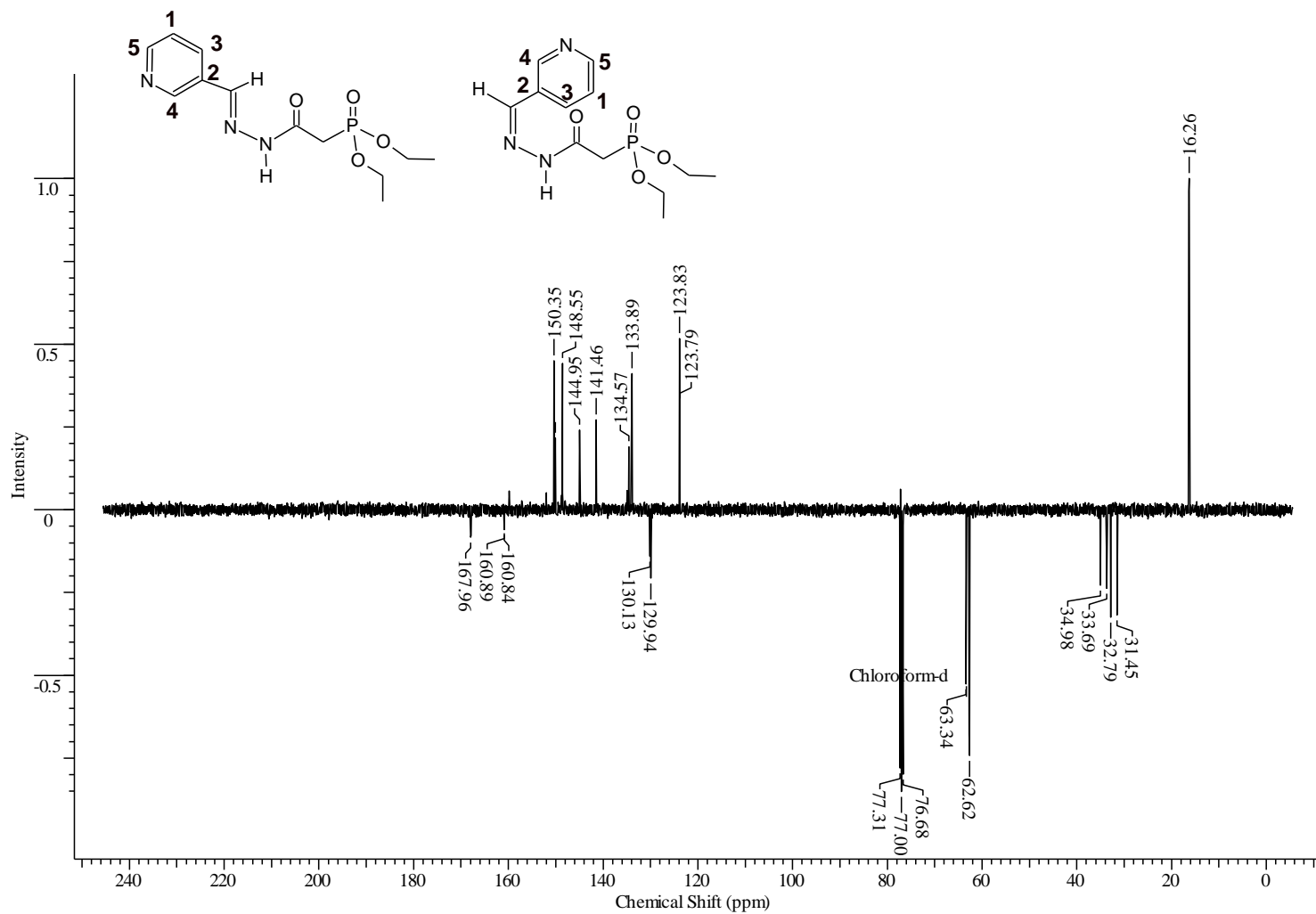


**Figura 78** - Espectro de IV (Célula de NaCl) - [2(*E/Z*)-2- (piridin-3-ilmetileno)hidrazinil] -2- oxoetilfosfonato de dietila (8).

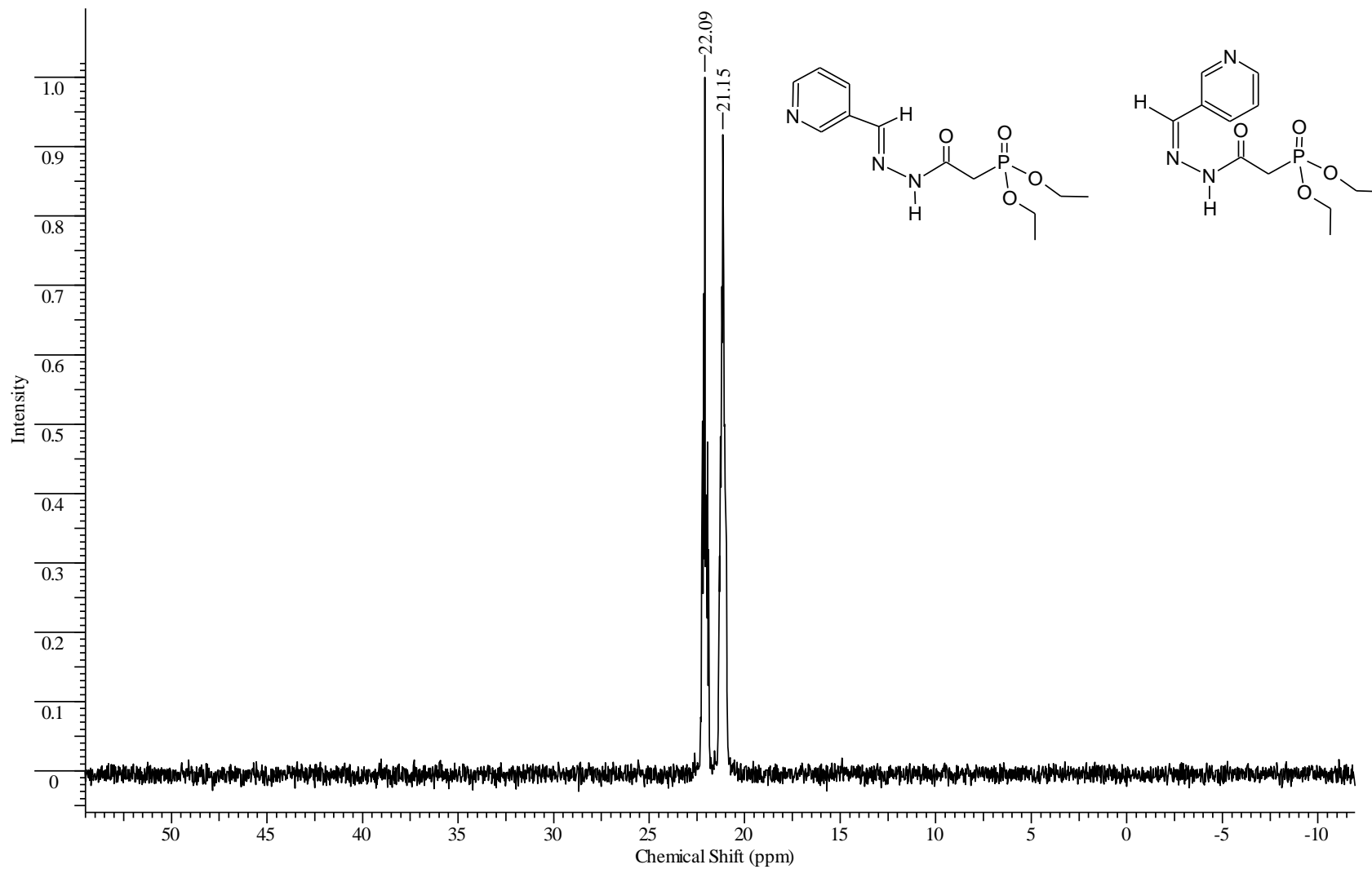




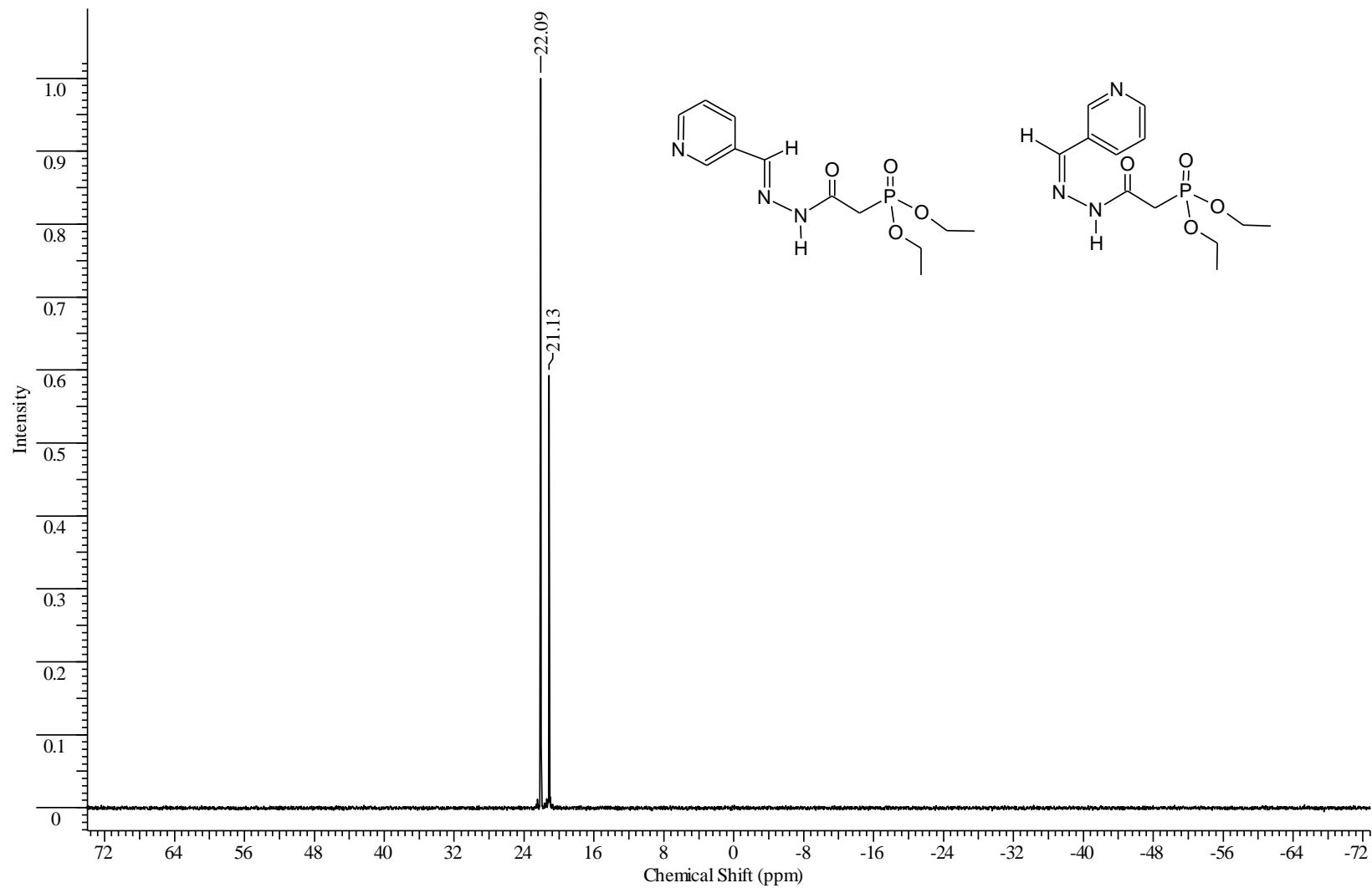
**Figura 79** - Espectro de RMN 1H (DMSO) - [2(E/Z)-2-(piridin-3-ilmetileno)hidrazinil]-2-oxoetilfosfonato de dietila (8).



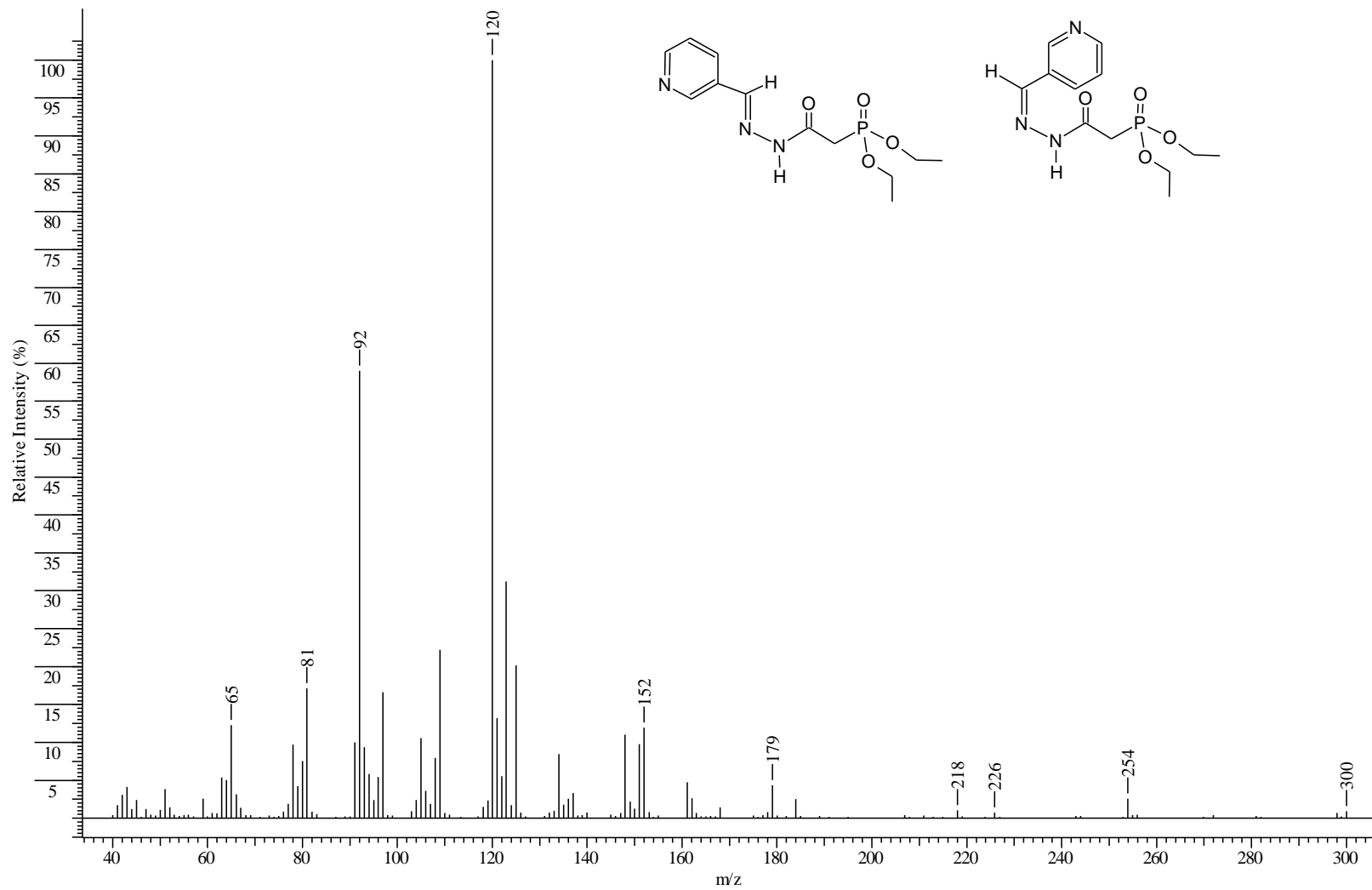
**Figura 80** - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) - [2(E/Z)-2-(piridin-3-ilmetileno)hidrazinil]-2-oxoetilfosfonato de dietila (8).



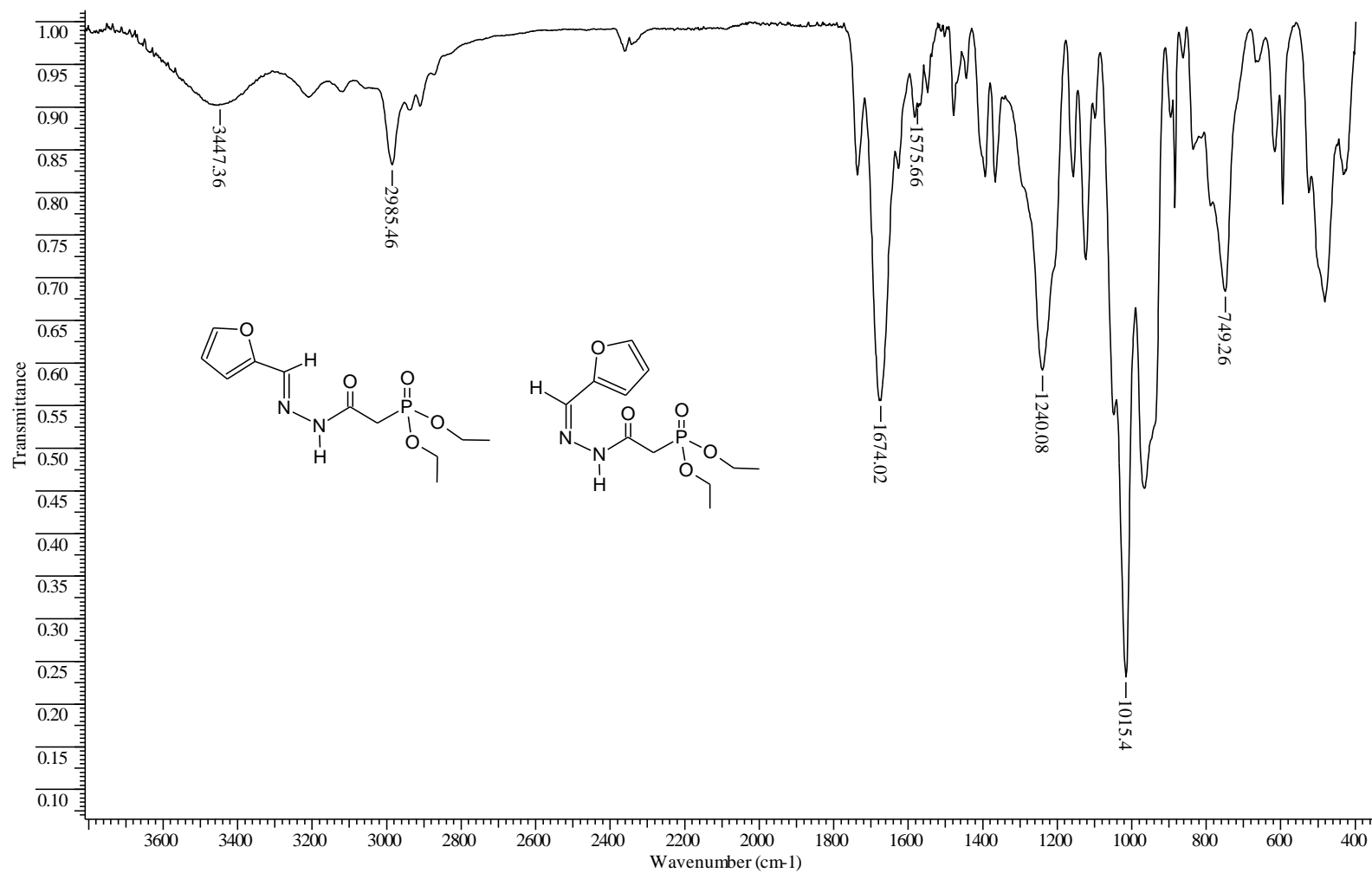
**Figura 81** - Espectro de RMN  $^{31}\text{P}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) - [2(*E/Z*)-2-(piridin-3-ilmetileno)hidrazinil]-2-oxoetilfosfonato de dietila (8).



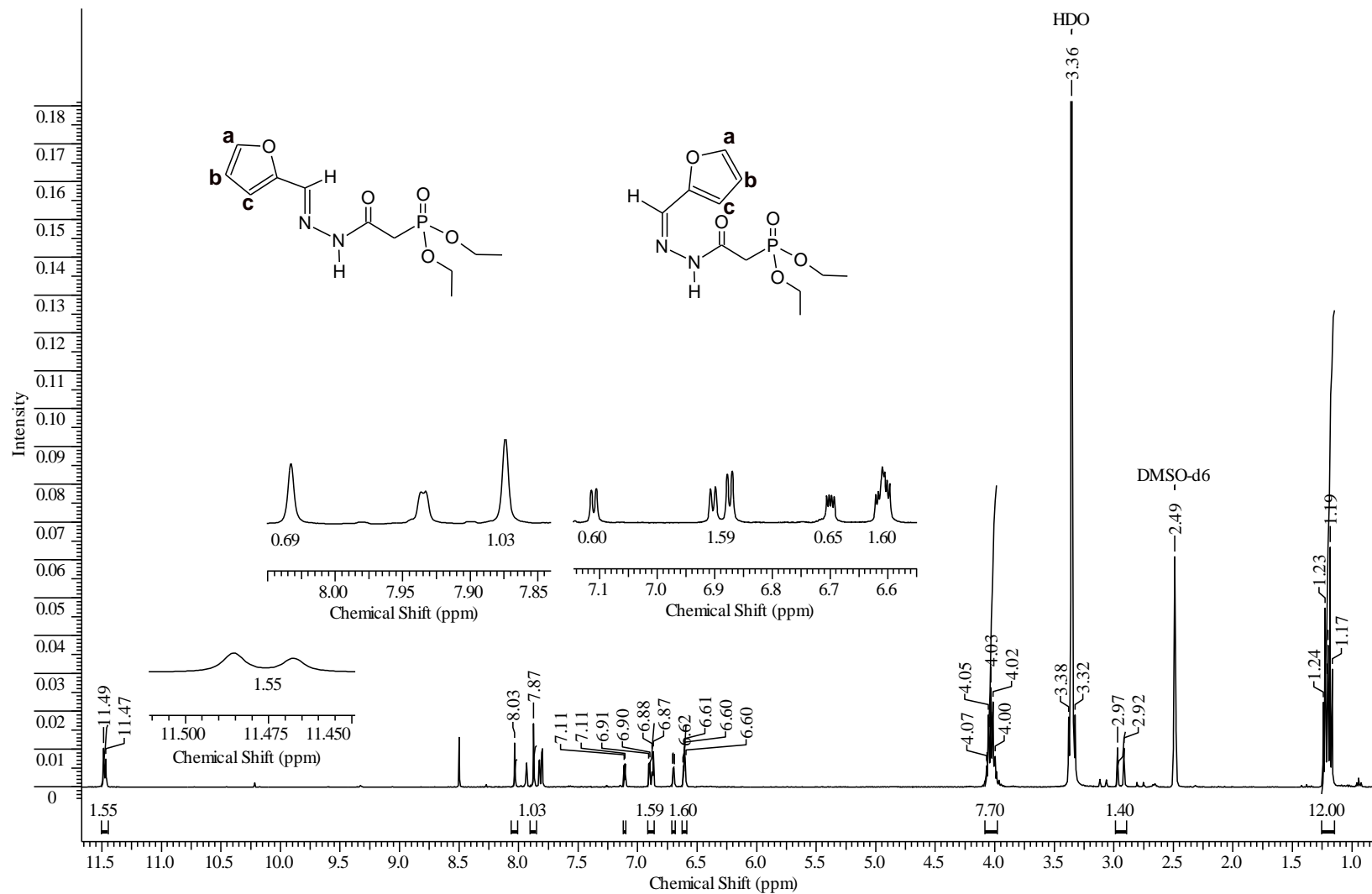
**Figura 82** - Espectro de RMN  $^{31}\text{P}_{\text{CPD}}(\text{CDCl}_3)$  - [2(*E/Z*)-2-(piridin-3-ilmetileno)hidrazinil]-2-oxoetilfosfonato de dietila (8).



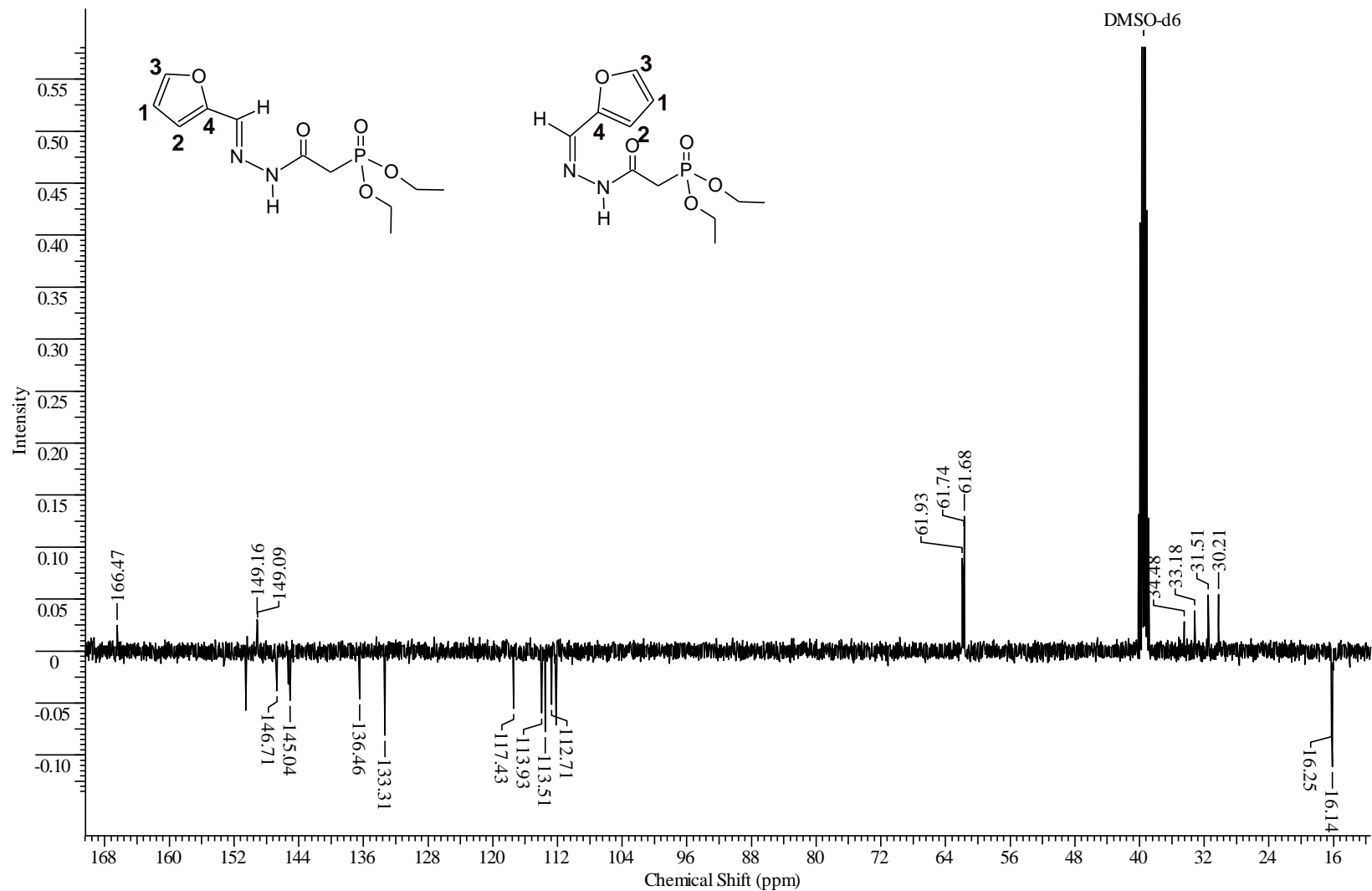
**Figura 83** - Espectro de massas - [2(*E/Z*)-2-(piridin-3-ilmetileno)hidrazinil]-2-oxoetilfosfonato de dietila (8).



**Figura 84** - Espectro de IV (Célula de NaCl) - [2(*E/Z*)-2-(2-furilmetileno)hidrazinil]-2-oxoetilfosfonato de dietila (9).

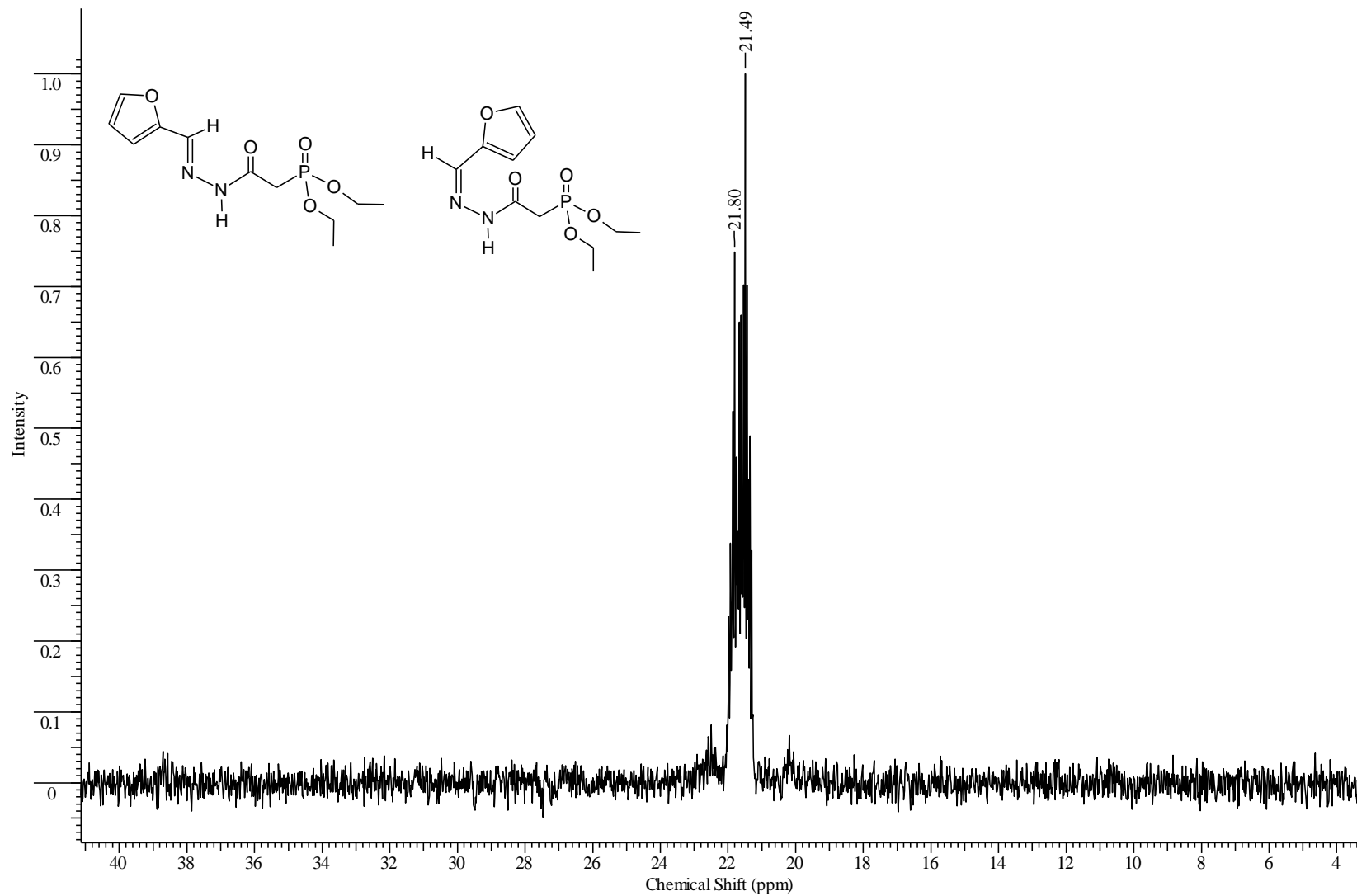


**Figura 85** - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (DMSO) - [2(*E/Z*)-2-(2-furilmetileno)hidrazinil]-2-oxoetilfosfonato de dietila (9).

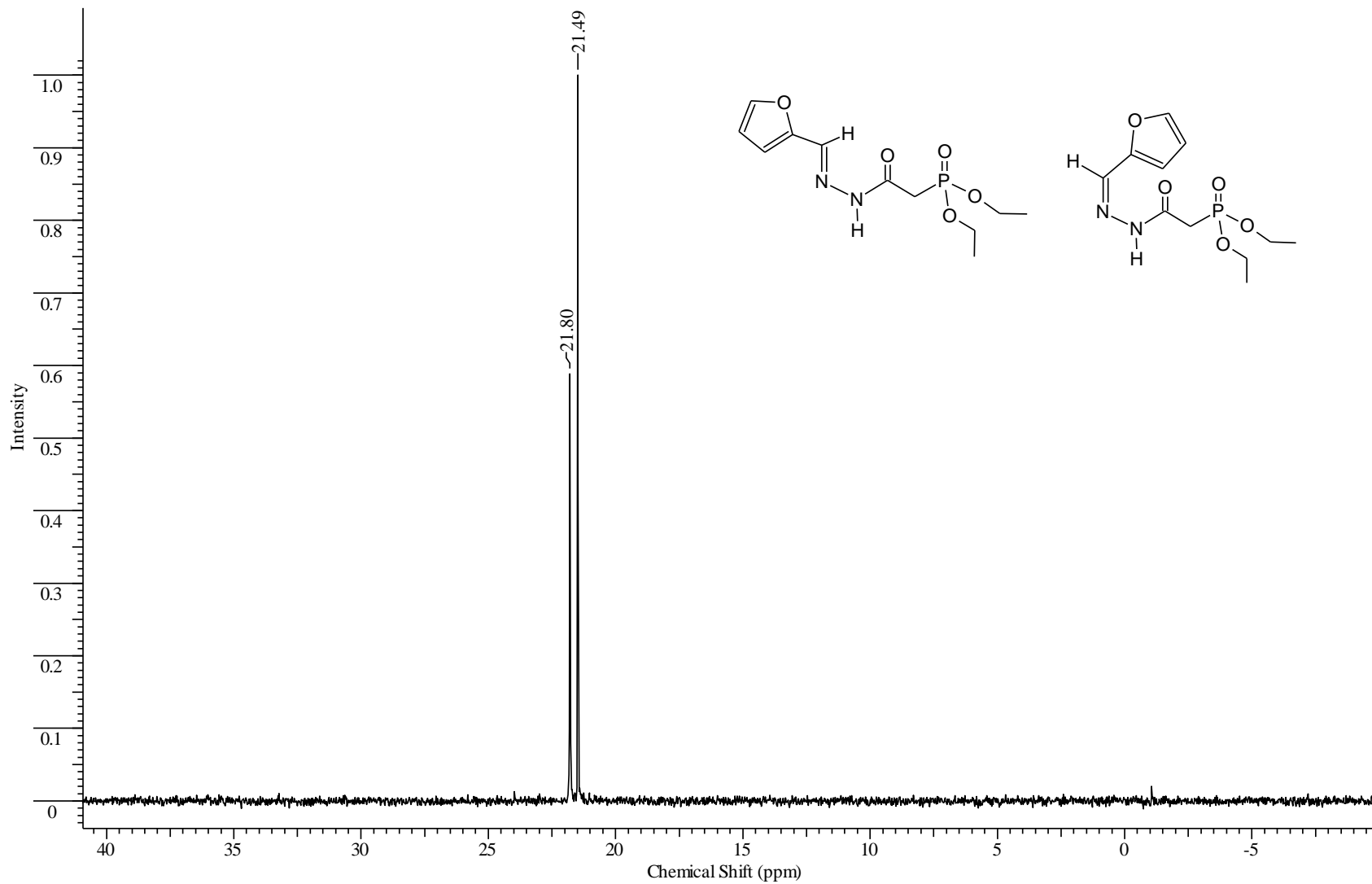


**Figura 86** - Espectro de RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) - [2(E/Z)-2-(2-furilmetileno)hidrazinil]-2-oxoetilfosfonato de dietila (9).

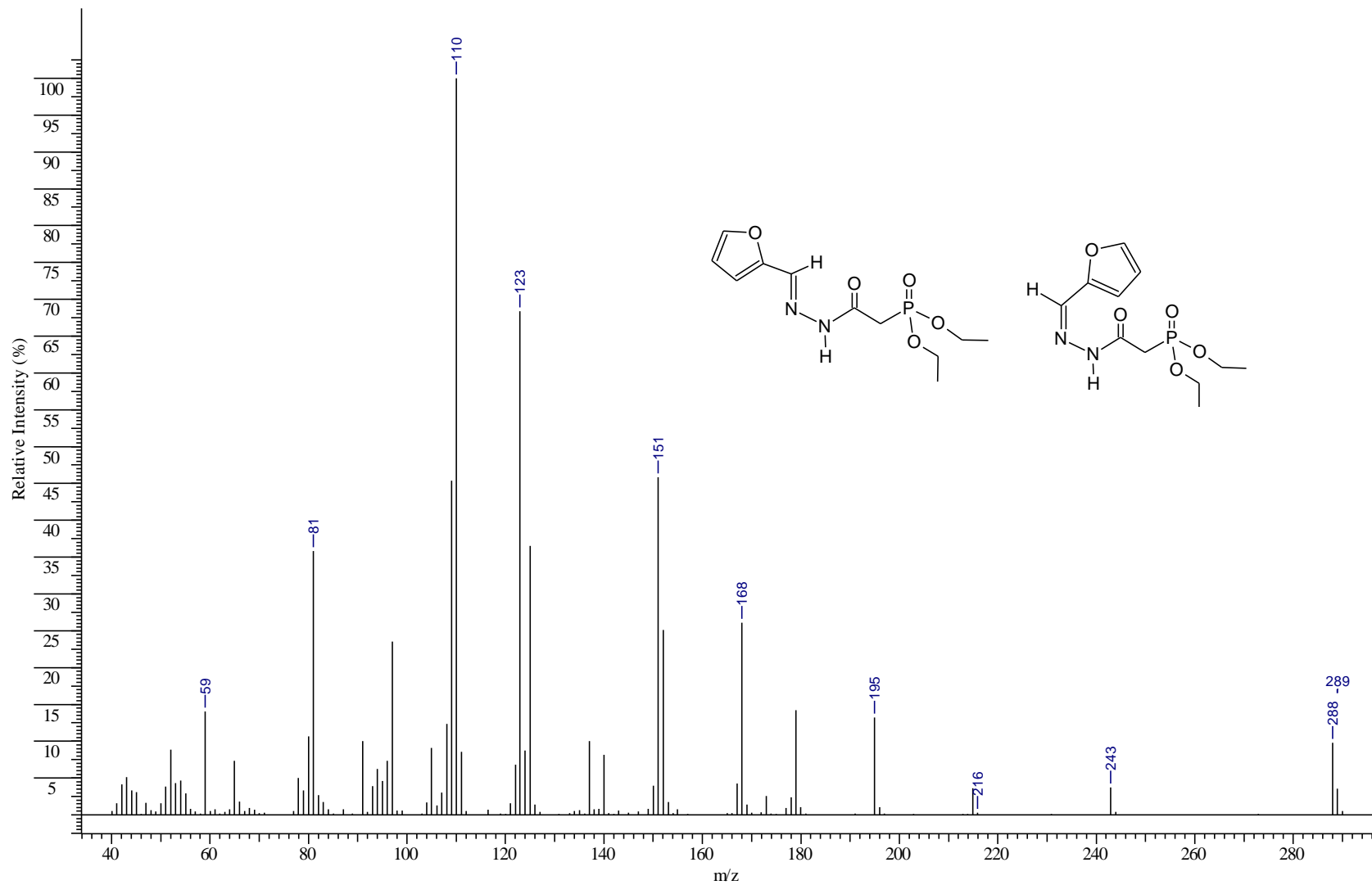




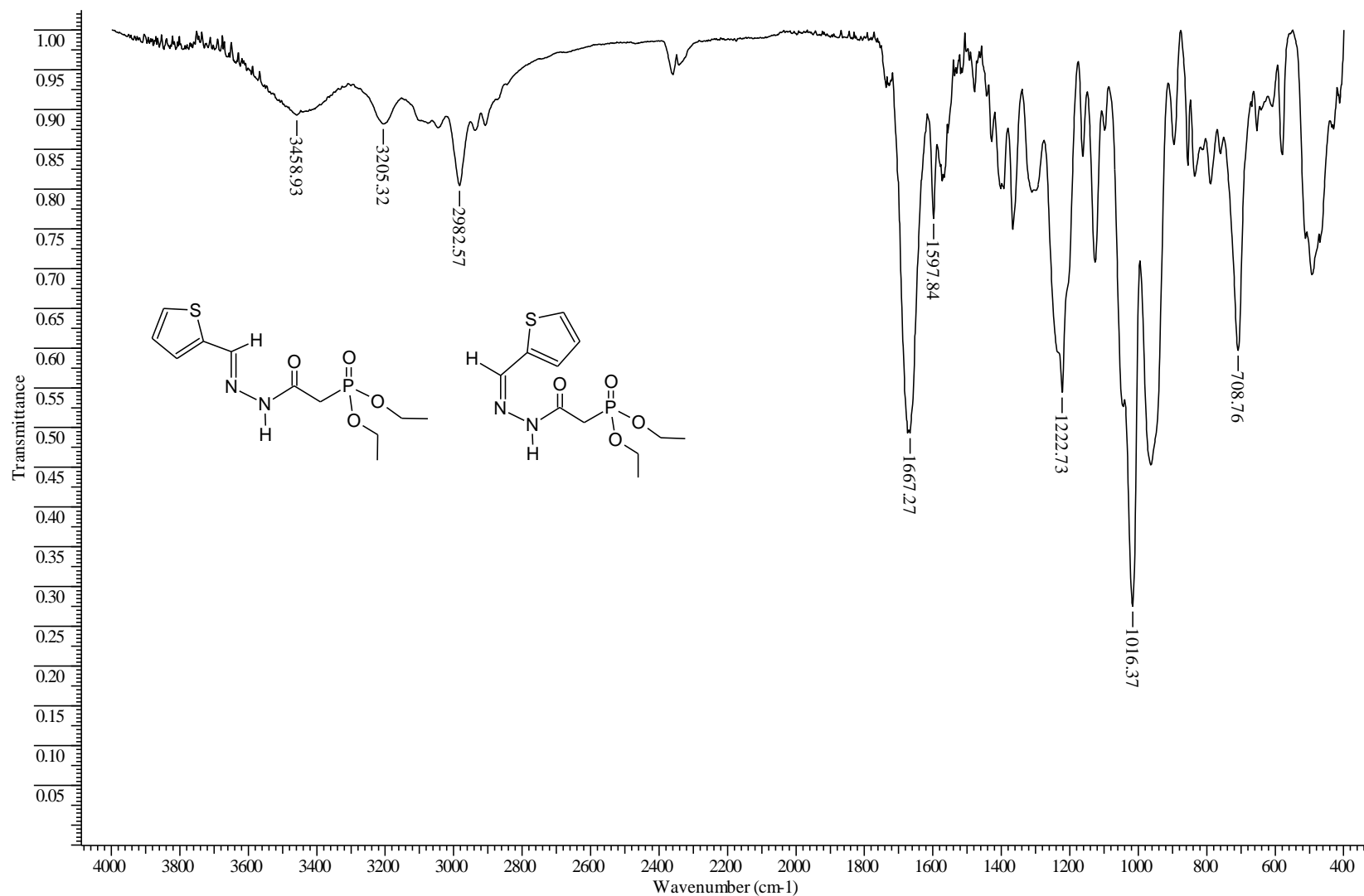
**Figura 87** - Espectro de RMN  $^{31}\text{P}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) - [2(*E/Z*)-2-(2-furilmetileno)hidrazinil]-2-oxoetilfosfonato de dietila (9).



**Figura 88** - Espectro de RMN  $^{31}\text{P}_{\text{CPD}}(\text{CDCl}_3)$  - [2(*E/Z*)-2-(2-furilmetileno)hidrazinil]-2-oxoetilfosfonato de dietila (9).



**Figura 89** - Espectro de massas - [2(E/Z)-2-(2-furilmetileno)hidrazinil]-2-oxoetilfosfonato de dietila (9).



**Figura 90** - Espectro de IV (Célula de NaCl) - [2(*E/Z*)-2-(2-tienilmetileno)hidrazinil]-2-oxoetilfosfonato de dietila (10).



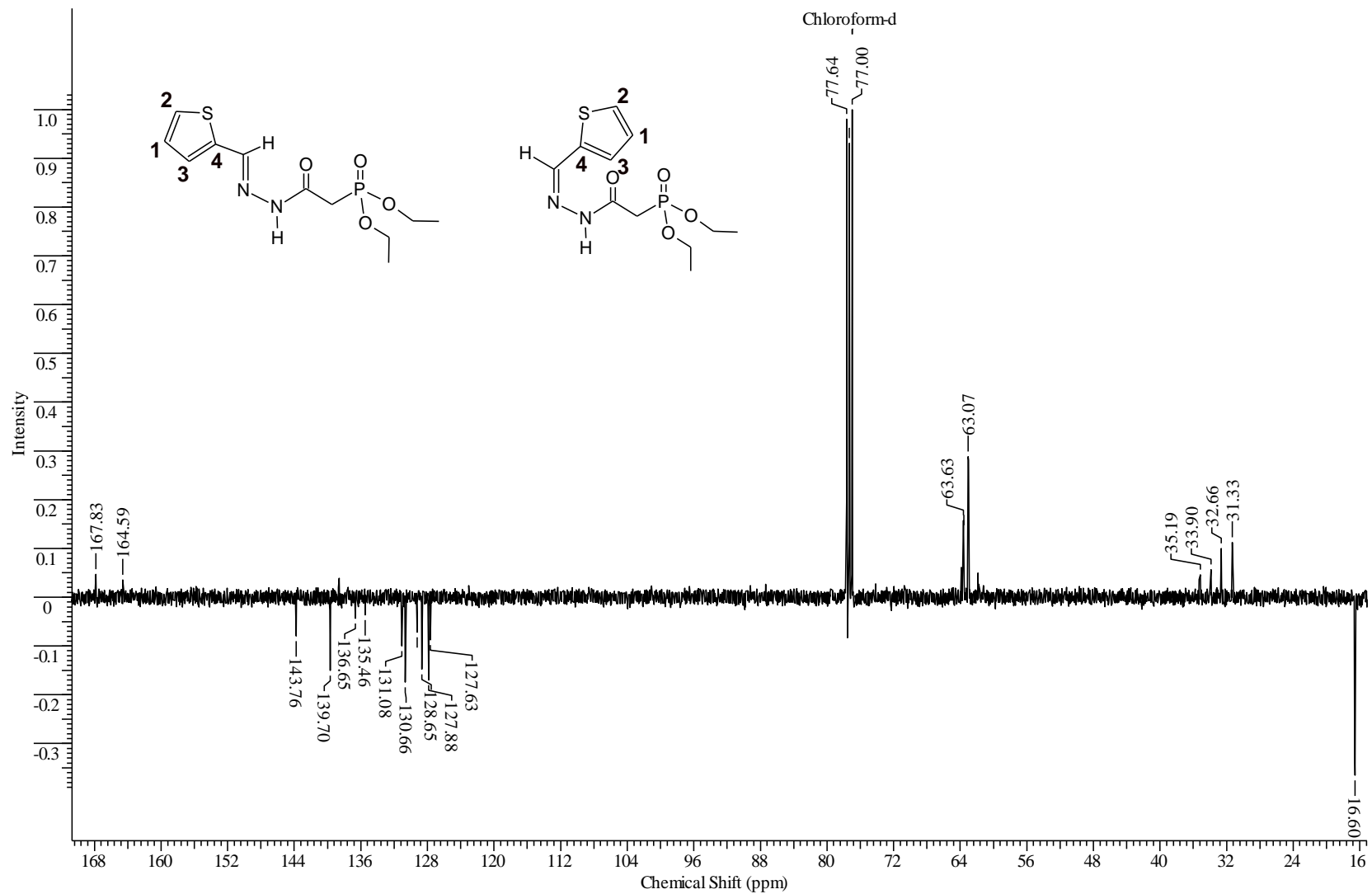
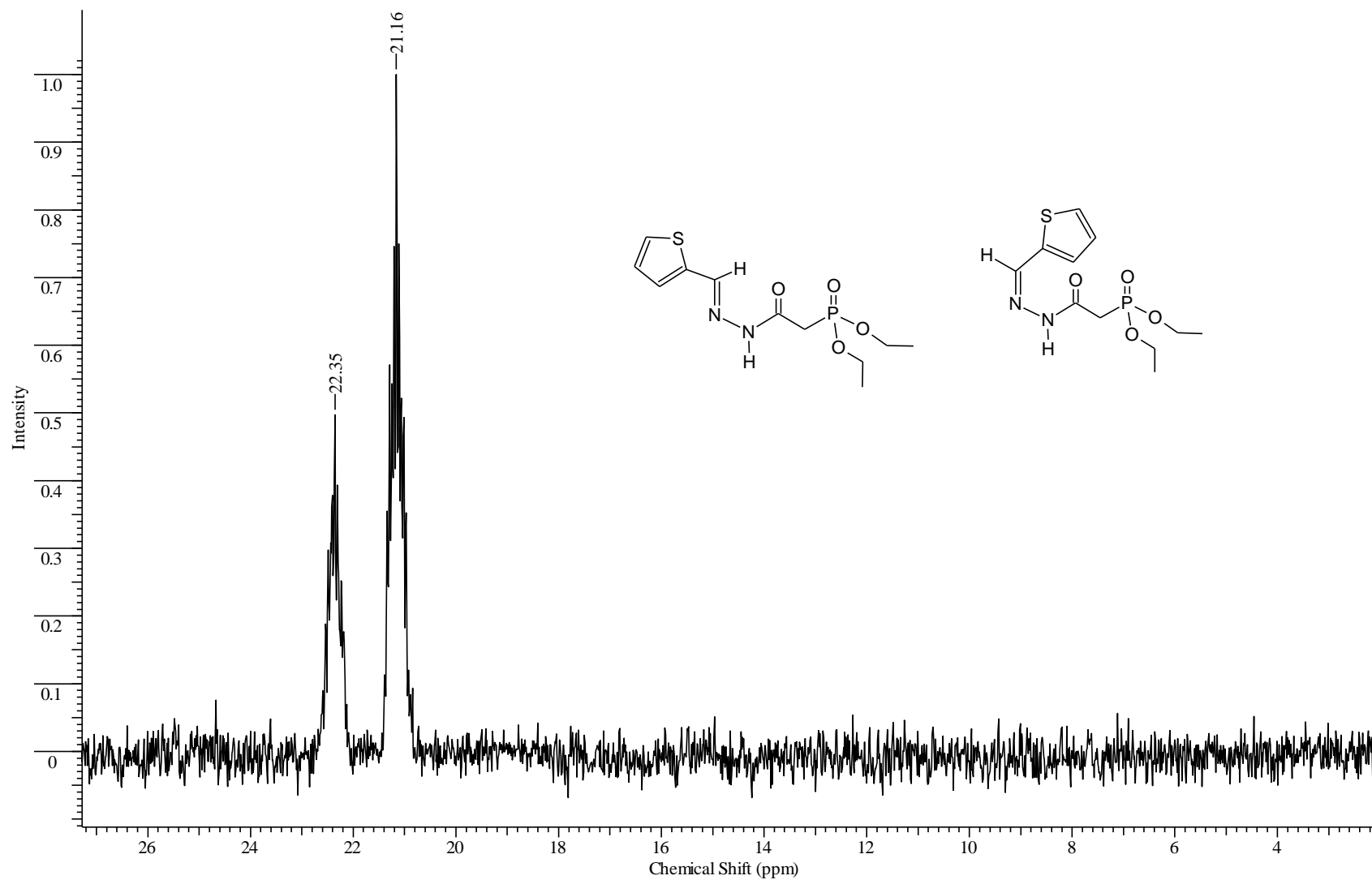
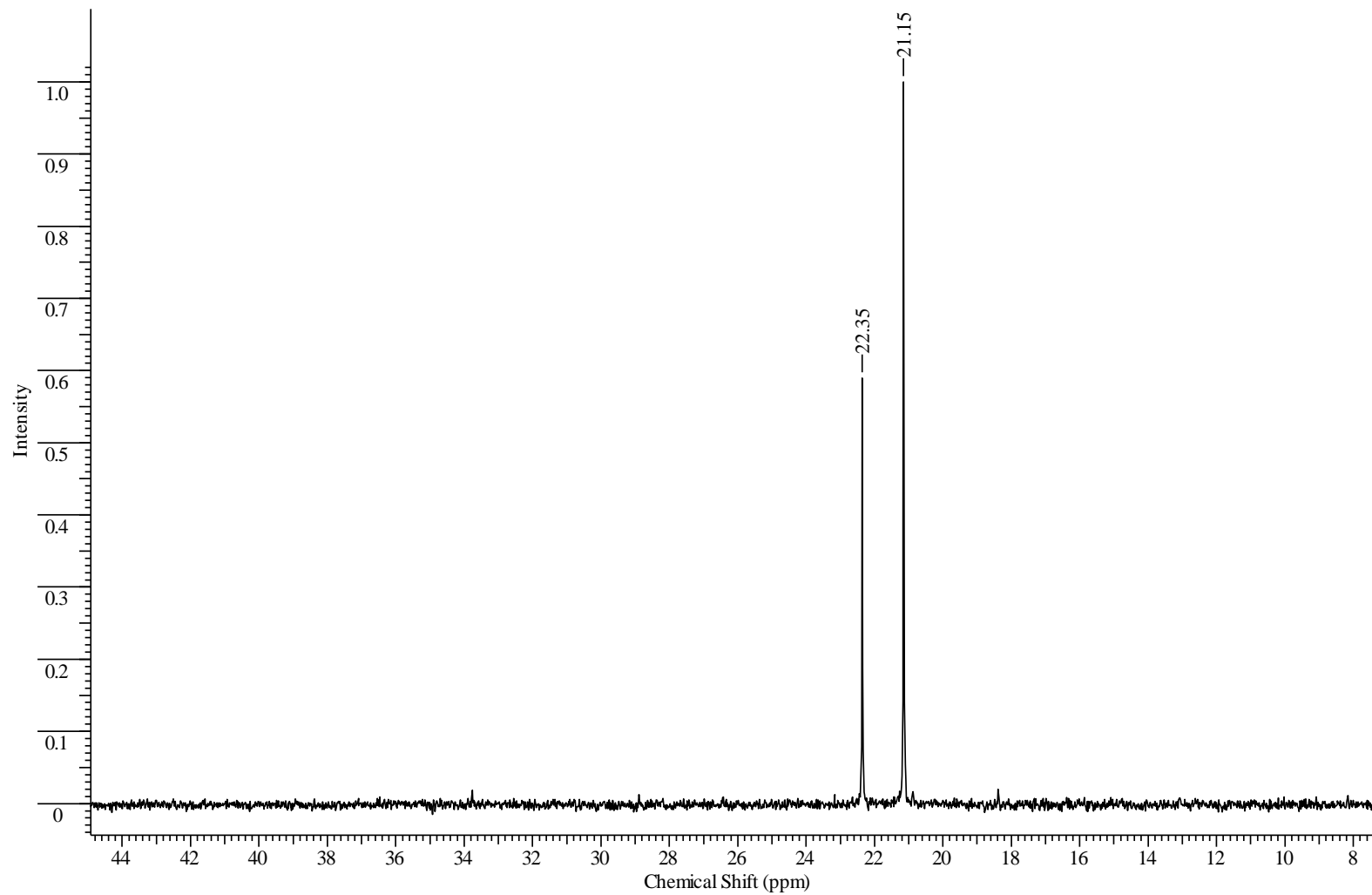


Figura 92 - Espectro de RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) - [2(*E/Z*)-2-(2-tienilmetileno)hidrazinil]-2-oxoetilfosfonato de dietila (10).

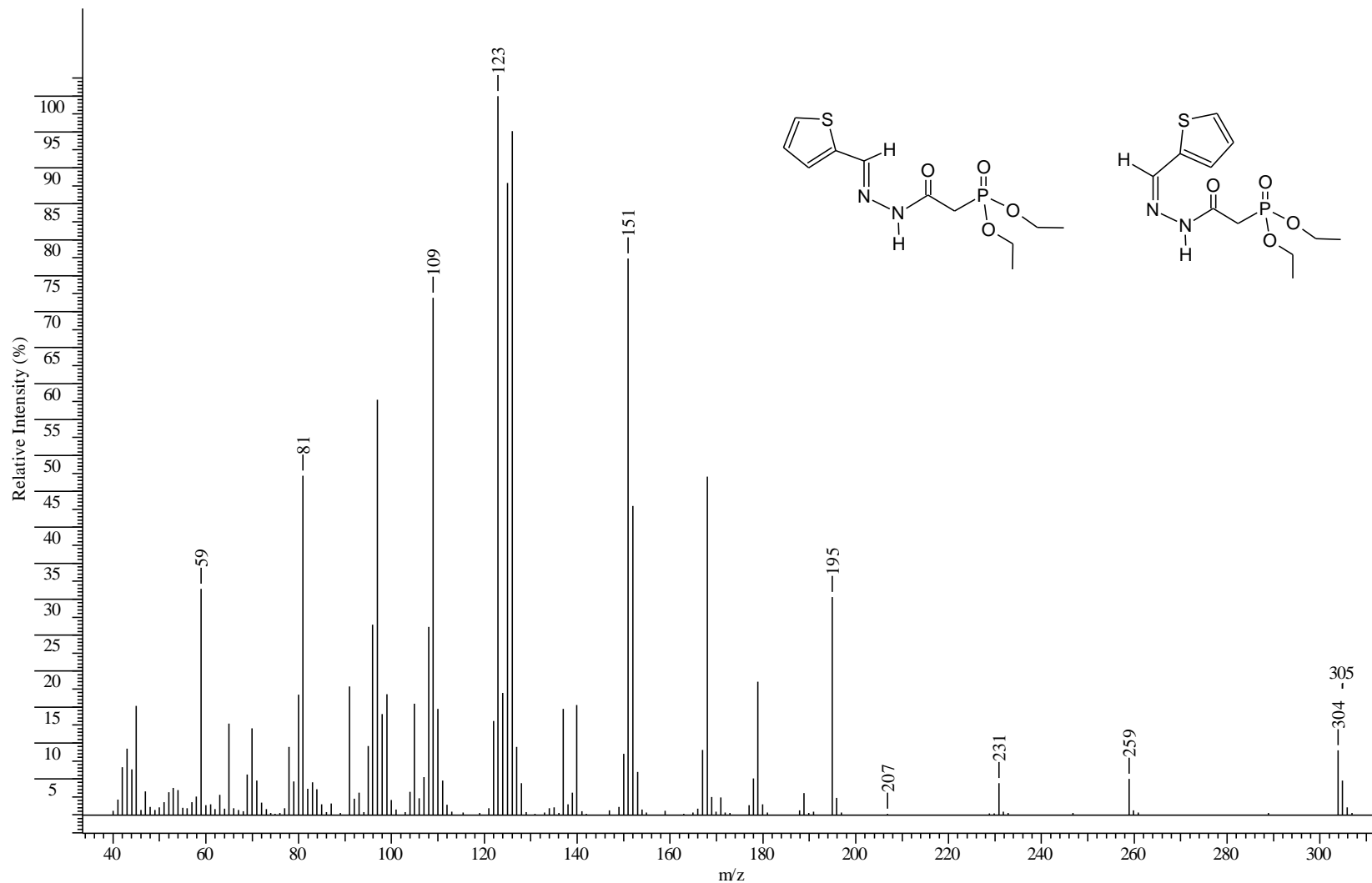


**Figura 93** - Espectro de RMN  $^{31}\text{P}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) - [2(*E/Z*)-2-(2-tienilmetileno)hidrazinil]-2-oxoetilfosfonato de dietila (10).

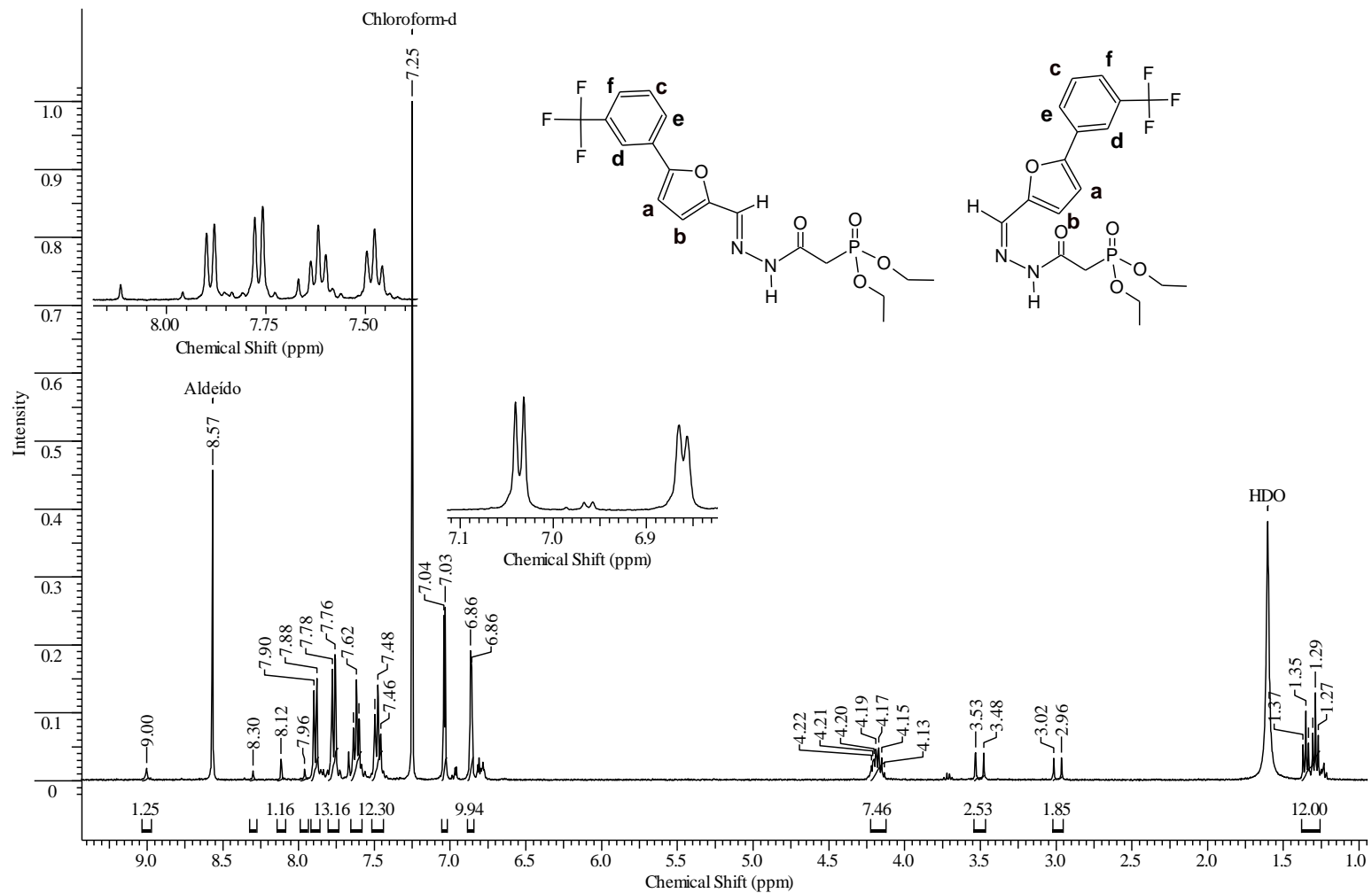


**Figura 94** - Espectro de RMN  $^{31}\text{P}_{\text{CPD}}(\text{CDCl}_3)$  - [2(*E/Z*)-2-(2-tienilmetileno)hidrazinil]-2-oxoetilfosfonato de dietila (10).

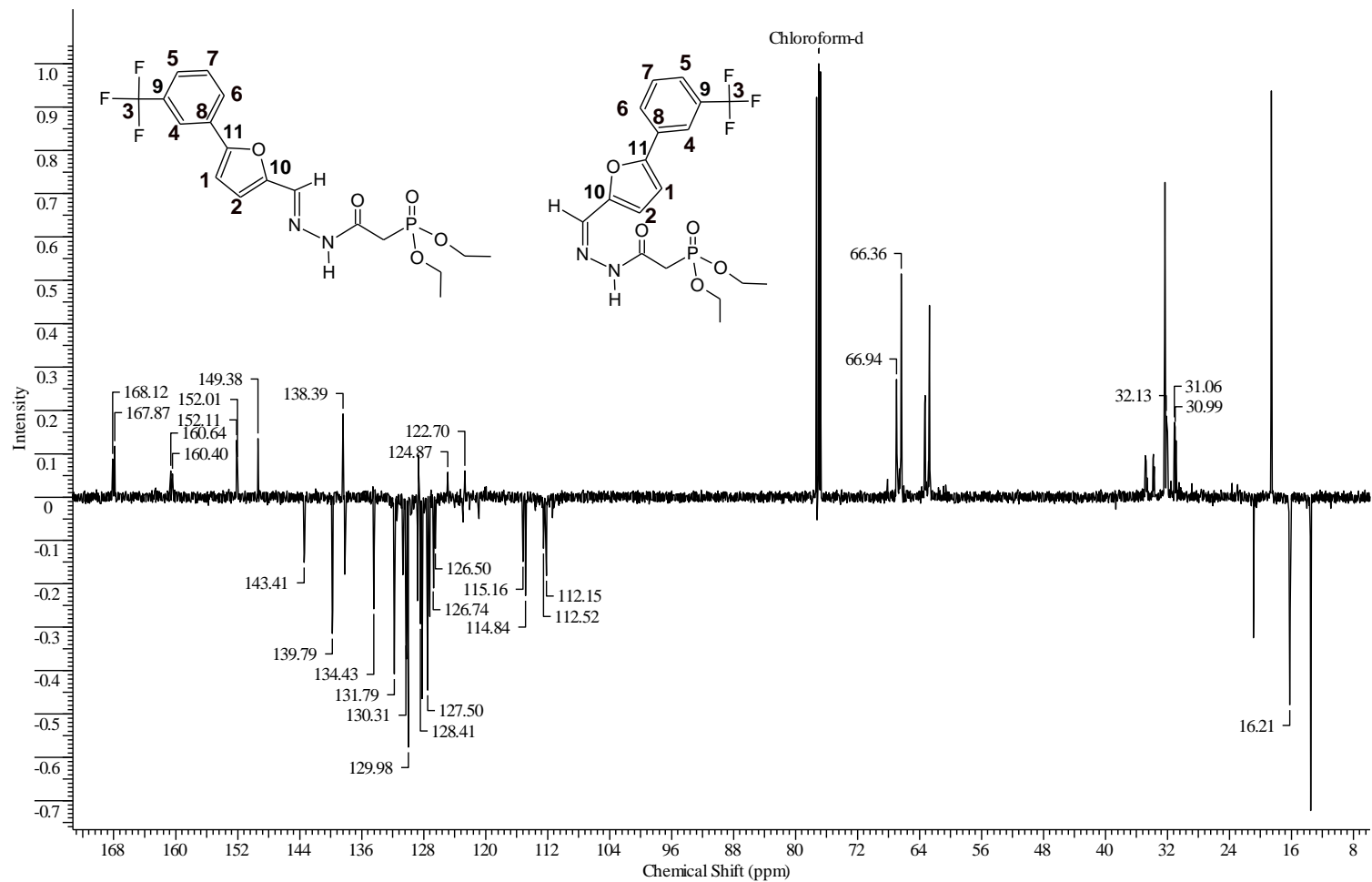




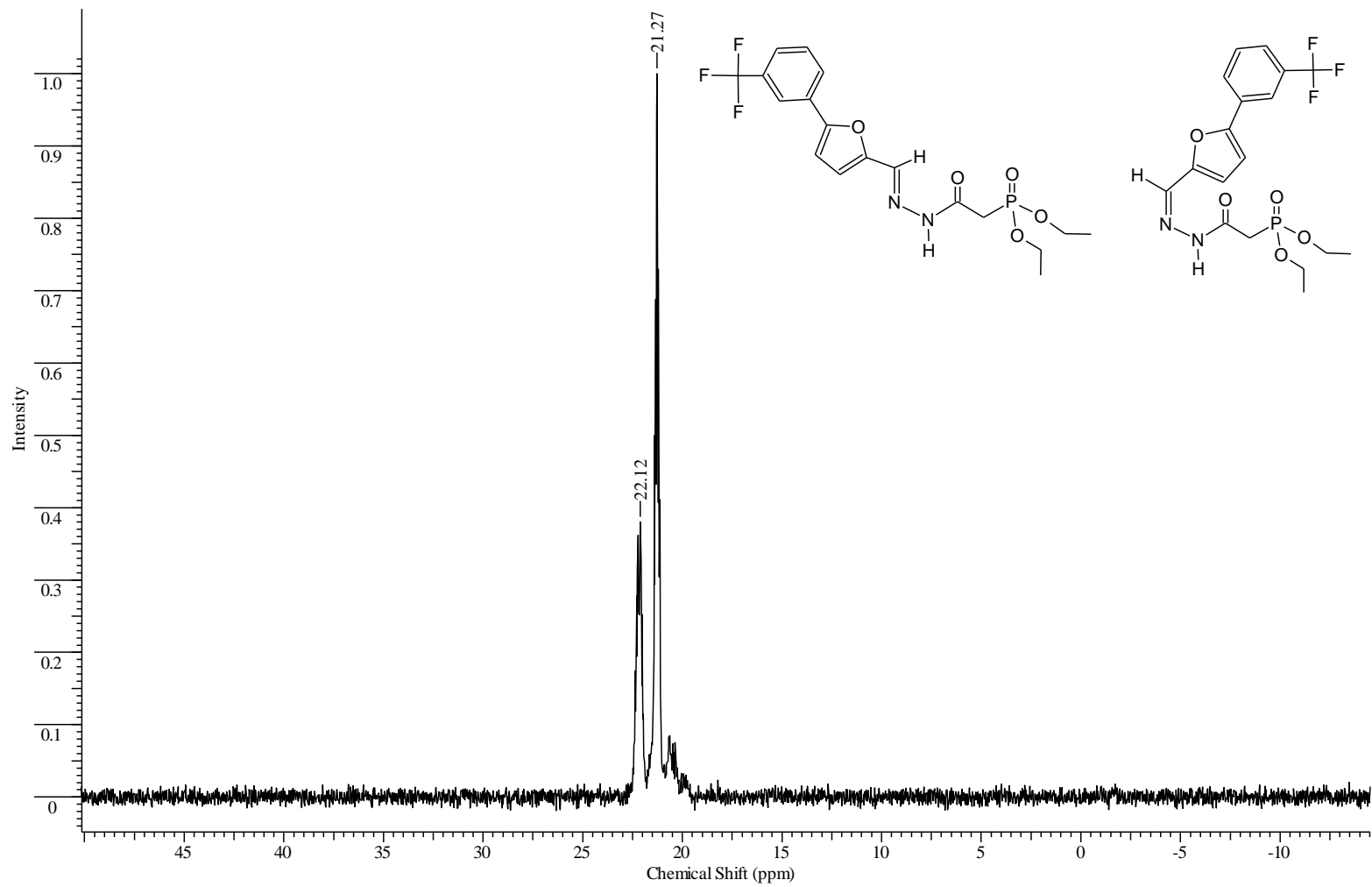
**Figura 95** - Espectro de massas - [2(E/Z)-2-(2-tienilmetileno)hidrazinil]-2-oxoetilfosfonato de dietila (10).



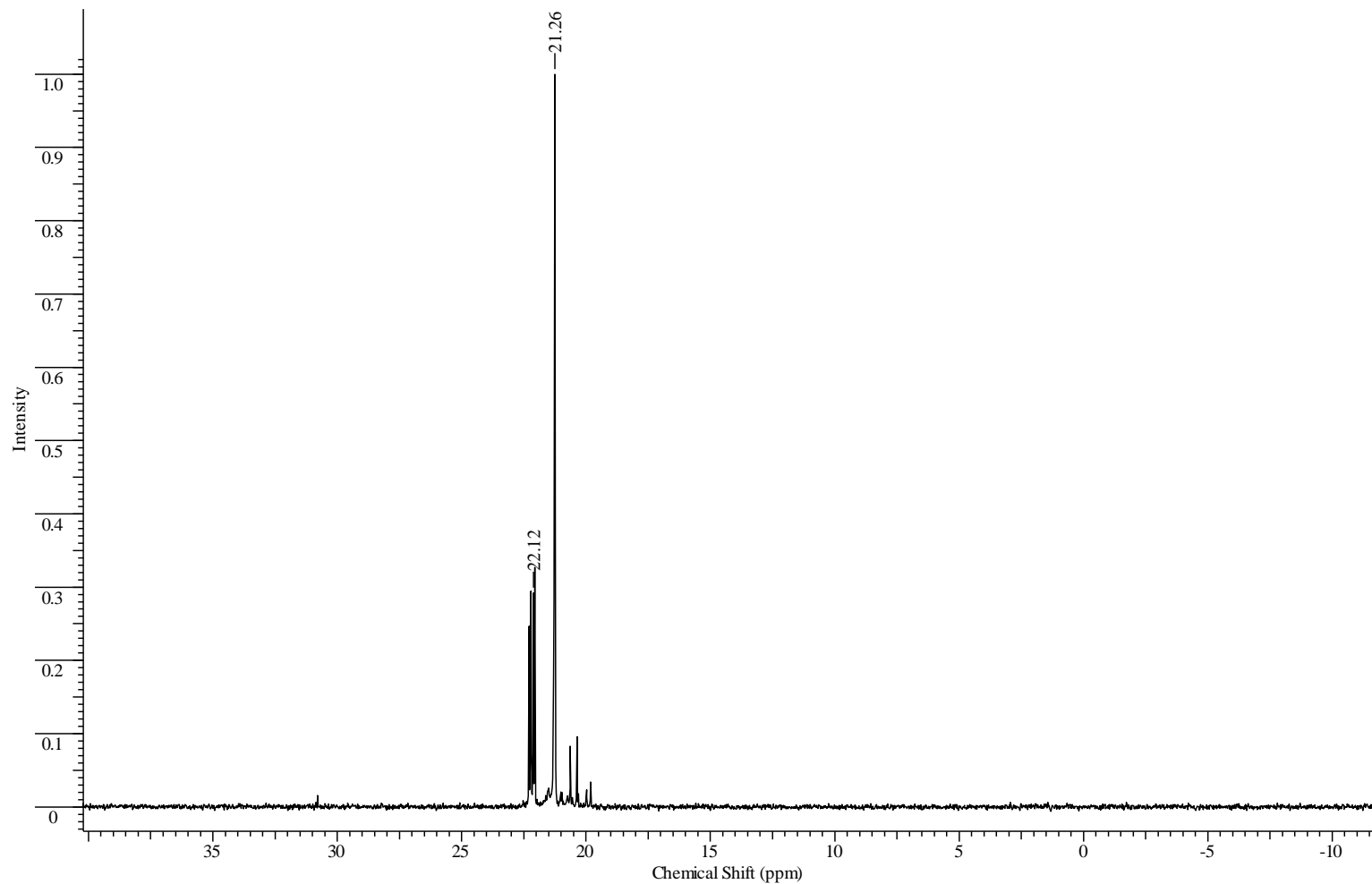
**Figura 96** - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (DMSO) - [2(*E/Z*)-2 - ({5- [3- (trifluorometil) fenil] -2-furil} metileno)hidrazinil] 2-oxoetilfosfonato de dietila (11).



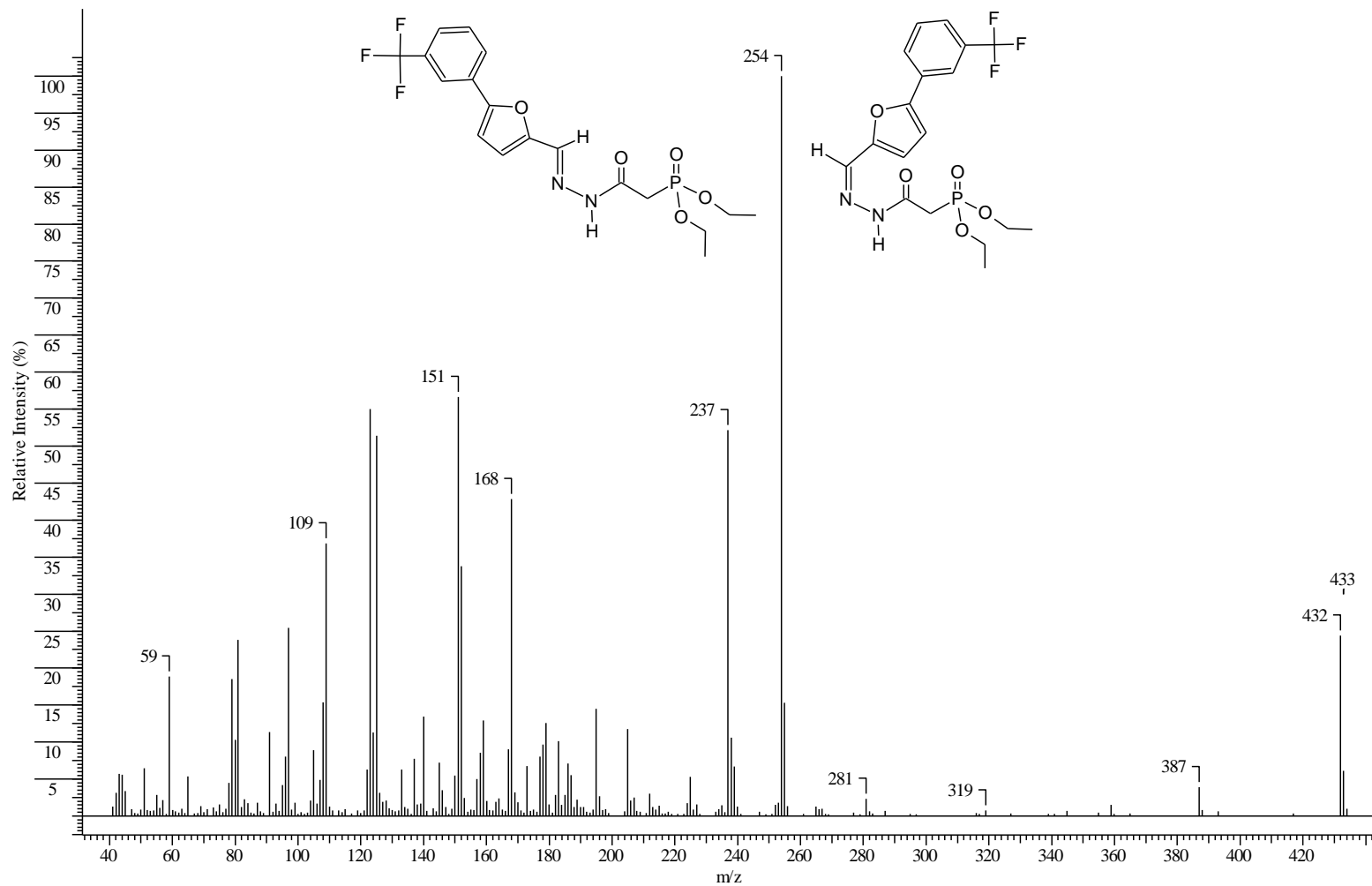
**Figura 97** - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) - [2(*E/Z*) -2 - ((5- [3- (trifluorometil) fenil] -2-furil) metileno)hidrazinil] 2-oxoetilfosfonato de dietila (11).



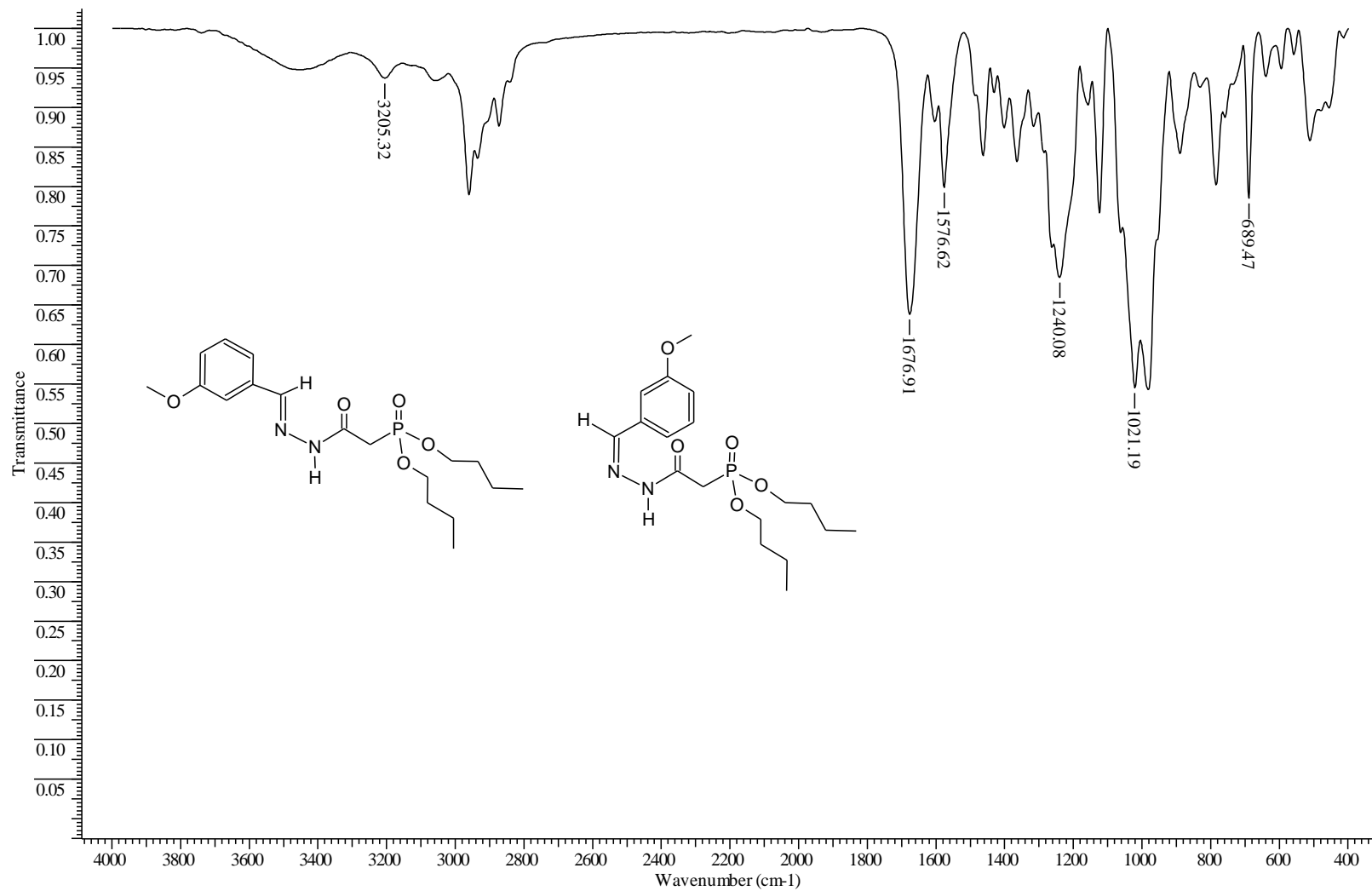
**Figura 98** - Espectro de RMN  $^{31}\text{P}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) - [2(*E/Z*) -2 - ({5- [3- (trifluorometil) fenil] -2-furil} metileno)hidrazinil] 2-oxoetilfosfonato de dietila (11).



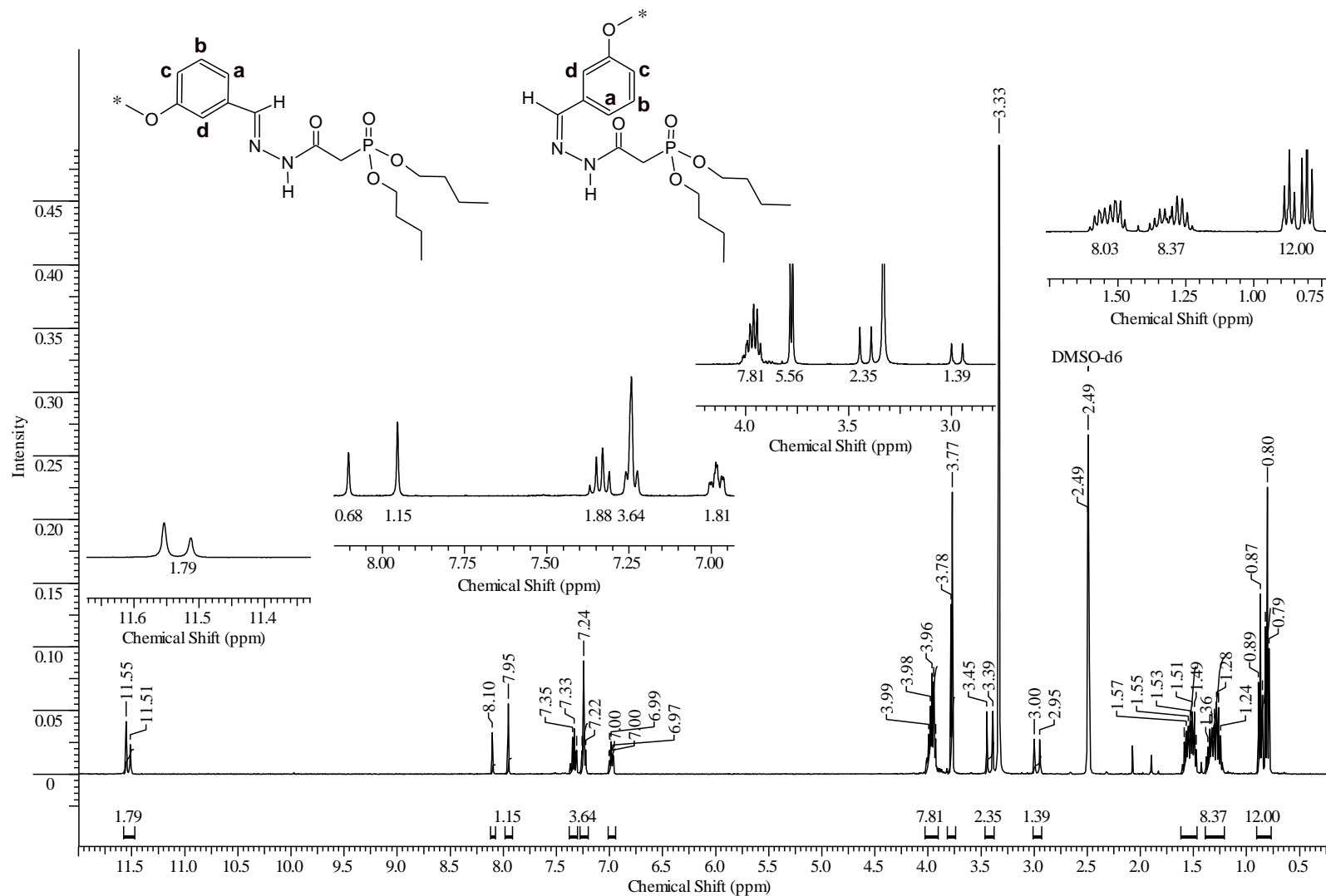
**Figura 99** - Espectro de RMN  $^{31}\text{P}_{\text{CPD}}(\text{CDCl}_3)$  - [2(*E/Z*) - 2 - ({5- [3- (trifluorometil) fenil] -2-furil} metileno)hidrazinil] 2-oxoetilfosfonato de dietila (11).



**Figura 100** - Espectro de massas - [2(*E/Z*)-2-({5-[3-(trifluorometil)fenil]-2-furil}metileno)hidrazinil]2-oxoetilfosfonato de dietila (11).

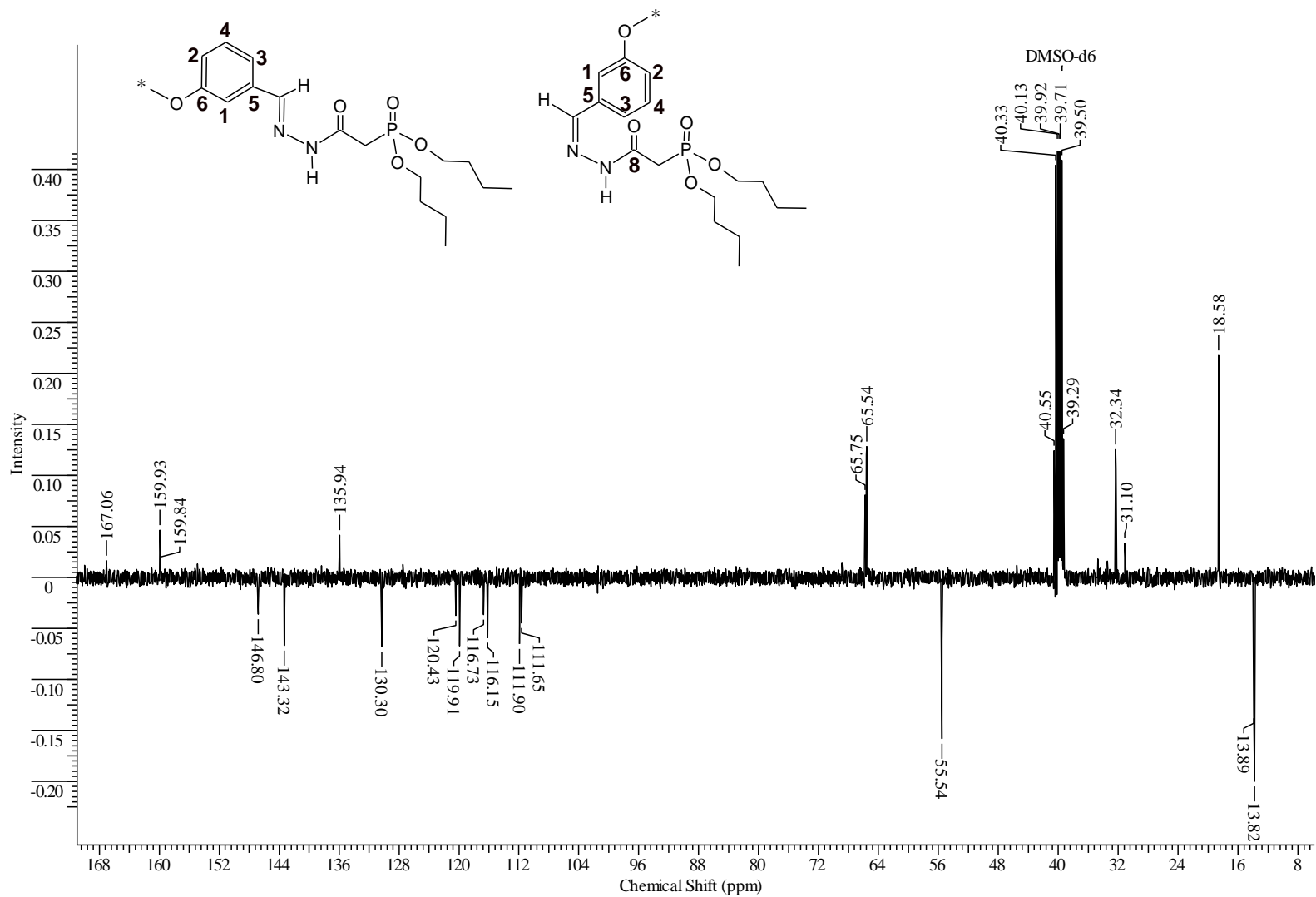


**Figura 101** - Espectro de IV (Célula de NaCl) - [2(*E/Z*) -2- (3-metoxibenzilideno)hidrazinil] -2- oxoetilfosfonato de dibutila (12).

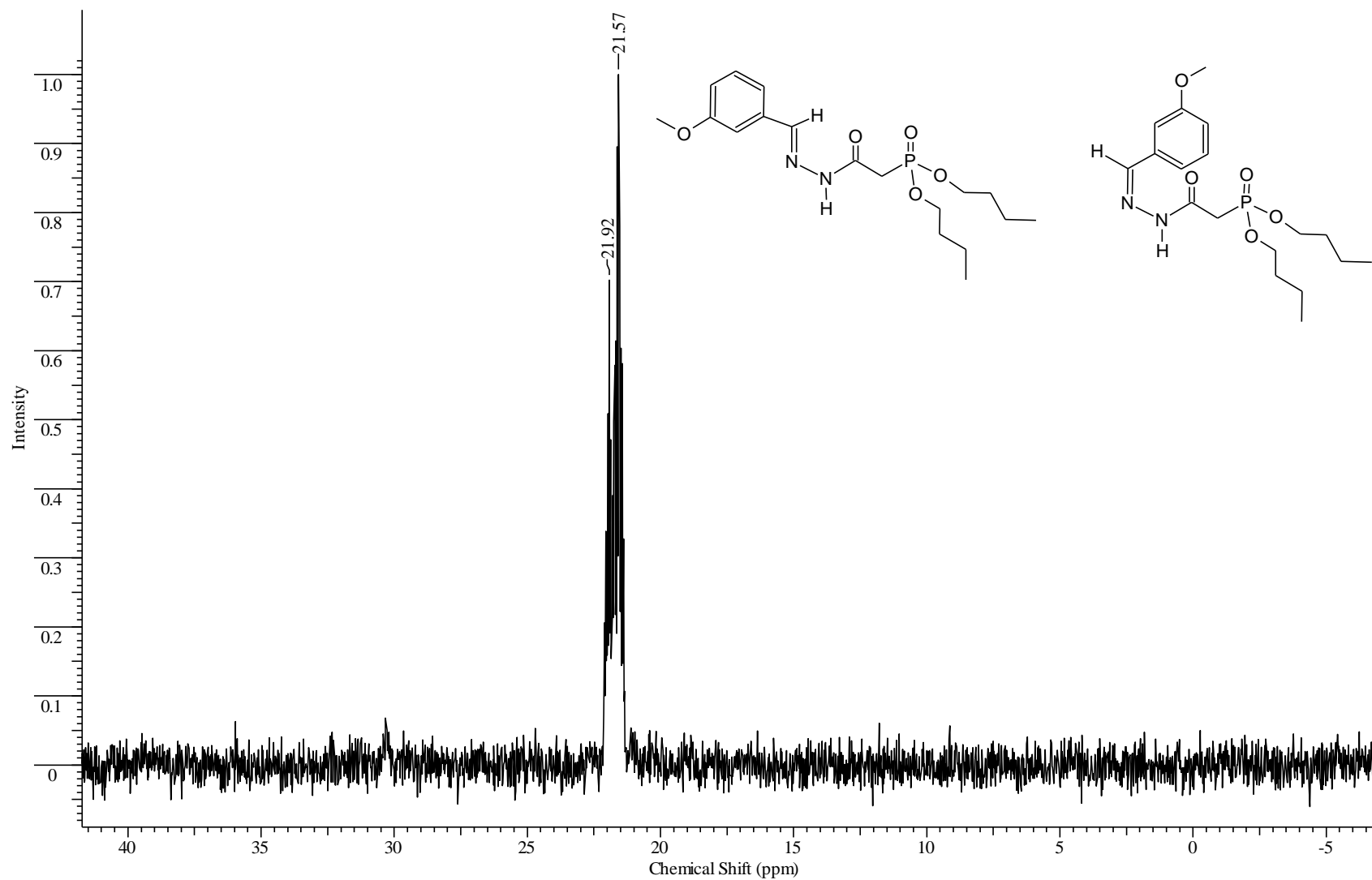


**Figura 102** - Espectro de RMN <sup>1</sup>H (DMSO) - [2(E/Z)-2-(3-metoxibenzilideno)hidrazinil]-2-oxoetilfosfonato de dibutila (12).

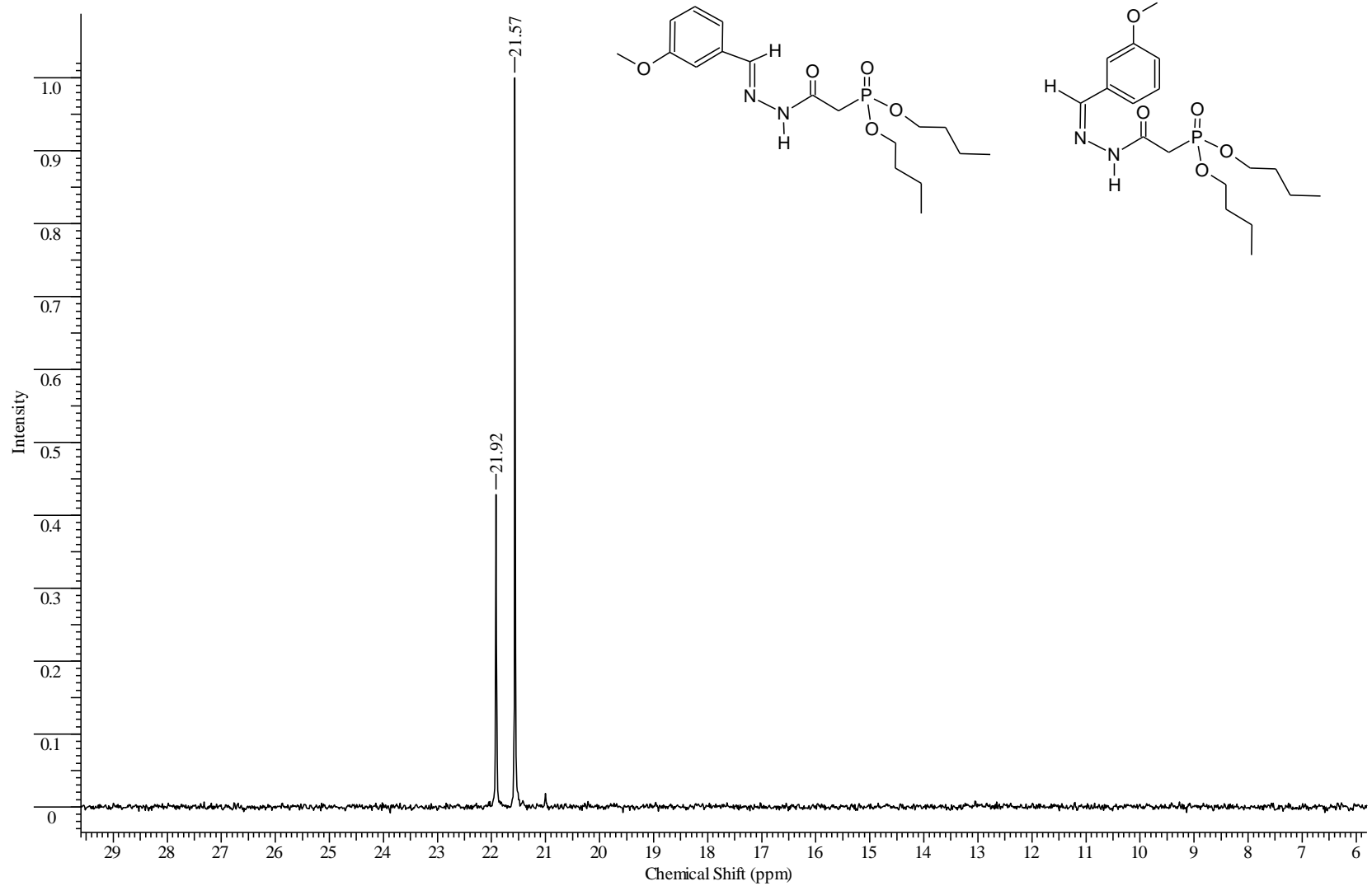




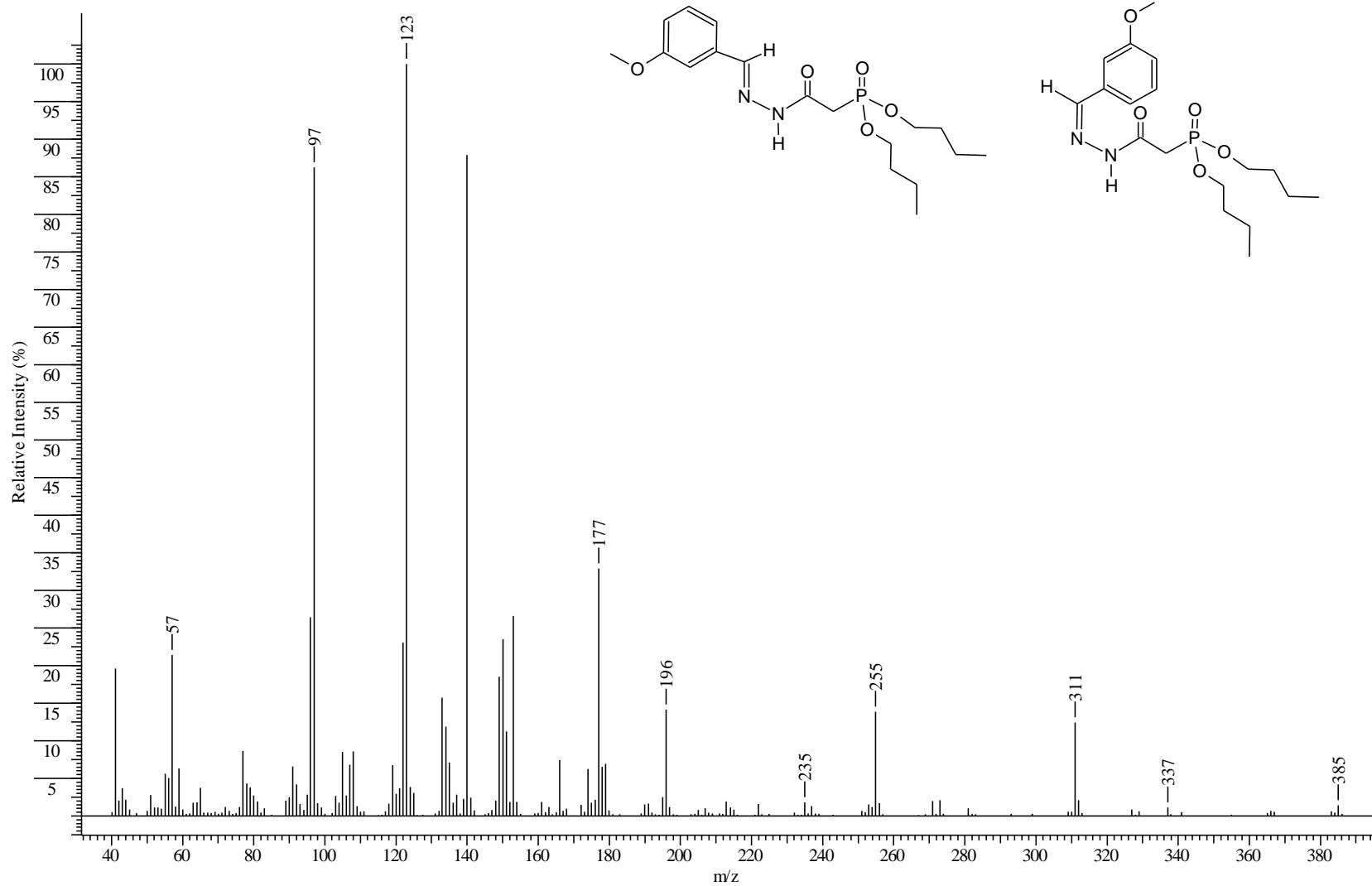
**Figura 103** - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) - [2(E/Z)-2-(3-metoxibenzilideno)hidrazinil]-2-oxoetilfosfonato de dibutila (12).



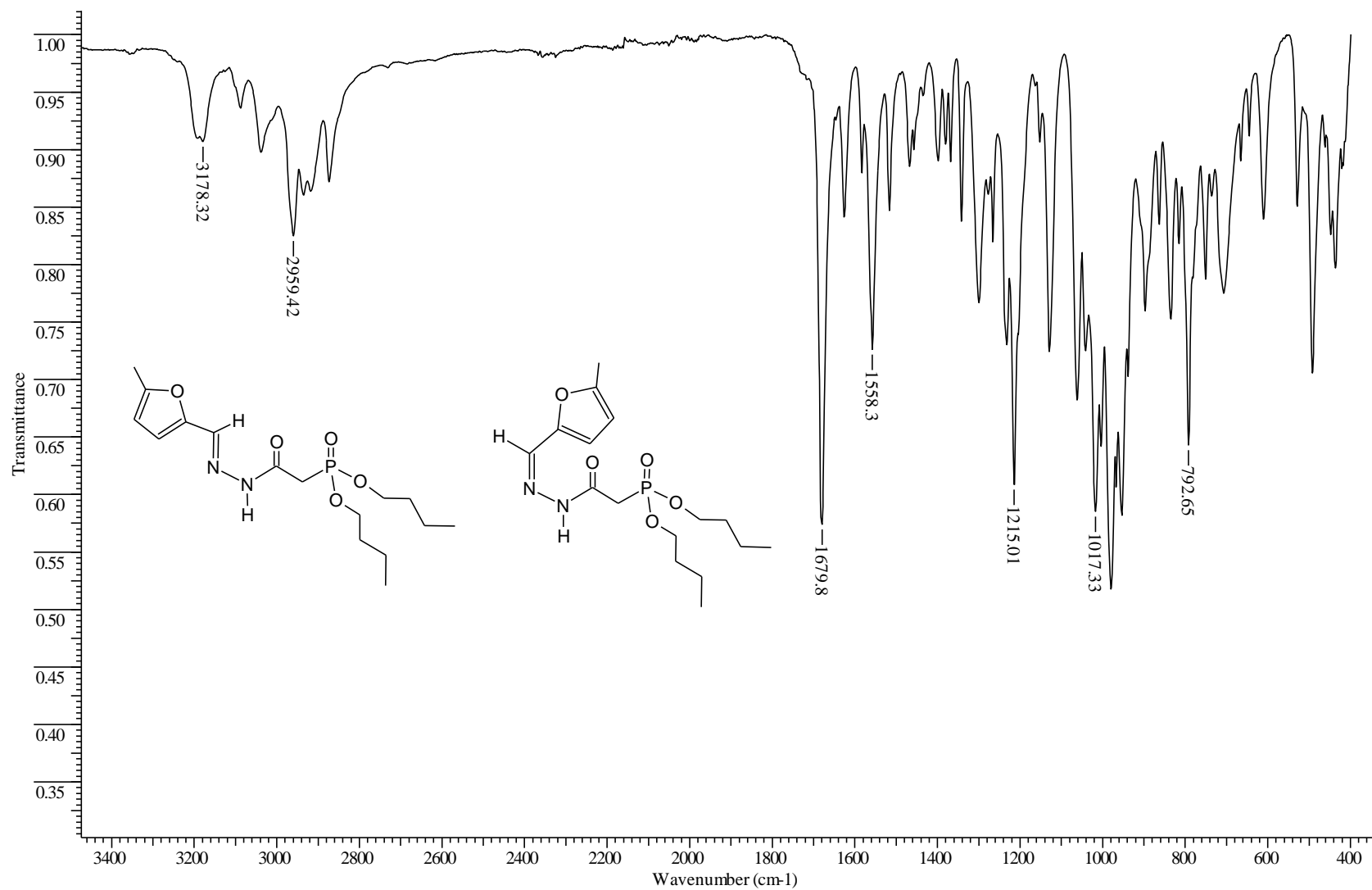
**Figura 104** - Espectro de RMN  $^{31}\text{P}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) - [2(*E/Z*)-2-(3-metoxibenzilideno)hidrazinil]-2-oxoetilfosfonato de dibutila (12).



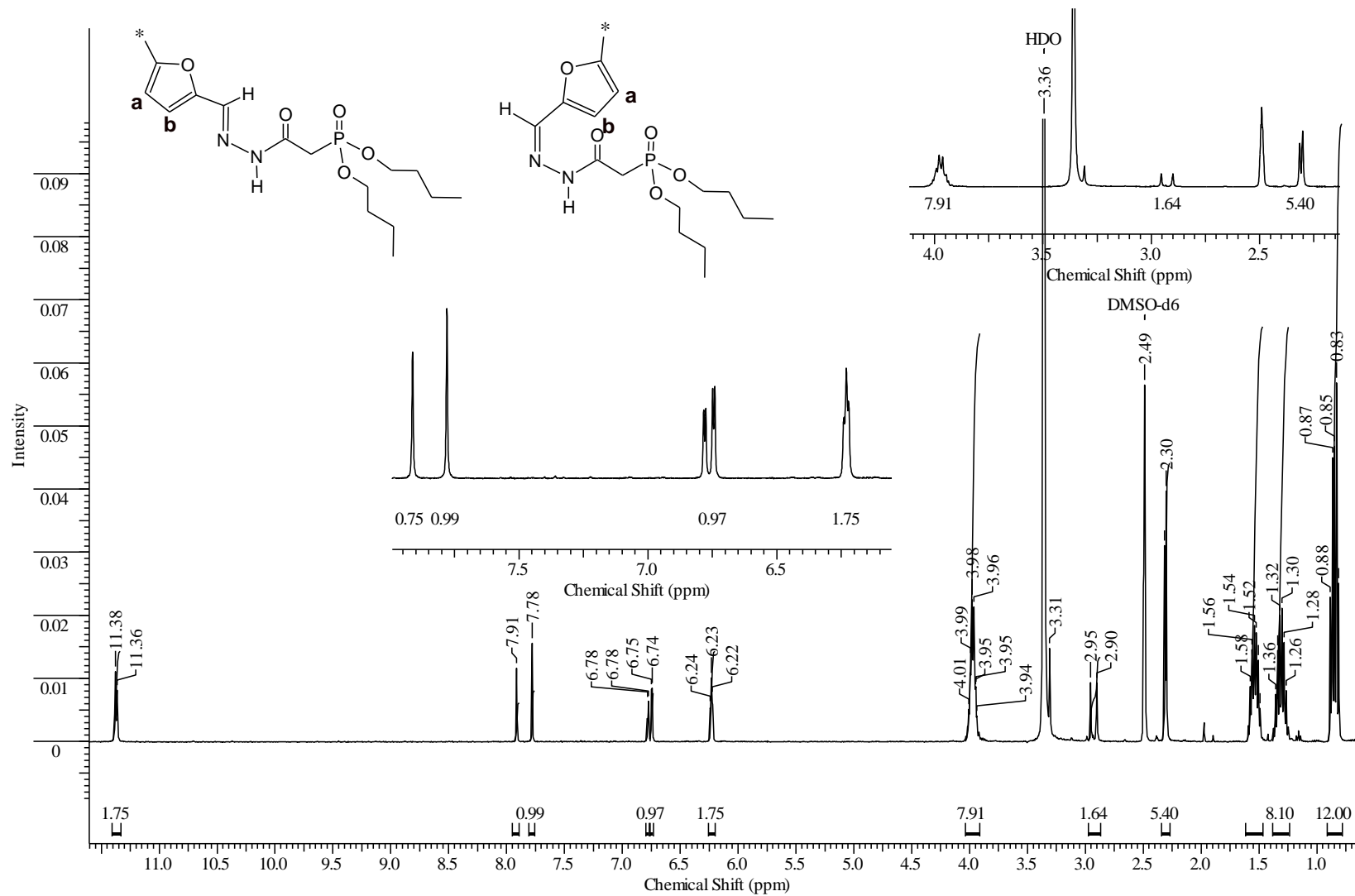
**Figura 105** - Espectro de RMN  $^{31}\text{P}_{\text{CPD}}(\text{CDCl}_3)$  - [2(*E/Z*)-2-(3-metoxibenzilideno)hidrazinil]-2-oxoetilfosfonato de dibutila (12).



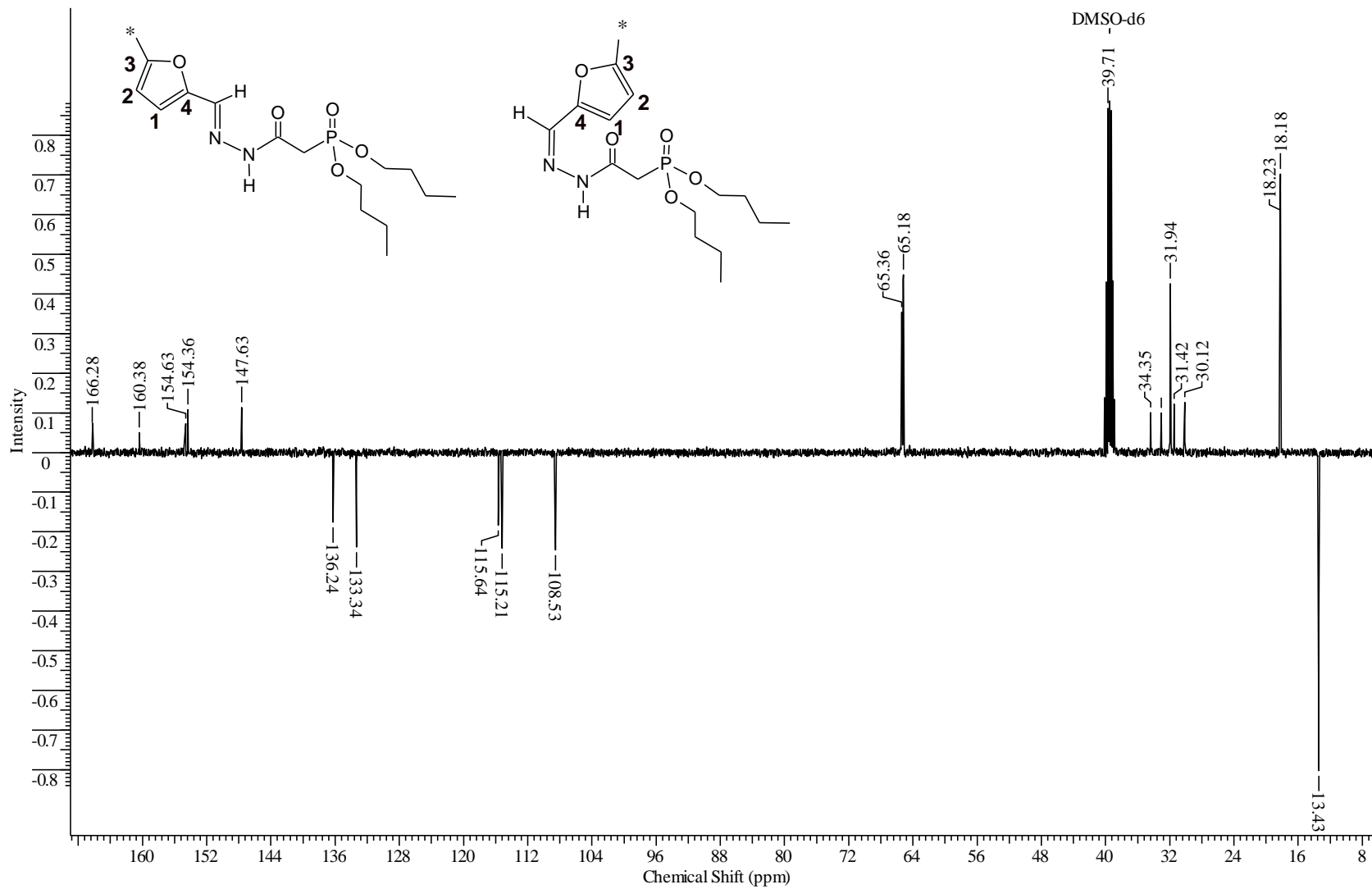
**Figura 106** - Espectro de massas - [2(E/Z)-2-(3-metoxibenzilideno)hidrazinil]-2-oxoetilfosfonato de dibutila (12).



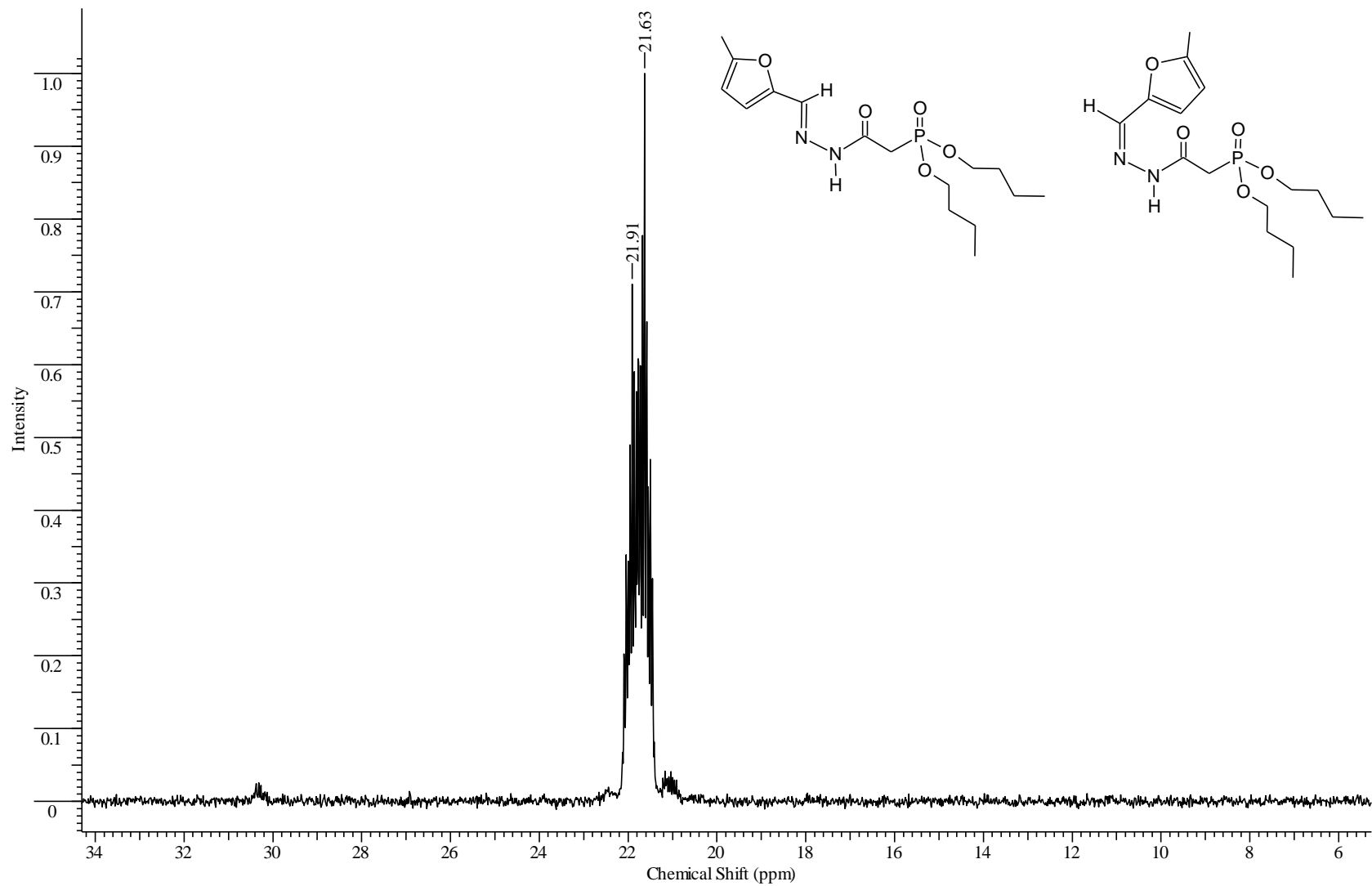
**Figura 107** - Espectro de IV (Célula de NaCl) - [2(E/Z) -2 - (5-metil-2-furilmetileno)hidrazinil] -2- oxoetilfosfonato de dibutila (13).



**Figura 108** - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (DMSO) -  $[2(E/Z)-2-(5\text{-metil-2-furilmetileno)hidrazinil}]-2\text{-oxoetilfosfonato de dibutila}$  (13).

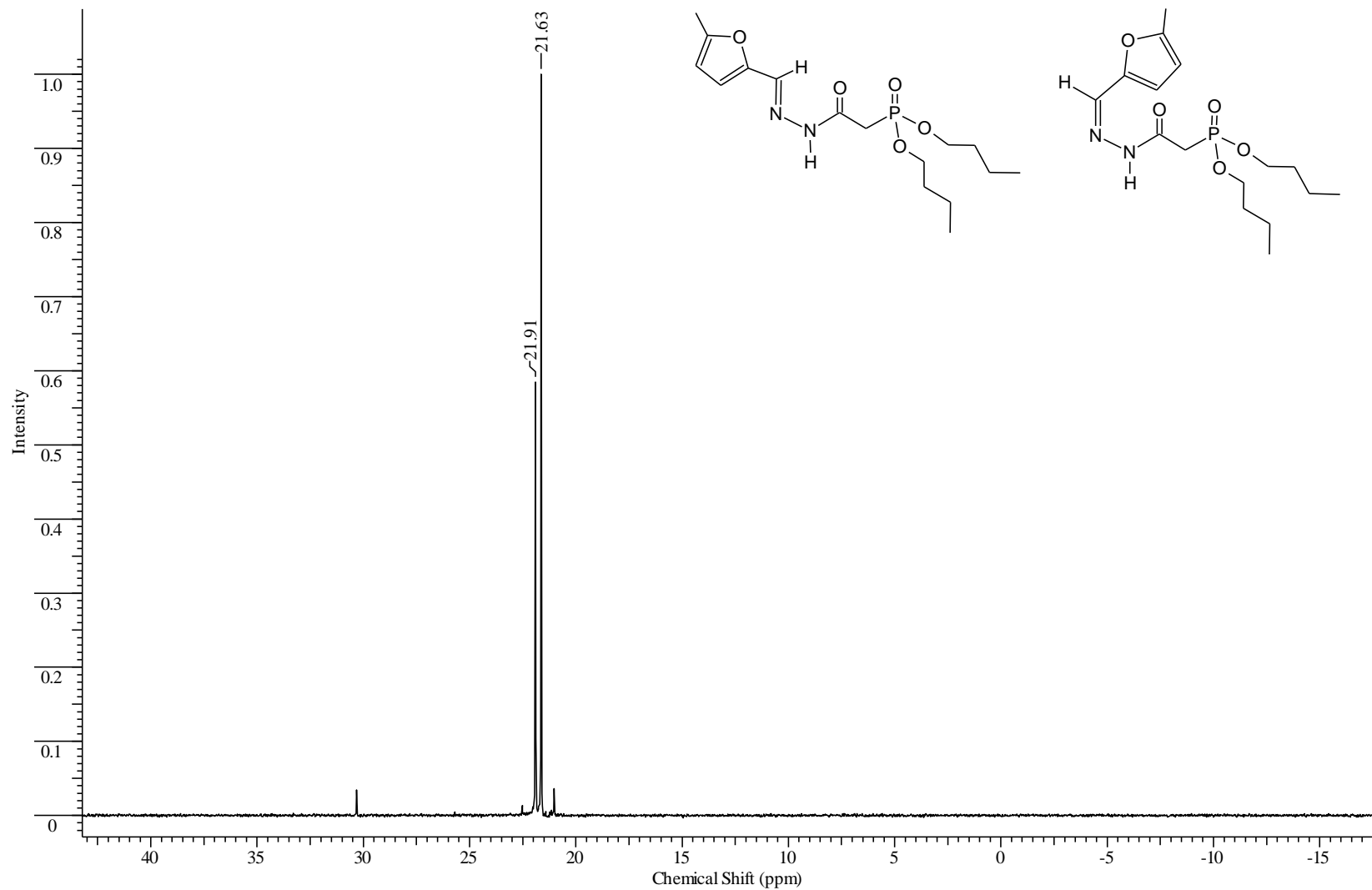


**Figura 109** - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) - [2(*E/Z*)-2-(5-metil-2-furilmetileno)hidrazinil]-2-oxoetilfosfonato de dibutila (13).

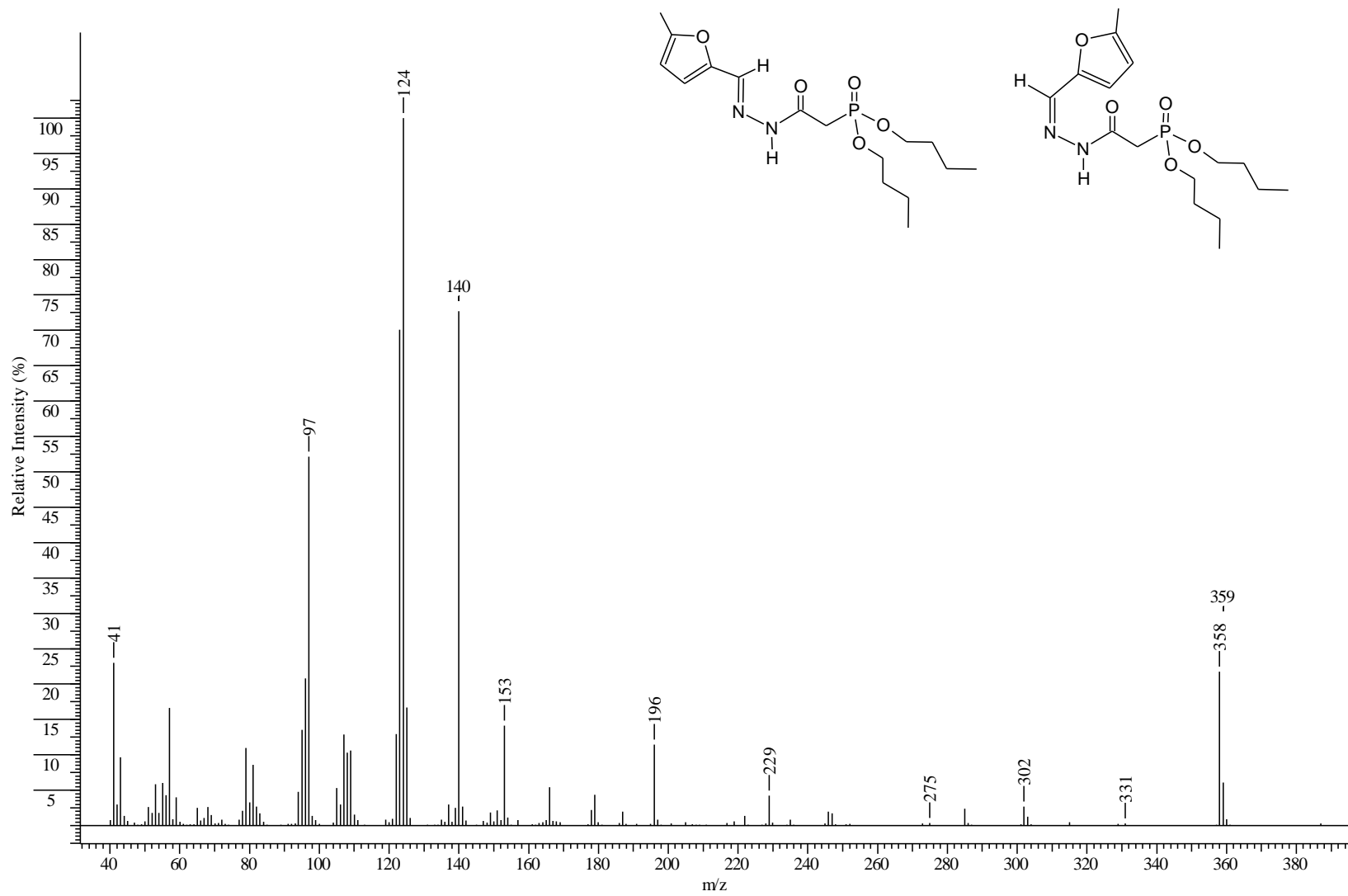


**Figura 110** - Espectro de RMN  $^{31}\text{P}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) - [2(*E/Z*)-2-(5-metil-2-furilmetileno)hidrazinil]-2-oxoetilfosfonato de dibutila (13).

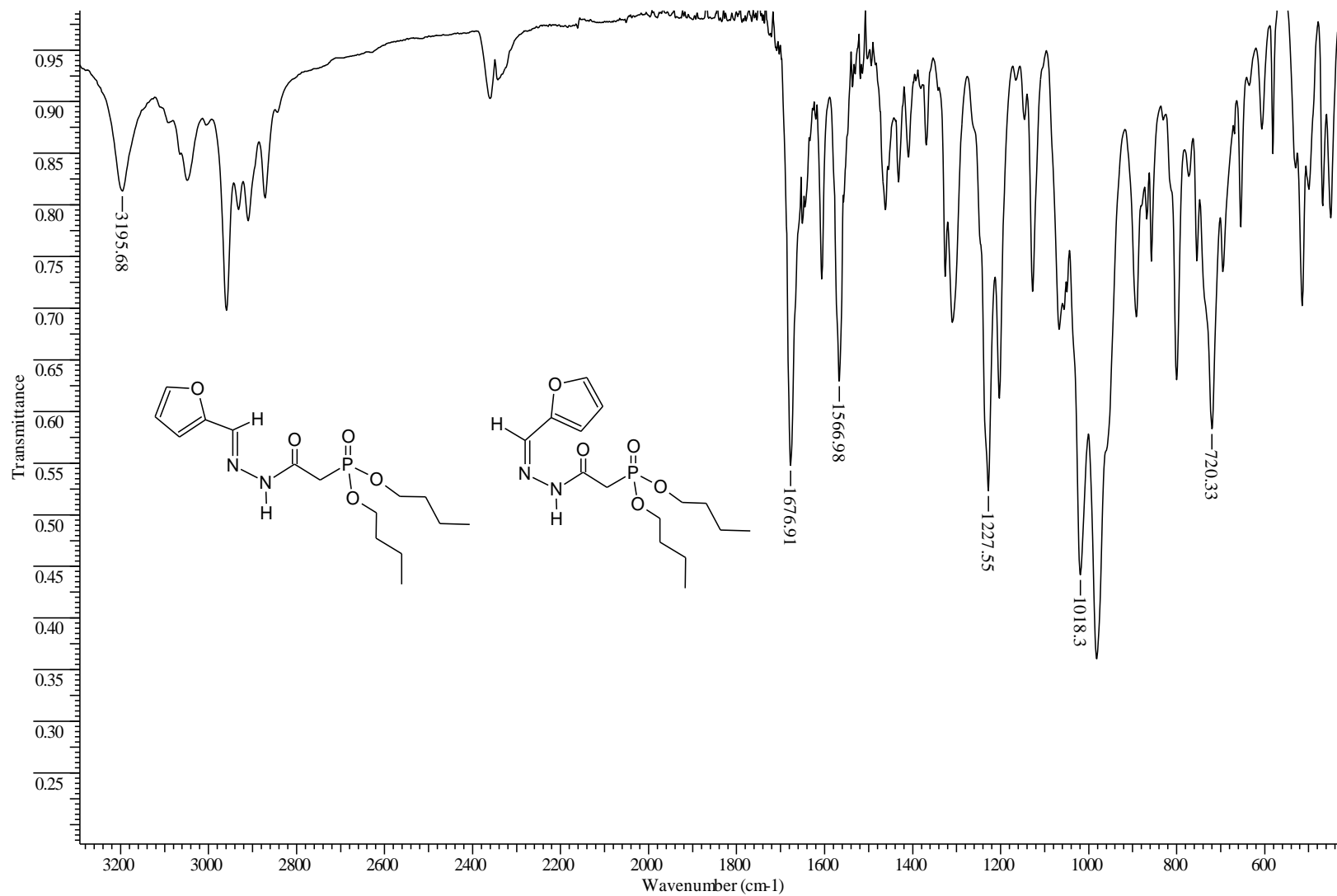




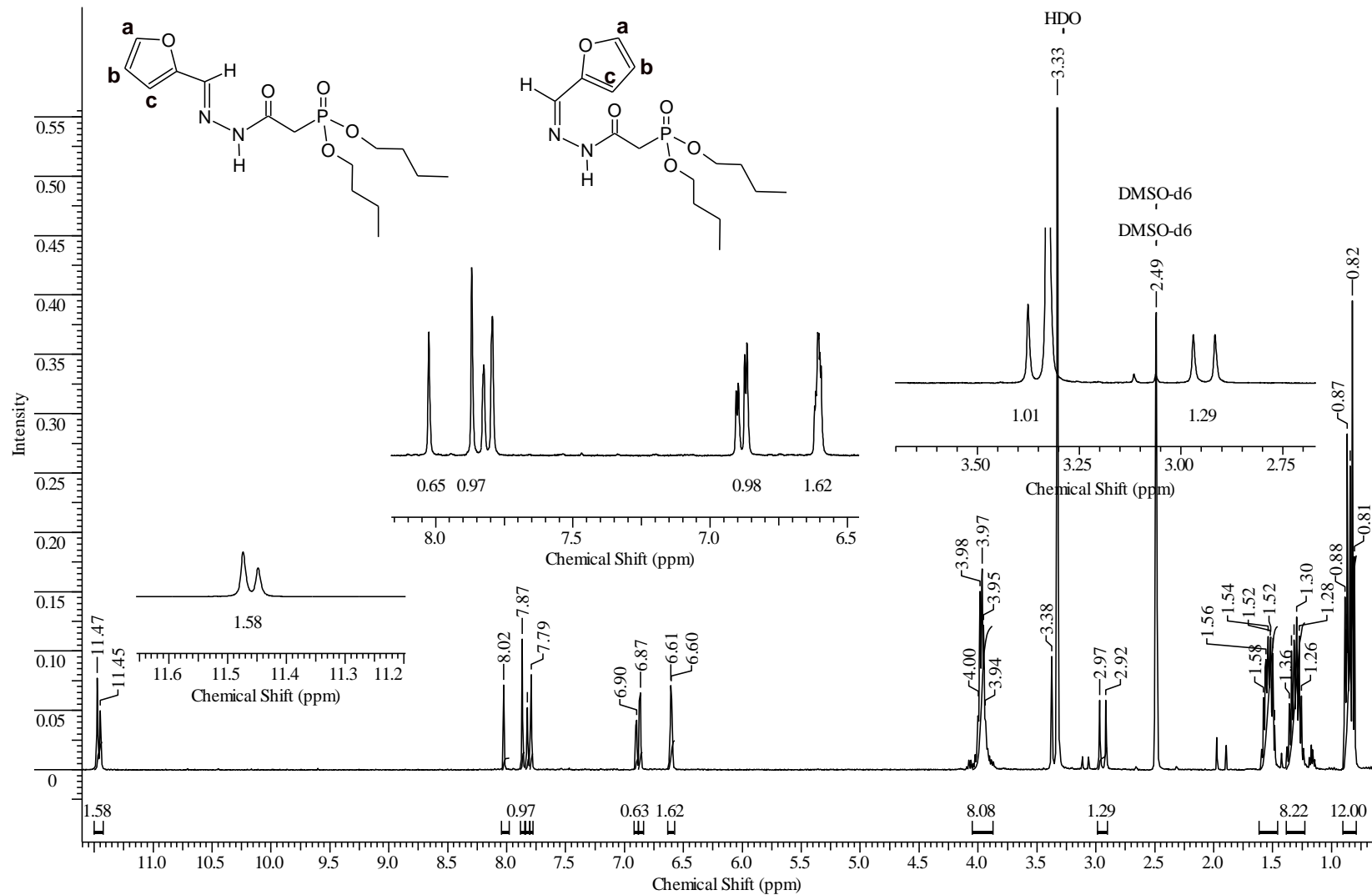
**Figura 111** - Espectro de RMN  $^{31}\text{PCPD}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) - [2(*E/Z*)-2-(5-metil-2-furilmetileno)hidrazinil]-2-oxoetilfosfonato de dibutila (13).



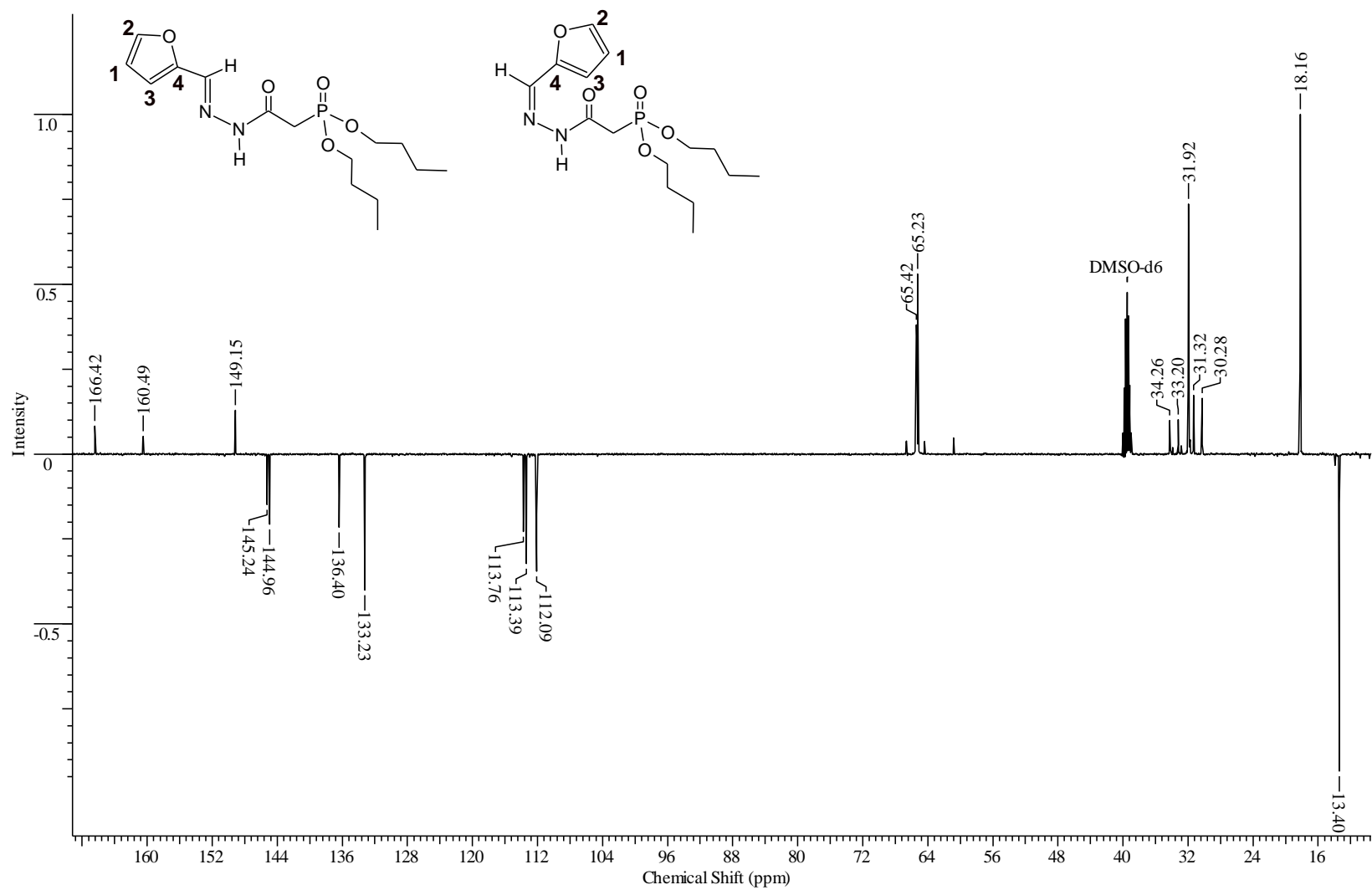
**Figura 112** - Espectro de massas - [2(E/Z)-2-(5-metil-2-furilmetileno)hidrazinil]-2-oxoetilfosfonato de dibutila (13).



**Figura 113** - Espectro de IV (Célula de NaCl) - [2(*E/Z*)-2-(2-furilmetileno)hidrazinil]-2-oxoetilfosfonato de dibutila (14).



**Figura 114** - Espectro de RMN <sup>1</sup>H (DMSO) - [2(E/Z)-2-(2-furilmetileno)hidrazinil]-2-oxoetilfosfonato de dibutila (14).



**Figura 115** - Espectro de RMN 13C (CDCl<sub>3</sub>) - [2(*E/Z*)-2-(2-furilmetileno)hidrazinil]-2-oxoetilfosfonato de dibutila (14).

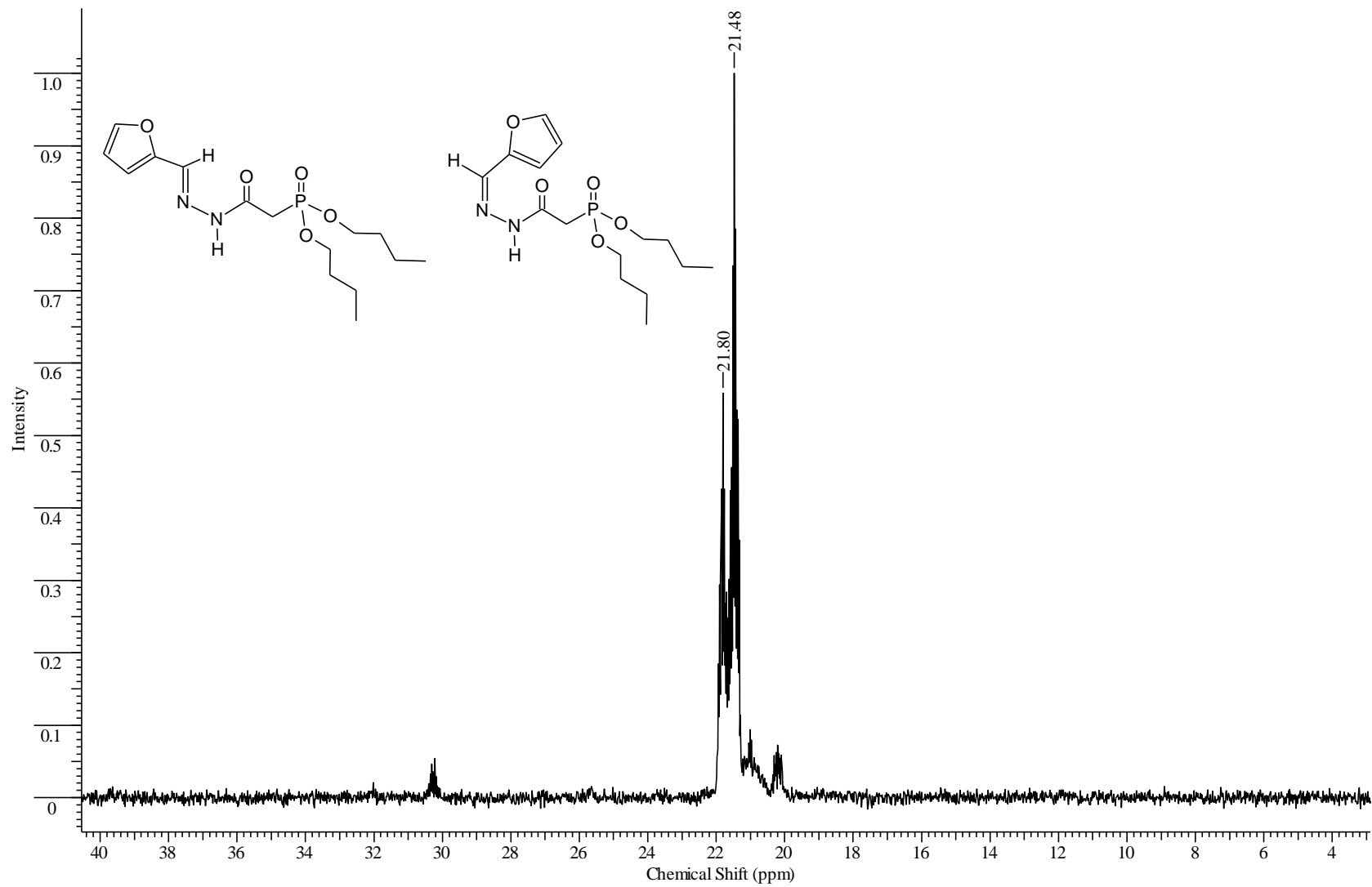
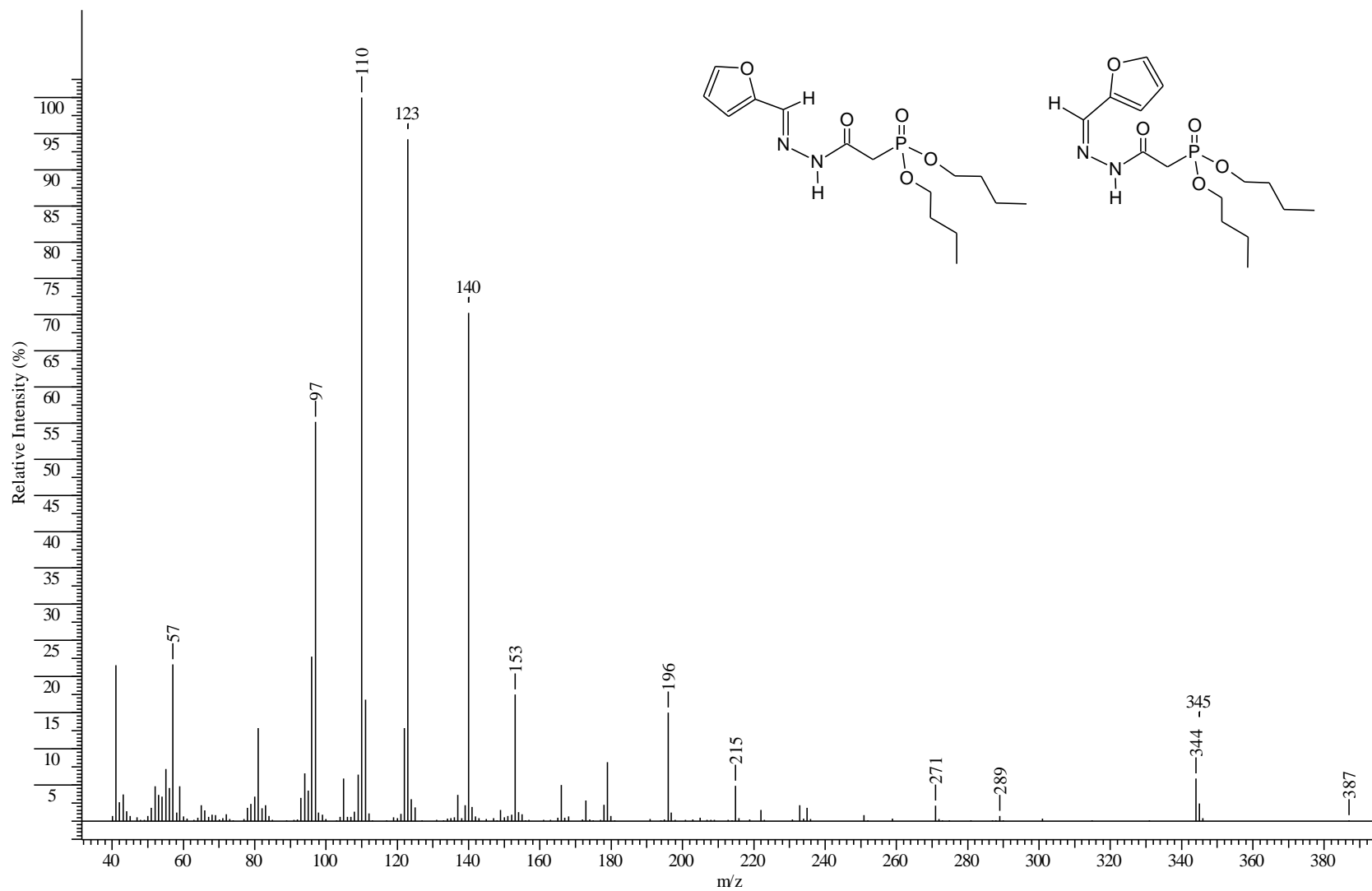
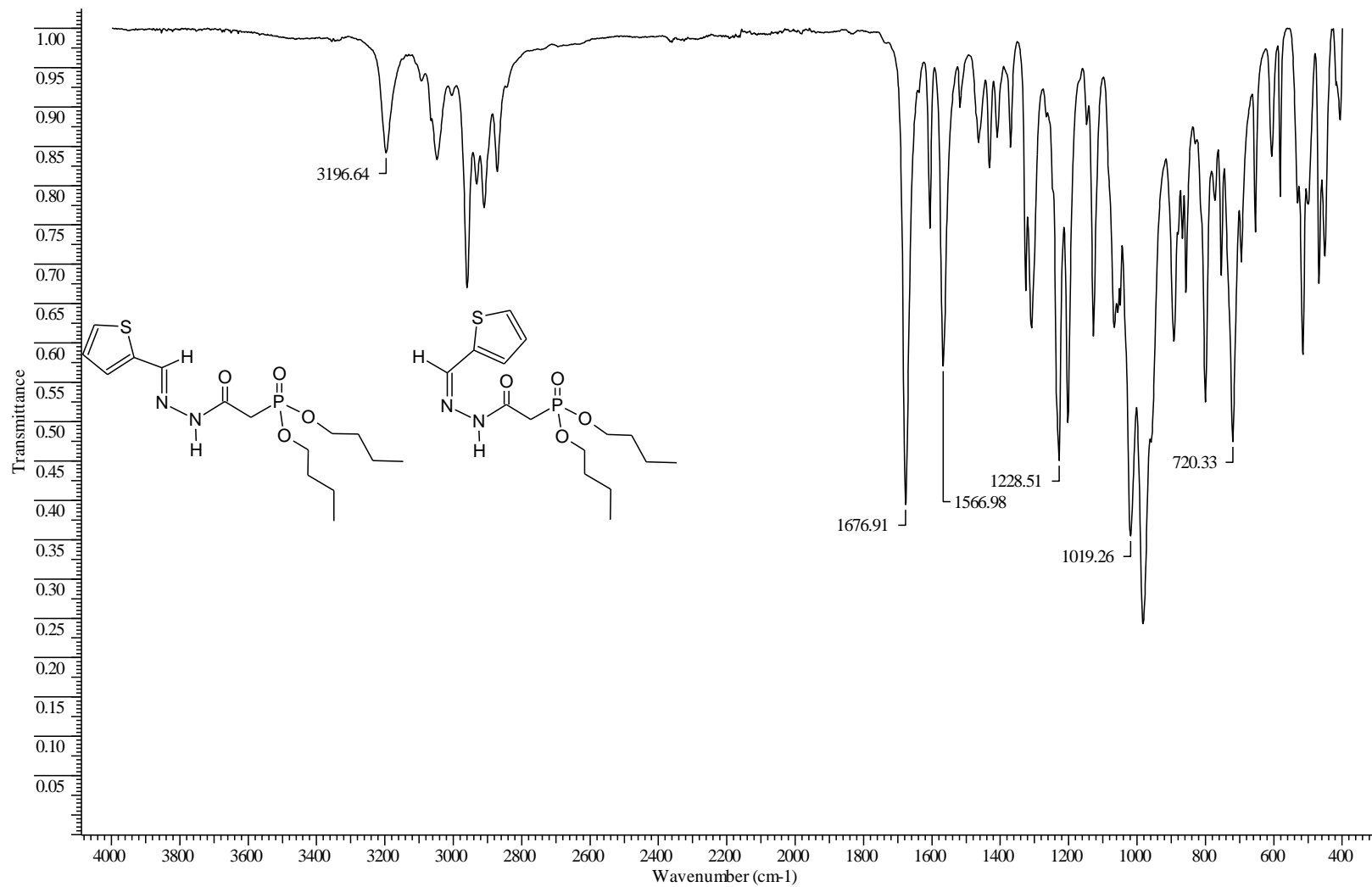


Figura 116 - Espectro de RMN 31P (CDCl<sub>3</sub>) - [2(*E/Z*)-2-(2-furilmetileno)hidrazinil]-2-oxoetilfosfonato de dibutila (14).

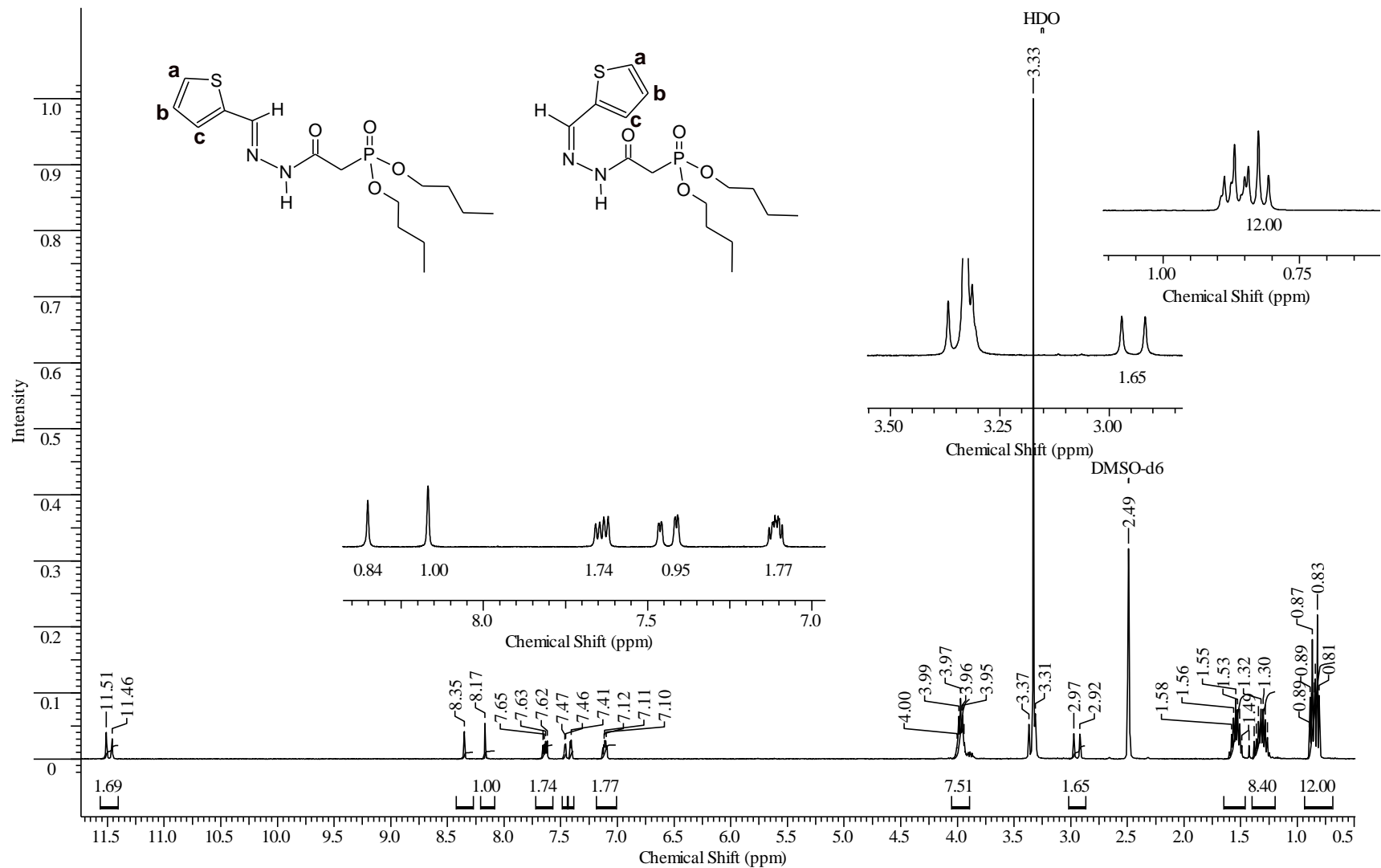


**Figura 117** - Espectro de RMN  $^{31}\text{P}_{\text{CPD}}(\text{CDCl}_3)$  - [2-(E/Z)-2-(2-furilmetileno)hidrazinil]-2-oxoetilfosfonato de dibutila (14).

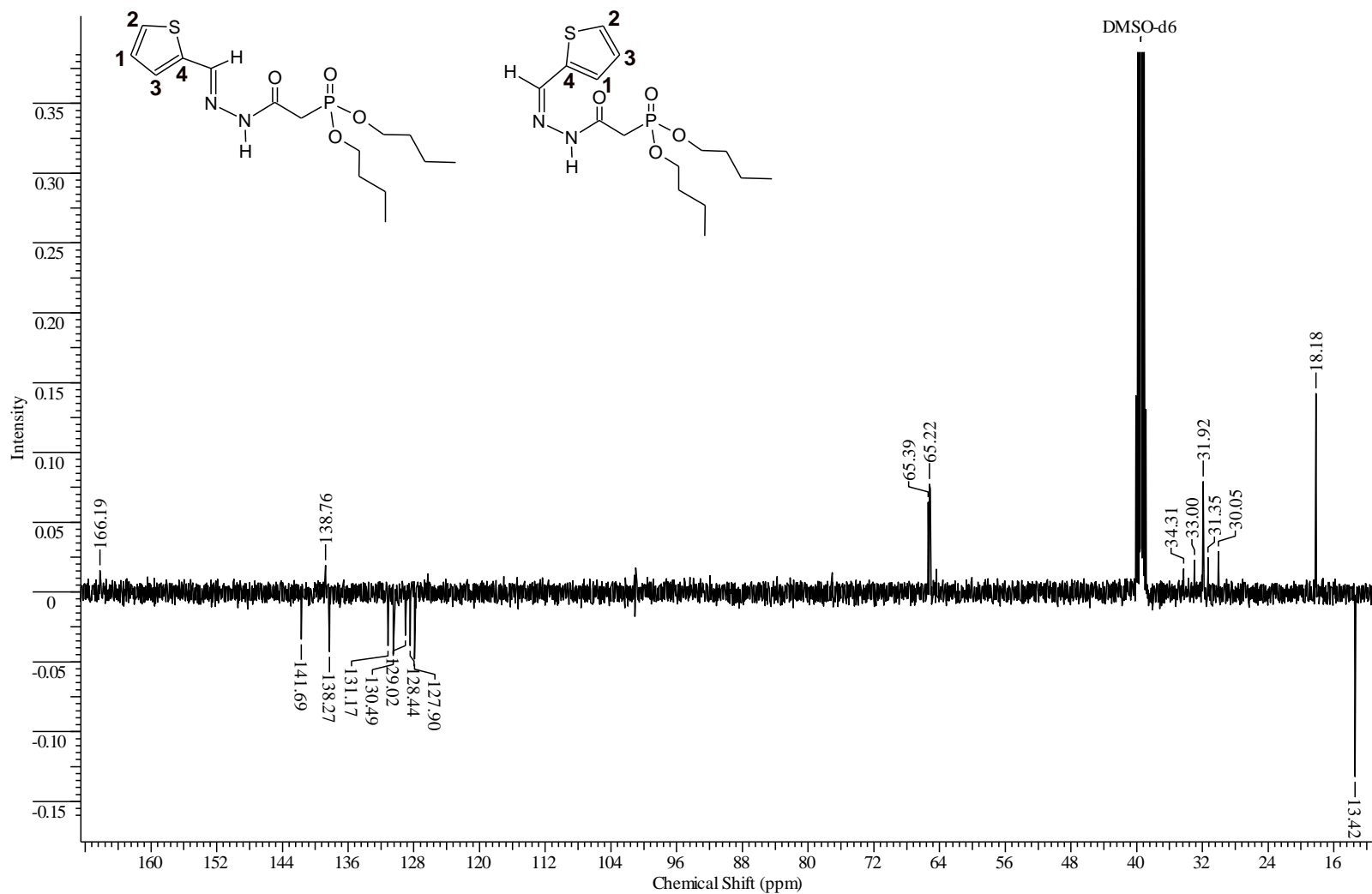


**Figura 118** - Espectro de IV (Célula de NaCl) - [2(E/Z)-2-(2-tienilmetileno)hidrazinil]-2-oxoetilfosfonato de dibutila (15).

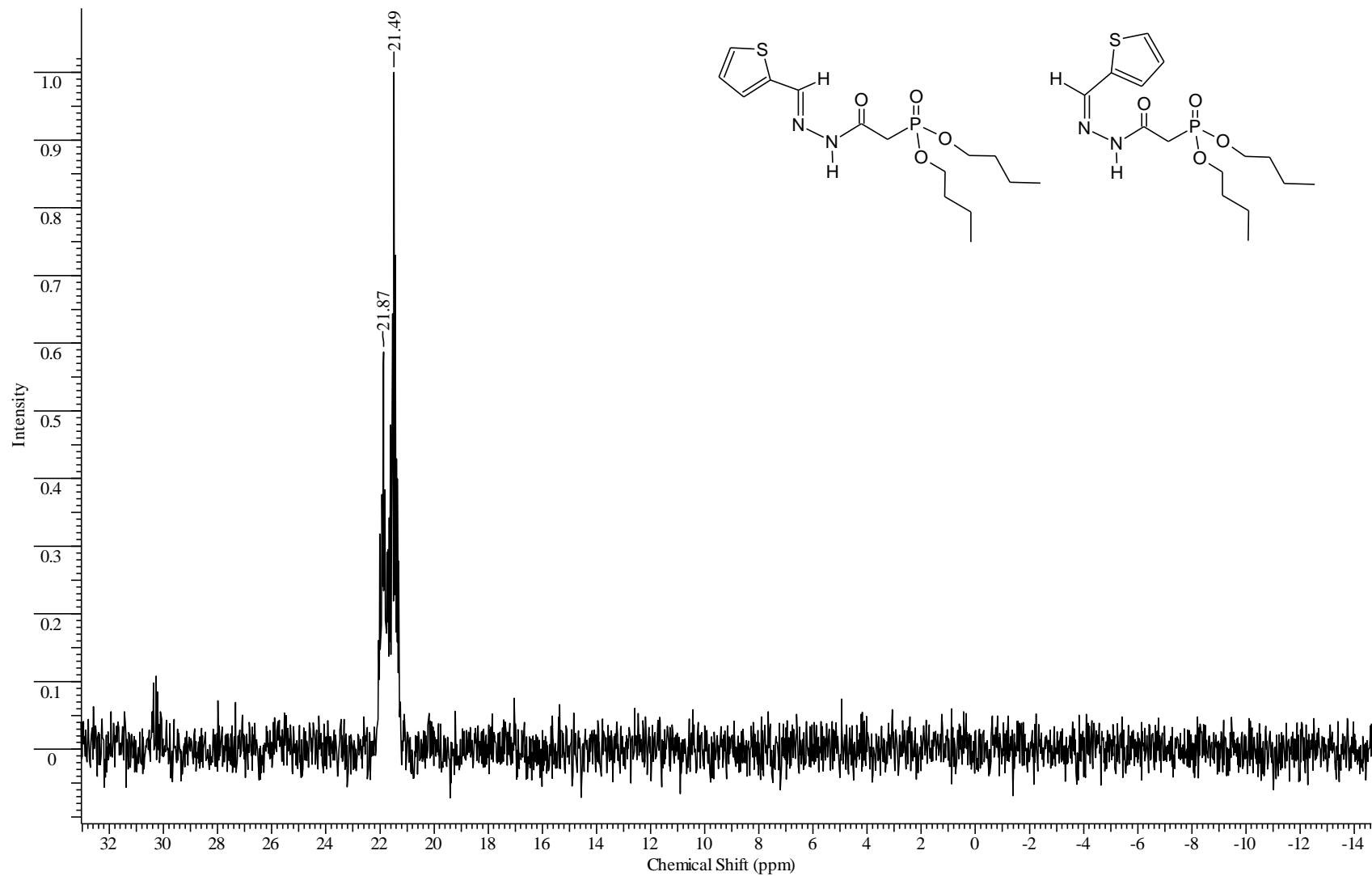




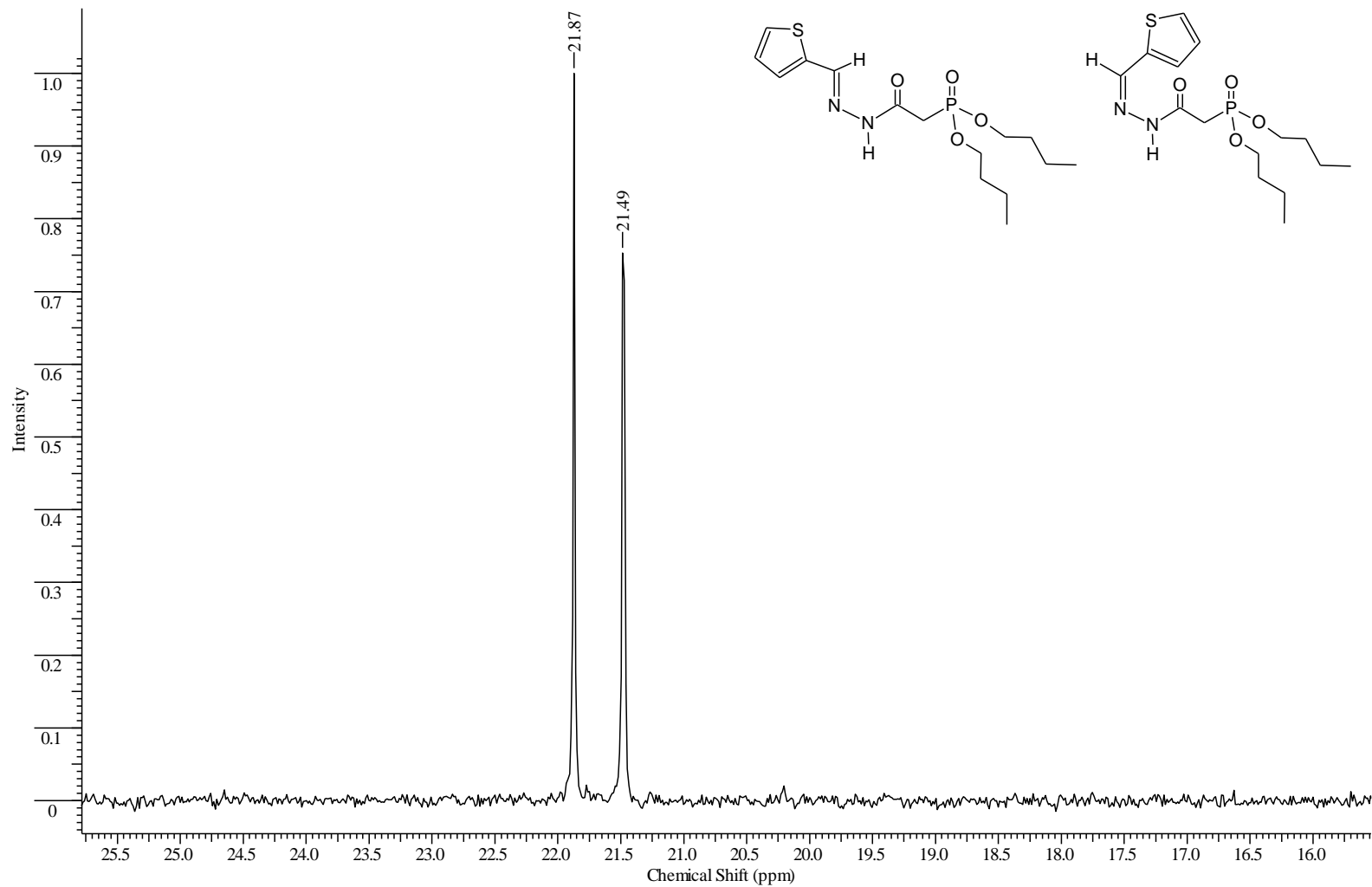
**Figura 119** - Espectro de RMN 1H (DMSO) - [2(E/Z)-2-(2-tienilmetileno)hidrazinil]-2-oxoetilfosfonato de dibutila (15).



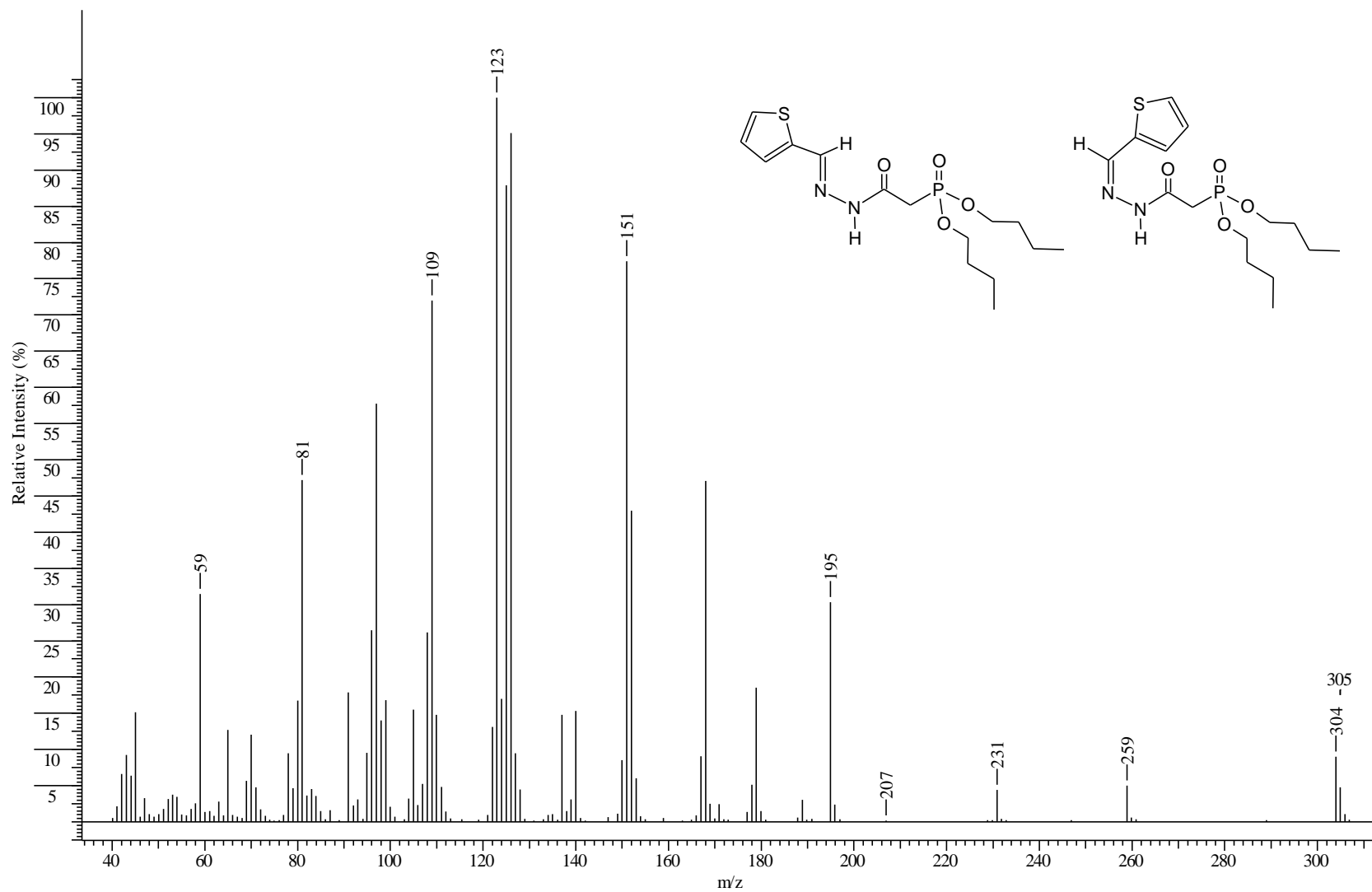
**Figura 120** - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) - [2(*E/Z*)-2-(2-tienilmetileno)hidrazinil]-2-oxoetilfosfonato de dibutila (15).



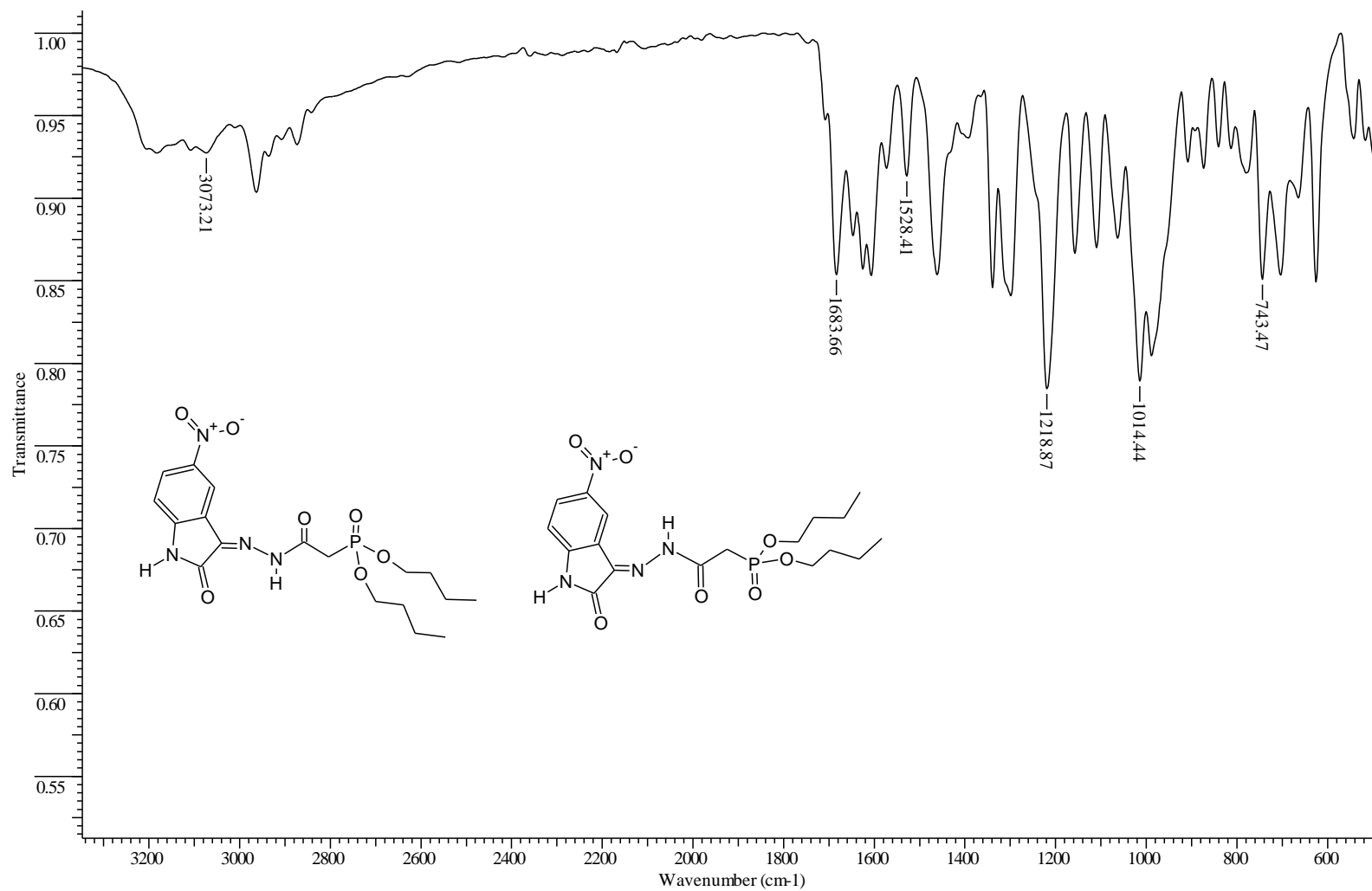
**Figura 121** - Espectro de RMN  $^{31}\text{P}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) - [2(*E/Z*) -2- (2-tienilmetileno)hidrazinil] -2- oxoetilfosfonato de dibutila (15).



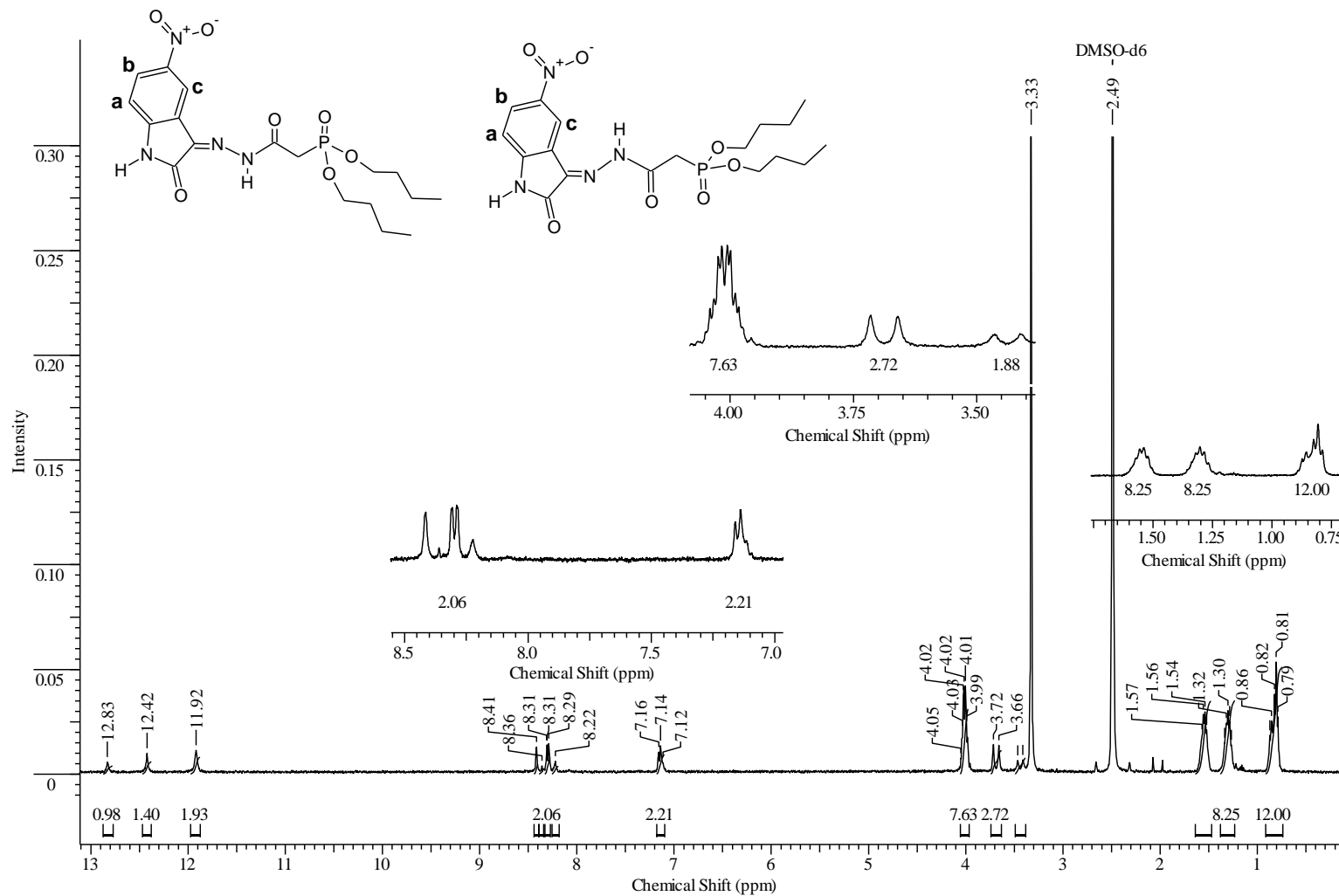
**Figura 122** - Espectro de RMN  $^{31}\text{P}_{\text{CPD}}(\text{CDCl}_3)$  - [2(*E/Z*)-2-(2-tienilmetileno)hidrazinil]-2-oxoetilfosfonato de dibutila (15).



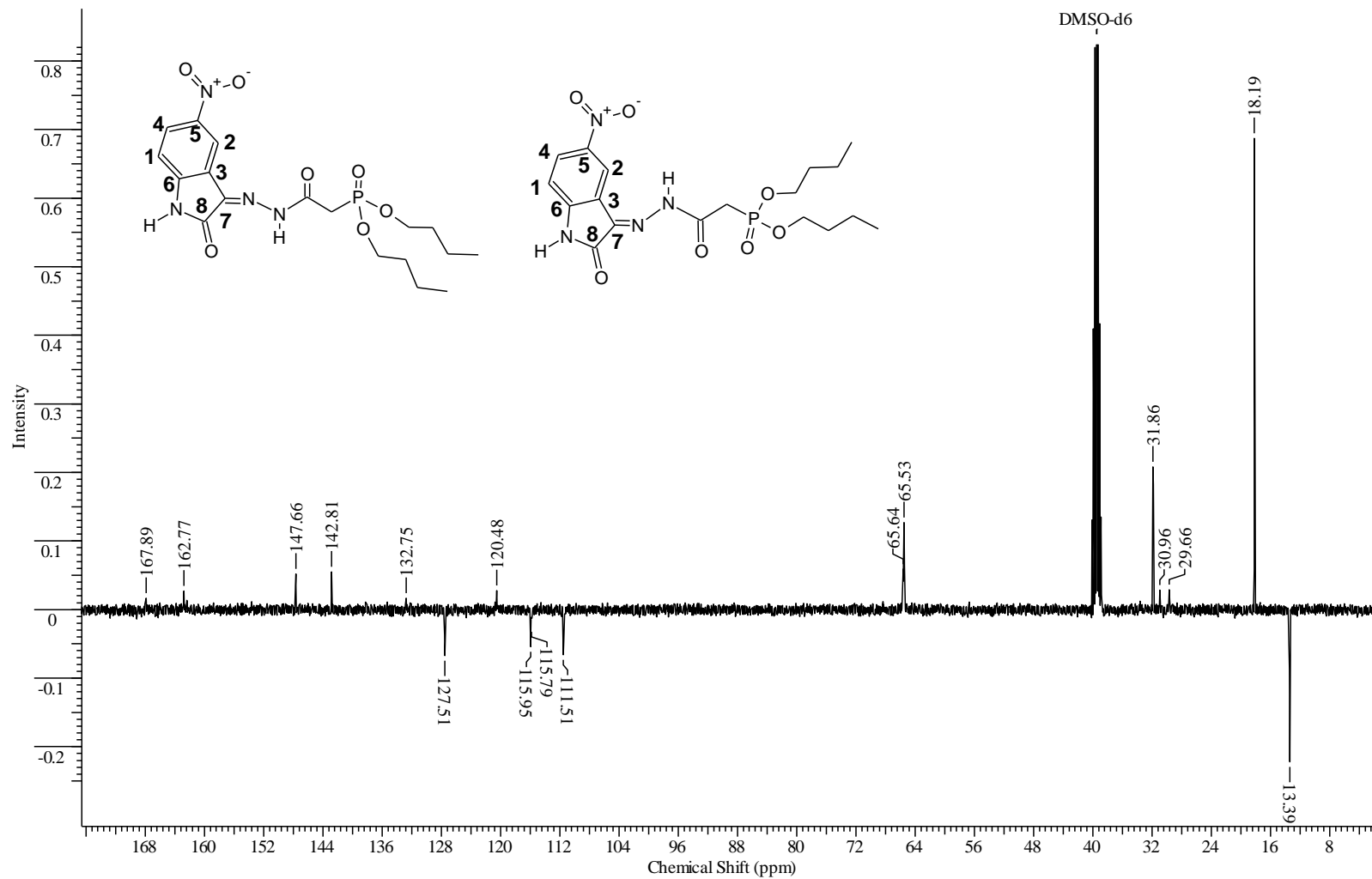
**Figura 123** - Espectro de massas - [2(*E/Z*)-2-(2-tienilmetileno)hidrazinil]-2-oxoetilfosfonato de dibutila (15).



**Figura 124** - Espectro de IV (Célula de NaCl) - [2(*E/Z*) -2- (5-nitro-2-oxo-1,2-di-hidro-3H-indol-3-ilideno)hidrazinil] -2- oxoetilfosfonato de dibutila (16).

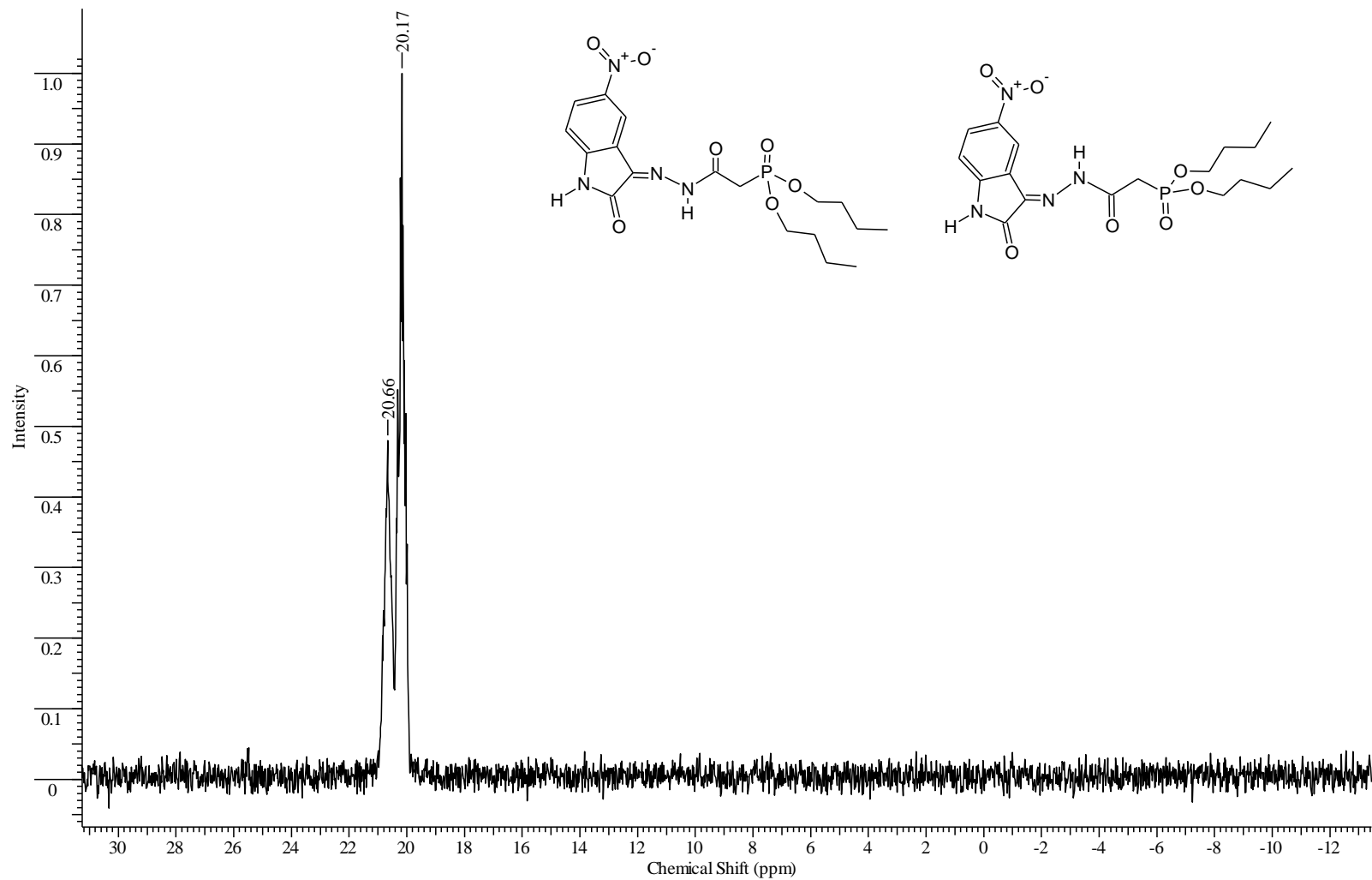


**Figura 125** - Espectro de RMN <sup>1</sup>H (DMSO) - [2(*E/Z*)-2-(5-nitro-2-oxo-1,2-di-hidro-3H-indol-3-ilideno)hidrazinil]-2-oxoetilfosfonato de dibutila (16).

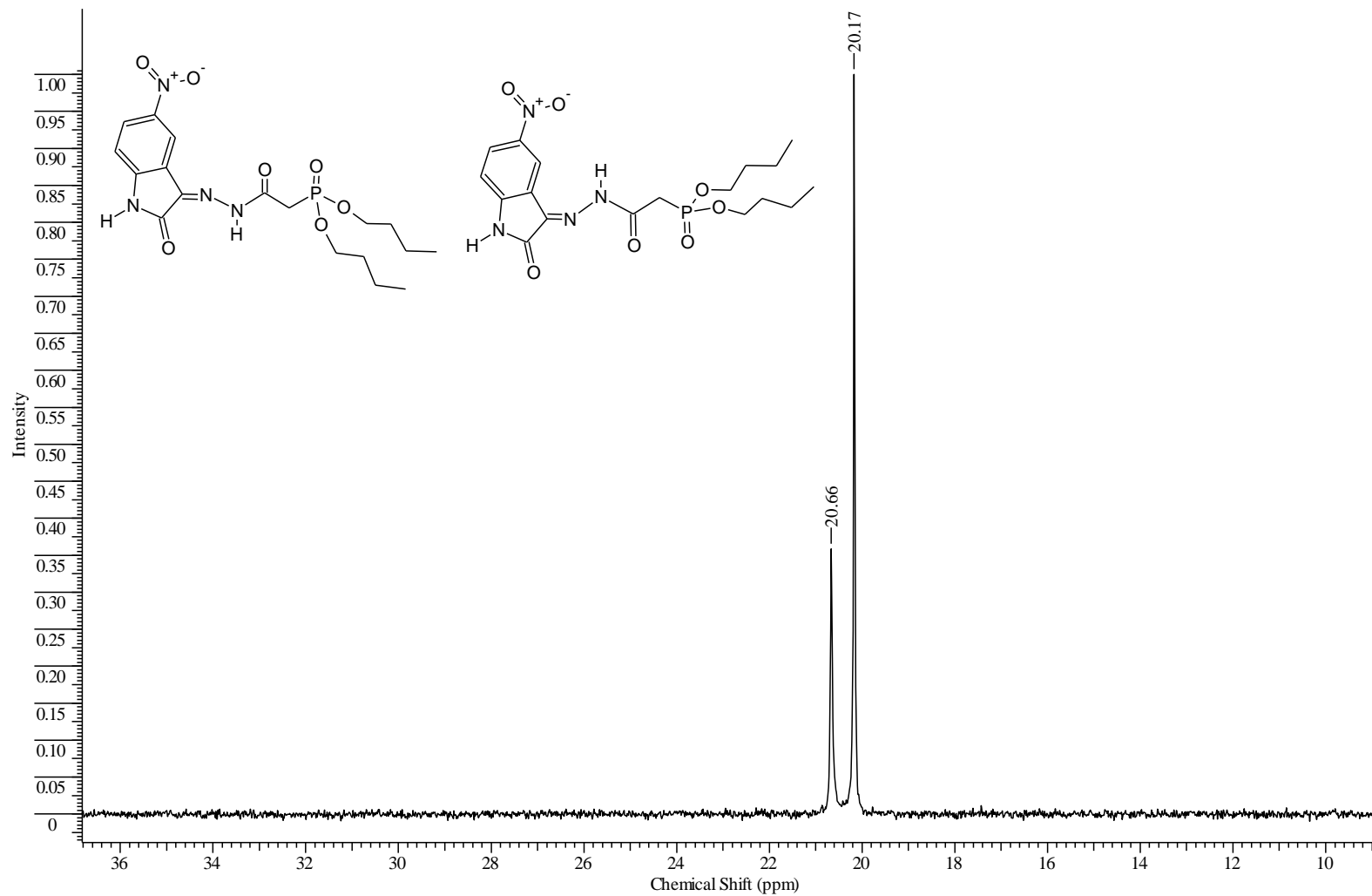


**Figura 126** - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) - [2(*E/Z*)-2-(5-nitro-2-oxo-1,2-di-hidro-3H-indol-3-ilideno)hidrazinil]-2-oxoetilfosfonato de dibutila (16).

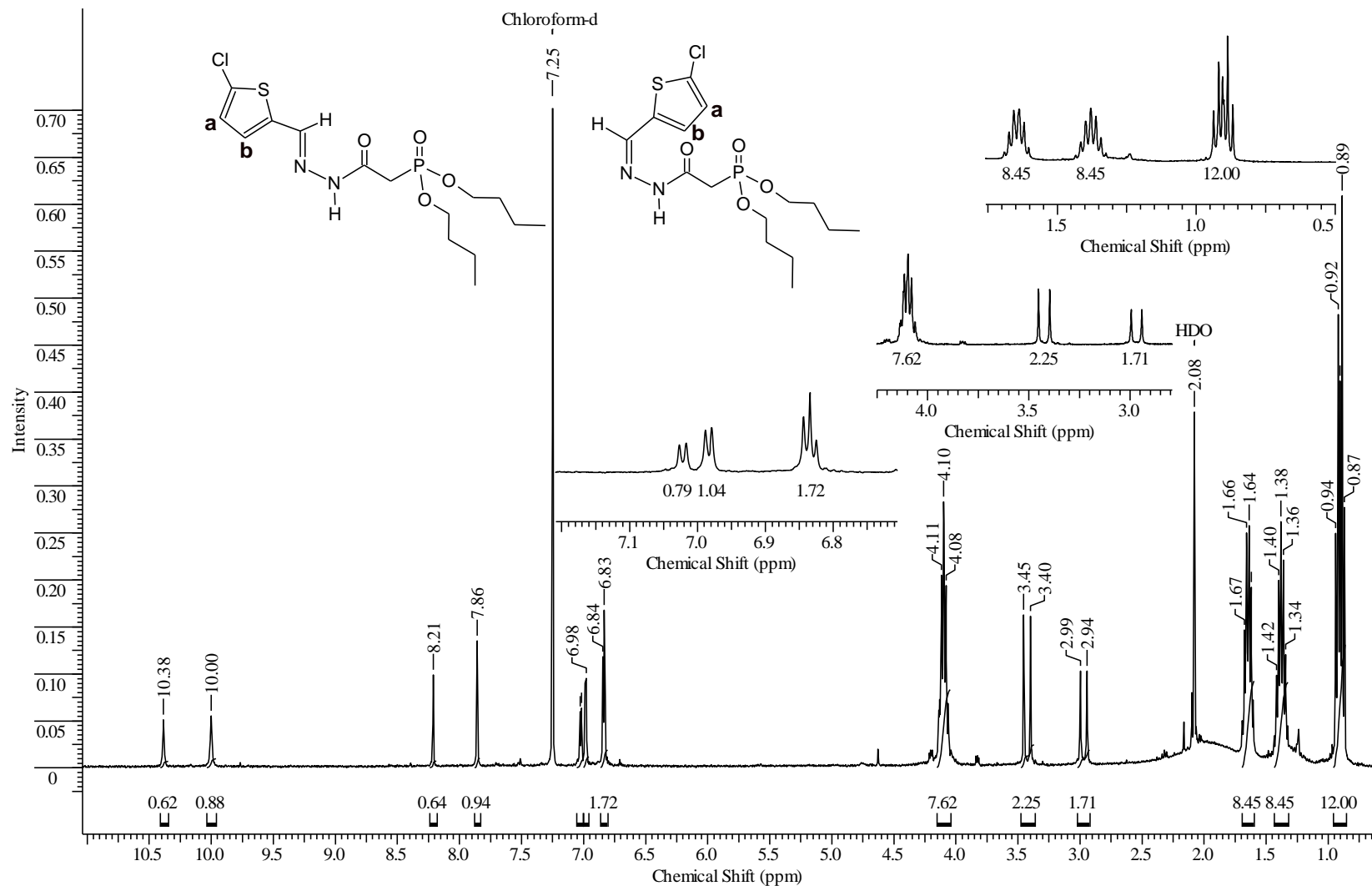




**Figura 127** - Espectro de RMN  $^{31}\text{P}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) - [2(*E/Z*)-2-(5-nitro-2-oxo-1,2-di-hidro-3H-indol-3-ilideno)hidrazinil]-2-oxoetilfosfonato de dibutila (16).



**Figura 128** - Espectro de RMN  $^{31}\text{PCPD}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) - [2(*E/Z*)-2-(5-nitro-2-oxo-1,2-dihidro-3H-indol-3-ilideno)hidrazinil]-2-oxoetilfosfonato de dibutila (16).



**Figura 129** - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) - [2(E/Z)-2-(5-cloro-2-tienilmetileno)hidrazinil]-2-oxoetilfosfonato de dibutila (17).

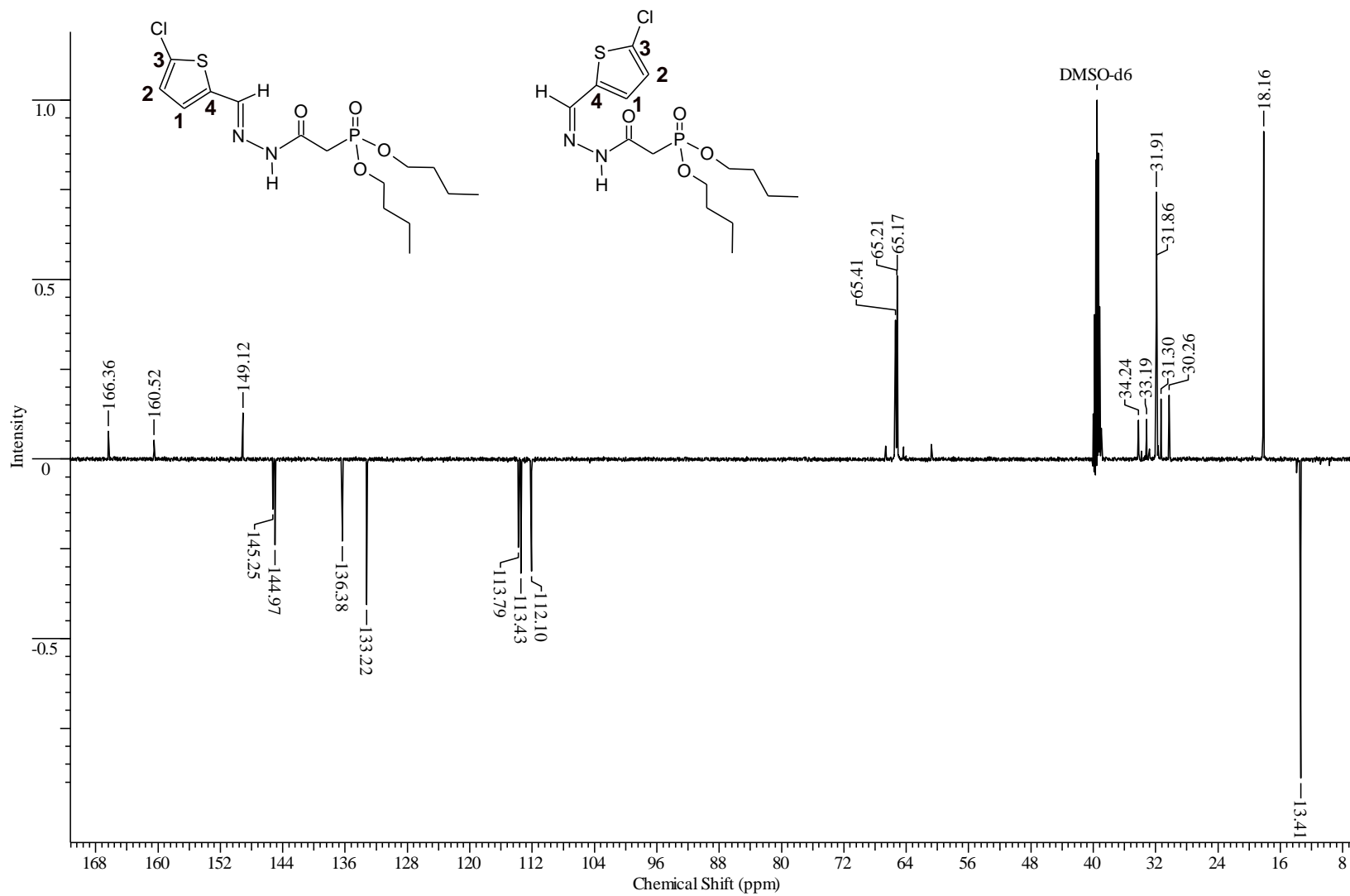
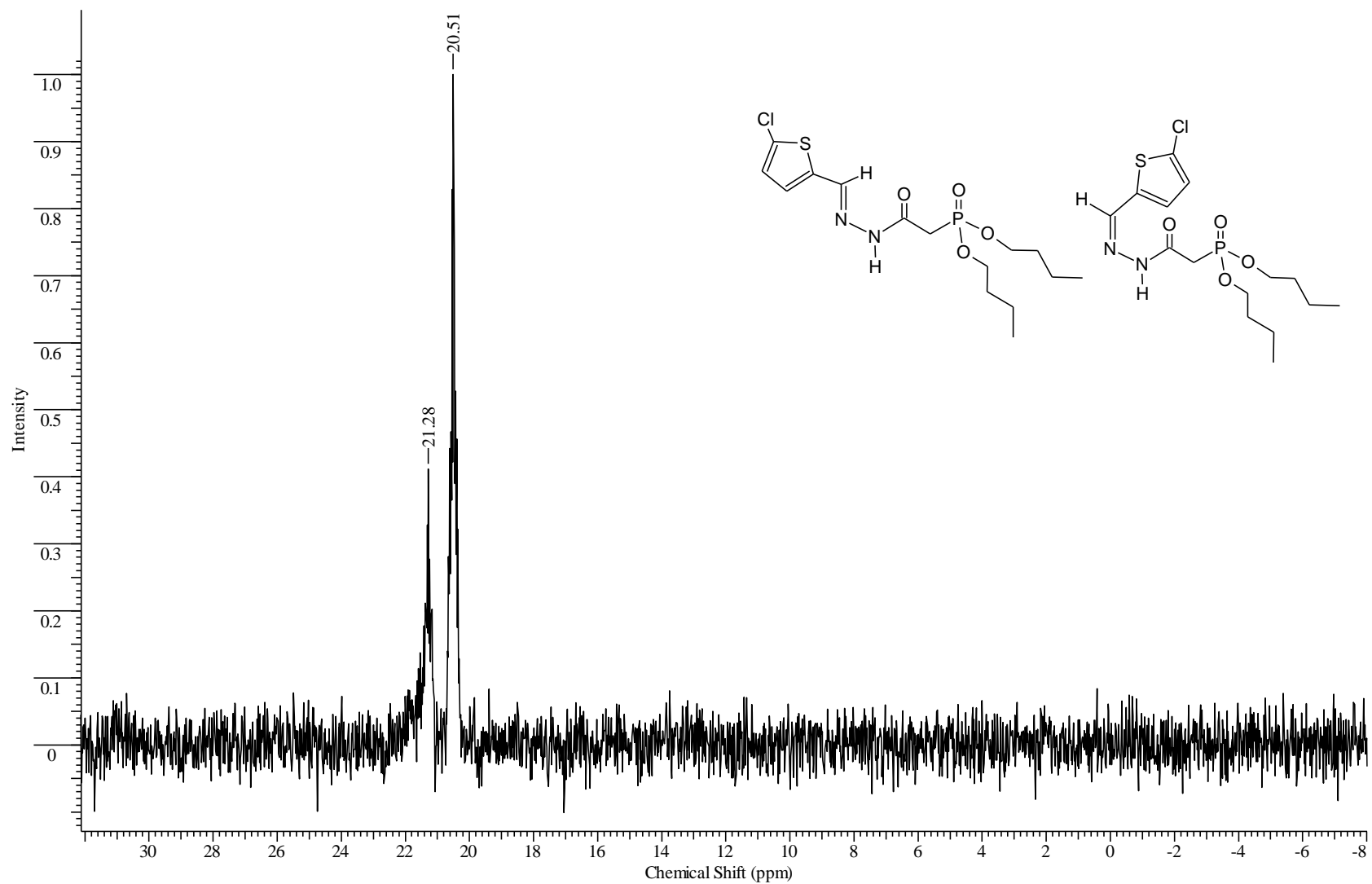
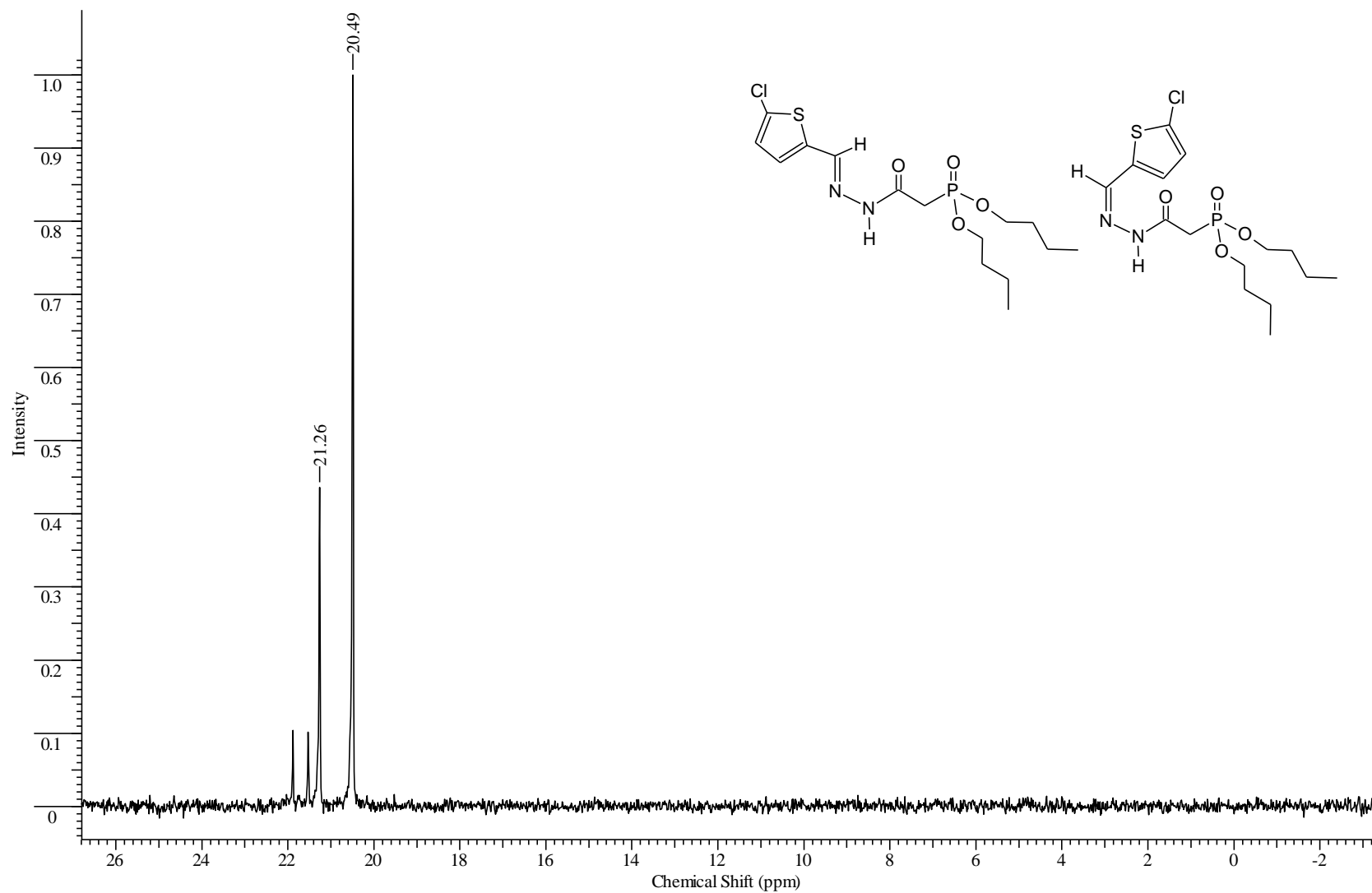


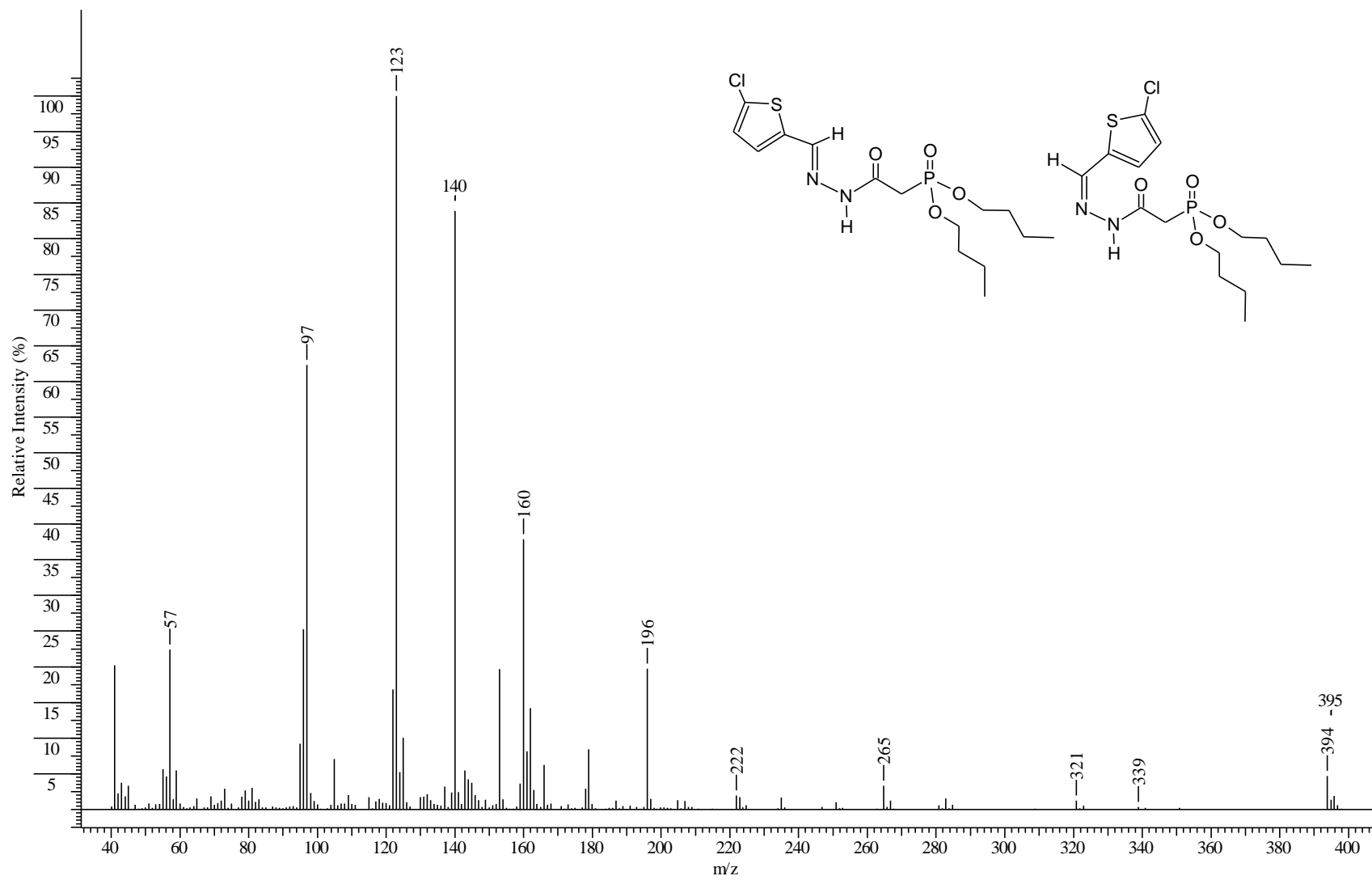
Figura 130 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (CDCl<sub>3</sub>) - [2(E/Z) - 2 - (5-cloro-2-tienilmetileno)hidrazinil] -2- oxoetilfosfonato de dibutila (17).



**Figura 131** - Espectro de RMN  $^{31}\text{P}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) -  $[2(E/Z)-2-(5\text{-cloro-2-tienilmetileno})\text{hidrazinil}]-2\text{-oxoetilfosfonato de dibutila}$  (17).



**Figura 132** - Espectro de RMN  $^{31}\text{P}_{\text{CPD}}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) - [2(*E/Z*)-2-(5-cloro-2-tienilmetileno)hidrazinil]-2-oxoetilfosfonato de dibutila (17).



**Figura 133** - Espectro de massas - [2(E/Z)-2-(5-cloro-2-tienilmetileno)hidrazinil]-2-oxoetilfosfonato de dibutila (17).