

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Exatas
Departamento de Química

Ivana Marques Marzano

**"SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL E
ANTIBACTERIANA DE ALGUNS COMPLEXOS METÁLICOS DE BISMUTO(III)
E GÁLIO(III)"**

Belo Horizonte

2013

UFMG/ ICEx/ DQ 998^a

T.456^a

Ivana Marques Marzano

**"SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL E
ANTIBACTERIANA DE ALGUNS COMPLEXOS METÁLICOS DE BISMUTO(III)
e GÁLIO(III)"**

Tese apresentada ao Departamento de Química
do Instituto de Ciências Exatas da Universidade
Federal de Minas Gerais, como requisito parcial
para obtenção do grau de Doutor em Ciências -
Química.

Belo Horizonte

2013

M298s Marzano, Ivana Marques
2013 Síntese, caracterização e estudo da atividade
T antitumoral e antibacteriana de alguns complexos
metálicos de bismuto(III) e gálio(III) [manuscrito] /
Ivana Marques Marzano. 2013.
190 f. : il.

Orientadora: Elene Cristina Pereira Maia.

Coorientadora: Cynthia Peres Demicheli.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas
Gerais. Departamento de Química.

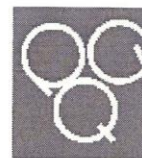
Inclui bibliografia e anexos.

1. Síntese inorgânica - Teses 2. Drogas -
Resistência em microorganismos - Teses 3. Células
cancerosas - Teses 4. Agentes antibacterianos - Teses
5. Bismuto - Teses 6. Gálio - Teses 7. Complexos
metálicos - Teses I. Maia, Elene Cristina Pereira,
Orientadora II. Demicheli, Cynthia Peres,
Coorientadora III. Título.

CDU 043

UFMG

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA - ICEX
31270-901 - BELO HORIZONTE - MG
TEL.: 031 - 3409-5732
FAX: 031 - 3409-5711
E-MAIL: pgquimic@.qui.ufmg.br



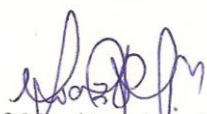
"Síntese, Caracterização e Estudo da Atividade Antitumoral e Antibacteriana
de Alguns Complexos Metálicos de Bismuto(III) e Gálio(III)"


Ivana Marques Marzano

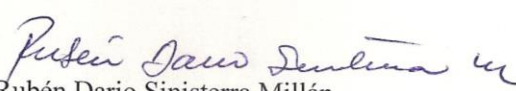
Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:


Profa. Elene Cristina Pereira Maia - Orientadora
UFMG


Profa. Marciela Scarpellini
UFRJ


Prof. Nicolás Adrián Rey
PUC-Rio


Profa. Ynara Marina Idemori
UFMG


Prof. Rubén Darío Sinisterra Millán
UFMG

Belo Horizonte, 13 de dezembro de 2013.

DEDICATÓRIA

À professora **Elene Cristina Pereira Maia**

Pelo exemplo de perseverança e competência,

Com gratidão por sua orientação e dedicação a este trabalho.

AGRADECIMENTOS

"Agradecer é admitir que houve um momento em que se precisou de alguém; é reconhecer que o homem jamais poderá lograr para si o dom de ser autossuficiente. Ninguém, nada cresce sozinho..."

Autor desconhecido

À professora Elene Cristina Pereira Maia, pela orientação deste trabalho, pela confiança e atenção de todos esses anos, por todas as oportunidades e incentivos, por tudo que me ensinou com dedicação, boa-vontade e competência.

À professora Cynthia Demicheli, coorientadora deste trabalho, pela atenção e incentivo durante esses 4 anos.

À professora Mônica Bucciarelli Rodriguez, do Laboratório de genética de microrganismos do ICB-UFMG, pela orientação dos testes realizados em bactérias, pelo incentivo e apoio profissional, sempre disposta a ajudar.

Ao professor Cláudio N. Verani, por aceitar-me em seu grupo (Wayne University-EUA), pela orientação, sempre muito atencioso, da etapa deste trabalho realizada em seu laboratório durante o estágio sanduíche.

Aos professores membros da Banca Examinadora, pela leitura atenciosa e sugestões a este trabalho.

Às professoras Cynthia Lopes e Flávia C. Moura, pelo incentivo, por partilhar comigo suas experiências profissionais, e por partilharmos da mais fantástica aventura da vida humana: a amizade.

Aos professores Jarbas e Dorila, sempre muito atenciosos, pelas orientações sobre RMN.

Ao professor Luiz Otávio Fagundes Amaral, pelo apoio e incentivo, sempre.

Aos amigos e colegas de laboratório: Priscila, Edgar (e Luz Helena), Flávia, Ívina, Grazielle, Marina Franco, Renata, Lílian, Jonhathan, Ariane, Jaime, Simone, Érica, Bruno, Júlio e Islã, a

todos pelos sorrisos, pela amizade e carinho, por saberem ouvir quando preciso falar, e saberem falar quando preciso ouvir.

Ao "Verani's Group", pela atenção e ajuda constante no laboratório: Sunalee, Lanka, Dakshika, Debashis, Habib, Keneth, Grace, Matthew, e especialmente à doutoranda Dajena Tomco, por todo o tempo dedicado a mim, o qual as palavras são pequenas para agradecer.

À Alexandra Valério, Denise, Juliana de Conto, Juliana, e ao Chris, pelo apoio durante a etapa deste trabalho realizada nos EUA.

Ao professor Humberto O. Stump, por todo apoio, especialmente em relação ao período de intercâmbio ("sanduíche"), em que mesmo à distância foi nota 10, sempre solucionando problemas com competência e muita boa-vontade.

À equipe administrativa ("meninas da secretaria") da pós-graduação do Departamento de química.

Às agências financiadoras: Capes, CNPq e Fapemig, pelo apoio financeiro.

Aos químicos responsáveis pela instrumentação e análises realizadas no DQ: Sandra e Gustavo (Abs. Atômica), Marley (CHN), Leandro (UV-vis), Ivana e Ricardo (RMN), aos doutorandos Júlio e Aretha pelos espectros de massas.

Aos funcionários-modelo Sônia e Sérgio da biblioteca, sempre muito prestativos.

A todos os professores, funcionários e alunos do DQ, pela atenção, carinho e respeito no dia-a-dia.

Ao amigo Gustavo, pelos ensinamentos de formatação.

Aos meus pais, Ivanete e Francisco, e à Giselda e Rafael, sempre.

Ao meu filho Artur, pela assistência e manutenção do meu computador.

Muito obrigada a todos pelo carinho e boa-vontade.

É maravilhoso contar com vocês!

"Quantas vezes a gente, em busca da ventura,

Procede tal e qual o avozinho infeliz:

Em vão, por toda parte, os óculos procura,

Tendo-os na ponta do nariz!"

Mário Quintana

RESUMO

Uma das mais importantes aplicações de complexos metálicos na clínica médica é no tratamento do câncer. Entretanto, existem problemas associados ao seu uso, especialmente efeitos colaterais e o aparecimento de resistência celular, que ainda não foram resolvidos. Do mesmo modo, o aparecimento de bactérias multirresistentes representa uma grave preocupação para a saúde pública. Portanto, a crescente resistência aos medicamentos disponíveis cria uma demanda por novos agentes quimioterápicos.

Visando aliar as propriedades farmacológicas da sulfassalazina (saz), sulfapiridina (sp), tetraciclina (tc) e de dois ligantes heterocíclicos tridentados às dos íons metálicos bismuto(III) e gálio(III), neste trabalho estão descritas a síntese, caracterização físico-química no estado sólido e em solução, a atividade citotóxica e a atividade antibacteriana de sete complexos metálicos inéditos. Os complexos $[\text{Bi}(\text{sp})_3\text{Cl}_3]$, $[\text{Bi}(\text{saz})_2\text{Cl}]$, $[\text{Ga}(\text{saz})(\text{H}_2\text{O})(\text{OH})]$, $[\text{Bi}(\text{tc})(\text{H}_2\text{O})\text{Cl}_2]$, $[\text{Ga}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{tc})_2](\text{NO}_3)$, $[\text{Bi}(\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O})\text{Cl}_2]$ e $[\text{Bi}(\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{I}_2\text{O})\text{Cl}_2]$ foram caracterizados por análise elementar e condutimétrica, espectrometria de massas, infravermelho e RMN de ^1H . As estruturas dos complexos $[\text{Bi}(\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O})\text{Cl}_2]$ e $[\text{Bi}(\text{sp})_3\text{Cl}_3]$ foram também determinadas por difração de raios-X em monocristal.

A coordenação do bismuto à sulfapiridina ocorreu através do nitrogênio sulfonamídico e melhorou o efeito antibacteriano em relação ao ligante livre. Já a coordenação do bismuto(III) à sulfassalazina ocorreu de modo bidentado através dos oxigênios do carboxilato e fenólico e não melhorou a atividade em nenhuma das linhagens bacterianas testadas. Entretanto, ambos os complexos apresentaram melhor atividade citotóxica em células tumorais que seus ligantes livres, sendo a Cl_{50} do composto de bismuto(III) da sulfassalazina de $9,7 \mu\text{mol L}^{-1}$. O gálio(III) também coordenou-se à sulfassalazina através de dois oxigênios do anel salicilato. A coordenação do gálio(III) à sulfassalazina não incrementou a atividade antibacteriana em proporção considerável, e sua atividade biológica contra células tumorais foi relativamente próxima à do ligante.

A tetraciclina coordenou-se ao bismuto(III) de modo bidentado através do nitrogênio da amida e do oxigênio da hidroxila em C3, após desprotonação. O complexo $[\text{Bi}(\text{tc})(\text{H}_2\text{O})\text{Cl}_2]$ mostrou-se um agente antibacteriano bastante promissor, apresentando atividade anti-

bacteriana semelhante à da tetraciclina nas linhagens sensíveis e capaz de reverter a resistência bacteriana em linhagens resistentes de *Escherichia coli* que carregam o plasmídeo pBR 322. O gálio(III) ligou-se a duas moléculas de tetraciclina atuando como ligante bidentado: através do oxigênio da carbonila da amida e da hidroxila em C3 após desprotonação. O complexo de gálio(III) da tetraciclina também conseguiu reverter a resistência bacteriana ao antibiótico livre. Estes resultados são muito promissores, pois a resistência bacteriana é o maior obstáculo para o uso clínico das tetraciclina. O complexo de bismuto da tetraciclina foi 7 vezes mais ativo que a tetraciclina livre contra células tumorais e o de gálio foi 12,7 vezes mais ativo.

Finalmente, os ligantes NN'O doadores coordenaram-se ao bismuto(III) de forma tridentada, formando estruturas similares do tipo $[Bi(L)Cl_2]$. Com relação ao potencial antitumoral destes compostos, vale a pena destacar que sua atividade está entre os compostos de bismuto mais ativos descritos até o presente. Os valores de Cl_{50} obtidos para os complexos $[Bi(C_{21}H_{29}N_2O)Cl_2]$ e $[Bi(C_{13}H_{11}N_2I_2O)Cl_2]$ foram 0,3 e 0,4 $\mu mol L^{-1}$ respectivamente.

PALAVRAS-CHAVE: resistência bacteriana, antibacteriano, antitumoral, bismuto(III), gálio(III).

ABSTRACT

The most important application of metal complexes in clinical medicine is the treatment of cancer. However, there are problems associated with their use, especially side effects and the emergence of resistance, which has not yet been solved. Similarly, the emergence of multi-resistant bacteria poses a serious public health concern. Therefore, increasing resistance to available drugs creates a demand for new chemotherapeutic agents.

Aiming to combine the pharmacological properties of sulfasalazine (saz), sulfapyridine (sp), tetracycline (tc) and two tridentate heterocyclic ligands to the metal ions Bi (III) and Ga (III), this work describes the synthesis, physicochemical characterization both in solid state and in solution, the cytotoxic activity and antibacterial activity of seven novel metal complexes. The complexes $[\text{Bi}(\text{sp})_3\text{Cl}_3]$, $[\text{Bi}(\text{saz})_2\text{Cl}]$, $[\text{Ga}(\text{saz})(\text{H}_2\text{O})(\text{OH})]$, $[\text{Bi}(\text{tc})(\text{H}_2\text{O})\text{Cl}_2]$, $[\text{Ga}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{tc})_2](\text{NO}_3)$, $[\text{Bi}(\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O})\text{Cl}_2]$ and $[\text{Bi}(\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O})\text{Cl}_2]$ were characterized by elemental analysis and conductimetric, mass spectrometry, IR and ^1H NMR. The structures of the complexes $[\text{Bi}(\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O})\text{Cl}_2]$ and $[\text{Bi}(\text{sp})_3\text{Cl}_3]$ were also determined by single crystal X-ray diffraction methods.

The coordination of bismuth to sulfapyridin occurred via the sulfonamidic nitrogen and improved the antibacterial effect as compared to the free ligand. The coordination of bismuto(III) to sulfasalazine was bidentate through the oxygens of the carboxylate and the phenolic group and did not improve the activity in any of the bacterial strains tested. However, both complexes showed higher cytotoxic activity in tumor cells than their free ligands, with the IC_{50} for the compound Bi (III) and sulfasalazine equal to 9.7 mol L^{-1} . Gallium (III) also coordinated to sulfasalazine through two oxygens of the salicylate ring. The coordination of Ga (III) to sulfasalazine did not increase the antibacterial activity considerably, and its biological activity against tumor cells was relatively close to that of the ligand.

Tetracycline coordinated to Bi (III) in a bidentate manner via the amide nitrogen and the hydroxyl oxygen at C3 after deprotonation. The complex $[\text{Bi}(\text{tc})(\text{H}_2\text{O})\text{Cl}_2]$ appeared as a promising antibacterial agent, with an antibacterial activity similar to that of tetracycline in sensitive strains and able to overcome bacterial resistance in resistant strains of *Escherichia*

coli carrying the plasmid pBR322. Gallium (III) ions bind to two tetracycline molecules acting as bidentate ligand through the carbonyl oxygen of the amide and the oxygen of the deprotonated hydroxyl group at C3. The Ga (III) complex with tetracycline was also able to overcome bacterial resistance to the free antibiotic. These results are very promising since bacterial resistance is the major obstacle to the clinical use of tetracyclines. The bismuth(III) complex with tetracycline was 7 times more active than free tetracycline against tumor cells and that with gallium(III) was 12.7 times more active.

Finally, NN'O donor ligands coordinated to the bismuth (III) in a tridentate manner to form similar structures of type $[\text{Bi}(\text{L})\text{Cl}_2]$. Concerning the antitumoral potential of these compounds, it is worth noting that they are among the most active bismuth compounds described to date. IC_{50} values obtained for the complex $[\text{Bi}(\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O})\text{Cl}_2]$ and $[\text{Bi}(\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{I}_2\text{O})\text{Cl}_2]$ were 0,3 e 0,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectively.

KEYWORDS: bacterial resistance, antibacterial, antitumoral, bismuth(III), gallium(III).

LISTAS DE ILUSTRAÇÕES

Figuras

Figura 1- Van Leuwenhhoek e seu microscópio.....	26
Figura 2 - Lister, o fenol e o uso do vaporizador de antisséptico sobre o campo operatório.....	27
Figura 3 – Estrutura da penicilina e o halo de inibição bacteriana ao redor do fungo (área na placa delimitada pelo círculo) observado no experimento de Fleming.....	28
Figura 4 - Degradação <i>in vivo</i> da <i>p</i> -sulfamidocrisoidina, dando origem à sulfanilamida, o primeiro antibiótico contra infecções sistêmicas.	30
Figura 5 – Estrutura química do sulfametoxazol (a), e do trimetoprim (b).....	31
Figura 6 – Estrutura da sulfadoxina, uma sulfa de longa duração.....	32
Figura 7 – Estrutura química da sulfapiridina (a), sulfassalazina (b), e do ácido 5-aminosalicílico (c), respectivamente.....	33
Figura 8 - Estruturas análogas: sulfonamida e o ácido <i>p</i> -aminobenzóico (PABA).....	33
Figura 9 – Mecanismo de ação das sulfonamidas: inibição da síntese do ácido tetrahidrofólico nas bactérias, necessário para a síntese de ADN e ARN.....	34
Figura 10 – Redução do ácido fólico, absorvido dos alimentos, pelos mamíferos.	35
Figura 11- Modos de coordenação metálica às sulfas; neste exemplo, sulfadiazina.	42
Figura 12 - Estrutura geral das tetraciclina (a). Na tetraciclina (b), $R_1=H$, $R_2=CH_3$, $R_3= OH$ e $R_4=H$	43
Figura 13 – Mecanismo de ação da tetraciclina na unidade 30 S do ribossomo.	44
Figura 14 – Esquema representando o mecanismo de efluxo mediado pela Tet(A)	46
Figura 15 – Alguns fármacos de Bismuto(III).....	47
Figura 16 – Gás mostarda (a), mostarda nitrogenada (b), primeiros quimioterápicos antineoplásicos.....	52
Figura 17 – Estrutura da cisplatina.....	53
Figura 18 – Compostos de gálio usados como antineoplásicos ou com atividade antitumoral.....	57

Figura 19 - Estrutura da sulfapiridina totalmente protonada, $C_{11}H_{12}N_3O_2S$ (a), e do complexo $[Bi(C_{11}H_{11}N_3O_2S)_3Cl_3]$ (b).....	62
Figura 20 - Estrutura da sulfassalazina ($C_{18}H_{14}N_4O_5S$) (a) e do complexo $[Bi(C_{18}H_{13}N_4O_5S)_2Cl]$ (b).....	64
Figura 21 - Estrutura da sulfassalazina ($C_{18}H_{14}N_4O_5S$) (a), e do complexo $[Ga(C_{18}H_{12}O_5N_4S)(H_2O)(OH)]$ (b).....	64
Figura 22 - Estrutura do cloridrato de tetraciclina, $(C_{22}H_{25}N_2O_8)Cl$, e seus pK_a 's.....	66
Figura 23 – Estrutura do complexo $[Bi(C_{22}H_{23}N_2O_8)(H_2O)Cl_2]$	66
Figura 24 - Estrutura do composto $[Ga(H_2O)_2(C_{22}H_{23}N_2O_8)_2](NO_3)$	67
Figura 25 - Estrutura do ligante $C_{21}H_{30}N_2O$ (a), e seu respectivo complexo $[BiC_{21}H_{29}N_2OCl_2]$ (b).....	68
Figura 26 - Estrutura do ligante $C_{13}H_{12}N_2I_2O$ (a) e seu respectivo complexo $[Bi(C_{13}H_{11}N_2I_2O)Cl_2]$ (b).....	69
Figura 27 - Crescimento bacteriano em placas-controle, contendo o meio de cultura Agar Müller Hinton (MH) sem adição de solvente (a), e com adição de DMF 0,1% (b).....	75
Figura 28 - Espectro na região do infravermelho, obtido para a sulfapiridina - $C_{11}H_{11}N_3O_2S$, em KBr.....	78
Figura 29 – Espectro, na região do infravermelho, obtido para o complexo $[Bi(C_{11}H_{11}N_3O_2S)_3Cl_3]$, em KBr.....	79
Figura 30 - Espectro de RMN de 1H da sulfapiridina $C_{11}H_{11}N_3O_2S$ em DMF- d_7	81
Figura 31 - Espectro de RMN 1H do complexo $[Bi(C_{11}H_{11}N_3O_2S)_3Cl_3]$ em DMF- d_7	81
Figura 32 – Região expandida do espectro ESI-MS em metanol, evidenciando o pico em 1062,63, que confirma a presença do complexo $[Bi(C_{11}H_{11}N_3O_2S)_3Cl_3]$ em solução.....	82
Figura 33 – Região do espectro MS-MS, pico intenso em m/z 814,59, correspondente à perda de $[C_{11}H_{10}N_3O_2S]^+$ (sulfapiridina- H^+) do íon molecular.....	83
Figura 34 - Estrutura do complexo $[Bi(C_{11}H_{11}N_3O_2S)_3Cl_3]$, <i>fac</i> -triclorotris(4-amino- <i>N</i> -piridin-2-il-benzenosulfonamida)bismuto(III), determinada por difração de raios-X em monocristal.....	84
Figura 35 - Interações intermoleculares entre 3 moléculas do complexo $[Bi(C_{11}H_{11}N_3O_2S)_3Cl_3]$	86
Figura 36 - Inibição do crescimento celular das células K562 em função da concentração de sulfapiridina livre e do complexo $[Bi(C_{11}H_{11}N_3O_2S)_3Cl_3]$	90
Figura 37 - Espectro na região do infravermelho para o ligante sulfassalazina livre, em KBr.....	92
Figura 38 - Região selecionada e ampliada do espectro IV da sulfassalazina, em KBr.....	93

Figura 39 - Espectro na região do infravermelho para o complexo $[\text{Bi}(\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}_5\text{S})_2\text{Cl}]$, em KBr.....	93
Figura 40 - Região selecionada e ampliada do espectro IV do complexo $[\text{Bi}(\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}_5\text{S})_2\text{Cl}]$, em KBr.....	94
Figura 41 – Espectro de RMN ^1H - ^1H – COSY, da sulfassalazina em DMSO-d_6 , 400 MHz.	96
Figura 42 - Espectro de RMN ^1H da sulfassalazina ($\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_5\text{S}$) em DMSO-d_6	98
Figura 43 – Espectro de RMN ^1H do composto $[\text{Bi}(\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}_5\text{S})_2\text{Cl}]$ em DMSO-d_6	98
Figura 44 – Região expandida do espectro ESI-MS em metanol, evidenciando o pico em 1073,91, atribuído à espécie $[\text{Bi}(\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}_5\text{S})_2(\text{H}_2\text{O})_2\text{Cl}]^{+\bullet}$ em solução.....	102
Figura 45 – Distribuição isotópica simulada para a espécie $[\text{Bi}(\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}_5\text{S})_2(\text{H}_2\text{O})_2\text{Cl}]^{+\bullet}$	102
Figura 46 - Inibição do crescimento celular das células K562 em função da concentração do complexo $[\text{Bi}(\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}_5\text{S})_2\text{Cl}]$ e da sulfassalazina livre.....	104
Figura 47 - Espectro na região do infravermelho para o ligante sulfassalazina, em KBr.....	106
Figura 48 – Região selecionada e ampliada do espectro IV da sulfassalazina, em KBr.....	107
Figura 49 - Espectro na região do infravermelho para o complexo $[\text{Ga}(\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{O}_5\text{N}_4\text{S})(\text{H}_2\text{O})(\text{OH})]$, em KBr.....	108
Figura 50 - Região selecionada e ampliada do espectro IV do complexo $[\text{Ga}(\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{O}_5\text{N}_4\text{S})(\text{H}_2\text{O})(\text{OH})]$, em KBr.	108
Figura 51 - Estruturas propostas para o complexo de gálio(III) da sulfassalazina: (a) $[\text{Ga}(\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{O}_5\text{N}_4\text{S})(\text{H}_2\text{O})(\text{OH})]$ e (b) o complexo na forma de um dímero.	110
Figura 52 - Espectro de RMN ^1H da sulfassalazina ($\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_5\text{S}$) em DMSO-d_6	111
Figura 53 - Espectro de RMN ^1H do composto $[\text{Ga}(\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{O}_5\text{N}_4\text{S})(\text{H}_2\text{O})(\text{OH})]$ em DMSO-d_6	111
Figura 54 - Região expandida do espectro ESI- MS em metanol, evidenciando o pico em 482,77, atribuído à espécie $[\text{Ga}(\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{O}_5\text{N}_4\text{S})(\text{H}_2\text{O})]^+$ em solução (a), e sua respectiva distribuição isotópica simulada (b).	114
Figura 55 - Espectro na região do infravermelho para o cloridrato de tetraciclina ($\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_8$)Cl, em KBr.	117
Figura 56 - Região ampliada do espectro de infravermelho do cloridrato de tetraciclina ($\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_8$)Cl, em KBr.....	118
Figura 57 - Espectro na região do infravermelho, obtido para o complexo $[\text{Bi}(\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_8)(\text{H}_2\text{O})\text{Cl}_2]$, em KBr.	120

Figura 58 - Região ampliada do espectro IV do complexo $[\text{Bi}(\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_8)(\text{H}_2\text{O})\text{Cl}_2]$	121
Figura 59 – Formas canônicas não-equivalentes, do grupo amida das tetraciclinas.....	123
Figura 60 - Espectro de RMN ^1H obtido para o cloridrato de tetraciclina, $(\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_8)\text{Cl}$, em DMSO-d_6	124
Figura 61 - Espectro de RMN ^1H , em DMSO-d_6 , para o complexo $[\text{Bi}(\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_8)(\text{H}_2\text{O})\text{Cl}_2]$ obtido no espectrômetro de 400 MHz	125
Figura 62 - Região expandida do espectro ESI-MS em metanol, evidenciando o pico em 705,08, atribuído à espécie $[\text{Bi}(\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_8)(\text{H}_2\text{O})\text{Cl}_2]^+$ em solução (a), e sua respectiva distribuição isotópica simulada (b).....	128
Figura 63 - Efeito do composto $[\text{Bi}(\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_8)(\text{H}_2\text{O})\text{Cl}_2]$ no crescimento de células K562, incubadas por 72 h.	131
Figura 64 - Espectro na região do infravermelho para o cloridrato de tetraciclina $(\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_8)\text{Cl}$, em KBr.	133
Figura 65 - Região ampliada do espectro de infravermelho da tetraciclina $(\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_8)\text{Cl}$, em KBr.....	134
Figura 66 – Espectro na região do infravermelho do composto $[\text{Ga}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_8)_2](\text{NO}_3)$, em KBr.....	134
Figura 67 - Região ampliada do espectro de infravermelho $[\text{Ga}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_8)_2](\text{NO}_3)$, em KBr.....	135
Figura 68 - Espectro de RMN ^1H obtido para cloridrato de tetraciclina, $(\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_8)\text{Cl}$, em DMSO-d_6	136
Figura 69 - Espectro de RMN ^1H obtido para o complexo $[\text{Ga}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_8)_2](\text{NO}_3)$ em DMSO-d_6	137
Figura 70 – Região expandida do espectro ESI- MS em metanol, evidenciando o pico em 955,15 atribuído à espécie $\text{Ga}(\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_8)_2^+$ em solução (a), e sua respectiva distribuição isotópica simulada (b).	139
Figura 71 - Estrutura para o complexo $[\text{Ga}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_8)_2](\text{NO}_3)$	140
Figura 72 - Efeito do composto $[\text{Ga}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_8)_2](\text{NO}_3)$ no crescimento de células K562.	142
Figura 73 - Espectros UV-Vis de solução do composto $[\text{Ga}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_8)_2](\text{NO}_3)$, inicialmente a $2,0 \times 10^{-5}$ mol L^{-1} e adições crescentes de solução de ADN.....	143
Figura 74 – Espectro na região do infravermelho, obtido para o ligante $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}$, em KBr.	146
Figura 75 - Região ampliada do espectro de infravermelho para o ligante $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}$, em KBr.....	146
Figura 76 - Espectro na região do infravermelho, obtido para o complexo $[\text{Bi}(\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O})\text{Cl}_2]$, em KBr.	147
Figura 77 - Região ampliada do espectro de infravermelho para o complexo $[\text{Bi}(\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O})\text{Cl}_2]$, em KBr.....	148

Figura 78 - Espectro de RMN ¹ H do ligante C ₂₁ H ₃₀ N ₂ O em DMSO-d ₆	149
Figura 79 - Espectro de RMN ¹ H do complexo [Bi(C ₂₁ H ₂₉ N ₂ O)Cl ₂] em DMSO-d ₆	150
Figura 80- Região expandida do espectro ESI- MS em metanol, evidenciando o pico em 603,1418, atribuído à espécie [Bi(C ₂₁ H ₂₈ N ₂ O)Cl ₂] ⁻ , formada pela perda de um próton do complexo em solução.....	152
Figura 81 - Distribuição isotópica simulada para a espécie [Bi(C ₂₁ H ₂₈ N ₂ O)Cl ₂] ⁻ , formada pela perda de um próton.....	152
Figura 82 – Estrutura do complexo [Bi(C ₂₁ H ₂₉ N ₂ O)Cl ₂] determinada por difração de raios-X em monocristal.	154
Figura 83 – Empacotamento das moléculas de [Bi(C ₂₁ H ₂₉ N ₂ O)Cl ₂] na rede cristalina, ao longo do eixo b.	156
Figura 84 – Espectro na região do infravermelho, obtido para o ligante C ₁₃ H ₁₂ N ₂ I ₂ O, em KBr.....	160
Figura 85 - Região selecionada e ampliada do espectro de infravermelho do ligante C ₁₃ H ₁₂ N ₂ I ₂ O, em KBr.....	160
Figura 86 - Espectro na região do infravermelho, obtido para o complexo [Bi(C ₁₃ H ₁₁ N ₂ I ₂ O)Cl ₂], em KBr.....	161
Figura 87 - Região ampliada do espectro de infravermelho do complexo [BiC ₁₃ H ₁₁ N ₂ I ₂ OCl ₂], em KBr.	162
Figura 88 – Espectro de RMN ¹ H do ligante C ₁₃ H ₁₂ N ₂ I ₂ O em DMSO-d ₆	163
Figura 89 – Espectro de RMN ¹ H do complexo [BiC ₁₃ H ₁₁ N ₂ I ₂ OCl ₂] em DMSO-d ₆	164
Figura 90 – Região expandida do espectro ESI-MS em metanol, evidenciando o pico em 742,8125, atribuído à espécie [Bi(C ₁₃ H ₁₀ N ₂ I ₂ O)Cl ₂] ⁻ , formada pela perda de um próton do complexo em solução.....	165
Figura 91- Distribuição isotópica simulada para a espécie [BiC ₁₃ H ₁₀ N ₂ I ₂ OCl ₂] ⁻	166

Tabelas

Tabela 1 - Valores de C,H,N e Bi, experimental e calculado, para o composto [Bi(C ₁₁ H ₁₁ N ₃ O ₂ S) ₃ Cl ₃] na forma cristalina.....	77
Tabela 2- Faixa de valores de condutividade (ohm ⁻¹ cm ² mol ⁻¹) esperados para complexos a 10 ⁻³ mol L ⁻¹ [124].	80
Tabela 3 - Dados de coleta e refinamento da estrutura do [Bi(C ₁₁ H ₁₁ N ₃ O ₂ S) ₃ Cl ₃], obtidos por difração de raios-X em monocristal	83
Tabela 4 - Comprimentos de ligação /Å, selecionados na estrutura do complexo [Bi(C ₁₁ H ₁₁ N ₃ O ₂ S) ₃ Cl ₃]......	85

Tabela 5 - Comprimentos de ligação selecionados, ângulos e parâmetros geométricos para ligações de hidrogênio (Å, °). Código de simetria: (i) -y, x-y, z ; (ii) -x+y+1/3, -x+2/3, z+2/3; (iii) x, y, z+1; (iv) -y, x-y, z+1	87
Tabela 6 - Concentração mínima inibitória (MIC) / $\mu\text{mol L}^{-1}$ da sulfapiridina e do complexo $[\text{Bi}(\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_2\text{S})_3\text{Cl}_3]$	87
Tabela 7 - Valores de C,H,N e Bi, experimental e calculado, para o composto $[\text{Bi}(\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}_5\text{S})_2\text{Cl}]$	91
Tabela 8 – Atribuições dos sinais de RMN de ^1H do ligante $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_5\text{S}$ e do composto $[\text{Bi}(\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}_5\text{S})_2\text{Cl}]$ em DMSO-d_6 a 298K, 200 MHz.....	99
Tabela 9 - Concentração mínima inibitória (MIC) / $\mu\text{mol L}^{-1}$ da sulfassalazina ($\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_5\text{S}$) e do complexo $[\text{Bi}(\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}_5\text{S})_2\text{Cl}]$	103
Tabela 10 – Valores de C,H,N e Ga, experimental e calculado, para a proposta $[\text{Ga}(\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{O}_5\text{N}_4\text{S})(\text{H}_2\text{O})(\text{OH})]$..	105
Tabela 11 - Atribuições dos sinais de RMN ^1H da sulfassalazina e do complexo $[\text{Ga}(\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{O}_5\text{N}_4\text{S})(\text{H}_2\text{O})(\text{OH})]$ em DMSO-d_6 a 298K.....	112
Tabela 12 - Concentração mínima inibitória (MIC) / $\mu\text{mol L}^{-1}$ da sulfassalazina ($\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_5\text{S}$) e do complexo $[\text{Ga}(\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{O}_5\text{N}_4\text{S})(\text{H}_2\text{O})(\text{OH})]$	114
Tabela 13 - Valores de CHN e Bi, experimental e calculado para a proposta $[\text{Bi}(\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_8)(\text{H}_2\text{O})\text{Cl}_2]$	116
Tabela 14 – Atribuição de bandas (cm^{-1}) na região do infravermelho para o cloridrato de tetraciclina em KBr.	119
Tabela 15 – Atribuições dos sinais de RMN ^1H do cloridrato de tetraciclina- ($\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_8$)Cl, e do composto $[\text{Bi}(\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_8)(\text{H}_2\text{O})\text{Cl}_2]$, em DMSO-d_6	125
Tabela 16 - MIC / $\mu\text{mol L}^{-1}$, da tetraciclina e do complexo $[\text{Bi}(\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_9)\text{Cl}_2(\text{H}_2\text{O})]$	128
Tabela 17 - Valores de CHN e Ga, experimental e calculado para $[\text{Ga}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_8)_2](\text{NO}_3)$	132
Tabela 18 – Atribuição dos sinais de RMN de ^1H do cloridrato de tetraciclina- ($\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_8$)Cl, e do complexo $[\text{Ga}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_8)_2](\text{NO}_3)$ em DMSO-d_6	137
Tabela 19 - MIC / $\mu\text{mol L}^{-1}$, para a tetraciclina e o complexo $[\text{Ga}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_8)_2](\text{NO}_3)$	140
Tabela 20 - Valores de CHN e Bi, experimental e calculado para $[\text{BiC}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{OCl}_2]$	145
Tabela 21 - Atribuições dos sinais de RMN ^1H do ligante $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}$ e do complexo $[\text{Bi}(\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O})\text{Cl}_2]$ em DMSO-d_6 a 298K.....	150

Tabela 22 - Dados da coleta e detalhes do refinamento da estrutura $[\text{Bi}(\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O})\text{Cl}_2]$, obtidos por difração de raios-X em monocristal.....	152
Tabela 23 – Comprimentos de ligação selecionados (Å), na estrutura cristalina do $[\text{Bi}(\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O})\text{Cl}_2]$	155
Tabela 24 – Ângulos selecionados /°, na estrutura cristalina do $[\text{Bi}(\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O})\text{Cl}_2]$	155
Tabela 25 - MIC / $\mu\text{mol L}^{-1}$, para o $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}$ e o respectivo complexo $[\text{Bi}(\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O})\text{Cl}_2]$	157
Tabela 26 - Valores de CHN e Bi, experimental e calculado para $[\text{Bi}(\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{I}_2\text{O})\text{Cl}_2]$	159
Tabela 27 – Atribuições dos sinais de RMN ^1H do ligante $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{I}_2\text{O}$ e do complexo $[\text{Bi}(\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{I}_2\text{O})\text{Cl}_2]$ em DMSO- d_6 a 298K.	164
Tabela 28 – MIC / $\mu\text{mol L}^{-1}$, para o $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{I}_2\text{O}$ e o respectivo complexo $[\text{Bi}(\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{I}_2\text{O})\text{Cl}_2]$	166

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC – American Type Culture Collection

BHI - Brain Heart Infusion

CDDP – *cis*-diaminodicloroplatina(II) (cisplatina)

CMI – Concentração Mínima Inibitória

CMB – Concentração Mínima Bactericida

DHPS – Dihidropteroato Sintetase

DHFR – Dihidrofolato Redutase

DMF – *N,N*-dimetilformamida

DMSO - Dimetilsulfóxido

ESI-MS - Espectroscopia de Massas por Eletrospray

ESKAPE – É um acrônimo referente aos 6 microrganismos patógenos multirresistentes *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Enterobacteriaceae*.

FDA - Food and Drug Administration

FR – Fator de Resistência

HPLC- High Performance/Pressure Liquid Chromatography

INCA – Instituto Nacional de Câncer do Ministério da Saúde

MH - Agar Müller Hinton

NC- número de coordenação

pBR 322 – plasmídeo que confere resistência bacteriana a vários antibióticos

PTK – protein tyrosine kinase

RPMI 1640– Nome dado ao meio usado em culturas de células, constituído de sais, amino-ácidos e vitaminas. A sigla RPMI refere-se ao nome do local onde este meio foi desenvolvido, Roswell Park Memorial Institute.

sp - sulfapiridina

saz – sulfassalazina

SN1 – substituição nucleofílica unimolecular

SN2 - substituição nucleofílica bimolecular

tc - tetraciclina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
1.1	Bactérias e antibacterianos.....	26
1.1.1	A atividade antibacteriana das sulfas.....	29
1.1.2	As sulfas que utilizamos neste trabalho	32
1.1.3	Mecanismo de ação das sulfas	33
1.1.4	Resistência bacteriana.....	35
1.1.5	Resistência intrínseca ou adquirida.....	37
1.1.6	Mecanismos de resistência	39
1.1.7	A resistência bacteriana às sulfas.....	41
1.1.8	As tetraciclinas.....	43
1.1.9	Mecanismo de ação das tetraciclinas.....	44
1.1.10	A resistência bacteriana às tetraciclinas.....	45
1.1.11	Atividade antibacteriana de compostos de bismuto.....	47
1.1.12	Atividade antibacteriana de compostos de gálio.....	48
1.2	Câncer e antineoplásicos.....	49
1.2.1	O que é o câncer e como se desenvolve.....	49
1.2.2	Quimioterapia antineoplásica	51
1.2.3	Atividade antitumoral de compostos de bismuto.....	55
1.2.4	Atividade antitumoral de compostos de gálio	56
1.3	Justificativa.....	58
1.4	Objetivo.....	59
2	MATERIAIS E MÉTODOS (Parte Experimental)	61
2.1	Reagentes.....	61
2.2	Síntese dos complexos.....	62
2.2.1	Complexo 1 - Composto de bismuto(III) da sulfapiridina.....	62
2.2.2	Complexo 2 - Composto de bismuto(III) da sulfassalazina	63
2.2.3	Complexo 3 - Composto de gálio(III) da sulfassalazina.....	64
2.2.4	Complexo 4 - Composto de bismuto(III) da tetraciclina	65
2.2.5	Complexo 5 - Composto de gálio(III) da tetraciclina	67

2.2.6	Complexo 6 – composto de bismuto(III) do $C_{21}H_{30}N_2O$	68
2.2.7	Complexo 7 – Composto de bismuto(III) do $C_{13}H_{12}N_2O$	69
2.3	Análise elementar (C, H, N) e Absorção Atômica (Bi e Ga).....	70
2.4	Temperatura de fusão/decomposição.....	70
2.5	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho.....	70
2.6	Condutimetria.....	70
2.7	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de 1H	71
2.8	Espectroscopia de massas.....	71
2.9	Difração de raios-X em monocristal.....	72
2.9.1	Complexo 1 - $[Bi(C_{11}H_{11}N_3O_2S)_3Cl_3]$	72
2.9.2	Complexo 6 – $[Bi(C_{21}H_{29}N_2O)Cl_2]$	72
2.10	Atividade antibacteriana.....	73
2.11	Atividade citotóxica em células tumorais.....	75
2.12	Interação com ADN por titulação na região do UV-Vis.....	76
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	77
3.1	Complexo 1 – $[Bi(C_{11}H_{11}N_3O_2S)_3Cl_3]$	77
	Composto de bismuto(III) da sulfapiridina.....	77
	<i>Fac</i> -triclortris(4-amino- <i>N</i> -piridin-2-il-benzenosulfonamida)bismuto(III).....	77
3.1.1	Análise Elementar: C, H, N e Bi.....	77
3.1.2	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho.....	78
3.1.3	Condutimetria.....	80
3.1.4	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio- RMN de 1H	80
3.1.5	Espectro de massas.....	82
3.1.6	Estrutura do cristal: Análise por difração de raios-X.....	83
3.1.7	Atividade antibacteriana (determinação da MIC - Concentração mínima inibitória).....	87
3.1.8	Atividade citotóxica em células tumorais (determinação da CI50).....	89
3.2	Complexo 2 – $[Bi(C_{18}H_{13}N_4O_5S)_2Cl]$	91
	Composto de bismuto(III) da sulfasalazina.....	91
	Clorobis(sulfasalazinato)bismuto(III).....	91
3.2.1	Análise Elementar: C, H, N e Bi.....	91
3.2.2	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho.....	92
3.2.3	Condutimetria.....	95
3.2.4	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio- RMN 1H e 1H - 1H -COSY.....	95

3.2.5	Espectro de massas.....	101
3.2.6	Atividade antibacteriana (MIC - Concentração mínima inibitória).....	102
3.2.7	Atividade citotóxica em células tumorais.....	104
3.3	Complexo 3- $[\text{Ga}(\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{O}_5\text{N}_4\text{S})(\text{H}_2\text{O})(\text{OH})]$	105
	Composto de gálio(III) da sulfassalazina.....	105
	Aquahidroxo(sulfassalazinato)gálio(III).....	105
3.3.1	Análise Elementar: C, H, N e Ga.....	105
3.3.2	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho.....	106
3.3.3	Condutimetria.....	110
3.3.4	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio- RMN ^1H	110
3.3.5	Espectro de massas.....	113
3.3.6	Atividade antibacteriana (MIC - Concentração mínima inibitória).....	114
3.3.7	Atividade citotóxica em células tumorais.....	115
3.4	Complexo 4 – $[\text{Bi}(\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_8)(\text{H}_2\text{O})\text{Cl}_2]$	116
	Composto de bismuto(III) da tetraciclina.....	116
	Aquadicloro(tetraciclinato)bismuto(III).....	116
3.4.1	Análise Elementar: C, H, N e Bi.....	116
3.4.2	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho.....	116
3.4.3	Condutimetria.....	122
3.4.4	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio- RMN ^1H	122
3.4.5	Espectro de massas.....	127
3.4.6	Atividade antibacteriana (MIC - Concentração mínima inibitória).....	128
3.4.7	Atividade citotóxica em células tumorais.....	131
3.5	Complexo 5 – $[\text{Ga}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_8)_2](\text{NO}_3)$	132
	Composto de gálio(III) da tetraciclina.....	132
	Nitrato de diaquabis(tetraciclinato)gálio(III).....	132
3.5.1	Análise Elementar: C, H, N e Ga.....	132
3.5.2	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho.....	133
3.5.3	Condutimetria.....	136
3.5.4	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio- RMN ^1H	136
3.5.5	Espectro de massas.....	139
3.5.6	Atividade antibacteriana (MIC - Concentração mínima inibitória).....	140
3.5.7	Atividade citotóxica em células tumorais.....	142
3.5.8	Interação com o ADN.....	143

3.6	Complexo 6 – [BiC ₂₁ H ₂₉ N ₂ OCl ₂]	145
	Composto de bismuto(III) do C ₂₁ H ₃₀ N ₂ O	145
	Dicloro(2,4-di-terc-butil-6-[[piridina-2-il-metil]amino]metil}fenol)bismuto(III)	145
3.6.1	Análise Elementar: C, H, N e Bi	145
3.6.2	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho	145
3.6.3	Análise condutimétrica	149
3.6.4	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio- RMN ¹ H	149
3.6.5	Espectro de massas	151
3.6.6	Estrutura do cristal: Análise por difração de raios-X	152
3.6.7	Atividade antibacteriana (MIC - Concentração mínima inibitória)	157
3.6.8	Atividade citotóxica em células tumorais	158
3.7	Complexo 7 – [Bi(C ₁₃ H ₁₁ N ₂ I ₂ O)Cl ₂]	159
	Composto de bismuto(III) do C ₁₃ H ₁₂ N ₂ I ₂ O	159
	Dicloro(2,4-diiodo-6-[[piridina-2-il metil]amino]metil}fenolato)bismuto(III)	159
3.7.1	Análise Elementar: C, H, N e Bi	159
3.7.2	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho	159
3.7.3	Análise condutimétrica	159
3.7.4	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio- RMN ¹ H	163
3.7.5	Espectro de massas	165
3.7.6	Atividade antibacteriana - (MIC - Concentração mínima inibitória)	166
3.7.7	Atividade citotóxica em células tumorais	167
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES	169
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	171
	ANEXO 1	181
	ANEXO 2	182

1 INTRODUÇÃO

*“Enquanto todo mundo espera a cura do mal
E a loucura finge que isso tudo é normal
Eu finjo ter paciência
E o mundo vai girando cada vez mais veloz
A gente espera do mundo e o mundo espera de nós...
“Paciência” - Lenine (Músico e Eng. Químico)*

A descoberta dos antibióticos (antimicrobianos) – substâncias que tratam infecções causadas por microrganismos – representou um dos marcos mais importantes na medicina moderna [1].

O surgimento dos primeiros antibióticos sintéticos em 1935 – as sulfas – e a produção industrial da penicilina em 1940 começaram a mudar o cenário das doenças no mundo, pois eles eram capazes de aniquilar microrganismos responsáveis por diversas epidemias que assolaram a humanidade, como o fizeram a pneumonia e a tuberculose. A indústria de antimicrobianos desde então chegou com força total e milhares de compostos foram sintetizados, produzindo um grande arsenal de medicamentos com diferentes espectros e mecanismos de ação, que transformaram o panorama epidemiológico global [2].

Entretanto, apesar do sucesso e do conforto trazidos pelos antimicrobianos, a angústia que permanecia, no que se refere aos “limites da ciência” em relação à medicina, era evidente quando surgia a palavra “câncer”, seja nos meios de comunicação ou no diagnóstico do médico. A afirmativa era determinante e sem vírgulas: “Câncer não tem cura”.

A descoberta da atividade citotóxica da cisplatina em 1964, por Rosenberg e van Camp [3], estimulou a pesquisa de desenvolvimento de fármacos num ramo relativamente novo, a Química de Coordenação, cujas relações com a Bioinorgânica têm ganhado atenção e destaque na ciência, uma vez que compostos de coordenação estão também envolvidos em fenômenos vitais.

Mas a luta entre a humanidade e as doenças parece nunca ter fim. E a palavra universalmente temida agora é resistência. O uso indiscriminado de antibióticos fez surgir bactérias resistentes, as quais não podem ser combatidas com o arsenal de antibióticos de que dispõe a ciência hoje, tornando-se um problema grave no panorama mundial da saúde desde

o ano 2000, segundo relatórios da Organização Mundial da Saúde. O Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos estima que 23 mil pessoas morram por ano no país vítimas de bactérias resistentes aos antibióticos. Atualmente, cerca de dois milhões de pessoas estão infectadas [4].

Se a resistência celular não for controlada, pode trazer de volta um cenário já limitado aos livros de história. Os antibióticos são a base da medicina moderna, e se não surtirem mais efeito, infecções de ferimentos ou doenças como tuberculose, pneumonia e sífilis podem se tornar novamente tão perigosas como já foram no passado. Além disso, transplantes, procedimentos cirúrgicos e quimioterapias para câncer funcionam apenas quando o paciente pode ser protegido de infecções, caso contrário se tornam inviáveis [4].

1.1 Bactérias e antibacterianos

As bactérias são os seres vivos mais antigos na Terra, e estima-se que sejam um dos mais abundantes. No organismo humano, existem aproximadamente 10 vezes mais bactérias do que o número de células que o constituem.

As bactérias foram observadas pela primeira vez por volta de 1680 pelo holandês Antonie van Leeuwenhoek (Figura 1), que construiu um dos primeiros microscópios do mundo, capaz de ampliar a imagem cerca de 200 vezes. Antes disso, não se imaginava a existência de seres vivos invisíveis a olho nu, que levou tempo para ser aceita, mesmo pela comunidade científica [1].

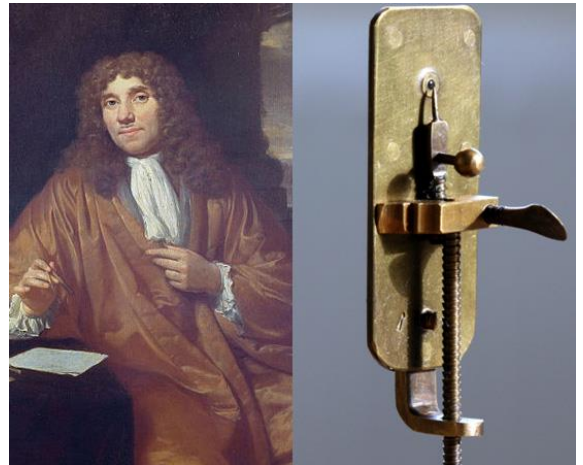


Figura 1- Van Leuwenhhoek e seu microscópio

Foi somente no século XIX que Louis Pasteur, em sua clássica “Teoria dos Germes”, propôs que bactérias possivelmente causavam doenças. Naquela época, cirurgias, por menores que fossem, comumente levavam à morte, pois o local da incisão facilmente era alvo de infecções causadas por bactérias presentes na pele e mesmo nos instrumentos cirúrgicos.

Um dos primeiros adeptos da teoria de Pasteur de que bactérias podiam causar doenças foi o cirurgião inglês Joseph Lister. Por volta de 1865, Lister introduziu o uso de uma solução de fenol para esterilizar os instrumentos cirúrgicos, e também criou vaporizadores que espalhavam uma névoa de antisséptico sobre o campo operatório. Esses procedimentos aumentaram notoriamente as taxas de sobrevivência pós-cirúrgica. Iniciava-se assim a “Era antimicrobiana”, inicialmente marcada pelo uso de substâncias capazes de matar os agentes infecciosos quando aplicadas em uma superfície ou em um tecido vivo [1].

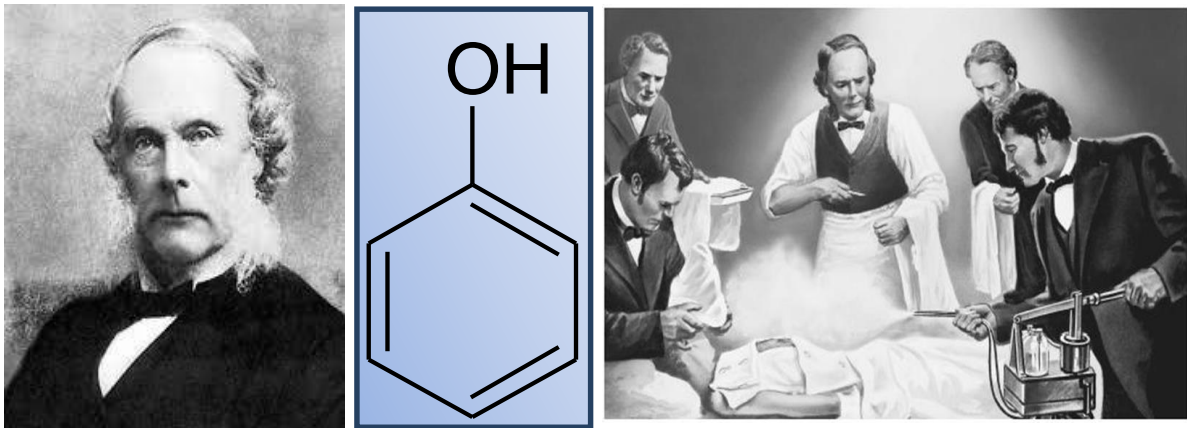


Figura 2 - Lister, o fenol e o uso do vaporizador de antisséptico sobre o campo operatório.

Por volta de 1909, o médico e bacteriólogo alemão Paul Erlich presenteou a ciência com um novo conceito: A “toxicidade seletiva”. Erlich acreditava que deveria haver uma substância que atuasse como uma “bala mágica”, capaz de atingir um alvo específico, o organismo invasor, sem provocar efeitos tóxicos para o hospedeiro. A toxicidade seletiva é a base do princípio da quimioterapia¹, que é o uso de substâncias químicas para combater doenças.

Em 1910, Erlich sintetizou a arsfenamina, um composto de arsênio conhecido pelo nome comercial de Salvarsan®. Além de atuar contra o tripanossomo da doença do sono, foi também o primeiro tratamento efetivo contra a bactéria causadora da sífilis [5]. Nos 20 anos que se seguiram ao Salvarsan®, pouco progresso foi feito em relação a encontrar novos agentes antibacterianos [1].

¹ Quando aplicada ao câncer, a quimioterapia é chamada de quimioterapia antineoplásica ou antitumoral.

Erlich também desenvolveu os modelos animais, que possibilitam testar os compostos em animais de laboratório, e extrapolar os resultados farmacológicos para o organismo humano.

Em 1928, Alexander Fleming trabalhando com a bactéria *Staphylococcus aureus*, percebeu que suas placas de cultura haviam se contaminado com um fungo. Observando cuidadosamente as placas, Fleming percebeu que havia um halo de inibição ao redor do fungo, onde não se desenvolveu bactéria alguma, e concluiu que o fungo produzia uma substância antibiótica, a qual denominou penicilina (Figura 3), por ser produzida pelo fungo *Penicillium notatum* [2].

Entretanto, era muito difícil cultivar esse fungo e apenas pequenas quantidades de penicilina podiam ser produzidas.

A penicilina só ficou disponível para uso terapêutico em 1940, quando foi possível sintetizá-la em escala industrial, mérito atribuído a Howard

Florey e Ernst Chain [2]. O desenvolvimento de antibacterianos revolucionou a medicina terapêutica, possibilitando a redução drástica da mortalidade causada por doenças bacterianas. Desde a descoberta das sulfonamidas, diversas classes de antibióticos surgiram com diferentes mecanismos de ação, que envolvem [1]:

- Inibição do metabolismo celular do microrganismo, mas não o do hospedeiro, por exemplo, sulfonas, sulfonamidas.
- Inibição da síntese da parede celular do microrganismo, ex. penicilinas, cefalosporinas e vancomicina.
- Interações com a membrana plasmática, afetando sua permeabilidade, por exemplo, polimixina, tirotricina.

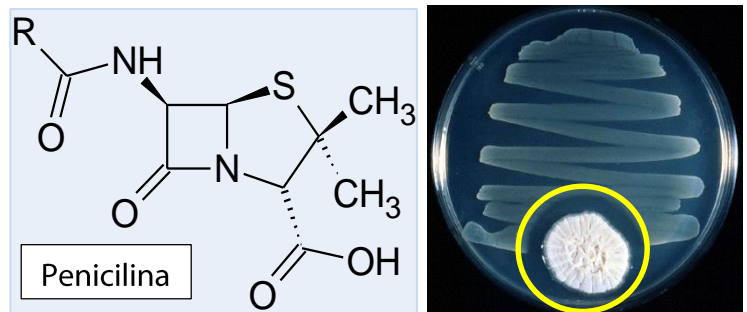


Figura 3 – Estrutura da penicilina e o halo de inibição bacteriana ao redor do fungo (área na placa delimitada pelo círculo) observado no experimento de Fleming.

- Interrupção da síntese proteica, por exemplo, rifamicina, aminoglicosídeos, tetraclinas, cloranfenicol.
- Inibição da transcrição e replicação do ácido nucleico, impedindo a divisão celular ou a síntese de proteínas essenciais. Por exemplo, o ácido nalidíxico.

1.1.1 A atividade antibacteriana das sulfas

Em 1935 foi publicada a descoberta da atividade antibacteriana das sulfonamidas, também chamadas de “sulfas”, o primeiro grupo de antibióticos² contra diversas infecções [2].

Químicos da Bayer sintetizavam compostos e o patologista alemão Gehard Domagk os testava. Domagk recebeu para testes um corante vermelho, a *p*-sulfamidocrisoidina, comercialmente denominada *Prontosil Rubrum*[®]. O corante foi inativo nos testes *in vitro*. Entretanto, não se sabe o porquê, Domagk prosseguiu os testes *in vivo* e... o composto foi misteriosamente ativo, apenas *in vivo*!

Mais tarde descobriu-se que o corante, a *p*-sulfamidocrisoidina, não era a espécie ativa, mas quando metabolizado no intestino do animal, produzia a sulfanilamida (Figura 4), que foi o primeiro antibacteriano efetivo contra infecções sistêmicas.

² O termo antibiótico (cujo grupo envolve antibacterianos, antifúngicos, antivirais e antiparasitários) tem sido comumente utilizado de modo mais restrito para indicar os antibacterianos, substâncias que atuam especificamente sobre as bactérias.

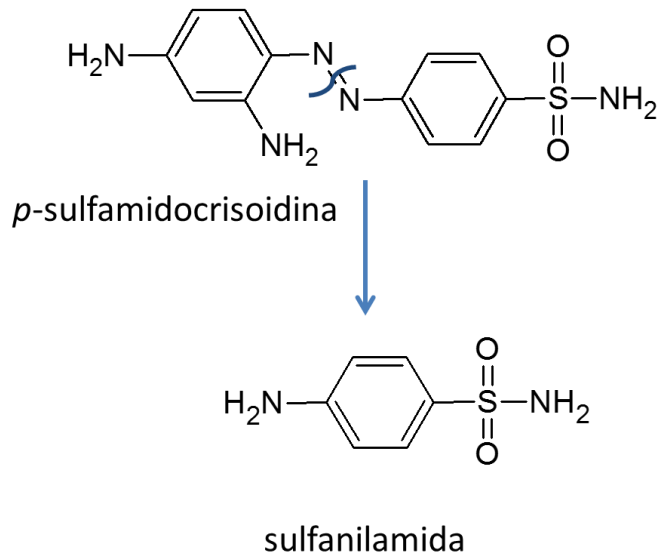


Figura 4 - Degradação *in vivo* da *p*-sulfamidocrisoidina, dando origem à sulfanilamida, o primeiro antibiótico contra infecções sistêmicas.

A sulfanilamida foi posteriormente sintetizada em laboratório e utilizada contra várias doenças, dentre elas a pneumonia e meningite. Várias estruturas análogas da sulfanilamida foram então obtidas substituindo-se um hidrogênio ligado ao N sulfonamídico por um grupo R, em geral heterociclos de 5 ou 6 membros. Constituiu-se assim o primeiro grupo de antibióticos sintéticos usados no tratamento de doenças infecciosas. Mais de 5000 sulfas foram sintetizadas até 1945 [2].

As sulfonamidas possuem um amplo espectro de ação contra bactérias Gram³-positivas e Gram-negativas, por exemplo, causadoras de meningites (*Haemophilus influenzae*) e pneumonias (*Streptococcus pneumoniae*). Antes das sulfas, a febre escarlate, causada pelo *Streptococcus pyogenes*, era uma causa frequente de morte em crianças, pois quando não é tratada pode causar hemorragias, convulsões, inflamação nos rins, infecção nos tímpanos e problemas cardiovasculares. As sulfas são também ativas contra *Nocardia sp.*, *Actinomyces sp.*⁴, *Calymmatobacterium granulomatis* e *Chlamydia trachomatis*. Apesar de muitas

³ O teste Gram é um teste de coloração cujo nome é em homenagem ao seu autor, o médico Hans C. J. Gram. Gram-negativas (não se coram no teste) possuem uma membrana externa que reveste a parede celular das bactérias tornando-as mais impermeáveis. Essa membrana é ausente nas Gram-positivas (que se coram).

⁴ *Actinomyces sp.* foram inicialmente confundidas com fungos, mas são bactérias Gram-positivas, causadoras principalmente de infecções provenientes de procedimentos dentários e abscessos orais.

sulfas terem sido substituídas por penicilinas, são utilizadas no tratamento de infecções urinárias, infecções de ouvido, mucosas ou intestino, e em loções oculares [6].

Outra sulfa de grande importância na clínica médica é o sulfametoxazol (Figura 5-a), que é usado numa combinação com o trimetoprim (Figura 5-b), um outro antimetabólito. Ambos atuam inibindo enzimas em etapas sequenciais da mesma via, o que leva a um efeito sinérgico, especialmente combinados na razão sulfa/trimetoprim de 5:1, como é comercializado sob o nome de Bactrin® ou Cotrimoxazol®.

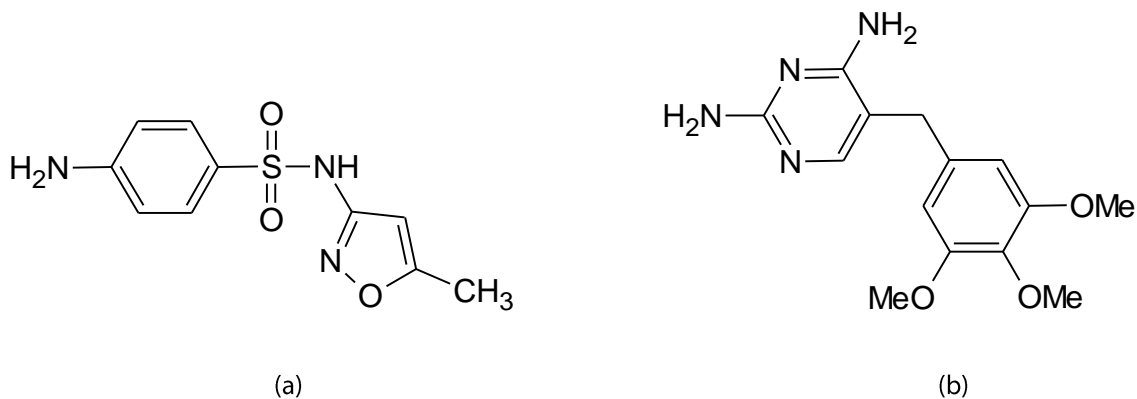


Figura 5 – Estrutura química do sulfametoxazol (a), e do trimetoprim (b).

A associação sulfametoxazol-trimetoprim foi recentemente avaliada contra 100 isolados clínicos de *Streptococcus pyogenes*, tendo sua atividade *in vitro* eficazmente comprovada em todos os isolados [7].

Essa associação é usada em caso de infecções renais, urogenitais, gastrointestinais e dermatológicas. Também é utilizado como medicamento de primeira linha para tratar a pneumonia por *Pneumocystis jirovecii*. Entretanto, estudos recentes confirmam pela primeira vez que mutações gênicas naturais em *P. jirovecii* levam à produção de formas variantes da enzima dihidrofolato redutase (DHFR), alvo do trimetoprim, levando à resistência e contribuindo para falhas da terapia padrão, observadas clinicamente [8].

A combinação sulfametoxazol/trimetoprim também é usada contra a doença meningocócica, causada pela bactéria *Neisseria meningitidis*, a mais grave das meningites, pois pode levar ao óbito em menos de 24 horas. Esse medicamento é especialmente importante para pacientes alérgicos à penicilina. A doença meningocócica tem distribuição global, podendo ocorrer surtos ocasionais e epidemias em qualquer país do mundo, embora a África seja

a região com maior número de casos, onde cerca de 15 países sofrem epidemias recorrentes a cada 8-12 anos. No Brasil, a doença é endêmica com casos principalmente no inverno, com surtos e epidemias ocasionais. As maiores epidemias registradas no país ocorreram na década de 70 e em 1988. Nos últimos 20 anos foram notificados cerca de 80 mil casos, motivando a vacinação em massa de crianças e adultos, como ocorreu em 1995. No entanto, nos últimos anos surgiram estirpes de *Neisseria meningitidis* resistentes às sulfas [9,10]. A emergência de cepas bacterianas com diferentes graus de resistência antimicrobiana é o aspecto mais alarmante na terapia de doenças infecciosas.

Muitas sulfonamidas foram substituídas pela penicilina, mas uma nova geração de sulfas tem tomado grande importância, as sulfas de longa duração como a sulfadoxina (Figura 6), que basta ser tomada uma vez por semana e constitui também um dos fármacos do Fansidar®, usado no tratamento da malária e de algumas pneumonias [1].

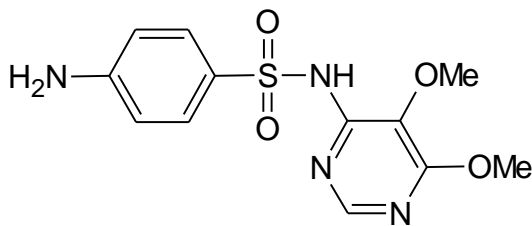


Figura 6 – Estrutura da sulfadoxina, uma sulfa de longa duração.

1.1.2 As sulfas que utilizamos neste trabalho

A sulfapiridina

O primeiro sucesso da segunda geração de sulfas foi o 4-amino-*N*-piridin-2-ilbenzenosulfonamida (IUPAC), ou sulfapiridina (Figura 7-a). Produzido em Dagenhan (Londres) em 1938, esse antibiótico foi comercializado sob o nome de Dagenan® e amplamente utilizado no tratamento de pneumonia e meningite em diversos países [2].

A sulfassalazina

A sulfassalazina (Figura 7-b), (ácido 2-hidroxi-5-[4-(2-piridilsulfamoil)fenildiazenil]benzóico) (IUPAC), Azulfín®, foi sintetizada em 1940 para tratar artrites reumatóides através da ligação da sulfapiridina ao ácido salicílico. É usada também no tratamento de doenças inflama-

tórias do intestino, como colite ulcerosa e doença de Crohn. A sulfassalazina continua sendo o fármaco de escolha para tratar artrites reumatóides [11], sozinha ou combinada com o metotrexato [12,13], e já entrou em estudos clínicos de fase 1-2 no tratamento de gliomas malignos [11].

A sulfassalazina (Figura 7-b) é administrada por via oral e passa, sem sofrer modificações estruturais, do trato gastrointestinal até o cólon, onde é metabolizada por bactérias entéricas originando a sulfapiridina (Figura 7-a) e o ácido 5-aminosalicílico (Figura 7-c) [14,15].

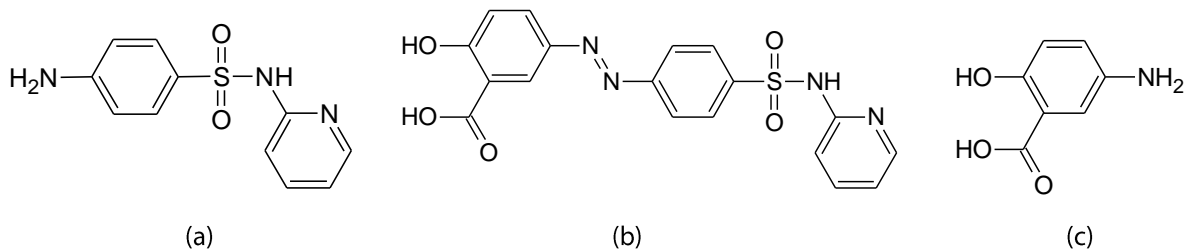


Figura 7 – Estrutura química da sulfapiridina (a), sulfassalazina (b), e do ácido 5-aminosalicílico (c), respectivamente.

1.1.3 Mecanismo de ação das sulfas

As sulfonamidas são agentes bacteriostáticos, ou seja, não matam as bactérias, mas impedem a sua proliferação, facilitando que o sistema imunológico do hospedeiro as destrua.

O mecanismo de ação das sulfas baseia-se na inibição da síntese do ácido tetrahidrofólico, que participa na síntese de ADN e ARN nas bactérias. A ação da sulfa é por mimetismo ao ácido *p*-aminobenzóico (PABA), pois estes compostos são estruturalmente muito parecidos (Figura 8), e competem por uma enzima bacteriana, a dihidropteroato sintetase (DHPS). A sulfonamida se liga a esta enzima impedindo que esteja disponível para se ligar ao PABA, e a rota sintética é interrompida [1].

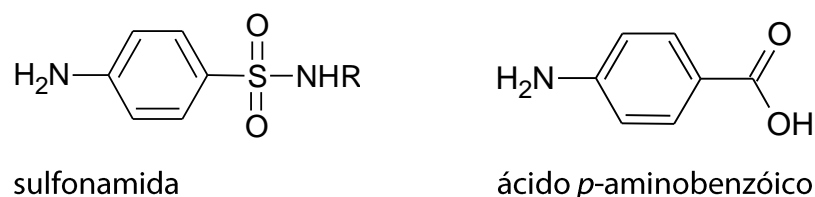


Figura 8 - Estruturas análogas: sulfonamida e o ácido *p*-aminobenzóico (PABA).

A rota sintética de produção do ácido tetrahidrofólico pode ser observada na Figura 9. (A inibição da enzima dihidropteroato sintetase (DHPS) pela ação da sulfa está destacada com um **X**).

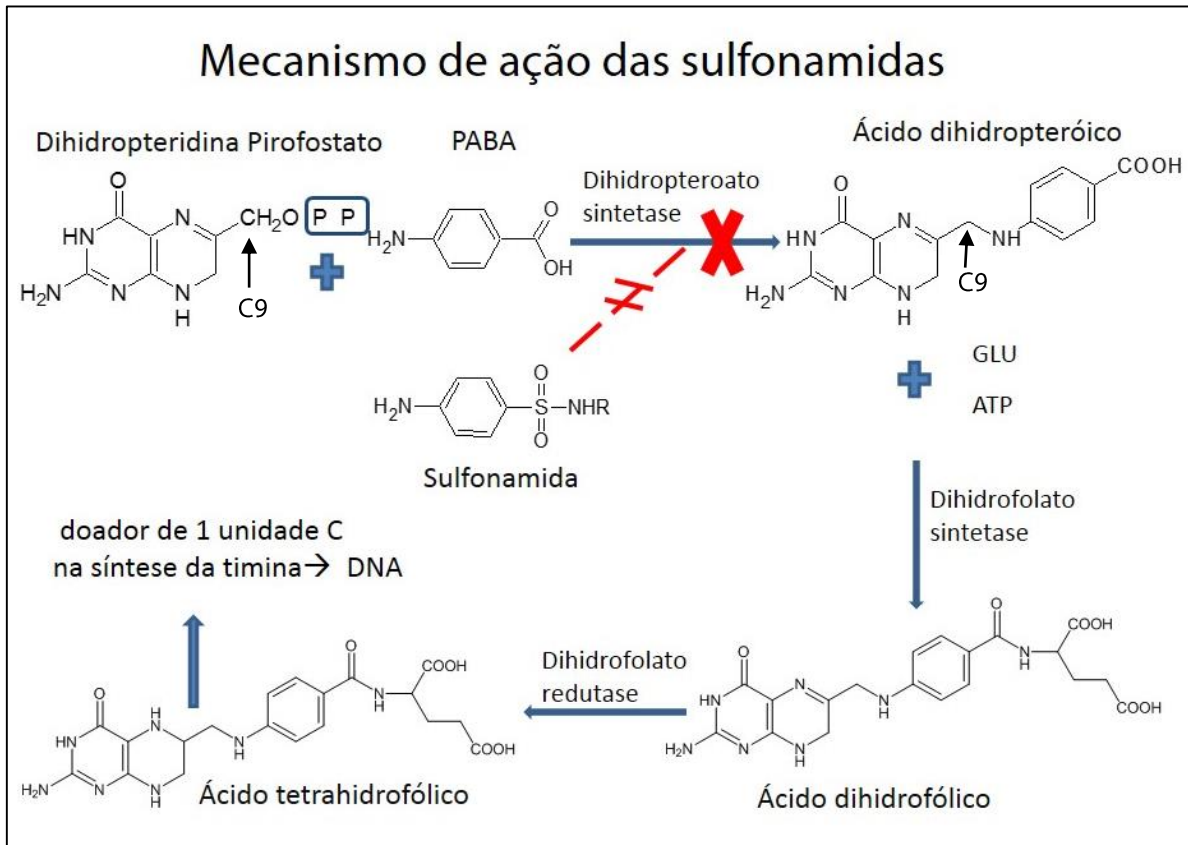


Figura 9 – Mecanismo de ação das sulfonamidas: inibição da síntese do ácido tetrahidrofólico nas bactérias, necessário para a síntese de ADN e ARN.

Yun e colaboradores [16] estudaram recentemente, por cristalografia e modelos quânticos computacionais, o mecanismo catalítico da enzima DHPS, que catalisa a formação da ligação entre o N do PABA e o C9 do dihidropteridina pirofosfato (DHPP), com a eliminação do pirofosfato. Os autores propõem um mecanismo SN1, pois não encontraram evidências para uma SN2, como anteriormente foi sugerido [17]. A clivagem heterolítica da ligação C9-O do DHPP na ausência do PABA foi investigada: a barreira energética é de apenas 24 kcal mol⁻¹ e o carbocátion formado em C9 é estabilizado pela deslocalização da carga no anel pterina. Além disso, o -NH₂ do PABA é um nucleófilo fraco, o que favorece a SN1.

As sulfonamidas possuem baixa toxicidade para os humanos, pois estes não sintetizam o ácido tetrahidrofólico, e sim o obtêm reduzindo o ácido fólico adquirido dos alimentos (Figura 10). Os humanos não possuem a enzima-alvo das sulfas, não sendo afetados no que diz respeito à síntese de ARN e ADN.

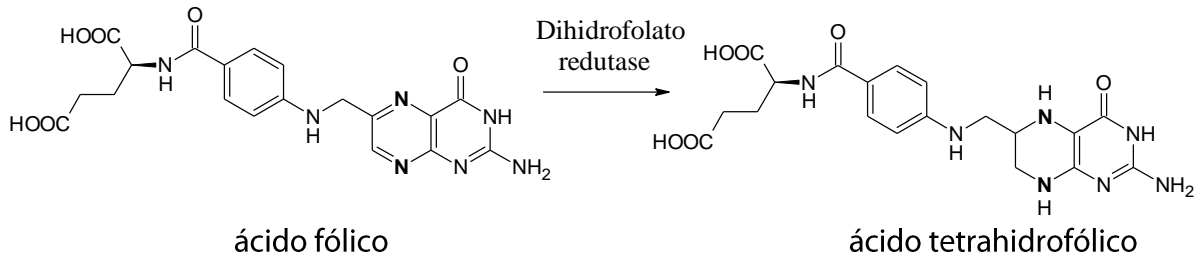


Figura 10 – Redução do ácido fólico, absorvido dos alimentos, pelos mamíferos.

Atualmente, algumas sulfas são utilizadas na forma associada, como o sulfametoxazol em combinação com o trimetoprim (Cotrimoxazol[®] ou Bactrim[®]). O trimetoprim também é um antimetabólito e inibe a dihidrofolato redutase⁵, outra enzima na mesma rota sintética do ácido tetrahidrofólico na qual as sulfas atuam. As duas inibições na mesma rota sintética são responsáveis por um efeito sinérgico da combinação sulfa/trimetoprim, que é potencializado na razão 5/1 [18].

As propriedades favoráveis das sulfas levaram ao seu uso indiscriminado e ao aparecimento de resistência bacteriana, que é hoje o principal obstáculo ao tratamento de infecções causadas por bactérias.

1.1.4 Resistência bacteriana

Se por um lado o sucesso dos antimicrobianos revolucionou a medicina, por outro lado, o uso indiscriminado e exagerado desses medicamentos favoreceu o surgimento e a seleção de cepas resistentes à ação dos fármacos. Inclui-se aqui o uso de antibióticos em humanos

⁵ A enzima dihidrofolato redutase também está presente nas células dos mamíferos. Entretanto, mutações de milhões de anos resultaram em diferenças estruturais significantes entre a enzima dos mamíferos e a enzima das bactérias, de maneira que o trimetoprim reconhece e inibe a enzima da bactéria mais fortemente, sendo em torno de 100.000 vezes mais ativo contra a enzima bacteriana [1].

e animais ou, ainda, com propósitos agrícolas, tanto terapêutica quanto profilaticamente [19].

O aparecimento da resistência bacteriana a antibióticos de primeira linha, como fluoroquinolonas, cefalosporinas de terceira e quarta geração e carbapenêmicos tem se tornado um problema global [20]. Neste contexto, os principais microrganismos patógenos multirresistentes de extrema preocupação para a saúde são: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Enterobacteriaceae*, e foram agrupados em um acrônimo, patógenos "ESKAPE", enfatizando a capacidade que possuem de "escapar" dos antimicrobianos comumente utilizados [21]. A emergência de resistência bacteriana tem se tornado uma grande ameaça à saúde pública, já que o arsenal de antibióticos disponível não é mais efetivo contra essas bactérias. Este fato tem feito com que o objetivo maior de muitos pesquisadores seja a busca de novos fármacos, associações ou esquemas terapêuticos [22-24].

A resistência bacteriana é uma condição de imunidade do microrganismo frente ao antibacteriano, fazendo com que este não tenha efeito, e pode ser vista como o oposto da susceptibilidade onde a quimioterapia tem sucesso absoluto.

Os antibióticos exercem a chamada "pressão seletiva", ou seja, em contato com os microrganismos levarão as cepas sensíveis à morte, deixando vivas as cepas resistentes. Com o uso frequente dos antibióticos, essa seleção leva ao predomínio das cepas que de alguma forma sobreviveram, multiplicaram-se e agora são maioria. Em ambientes hospitalares ou em comunidades sem qualquer controle do uso desses fármacos, o aparecimento de cepas multirresistentes é mais frequente.

A resistência apresenta-se em diferentes graus e considera-se um nível baixo de resistência quando um aumento tolerável da dose do medicamento mantém a sua ação. Neste caso, a atividade *in vitro* do fármaco contra a linhagem de baixa resistência é algumas vezes menor que a atividade contra a linhagem susceptível. Linhagens altamente resistentes são centenas ou milhares de vezes menos sensíveis ao antibacteriano em comparação com a linhagem susceptível [25].

As bactérias têm sido classificadas como sensíveis ou resistentes a determinado fármaco de acordo com a avaliação, *in vitro*, da atividade antibacteriana do fármaco. A CIM⁶ (Concentração Mínima Inibitória) ou a CMB (Concentração Mínima Bactericida) são geralmente determinadas e são consideradas resistentes as linhagens inibidas *in vitro* somente em concentrações superiores àquelas que se pode alcançar *in vivo*.

Entretanto, a relação “inibição de crescimento bacteriano × concentração do fármaco” não deve ser vista como absoluta, pois o sucesso terapêutico depende também de outros fatores, por exemplo, o farmacocinético, como a capacidade do fármaco em atingir o foco infeccioso, como é o caso da eritromicina, extremamente ativa contra o meningococo, mas que não penetra no sistema nervoso central. Além disso, o fator imunológico do paciente pode contribuir para a terapêutica quimioterápica. Dessa forma, um dado microrganismo é sensível ou resistente apenas quando se observa o sucesso ou a falha terapêutica, respectivamente [26]. Portanto, a terapêutica deve ser vista de uma maneira menos simplista e mais abrangente, na qual se leva em conta aspectos relativos ao fármaco, ao microrganismo, à farmacocinética e à imunidade do paciente.

1.1.5 Resistência intrínseca ou adquirida

A resistência de um microrganismo pode ser classificada inicialmente como **intrínseca** ou como **adquirida**.

A resistência **intrínseca** é aquela que faz parte das características naturais, fenotípicas do microrganismo, transmitida apenas verticalmente à prole. Faz parte da herança genética do microrganismo. Por exemplo, a bactéria Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa*, possui uma parede celular impermeável a vários antibacterianos, como penicilinas, cefalosporinas, tetraciclinas, quinolonas e cloranfenicol, que não conseguem atravessar essa parede e atingir o alvo de ação antibacteriana, sendo portanto, naturalmente resistentes a esses antibacterianos [1]. Essa característica fenotípica é transmitida verticalmente de geração a geração. Outro fator de resistência intrínseca é a ausência do alvo de ação para o fármaco, por exemplo, as penicilinas são inibidores da síntese da parede celular bacteriana, e não

⁶ A Concentração Mínima Inibitória é mais comumente dita por MIC (Minimum Inhibitory Concentration).

atuam contra micoplasmas devido à ausência de parede celular nesses microrganismos. A resistência intrínseca determina as classes de antibióticos recomendadas para cada espécie, por exemplo, a vancomicina é geralmente ativa em cocos Gram-positivos e aminoglicosídeos são reservados aos bacilos Gram-negativos [11, 28].

Já a resistência **adquirida** ocorre quando, em uma espécie anteriormente susceptível, surge uma “nova” característica, ausente nas células parentais, como resultado de alterações estruturais ou bioquímicas na célula bacteriana. Essas alterações podem ocorrer devido a mutações cromossômicas, ou extra cromossômicas, via plasmídeos, que são estruturas de ADN circular que carregam genes para determinada característica, e são transmitidas de uma bactéria a outra [11].

A mutação é um fenômeno aleatório, resultado de um erro na replicação do ADN, e ocorre naturalmente com probabilidade de 1 em cada 10 milhões de células por divisão [11, 29]. Mutações ocorrem na ausência ou presença de antibióticos, entretanto se uma população bacteriana infecciosa contendo alguns mutantes resistentes a um determinado antibiótico, for exposta a este fármaco, os microrganismos resistentes serão selecionados enquanto haverá a drástica redução das cepas sensíveis devido à ação do antibiótico, e na maioria dos casos, a rápida redução da população bacteriana sensível permite que as defesas naturais do hospedeiro possam lidar efetivamente com as cepas resistentes [29].

O uso descontínuo do antibiótico faz com que as defesas do hospedeiro tenham que lidar com as cepas resistentes, que foram selecionadas pelo tratamento iniciado, como também tenham que lidar com as cepas sensíveis, já que o tratamento foi interrompido. Isso aumenta as chances das cepas resistentes se multiplicarem, que dependendo do fator imunológico do hospedeiro, pode levar a uma infecção causada por bactérias inteiramente resistentes àquele antibiótico. Este problema foi o principal fator no aparecimento de bactérias multirresistentes causadoras de tuberculose [1].

A resistência transferível ocorre quando um dado microrganismo recebe material genético de outro microrganismo, passando a expressar a característica contida no gene adquirido. São elementos transferíveis importantes para o fenômeno da resistência os plasmídeos, os transposons, e as sequências de inserção.

1.1.6 Mecanismos de resistência

Mecanismos de resistência podem estar presentes em qualquer etapa dos processos necessários a que um fármaco alcance e combine-se com seus alvos, podendo ocorrer como consequência de vários fatores [30].

O acesso reduzido do antibiótico ao patógeno, por exemplo, é um fator que leva à resistência. Antibióticos β -lactâmicos conseguem penetrar em algumas bactérias Gram-negativas através de porinas, que são canais proteicos presentes em sua membrana externa, que atuam como poros para a passagem de água e nutrientes essenciais para o interior bacteriano [1]. Através desses canais, os fármacos conseguem atingir seu receptor na parede celular e exercer sua ação bactericida. Como mecanismo de defesa, algumas bactérias, através de gerações, passaram a sintetizar esse canal cada vez menor ou até a codificar a ausência completa desse canal, impedindo assim a entrada do fármaco na célula, como detectado em linhagens dos gêneros *Klebsiella* e *Enterobacter* resistentes aos carbapenêmicos [31].

Antibióticos aminoglicosídeos utilizam-se da diferença de potencial elétrico da membrana bacteriana para penetrá-la, ou seja, por terem carga positiva são atraídos ao interior bacteriano, que é negativamente carregado. Algumas cepas de *P. aeruginosa* alteram, via plasmídeo, o metabolismo energético da membrana da bactéria, resultando em diminuição desse potencial da membrana, dificultando muito a penetração do fármaco na bactéria [32].

Outro mecanismo de resistência bastante frequente é a eliminação do antibiótico por bombas de efluxo: A bactéria passa a produzir proteínas de membrana que bombeiam ativamente os antibióticos de dentro da célula para fora, diminuindo a sua concentração citoplasmática. Esse mecanismo chamou a atenção da comunidade científica em torno de 1980, quando pesquisadores demonstraram esse mecanismo codificado em plasmídeos em cepas de *E. coli* [33, 34]. Outro exemplo muito estudado deste tipo de resistência é a proteína transmembranar Tet(A), que confere resistência às tetraciclinas [35, 36]. A busca por inibidores de bombas de efluxo a fim de reverter esse mecanismo de resistência também tem atraído a atenção de pesquisadores [37].

As bactérias podem conter genes que codificam a produção de enzimas com propriedades de clivar ou de promover alterações estruturais na molécula do fármaco, tornando-o inativo. Como exemplo de enzimas que quebram a estrutura do fármaco temos dezenas de β -lactamases, variando de substrato e de microrganismo, que atuam promovendo a hidrólise de β -lactâmicos como a penicilina e seus derivados, deixando aberta a estrutura do anel, fazendo com que seja incapaz de se ligar ao seu sítio receptor [38-40]. A informação para a produção das β -lactamases pode estar presente no cromossomo bacteriano, em plasmídeos ou em transposons e, como visto anteriormente, pode ser transferida a outras bactérias tanto vertical como horizontalmente.

Existem ainda enzimas bacterianas que, em vez de quebrar a estrutura molecular do fármaco, apenas alteram sua conformação, como ocorre nos aminoglicosídeos (através de adenilação, acetilação e fosforilação), o que reduz sua afinidade pelo receptor ribossômico impedindo que exerça seu mecanismo de ação (inibição da síntese proteica bacteriana) [1].

Os aminoglicosídeos e o cloranfenicol também sofrem modificação estrutural mediada por enzimas, perdendo sua afinidade pelo receptor e, portanto, sua atividade. O cloranfenicol é transformado em monoacetato ou diacetato de cloranfenicol por uma acetiltransferase no interior de alguns microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos. Recentemente, foi relatada a ação de uma enzima do tipo hidrolase na inativação do cloranfenicol e florfenicol [41].

Alterações nos alvos em que atuam os fármacos também podem impedir a interação fármaco-receptor, imprescindível para a ação antibacteriana. Muitas vezes, por mutação cromossômica, há a alteração bioquímica do receptor, impedindo ali a perfeita ligação do fármaco no seu alvo de ação. Alterações no ribossomo bacteriano são responsáveis por resistência a grande número de drogas, ocorrendo com aminoglicosídeos, cloranfenicol e principalmente macrolídeos. Existe uma outra maneira, promovida pela bactéria, de impedir o contato fármaco-receptor, como é o caso da produção de uma proteína citoplasmática que protege fisicamente o ribossomo da inibição promovida pela tetraciclina [42].

Pode ocorrer ainda alteração na ADN-girase ou topoisomerase, levando à resistência a quinolonas [43], ou alteração na ARN-polimerase, como recentemente identificado em

linhagens de *Bacillus subtilis* resistentes à cefalosporina [44] e em *Mycobacterium tuberculosis* resistentes às rifamicinas [45].

Resistência bacteriana pode também ocorrer por alterações das proteínas microbianas que transformam pró-fármacos em moléculas ativas, ou através do desenvolvimento de vias metabólicas alternativas às que foram suprimidas pelo antibiótico [30].

1.1.7 A resistência bacteriana às sulfas

As sulfas não foram somente os primeiros antibióticos de amplo espectro disponíveis na clínica médica mas, também, foram as primeiras vítimas do fenômeno chamado resistência bacteriana [46].

Em 1938, quase todas as cepas de *Neisseria gonorrhoeae* eram sensíveis às sulfonamidas. Dez anos mais tarde, apenas 20% dessas cepas ainda apresentavam susceptibilidade. Essa diminuição na atividade se estendeu também a *Streptococcus hemolyticus* e outras espécies [26].

Como dito anteriormente, as sulfonamidas atuam inibindo a dihidropteroato sintetase (DHPS), enzima responsável pela ligação entre o ácido *p*-aminobenzóico (PABA) e a pteridina na síntese de ácido fólico bacteriano. A resistência bacteriana às sulfas pode surgir por vários fatores, uma vez que atuam por inibição enzimática competitiva. Por exemplo, podem ocorrer mutações no cromossomo bacteriano que levem à hiperprodução de PABA, aumentando a probabilidade de que este se ligue à enzima alvo das sulfas [6]. Entretanto, a hiperprodução de PABA ocorre muito mais frequentemente através de plasmídeos transferidos de bactéria para bactéria.

Outros exemplos de resistência adquirida via plasmídeo são comumente observados. Mudanças na permeabilidade da membrana celular [47], que impedem a entrada do antibiótico dentro da célula bacteriana. Mutações no sítio alvo da enzima DHPS, associadas aos genes denominados *sul1*, *sul2*, e *sul3*, foram também caracterizadas em muitos isolados clínicos e fazem com que a enzima perca a afinidade pela sulfa, mas mantenha sua atividade bioquímica na produção do folato [48, 49].

Um modo proposto para se reverter o fenômeno da resistência é a coordenação de antibióticos a íons metálicos [50]. A coordenação de sulfas a íons metálicos vem se mostrando uma importante estratégia para incrementar a atividade antibacteriana desses antibióticos bem como tem se mostrado uma estratégia interessante no que diz respeito à reversão da resistência bacteriana. As sulfas possuem potenciais sítios de coordenação em sua estrutura, o que permite vários modos de coordenação, como exemplificado na Figura 11, para a sulfadiazina:

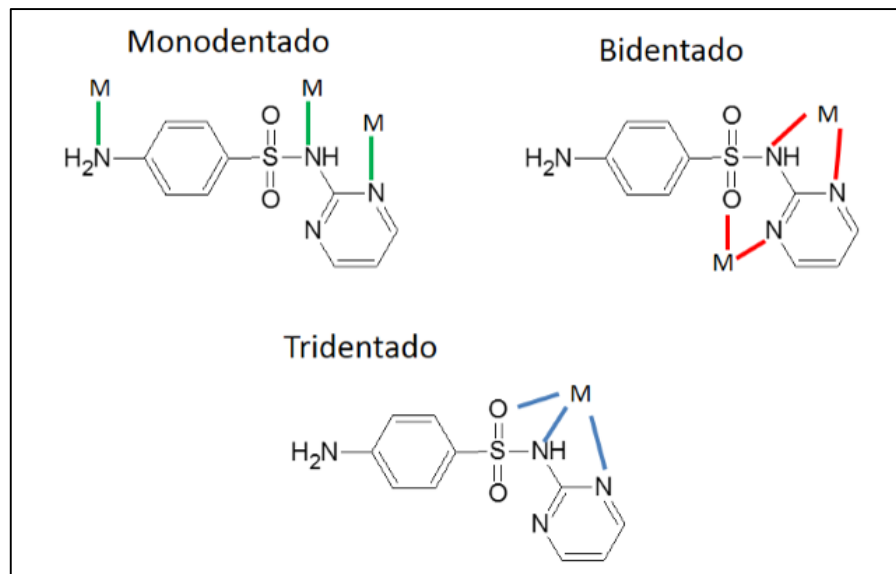


Figura 11- Modos de coordenação metálica às sulfas; neste exemplo, sulfadiazina.

Um exemplo da coordenação metálica às sulfas como estratégia no combate à reversão da resistência bacteriana é o uso do complexo sulfadiazinaprata(I) [51], aprovado pela FDA (Food and Drug Administration) em 1973, até hoje o medicamento de escolha em casos de queimaduras graves. O longo período de tratamento necessário à regeneração do tecido e cura, frequentemente propicia o desenvolvimento de bactérias resistentes aos antibióticos, mas sensíveis a este complexo. Estudos recentes propõem a associação do complexo a outros fármacos e materiais de uso médico [52, 53]. Por exemplo, associado ao ácido hialurônico, pode controlar infecções em ferimentos nos pacientes diabéticos, onde normalmente desenvolvem-se bactérias resistentes aos antibióticos, mas não resistentes ao complexo sulfadiazinaprata(I) [54].

AGERTT *et al.* obtiveram excelentes resultados antibacterianos *in vitro* com complexos metálicos de Au(I) e Ag(I) coordenados a sulfas, que associados com o trimetoprim revelaram-se bastante promissores no combate a *Mycobacterium tuberculosis* [18], possivelmente sendo uma alternativa para o combate às linhagens multirresistentes.

1.1.8 As tetraciclinas

As tetraciclinas (Figura 12-a) recebem essa denominação devido à sua estrutura química formada por quatro anéis, e foram o primeiro grupo de antibióticos de amplo espectro de ação, ou seja, que exibem atividade contra uma variedade de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, aeróbias ou anaeróbias. As tetraciclinas são antibióticos de primeira escolha no tratamento da cólera, peste, brucelose, riquetsioses e no tratamento das infecções causadas por microrganismos atípicos⁷ como *Chlamydia* e *Mycoplasma* [1, 6].

A primeira tetraciclina, a clortetraciclina, foi descoberta em 1948 e recebeu inicialmente o nome de aureomicina por ser produzida por um fungo de coloração dourada, o *Streptomyces aureofaciens*. Mais tarde foram descobertos ou sintetizados muitos outros antibióticos da família das tetraciclinas (Figura 12-a), entre eles a tetraciclina (Figura 12-b) [1].

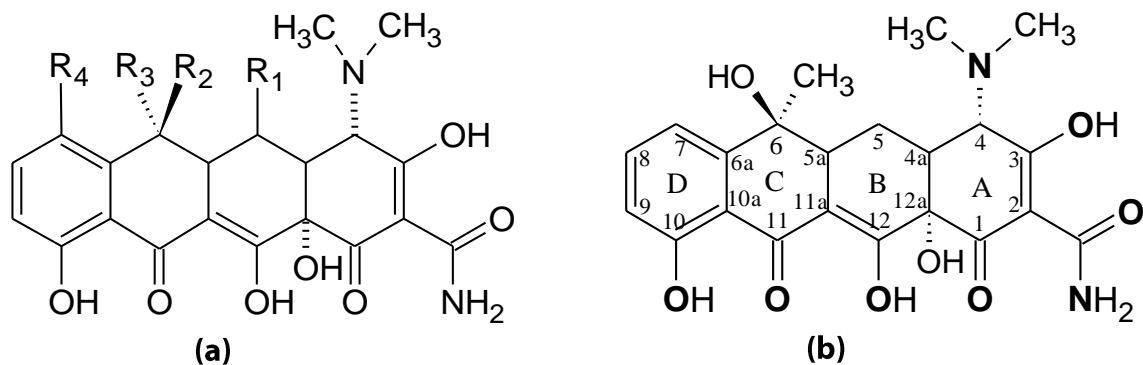


Figura 12 - Estrutura geral das tetraciclinas (a). Na tetraciclina (b), R₁=H, R₂=CH₃, R₃= OH e R₄=H.

⁷ Microrganismos denominados "atípicos" devido a possuírem características diferentes daquelas apresentadas pelas outras bactérias, por exemplo, ausência de parede celular sólida, possuindo apenas uma membrana flexível, e tamanho menor, o que dificultam sua identificação mesmo em microscópios eletrônicos potentes. Normalmente são causadores de pneumonias então denominadas "atípicas", infecções alérgicas e outras doenças.

As tetraciclina apresentam um amplo espectro de ação, que engloba a maioria das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, anaeróbias ou aeróbias. Além de suas propriedades farmacológicas, a tetraciclina possui uma estrutura química muito interessante para a coordenação a íons metálicos, com vários sítios potencialmente quelantes:

- Os oxigênios do sistema ceto-fenólico em C10 e C11;
- Os oxigênios da β -dicetona em C11 e C12 ou em C12 e C1.
- O nitrogênio da dimetilamina em C4 e o oxigênio em C3.
- O oxigênio em C1 e o oxigênio (ou o nitrogênio) da amida.
- O oxigênio em C3 e o oxigênio (ou o nitrogênio) da amida.

1.1.9 Mecanismo de ação das tetraciclina

As tetraciclina são antibióticos que inibem o crescimento das bactérias ligando-se à unidade 30S do ribossomo (Figura 13) e impedindo que o anti-códon no ARN transportador se ligue ao códon no ARN mensageiro. Isso interrompe as adições de aminoácidos para o alongamento da cadeia proteica. As tetraciclina tem ação bacteriostática inibindo a síntese de proteínas, o que impede a replicação e leva à morte da bactéria.

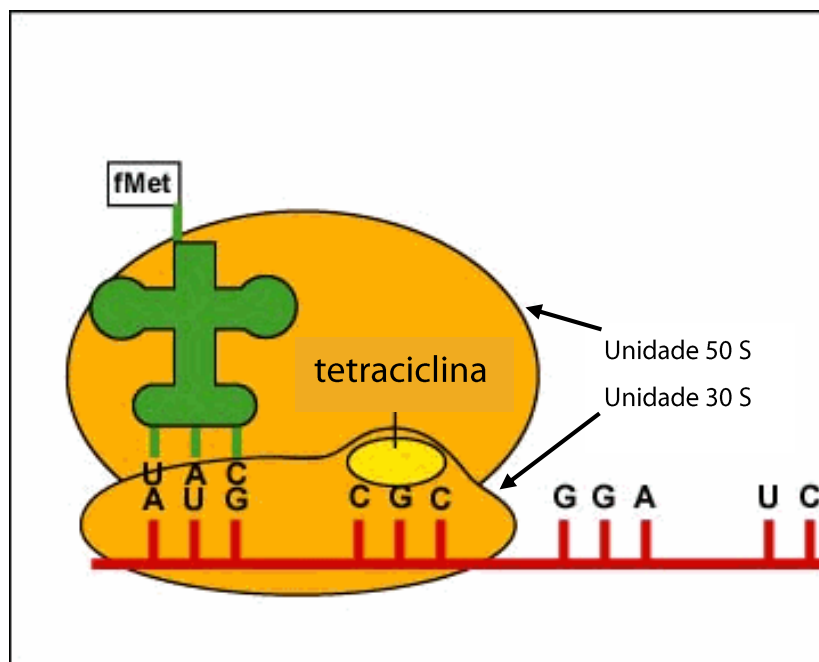


Figura 13 – Mecanismo de ação da tetraciclina na unidade 30 S do ribossomo.

As tetraciclina penetram nas bactérias Gram-negativas por difusão passiva, através de canais hidrofílicos nas porinas da membrana externa, ou por transporte ativo através de um sistema dependente de energia. No plasma sanguíneo, a tetraciclina é transportada como complexo de cálcio [55] e, uma vez dentro da célula da bactéria, um complexo de magnésio é que se liga ao ribossomo e inibe a síntese proteica [56, 57].

A seletividade das tetraciclina ocorre devido a diferenças entre o ribossomo bacteriano e o das células eucariotas, além da habilidade das células bacterianas em concentrar esses agentes mais rapidamente do que as células humanas o fazem, o que é muito importante, pois as tetraciclina podem inibir a síntese proteica nas células dos mamíferos, especialmente ao nível das mitocôndrias [1, 58].

1.1.10A resistência bacteriana às tetraciclina

O amplo espectro de ação, a baixa toxicidade, o baixo custo e o fato de serem administradas por via oral, fizeram com que as tetraciclina fossem um dos antibióticos mais utilizados no mundo durante anos [56]. Infelizmente, o seu uso indiscriminado levou ao aparecimento de resistência bacteriana [59-62]. Outro fator apontado para o surgimento da resistência às tetraciclina foi o seu uso em tratamento de animais e como aditivo para promover o crescimento de animais recém-nascidos [1].

A emergência da resistência às tetraciclina tem limitado seu uso no tratamento de infecções bacterianas em humanos. Entre os mecanismos de resistência bacteriana às tetraciclina, os mais importantes envolvem genes adquiridos de outras bactérias via plasmídeos, que codificam proteínas que agem ou impedindo a ligação da tetraciclina ao ribossomo ou bombeando o antibiótico para fora das células [36].

No mecanismo por efluxo (Figura 14), comumente encontrado em bactérias Gram-negativas, há uma diminuição do acesso das tetraciclina ao ribossomo por redução da concentração intracelular do antibiótico a um nível bem abaixo do necessário para a sua atividade. Neste mecanismo, proteínas transmembranares (TetA) exportam tetraciclina para fora da célula, provocando uma menor concentração do fármaco dentro das células

bacterianas. A Tet(A) acopla o transporte de uma molécula de tetraciclina, na forma de um complexo de Mg(II), $[TcMg]^+$, de dentro para fora das células, à entrada de um próton.

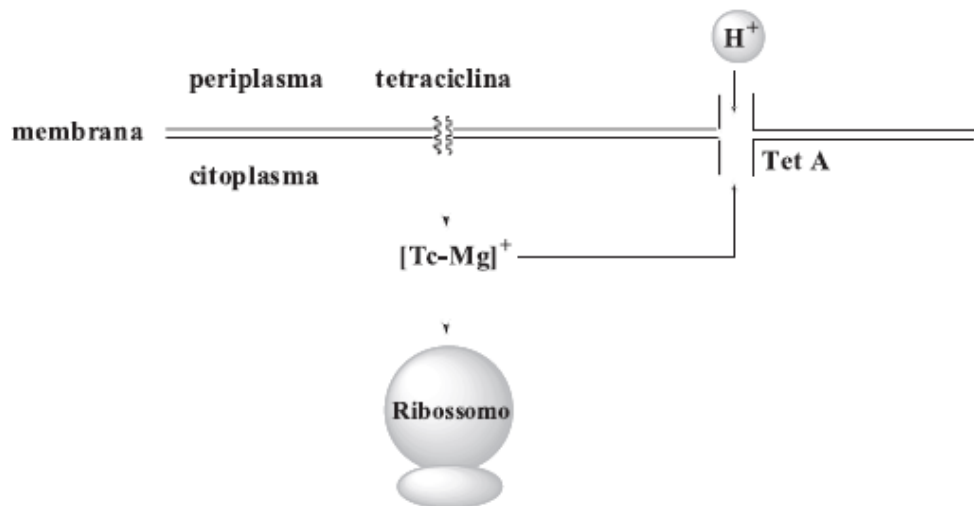


Figura 14 – Esquema representando o mecanismo de efluxo mediado pela Tet(A)

Outra proteína responsável por efluxo da tetraciclina é a Tet(K), encontrada por exemplo em cepas Gram-positivas de *Staphylococcus aureus* resistentes à tetraciclina, mas neste caso podem ser sensíveis a outro exemplar tetraciclínico, a minociclina, que não interage com a proteína Tet(K) [30].

Em bactérias sensíveis, as tetraciclinas ligam-se ao ribossomo e mudam sua conformação padrão interrompendo a síntese proteica. Essa interação fármaco \times sítio ativo pode ser impedida através da proteção ribossomal por proteínas citoplasmáticas, Tet(O) e Tet(M), que atuam como uma barreira, protegendo o ribossomo da ação das tetraciclinas e a síntese proteica prossegue normalmente [63-65]. Um dado curioso é que a minociclina, outro membro da família das tetraciclinas, permanece ativa contra alguns tipos específicos de bactérias que contêm o gene de expressão dessas proteínas [66].

O fenômeno da resistência às tetraciclinas tem aumentado e até mesmo a tigeciclina, lançada mais recentemente, tem apresentado resistência em *Proteae* e em *Pseudomonas aeruginosa*. Cabe aqui ressaltar que o fenômeno da resistência é algo muito preocupante e

que existem cepas resistentes a todos os agentes conhecidos atualmente. Em consequência, é constante a necessidade de renovação do arsenal de antibióticos, especialmente aqueles com atividade em bactérias Gram-negativas, uma vez que são menos sensíveis à terapia [67].

1.1.11 Atividade antibacteriana de compostos de bismuto

O aparecimento da resistência aos antibióticos usados atualmente fez com que fosse retomado o interesse por compostos que haviam sido substituídos pelos antibióticos modernos. Entre esses agentes encontram-se complexos metálicos, cujo uso havia sido diminuído após a descoberta da penicilina.

As propriedades do bismuto(III) para o alívio de dores estomacais são conhecidas desde a Idade Média, e atualmente muitos compostos de bismuto têm sido prescritos para tratar distúrbios gastrointestinais. Entre os sais de bismuto mais utilizados, o subsalicilato de bismuto(III) é eficaz na prevenção e tratamento de quadros diarreicos de origem bacteriana (e viral), em particular na “diarreia do viajante”, causada principalmente por cepas de *Escherichia coli*.

Na Figura 15, podem-se observar as estruturas de três compostos de bismuto(III) de uso farmacológico: o subsalicilato de bismuto(III) (a), principal ingrediente em Pepto-Bismol® e Kaopectate®, usado há mais de 75 anos como agente antidiarreico; o Bibrocatol (b), utilizado para tratar infecções dos olhos, e o subgalato de bismuto(III) (c), usado em preparações dermatológicas.

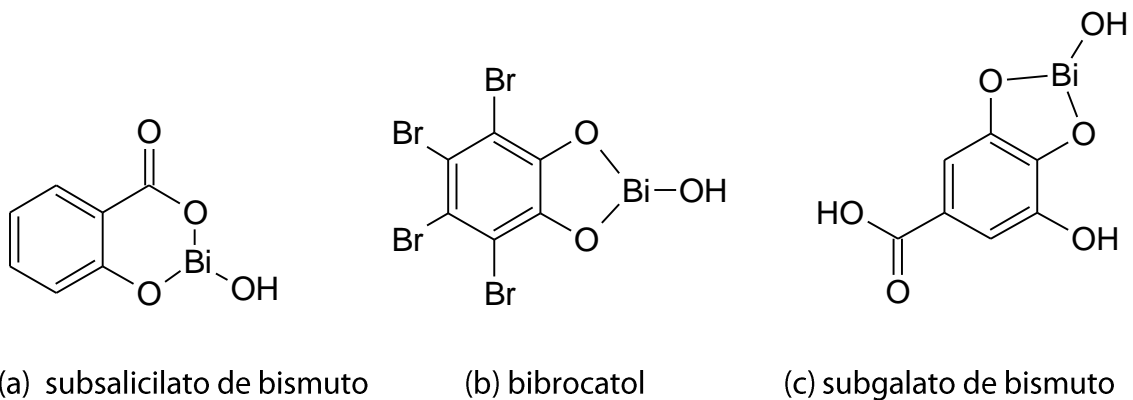


Figura 15 – Alguns fármacos de Bismuto(III).

O subsalicilato, o citrato e o subcitrato de bismuto coloidal são amplamente utilizados no mundo todo para tratar doenças gastrointestinais relacionadas à infecção por *Helicobacter pylori* [68]. Esta bactéria, descoberta em 1983, é comum em cerca de 80% da população em países subdesenvolvidos [69]. Para erradicá-la completamente são usadas combinações desses fármacos de bismuto com antibióticos como amoxicilina e claritromicina [70]. Recentemente, ANDREWS *et al.* sintetizaram compostos de bismuto com atividade antibacteriana muito relevante contra *H. pylori*, com valores de concentração mínima inibitória (MIC) na faixa de nmol L^{-1} [71].

Por outro lado, uma associação medicamentosa contendo citrato de bismuto coloidal, metronidazol e tetraciclina foi aprovada pela FDA para o tratamento e erradicação do *H. pylori* [72, 73]. Esta associação nos levou a acreditar que a coordenação do íon bismuto(III) a antibióticos poderia conduzir à obtenção de novos fármacos biologicamente mais ativos que os antibióticos em si, por exemplo em linhagens bacterianas resistentes.

1.1.12 Atividade antibacteriana de compostos de gálio

Estudos *in vitro* demonstraram que o nitrato de gálio tem ação antibacteriana inibindo o crescimento da bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, uma bactéria Gram-negativa que cresce formando um biofilme, comumente encontrada em infecções hospitalares, sendo capaz de se aderir a diversos materiais, contaminando catéteres, ventiladores, próteses e lentes de contato [74]. Por causa da alta resistência a antibióticos e do grande arsenal de fatores de virulência desta bactéria, as infecções causadas por ela são de difícil controle. KANEKO *et al.* demonstraram que o nitrato de gálio previne a formação do biofilme e apresenta ação bactericida *in vitro*. Além disso, este sal de gálio foi efetivo em dois modelos experimentais de infecção por pneumonia em animais. A ação antimicrobiana deve-se à habilidade do gálio(III) de penetrar nos microrganismos através de seus mecanismos de transporte de ferro(III) e interferir com o metabolismo do ferro e com a síntese do ADN e de proteínas.

1.2 Câncer e antineoplásicos

De acordo com dados levantados pelo INCA (Instituto Nacional de Câncer do Ministério da Saúde), o câncer é a segunda maior causa de morte por doença no Brasil, perdendo apenas para as doenças cardiovasculares. A mesma estatística é observada em vários países do mundo [75].

As estatísticas do INCA para 2012/2013 apontaram o câncer de próstata como o mais incidente em homens (30,8%), estimando-se 60.180 casos novos, e o câncer de mama (27,9%), o mais incidente em mulheres de todo o mundo [75].

Nas últimas décadas, o câncer, antes mais acentuado nos países desenvolvidos, ganhou uma dimensão maior, convertendo-se em um evidente problema de saúde pública mundial. Essa progressiva ascensão da incidência de doenças crônico-degenerativas é conhecida como transição epidemiológica, sendo notório que a partir de 1960 as doenças infecciosas e parasitárias deixaram de ser a principal causa de morte, sendo substituídas pelas doenças do aparelho circulatório e pelas neoplasias⁸. O principal fator apontado como causa dessa mudança é o envelhecimento da população, pois traz mudanças nas células, aumentando a sua susceptibilidade a mutações, além de terem sido expostas por mais tempo aos diferentes fatores de risco para câncer [75].

1.2.1 O que é o câncer e como se desenvolve

O corpo humano é formado por milhões de células que se reproduzem por um processo chamado divisão celular. Esse processo é controlado, sendo o responsável pela formação, crescimento e regeneração dos tecidos saudáveis do corpo. Entretanto, existem situações nas quais as células se tornam defeituosas e podem perder os mecanismos que controlam a sua reprodução. Neste caso não param de se reproduzir, gerando o que comumente chamamos de tumor.

⁸ Neoplasma significa novo crescimento. Neoplasia, câncer, tumor.

Entretanto, quando o ADN é danificado numa célula normal, há mecanismos que bloqueiam a replicação do ADN, dando tempo à célula de repará-lo até a próxima divisão. Se o reparo não for possível, a célula se suicida (entra em apoptose), impedindo que o defeito seja levado adiante nas células-filhas. Mas quando o número de defeitos é grande, pode ocorrer que os mecanismos de reparo ou eliminação da célula sejam vencidos ou insuficientes, e o câncer se instala.

Diversas mutações podem levar à formação de tumores, por exemplo, mutações em genes de supressão de tumor, que são genes envolvidos no processo de checar a qualidade das células, repará-las ou eliminá-las, em último caso. O gene TP53 é um importante exemplo e codifica a proteína p53. Se o gene TP53 for danificado, os mecanismos de reparo ficam deficientes e as células danificadas, não sendo reparadas nem eliminadas, se multiplicam aumentando as chances de se desenvolver câncer [76]. Mutações no gene p53 são encontradas em 50% dos tumores humanos, sendo que está presente em 96% dos tumores ovarianos [77].

Também são frequentes mutações em genes que codificam proteínas envolvidas no controle da divisão celular. Por exemplo, mutação no gene Ras é frequente em, no mínimo, 25 % dos casos de câncer em humanos [78]. Esse gene codifica a proteína Ras, que se auto-ativa e auto-desativa fazendo o controle da divisão celular. Mutações no gene Ras podem fazer a proteína Ras perder a capacidade de se auto-desativar e a divisão celular não para.

Além da exposição a mutagênicos, outros fatores ou agentes são usualmente envolvidos no desenvolvimento do câncer. Vírus estão envolvidos no mínimo em 6 tipos de câncer humano, e são a causa de 15 % das mortes por câncer no mundo. O Epstein-Barr vírus, por exemplo, pode estar associado a determinados tipos de câncer como o linfoma de Hodgkin e o câncer nasofaríngeo; alguns tipos de Papiloma vírus, sexualmente transmissíveis, são encontrados em aproximadamente 90 % dos casos de câncer do colo do útero; o vírus da Hepatite B e o HIV também podem inserir no genoma genes que codifiquem anomalias em proteínas, por exemplo, nas tirosina quinases-PTKs, que são proteínas responsáveis pela fosforilação de substratos proteicos, como enzimas, e estão relacionadas a diversos processos fundamentais, como a proliferação, diferenciação, sobrevivência ou morte celular. A bactéria *Helicobacter pilory*, responsável por úlceras estomacais, também é apontada como causa de câncer no estômago [1].

Alguns tipos de câncer de mama, estômago e intestino parecem ter um forte componente familiar, embora não se possa afastar a hipótese de exposição dos membros da família a uma causa comum. Determinados grupos étnicos parecem estar protegidos de certos tipos de câncer: a leucemia linfocítica é rara em orientais, e o sarcoma⁹ de Ewing é muito raro em negros [75].

Os tratamentos utilizados no combate ao câncer, quimioterapia e radioterapia, também podem induzir a outros tipos de câncer nos pacientes já tratados. Por exemplo, pacientes curados da doença de Hodgkin frequentemente desenvolvem leucemia aguda. O risco do desenvolvimento de um segundo câncer pode ser maior que o benefício de cura do outro.

1.2.2 Quimioterapia antineoplásica

A quimioterapia é o tratamento de doenças através do uso de compostos químicos. Quando aplicada ao câncer é chamada de quimioterapia antineoplásica ou quimioterapia anti-blástica [75].

Uma vez instalado o câncer, é muito difícil combatê-lo pois, como já dito no item anterior, os mecanismos de reparo celular já foram vencidos. Como resultado, os agentes antineoplásicos tendem a ser altamente tóxicos e atuam contra uma variedade de alvos celulares. E tendo em mente o número de defeitos numa célula cancerosa, é pouco provável que um único composto químico seja eficaz e sim uma combinação deles, com diferentes mecanismos de ação, aliados à cirurgia e radioterapia.

Os quimioterápicos antineoplásicos usados na prática clínica apresentam os seguintes mecanismos de ação, compostos por:

- Agentes alquilantes: Ligam-se ao ADN impedindo a separação dos filamentos da dupla hélice, evento indispensável na reprodução celular. Ex: mostardas nitrogenadas, cisplatina, carboplatina.

⁹ Sarcoma (do grego "crescimento carnosos") é um câncer de pele menos comum, porém dos mais perigosos e difíceis de se tratar. Atingem a mesoderme e são os tipos de câncer que mais fazem metástase.

- Antimetabólitos: inibem a biossíntese de componentes essenciais do ADN e ARN, impedindo a multiplicação e função normal da célula. Ex: inibidores da síntese de purinas, como 6-mercaptopurina e 6-tioguanina, inibidores da síntese de ácido timidílico, como o 5-fluoruracil e metotrexato; e outros.
- Antibióticos: interagem com ADN ou inibem a síntese de ADN ou de proteínas. Apesar de apresentarem estruturas diversas, os antibióticos possuem em comum anéis insaturados que permitem a redução e a consequente produção de radicais livres reativos. Podem também apresentar outro grupo funcional que lhes acrescenta novos mecanismos de ação, como alquilação (mitomicina C), inibição enzimática (actinomicina D e mitramicina) ou inibição da função do ADN por intercalação (bleomicina, daunorrubicina, actinomicina D, adriamicina, mitroxantona e epirubicina).
- Inibidores mitóticos: podem paralisar a mitose na metáfase, devido a atuar sobre a proteína tubulina, que forma os microtúbulos do fuso pelo qual migram os cromossomos. Ex: alcaloides vincristina, vimblastina e vindesina, e outros.
- Outros agentes.

O primeiro antineoplásico desenvolvido foi o 1,1-tio-bis-2-cloroetano (Figura 16 -a), conhecido como gás mostarda, usado nas duas Guerras Mundiais [75]. Em 1919, poucos anos após seu uso como arma química, observou-se que suas vítimas apresentavam poucos glóbulos brancos, porque o gás mostarda causava destruição da medula óssea. Atualmente a sua utilização está regulada pela Convenção de Armas Químicas (CWC-Chemical Weapons Convention) como uma substância de Classe 1, ou seja, sem outro uso a não ser guerra química.

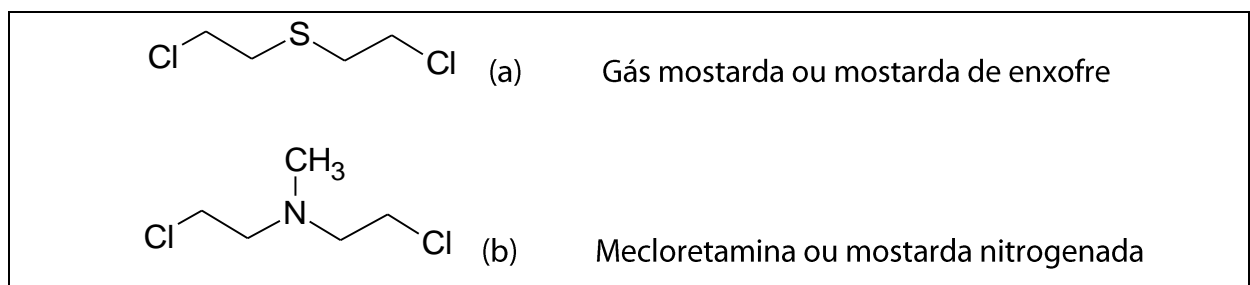


Figura 16 – Gás mostarda (a), mostarda nitrogenada (b), primeiros quimioterápicos antineoplásicos.

Em 1946, estudos com camundongos mostraram que "mostardas nitrogenadas" (compostos análogos ao gás mostarda, porém tendo um átomo de N no lugar do S) reduziam o crescimento de tumores. O avanço deste tipo de pesquisa levou ao primeiro quimioterápico, a mecloretamina (Figura 16-b), especialmente útil no combate ao linfoma de Hodgkin.

O desenvolvimento de antitumorais a base de metais iniciou-se com a descoberta da atividade antitumoral da *cis*-diaminodichloroplatina(II), conhecida por cisplatina (Figura 17).

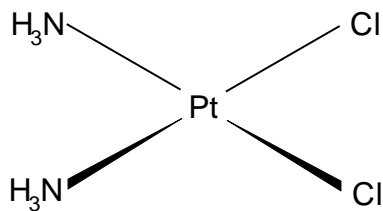


Figura 17 – Estrutura da cisplatina.

Suas propriedades citotóxicas foram descobertas por Rosenberg e colaboradores em 1964, enquanto investigavam os efeitos de um campo elétrico na proliferação da bactéria *Escherichia coli* em solução de NH_4Cl , sob uma corrente elétrica produzida por eletrodos de platina [3, 79, 80]. Durante o experimento, foram observados filamentos de bactérias, consequência da interrupção da proliferação bacteriana (divisão celular interrompida). Esse efeito foi então atribuído a compostos possivelmente formados pela reação lenta entre a platina dos eletrodos e o NH_4Cl da solução, em presença da corrente elétrica aplicada e luz. Os compostos possivelmente formados na reação, $(\text{NH}_4)_2[\text{PtCl}_6]$, $(\text{NH}_4)[\text{Pt}(\text{NH}_3)\text{Cl}_5]$, *cis*- $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_4]$, *cis*- $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$ (cisplatina) e $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_3\text{Cl}_3]\text{Cl}$ foram testados e apenas os compostos com geometria *cis* apresentaram atividade antitumoral, sendo a cisplatina o mais ativo em teste animal [81].

A cisplatina entrou em testes clínicos de fase I em 1971 e foi aprovada pela FDA (Food and Drug Administration) em 1978 sob o nome comercial de Platinol®. Apesar da alta eficácia da cisplatina, a resistência celular, além dos efeitos colaterais como nefrotoxicidade e neurotoxicidade, representam uma limitação ao seu uso. Atualmente, existem 6 fármacos de platina comercialmente aprovados para uso clínico. A principal característica dos complexos de platina(II) é ligar-se ao ADN de maneira covalente, interferindo no processo de divisão celular, levando à apoptose e necrose [81].

O sucesso dos antibióticos no tratamento de infecções bacterianas em meados do século XX levou a esforços paralelos nos Estados Unidos, Europa e Ásia para descobrir um arsenal equivalente de fármacos direcionados ao tratamento do câncer. Embora não tão bem sucedidos quanto os antibióticos são no tratamento de infecções, antibióticos como doxorubicina, daunorrubicina e bleomicina, cujo alvo é o ADN, levaram a um importante impacto, desde 1960, no tratamento de pacientes com câncer. Estes compostos pertencem a uma classe de antibióticos denominada antraciclinas, produzidos por bactérias pertencentes ao gênero *Streptomyces* [82].

São mecanismos de ação antitumoral sugeridos para as antraciclinas, quebras no ADN através da inibição da enzima Topoisomerase II, formação de adutos e pontes intercadeias no ADN, bem como indução de radicais livres dentro da célula, levando ao envelhecimento e morte celular, embora ainda não sejam totalmente esclarecidos [83]. Esses antibióticos antitumorais parecem ter maior seletividade às células cancerosas do que às células normais. Estudos recentes propõem um novo mecanismo de ação antitumoral envolvendo a clivagem de um fator de transcrição chamado CREB3L1, que explica os efeitos antitumorais e a seletividade da doxorubicina. Esses estudos revelaram que o fármaco produz moléculas lipídicas denominadas ceramidas que desencadeiam a clivagem do CREB3L1. Neste caso, células tumorais com alta concentração de CREB3L1, como, por exemplo, células de câncer de mama humano, são mais sensíveis à doxorubicina [84].

Em contraste com a maioria dos outros fármacos terapêuticos, agentes antineoplásicos que têm mais de um mecanismo de ação parecem ter uma vantagem clínica sobre agentes com um único mecanismo de ação.

A maior falha da quimioterapia antineoplásica é resultado da resistência celular aos fármacos. As células tumorais podem ter resistência intrínseca ou adquirida. A resistência pode ser devido à dificuldade do fármaco de penetrar na célula, aumento da produção da proteína alvo do fármaco, mutações que previnem o fármaco de se ligar no seu alvo de ação, desenvolvimento de vias metabólicas alternativas, ou sistemas de efluxo do fármaco para fora da célula [1]. É também observada resistência nos casos em que o tratamento é descontinuado, em que a quimioterapia é aplicada em intervalos irregulares ou doses inadequadas.

1.2.3 Atividade antitumoral de compostos de bismuto

O bismuto é uma alternativa bastante interessante, pois seus compostos não são tóxicos e os efeitos indesejáveis são reversíveis ao longo de algumas semanas, assim que a sua ingestão é interrompida [73]. A baixa toxicidade e o fato de não haver descrição de resistência a compostos de bismuto têm estimulado a busca por novos agentes e o estudo de suas propriedades antitumorais [68, 72].

Podemos citar, como exemplo, compostos de tropolonas ou tiossemicarbazonas ou ditio-carbamatos de bismuto(III) que apresentaram atividade antitumoral [72, 85-87]. O mecanismo da ação citotóxica de compostos de bismuto parece envolver a inibição de enzimas como proteases, lipases, glicosidases e fosfolipases [88]. LI *et al.* demonstraram que a citotoxicidade de um complexo de bismuto(III) com 2-acetilpiridina-*N*(4)feniltiossemicarbazona em células HepG2 (células de carcinoma hepático) estava associada a um aumento na produção intracelular de espécies reativas de oxigênio, e à redução do potencial da membrana mitocondrial [89].

Um composto de bismuto com a 6-mercaptopurina apresentou atividade semelhante ao ligante livre, porém menor toxicidade quando administrado em altas doses em camundongos [72, 90].

WANG *et al.* descreveram um composto hidrossolúvel de bismuto(III) com o 1,4,7,10-tetraaqua(2-piridilmetil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano, que se mostrou 100 vezes mais potente que a cisplatina. O complexo liga-se ao ADN em concentrações fisiologicamente relevantes via interação não-covalente [91].

A utilização de compostos de bismuto no tratamento de câncer também se apoia na habilidade de reduzir efeitos colaterais de antineoplásicos como a cisplatina, cuja toxicidade é limitante, sem afetar a atividade do fármaco. Nesse sentido, o subnitrato de bismuto foi capaz de reduzir os efeitos colaterais da cisplatina [92, 93].

1.2.4 Atividade antitumoral de compostos de gálio

O gálio(III) vem ganhando interesse e espaço na medicina, sendo o nitrato de gálio(III) utilizado no tratamento do câncer e da hipercalcemia. O nitrato de gálio mostrou-se ativo em pacientes com linfoma não-Hodgkin e também com câncer de bexiga [94-96]. Foi muito efetivo na inibição de crescimento de tumores implantados subcutaneamente e o menos tóxico [97].

Outros compostos de gálio têm sido sintetizados e têm se mostrado promissores [98]. O maltolato de gálio é ativo contra várias linhagens celulares, inclusive as resistentes ao nitrato de gálio [99]. O tris(8-quinolinato)gálio(III) possui maior disponibilidade oral que sais de gálio(III), o que permite a administração de doses menores, diminuindo efeitos colaterais tóxicos [100]. Este composto apresentou-se dez vezes mais ativo que o cloreto de gálio [101].

O gálio(III) entra na célula da mesma forma que os íons ferro(III), por endocitose mediada pelo receptor da transferrina [102]. Transferrina é uma beta-globulina não-heme, mediadora do transporte de ferro no plasma e está normalmente 25 a 50 % saturada com ferro. Outro ponto em comum com o ferro é que, uma vez dentro da célula, o gálio é transferido para a ferritina celular. A atividade do gálio é muito aumentada pela adição de transferrina no meio de cultura, que aumenta sua acumulação celular. Como as células tumorais expressam maiores níveis de receptores de transferrina do que as células normais, a entrada do gálio nas células tumorais pode ser favorecida [103, 104].

Mecanismo de ação

O gálio(III) mimetiza o Fe(III), ligando-se à transferrina e formando um complexo que bloqueia a proliferação celular dependente do ferro e outros processos relacionados com o ferro nas células tumorais [105, 106].

O gálio inibe a subunidade R2 da enzima ribonucleotídeo-redutase, bloqueando a síntese de ribonucleotídeos essenciais para a síntese do ADN [106].

Foi demonstrado que o nitrato de gálio e o maltolato de gálio induzem a apoptose em linhagens celulares de linfoma humano através da inibição do potencial da membrana

mitocondrial e ativação da caspase-3. Além disso, o gálio pode causar alterações em processos celulares, tais como: inibição da proteína tirosina fosfatase, inibição da ATPase dependente de magnésio, inibição da polimerização da tubulina, inibição da proteassoma, e outros [97].

O nitrato de gálio não apresenta resistência cruzada com fármacos antineoplásicos convencionais e não causa mielossupressão, podendo ser usado quando outros fármacos falharem, ou quando a contagem sanguínea esteja baixa. Outro interesse clínico do nitrato de gálio centra-se no tratamento de hipercalcemias associadas ao câncer [107].

Devido ao potencial terapêutico do gálio, gerações mais novas de compostos de gálio estão em várias fases de desenvolvimento pré-clínico e clínico. A Figura 18 mostra alguns compostos de gálio que já são usados ou que apresentam atividade antitumoral promissora contra vários tipos de câncer.

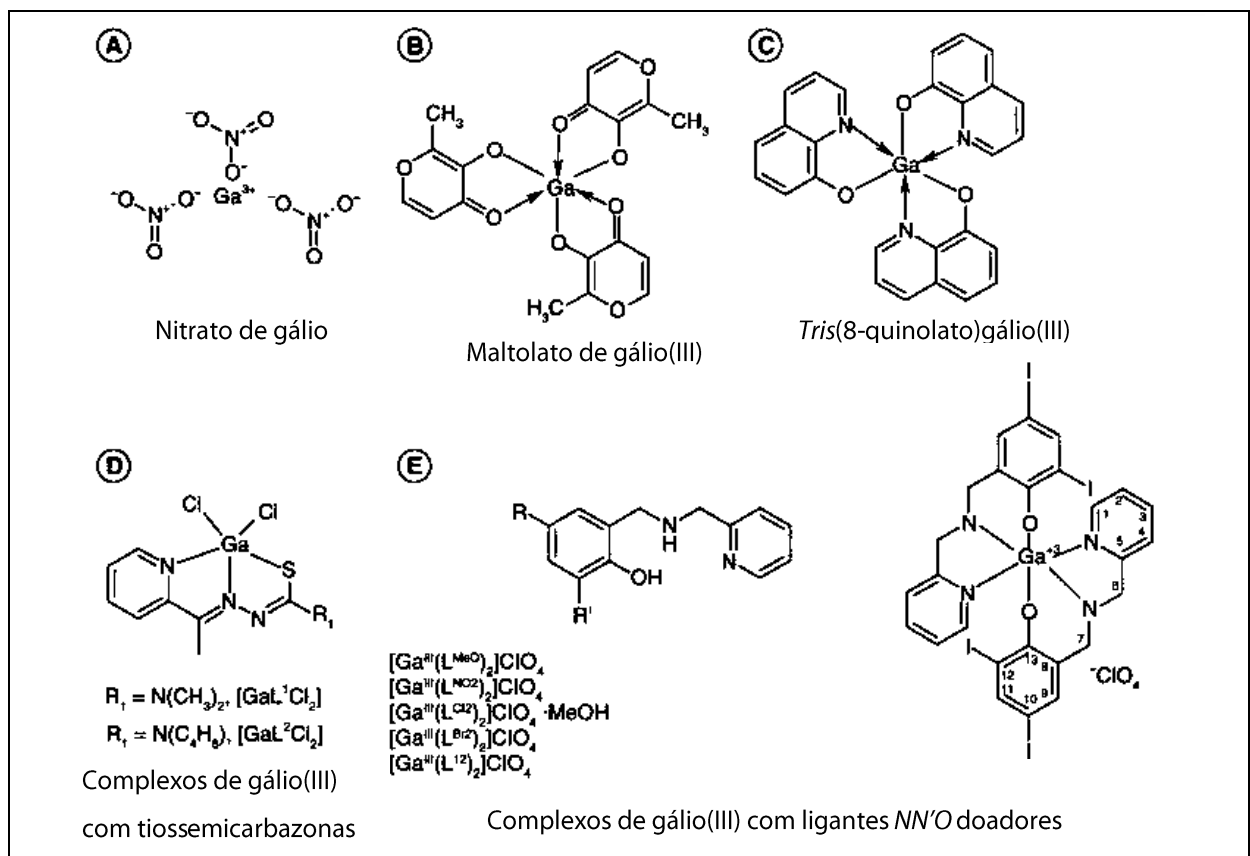


Figura 18 – Compostos de gálio usados como antineoplásicos ou com atividade antitumoral.

1.3 Justificativa

O uso de complexos metálicos no tratamento de câncer é uma das mais importantes aplicações de complexos na clínica médica. Entretanto, existem problemas associados ao seu uso, especialmente efeitos colaterais e o aparecimento de resistência celular, que ainda não foram resolvidos. Várias estratégias têm sido empregadas visando à obtenção de novos fármacos que não sejam reconhecidos pelos mecanismos de resistência celular e que apresentem especificidade para células tumorais.

Do mesmo modo, o aparecimento de bactérias “super-resistentes” representa uma extrema preocupação para a saúde pública. A crescente resistência microbiana aos antibióticos convencionais cria uma demanda por novos agentes antibacterianos.

A obtenção de complexos combinando fármacos já utilizados na clínica e íons metálicos pode causar um impacto na atividade biológica em relação a esses fármacos livres.

Compostos de coordenação contendo antibióticos são promissores para o uso na clínica médica, tanto no tratamento do câncer como no tratamento de doenças infecciosas [36, 108-116]. Neste sentido, os íons gálio(III) e bismuto(III) são interessantes devido ao seu potencial farmacológico. No entanto, as formulações farmacêuticas à base de bismuto não são muito bem definidas ou estáveis, os compostos de bismuto não são muito solúveis e as espécies ativas ainda não estão muito bem caracterizadas. A labilidade dos ligantes, a acidez de Lewis e a habilidade do centro metálico de expandir sua esfera de coordenação fazem com que o controle das reações e a caracterização dos complexos seja uma tarefa difícil. Uma estratégia para atenuar as reações de hidrólise em solução aquosa com a formação do cátion $(\text{BiO})^+$ é a incorporação de ligantes coordenantes contendo N, O ou S como átomos doadores [108]. O gálio(III) também apresenta problemas de solubilidade em pH fisiológico e sua baixa disponibilidade e toxicidade justificam a busca por novos compostos para uso clínico.

Com relação às estratégias utilizadas para contornar os mecanismos da resistência, neste trabalho é abordada a coordenação de metais a antibióticos como uma estratégia de reversão da resistência e como uma plataforma para a produção de novos fármacos.

Nossa proposta é a de tentar aliar as propriedades farmacológicas da sulfassalazina, sulfapiridina, e tetraciclina às dos íons metálicos bismuto(III) e gálio(III) através da obtenção de complexos de coordenação.

Foram também escolhidos 2 ligantes heterocíclicos tridentados do tipo [NN'O] doadores que não são utilizados como antibióticos, mas seus compostos metálicos relatados na literatura, inclusive o complexo de gálio(III), apresentaram atividade antitumoral agindo como inibidores de proteassomas, que são complexos de proteínas celulares capazes de degradar proteínas como a proteína citoplasmática [117]. Buscou-se através da síntese de complexos inéditos de bismuto(III) com esses ligantes, aliar suas propriedades farmacológicas, buscando obter compostos com propriedades antitumorais e possivelmente com novas propriedades biológicas, por exemplo, antibacterianas, inclusive em linhagens resistentes, a fim de contribuir para a restauração do arsenal quimioterápico que vem sendo perdido devido à emergência alarmante da resistência celular. Neste trabalho estão relatadas a síntese, caracterização físico-química no estado sólido e em solução, a atividade citotóxica e a atividade antibacteriana de alguns complexos metálicos inéditos de bismuto(III) e gálio(III).

1.4 Objetivo

A fim de se obter complexos metálicos com melhor potencial quimioterápico que seus ligantes livres e que sejam biologicamente mais ativos em linhagens celulares resistentes, o objetivo deste trabalho foi sintetizar e caracterizar complexos metálicos inéditos de bismuto(III) e gálio(III) coordenados aos antibióticos sulfapiridina, sulfassalazina e tetraciclina. Objetiva-se obter compostos mais solúveis do que os atualmente disponíveis e que sejam ativos contra bactérias resistentes. Objetiva-se igualmente obter compostos ativos em linhagens cancerosas.

Mais especificamente, pretendeu-se:

- Sintetizar e caracterizar complexos inéditos de bismuto(III) e gálio(III) com os antibióticos sulfapiridina, sulfassalazina e tetraciclina, em estado sólido e em solução.

- Sintetizar e caracterizar complexos inéditos de bismuto(III) com ligantes tridentados assimétricos, em estado sólido e em solução.
- Estudar o efeito dos complexos sintetizados no crescimento de bactérias, avaliando o efeito da coordenação na atividade biológica, inclusive contra algumas linhagens resistentes aos antibióticos livres utilizados na obtenção dos complexos.
- Estudar o efeito dos complexos sintetizados no crescimento de células tumorais, através da determinação da concentração de composto necessária para inibir 50% do crescimento celular.
- Estudar a interação do complexo de gálio(III) da tetraciclina com o ADN, e determinar a constante de ligação do complexo com este alvo, que é o alvo celular de muitos fármacos antineoplásicos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS (PARTE EXPERIMENTAL)

2.1 Reagentes

Todos os reagentes e solventes utilizados neste trabalho foram de grau analítico, adquiridos da Sigma®, Aldrich®, Merck®, ou Vetec® e foram utilizados conforme adquiridos do fabricante.

Os compostos de bismuto(III) foram sintetizados a partir do cloreto de bismuto(III), BiCl_3 , dissolvido em solução aquosa com adição de HCl 3 mol L^{-1} . O meio ácido foi utilizado para a dissolução do sal de bismuto a fim de evitar a precipitação do cloreto de bismutila, BiOCl , insolúvel, que normalmente ocorre com o bismuto(III) na presença de água [118].

Os compostos de gálio(III) foram sintetizados a partir do nitrato de gálio, $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$, dissolvido em água desionizada.

Os antibióticos de grau analítico, sulfapiridina (usado para a obtenção do composto **1**), sulfassalazina (usado para a obtenção dos compostos **2** e **3**) e tetraciclina (usado para a obtenção dos compostos **4** e **5**) foram obtidos da Aldrich® e Merck®, e conservados sob refrigeração e abrigo da luz.

O ligante $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}$, utilizado na síntese do composto **6**, foi sintetizado como descrito na literatura [119], pela condensação da 2-aminometilpiridina com o 3,5-di-*terc*-butil-2-hidroxibenzaldeído, seguida da redução do produto com NaBH_4 a 0 °C. Detalhes da síntese desse ligante estão descritos no Anexo 1. Rendimento: 85 %; Ponto de fusão: 69 °C.

O ligante $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{I}_2\text{O}$, utilizado na síntese do composto **7**, foi sintetizado como descrito na literatura [117, 120], pela condensação da 2-aminometilpiridina ($\text{MM} = 108,14 \text{ g mol}^{-1}$) com o 3,5 diiodosalicilaldeído ($\text{MM} = 373,92 \text{ g mol}^{-1}$), seguida da redução com NaBH_4 a 0 °C. Detalhes da síntese estão descritos no Anexo 2. Rendimento: 90 %; Ponto de fusão: 89 °C.

As caracterizações dos dois ligantes sintetizados ($\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}$ e $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{I}_2\text{O}$) foram feitas por RMN de ^1H , espectroscopia na região do infravermelho e ponto de fusão, já conhecidos na

literatura, e os espectros serão apresentados e discutidos juntamente com aqueles obtidos para os respectivos complexos inéditos de bismuto(III).

2.2 Síntese dos complexos

2.2.1 Complexo 1 - Composto de bismuto(III) da sulfapiridina

A sulfapiridina possui 2 prótons ionizáveis: $pK_{a1} = 2,6$ ($-\text{NH}_3^+$) e $pK_{a2} = 8,4$ (H sulfonamídico) [106], e está representada com o seu respectivo complexo de bismuto(III) na Figura 19.

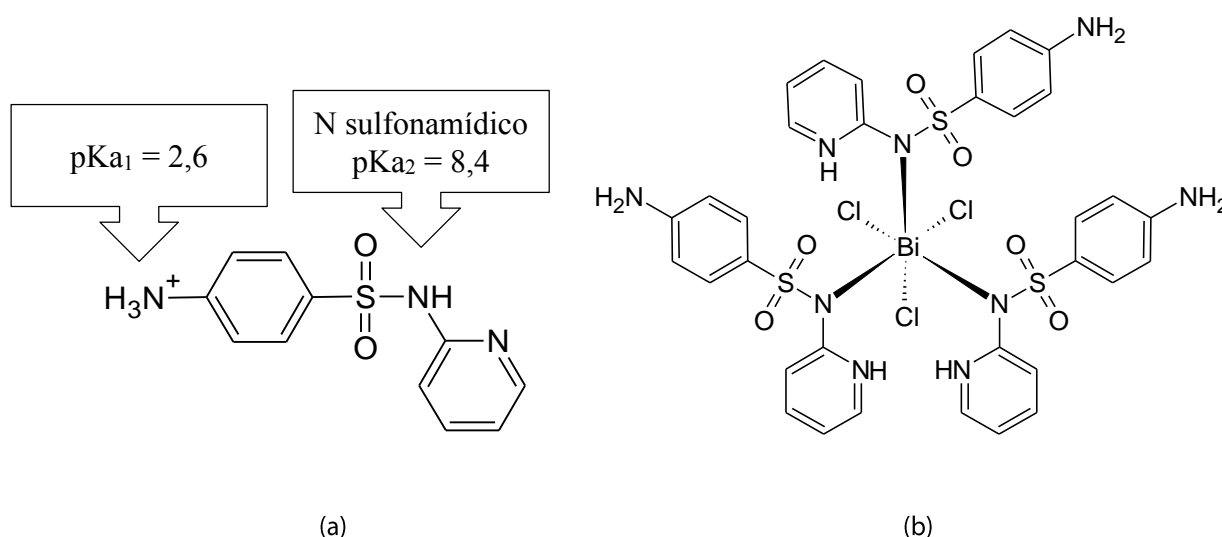


Figura 19 - Estrutura da sulfapiridina totalmente protonada, $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$ (a), e do complexo $[\text{Bi}(\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_2\text{S})_3\text{Cl}_3]$ (b).

A síntese do complexo **1** foi feita com a participação da aluna de Iniciação científica Marina S. Franco. Adicionou-se 0,1420 g ($5,7 \times 10^{-4}$ mol) de sulfapiridina ($\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$) a 3,0 mL de água bidestilada, sob agitação. Acrescentou-se NaOH 1 mol L^{-1} , gota-a-gota, até a dissolução completa da sulfapiridina, em pH 9,5.

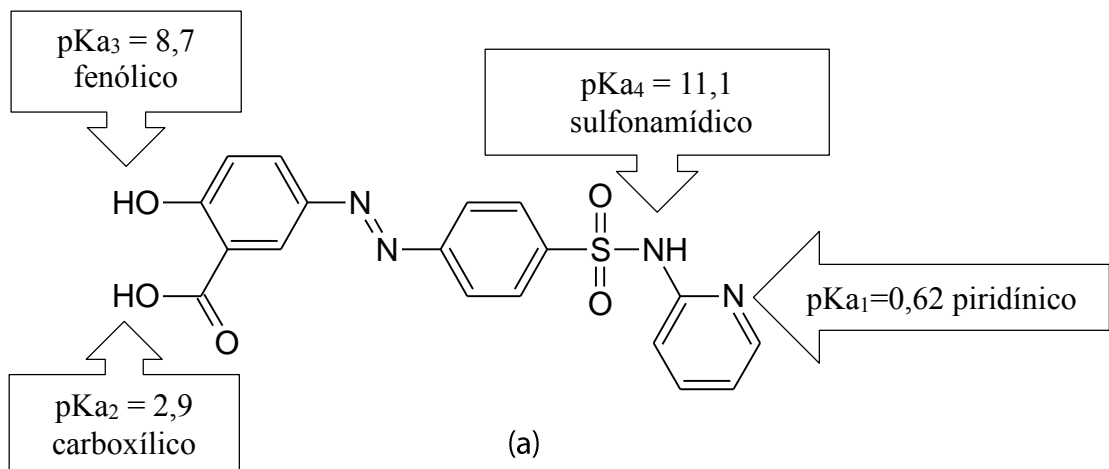
- Dissolveu-se 0,0600 g ($1,9 \times 10^{-4}$ mol) de BiCl_3 em água desionizada com adições de alíquotas de HCl 3 mol L^{-1} , obtendo-se uma solução de pH 1,0.

- A solução de sulfapiridina foi gotejada sobre a solução do cloreto de bismuto, sob agitação. Formou-se um precipitado levemente amarelado, que foi filtrado, lavado com água e seco a vácuo.
- Cristais de coloração amarelo-pálida foram obtidos através da evaporação lenta de uma solução do composto obtida em etanol com aquecimento.

Rendimento: 0,11 g - 53 %.

2.2.2 **Complexo 2** - Composto de bismuto(III) da sulfassalazina

A sulfassalazina (Figura 20-a) possui 4 prótons ionizáveis: pKa = 0,62 (H ligado ao nitrogênio piridínico), pKa 2,9 (H carboxílico), pKa 8,7 (H fenólico) e pKa 11,1 (H sulfonamídico) [121]. A estrutura do complexo inédito de bismuto(III) sintetizado é apresentada na Figura 20-b.



- Transferiu-se para um balão e deixou-se em refluxo por 15 minutos.
- Adicionou-se uma solução preparada com 0,1275 g de nitrato de gálio, $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$, em 13 mL de etanol. Formou-se um precipitado instantaneamente.
- O sistema ficou em refluxo por 3 horas. A suspensão foi filtrada a vácuo, o precipitado foi lavado com etanol e éter etílico.

Rendimento: 0,15 g – 56 %.

2.2.4 **Complexo 4** - Composto de bismuto(III) da tetraciclina

A estrutura da tetraciclina (Figura 22) contém 4 anéis, nomeados ABCD da direita para a esquerda. O carbono 1 é identificado na carbonila do anel A e a numeração dos outros carbonos se faz no sentido anti-horário. O anel D é aromático.

A tetraciclina possui 3 prótons ionizáveis com $\text{pK}_{a1} = 3,47$ (C3-OH), $\text{pK}_{a2} = 7,66$ (C10-OH e C12-OH) e $\text{pK}_{a3} 9,3$ ($\text{H-N}(\text{CH}_3)_2$) [122, 123].

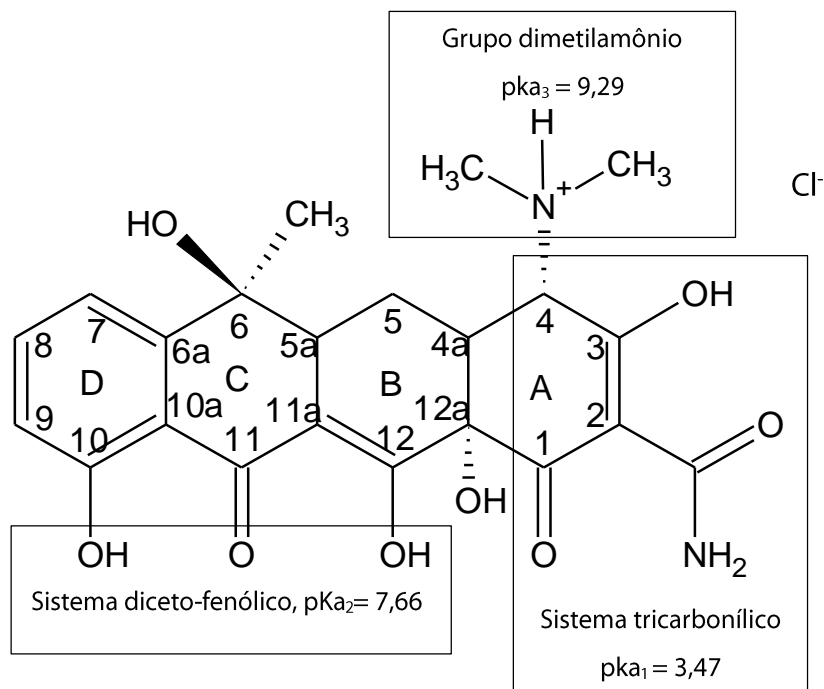


Figura 22 - Estrutura do cloridrato de tetraciclina, $(C_{22}H_{25}N_2O_8)Cl$, e seus pK_a 's.

O complexo inédito de bismuto(III) obtido com o ligante tetraciclina está apresentado na Figura 23.

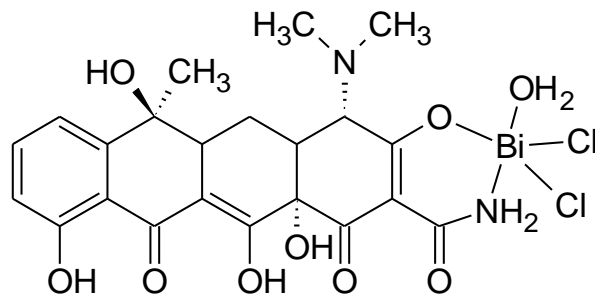


Figura 23 – Estrutura do complexo $[Bi(C_{22}H_{23}N_2O_8)(H_2O)Cl_2]$.

A síntese foi feita em capela e ao abrigo da luz, de acordo com o procedimento descrito a seguir.

- Dissolveu-se 0,3300 g $BiCl_3$ (1×10^{-3} mol) em 600 μL de solução de HCl 3 mol L^{-1} .
- Dissolveu -se 0,5000 g de cloridrato de tetraciclina, $(C_{22}H_{25}N_2O_8)Cl$ ($MM= 480,91 \text{ g mol}^{-1}$; 1×10^{-3} mol) em 7,0 mL de H_2O .
- Adicionou-se a solução do metal à solução do ligante. Após a adição do metal, o pH foi elevado a 2, com adição de alíquotas de solução de $NaOH$ 1 mol L^{-1} . Houve a formação de um precipitado amarelo.
- Após 10 minutos de agitação, o precipitado foi filtrado e seco a vácuo.

Rendimento: 0,47 g – 61 %.

2.2.5 Complexo 5 – Composto de gálio(III) da tetraciclina

Ainda com o ligante tetraciclina, foi sintetizado um complexo inédito de gálio(III), cuja estrutura está representada na Figura 24.

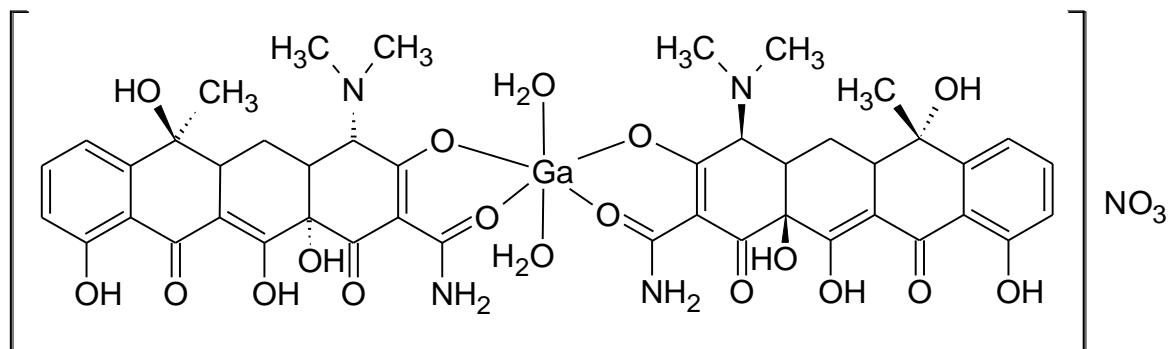


Figura 24 - Estrutura do composto $[Ga(H_2O)_2(C_{22}H_{23}N_2O_8)_2](NO_3)$

A síntese do complexo foi feita com a participação da aluna de Iniciação científica Lílian Amaral de Carvalho, em capela e ao abrigo da luz.

- Dissolveu-se 0,0800 g ($3,1 \times 10^{-4}$ mol) nitrato de gálio em 500 μ L de H_2O .
- Dissolveu-se 0,3000 g ($6,2 \times 10^{-4}$ mol) de cloridrato de tetraciclina em 3,0 mL de H_2O .
- Adicionou-se, lentamente, a solução do nitrato de gálio sobre a solução do ligante. A reação foi deixada sob agitação por 4 horas. Durante esse período, a solução passou de amarela a alaranjada.
- O pH foi elevado com adições de alíquotas de NaOH 1 mol L^{-1} até que houvesse precipitação (pH = 1,88).
- O precipitado foi filtrado, lavado com água e etanol, seco a vácuo e posteriormente mantido em geladeira e ao abrigo da luz.

Rendimento: 0,14 g – 40 %

2.2.6 Complexo 6 – composto de bismuto(III) do $C_{21}H_{30}N_2O$

A síntese e caracterização do ligante e do complexo inédito de bismuto(III) descrito a seguir foram executadas na Wayne State University, MI- EUA em colaboração com o Prof. Cláudio N. Verani (orientador do estágio sanduíche de seis meses). A estrutura do ligante (Figura 25-a) e a do respectivo complexo de bismuto (Figura 25-b) estão apresentadas a seguir.

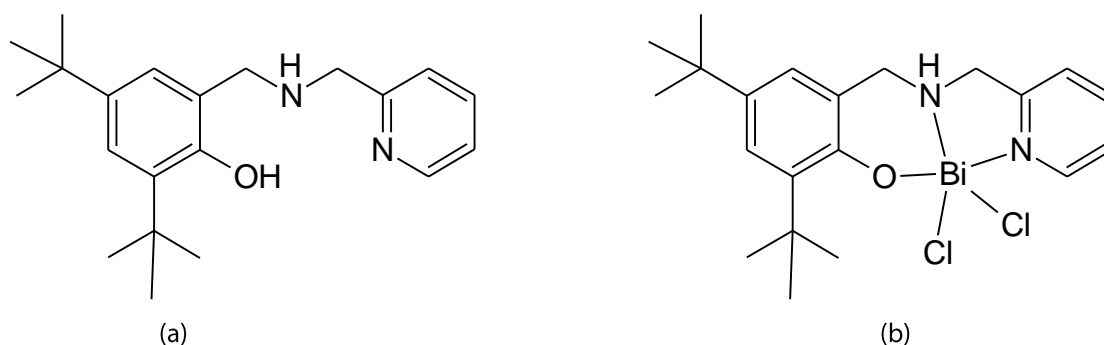


Figura 25 - Estrutura do ligante $C_{21}H_{30}N_2O$ (a), e seu respectivo complexo $[BiC_{21}H_{29}N_2OCl_2]$ (b).

O complexo $[Bi(C_{21}H_{29}N_2O)Cl_2]$ foi obtido reagindo-se o ligante $C_{21}H_{30}N_2O$ com $BiCl_3$ em metanol na razão molar metal/ligante de 1:3, embora o produto obtido tenha sido (M:L) 1:1.

- Dissolveu-se 0,3000 g ($9,2 \times 10^{-4}$ mol, $MM = 326,2 \text{ g mol}^{-1}$) de ligante em 30 mL de metanol sob agitação e aquecimento a 60°C .
- Dissolveu-se 0,0960 g ($3,0 \times 10^{-4}$ mol, $MM = 315,5 \text{ g mol}^{-1}$) de $BiCl_3$ em uma solução preparada com 20 mL metanol + 32 μL de HCl concentrado.
- A solução do metal foi adicionada à solução do ligante sob agitação. Observou-se mudança imediata na cor, intensificando o tom amarelo. Após 30 minutos de agitação e aquecimento, o solvente foi evaporado em rotavapor deixando o mínimo de solvente para filtrar o precipitado amarelo microcristalino formado.
- O precipitado foi filtrado, lavado com dietiléter, e seco a vácuo. Foram adicionadas duas gotas de DMSO em aproximadamente 15 mL do filtrado, o qual foi mantido à

temperatura ambiente. Cristais hexagonais de coloração amarela intensa foram obtidos após 2-3 horas.

Rendimento: 0,15 g - 81,1 %.

2.2.7 **Complexo 7** – Composto de bismuto(III) do $C_{13}H_{12}N_2I_2O$

A síntese e caracterização do ligante e do complexo inédito descrito a seguir também foram executadas na Wayne State University (EUA).

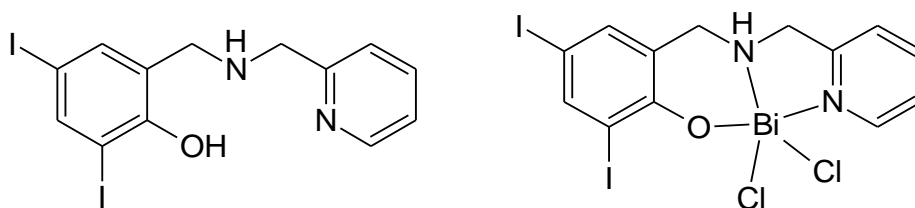


Figura 26 - Estrutura do ligante $C_{13}H_{12}N_2I_2O$ (a) e seu respectivo complexo $[Bi(C_{13}H_{11}N_2I_2O)Cl_2]$ (b).

- Dissolveu-se 0,2000 g de ligante $C_{13}H_{12}N_2I_2O$ (MM = 466,06 g mol⁻¹) em 20 mL de metanol sob agitação e aquecimento para auxiliar na dissolução.
- Dissolveu-se completamente 0,050 g de cloreto de bismuto(III) (MM = 315,5 g mol⁻¹) em 10 mL de metanol e 10 gotas de solução metanólica de HCl 1,2 mol L⁻¹.
- Adicionou-se a solução do cloreto de bismuto sobre a solução do ligante, o que modificou a cor da solução para um amarelo bem intenso.
- O volume foi reduzido com aquecimento sob agitação, até a precipitação do complexo.
- O precipitado de cor amarela foi filtrado, lavado com dietiléter, e seco a vácuo.

Rendimento: 0,11 g - 92 %.

2.3 Análise elementar (C, H, N) e Absorção Atômica (Bi e Ga)

A determinação do teor de C, H e N foi realizada no Departamento de Química-UFMG, em analisador elementar Perkin-Elmer 2400, e o teor de metal nos complexos foi determinado por absorção atômica em espectrômetro modelo Hitachi-Z8200, acoplado a um forno de grafite Hitachi.

2.4 Temperatura de fusão/decomposição

A temperatura de fusão/decomposição dos compostos foi determinada em um aparelho de ponto de fusão modelo MQAPF-302 da Microquímica Equipamentos LTDA (Temperatura máxima 350 °C).

2.5 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos na região de 4000 a 400 cm^{-1} em Espectrômetro Perkin Elmer 283 B, ou em Espectrômetro Bruker Tensor 27 FTIR, na região de 4000 a 600 cm^{-1} . As amostras foram preparadas em pastilhas de KBr e os espectros foram obtidos à temperatura ambiente.

2.6 Condutimetria

As medidas de condutividade foram realizadas em um aparelho Digimed DM 31.

A condutividade molar, a 25 °C, dos compostos foi determinada a partir de uma solução de concentração $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em dimetilformamida ou nitrometano de grau ultrapuro, HPLC, adquiridos da Vetec®.

A constante de célula foi de 1,02 cm^{-1} e a condutividade $\Lambda_M = 4,08 \text{ ohm}^{-1} \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ para o solvente dimetilformamida puro. A constante de célula foi de 0,94 cm^{-1} e a condutividade $\Lambda_M = 8,75 \text{ ohm}^{-1} \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ para o solvente nitrometano puro.

W.J. Geary fez uma revisão de valores de condutividade molar para compostos de coordenação em diferentes solventes orgânicos [124]. Os resultados obtidos neste trabalho foram analisados com base nas faixas de valores constantes da Tabela 1, que foram retiradas do artigo de revisão escrito por GEARY intitulado "The use of conductivity measurements in organic solvents for the characterisation of coordination compounds" [124].

2.7 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^1H

Os espectros de RMN de ^1H foram obtidos no espectrômetro Bruker Avance DRX 200 ou DRX 400 do Departamento de Química da UFMG, à temperatura ambiente. Os espectros de RMN de ^1H - ^1H COSY foram feitos a 400 MHz em um espectrômetro BRUKER AVANCE DRX 400, à temperatura ambiente. As amostras foram analisadas em dimetilsulfóxido- d_6 (DMSO- d_6) ou em *N,N*-dimetilformamida- d_7 (DMF- d_7), usando TMS como referência.

2.8 Espectroscopia de massas

Os espectros de massas foram obtidos em colaboração com o Professor Rodinei Augusti, Departamento de Química-UFMG, em espectrômetro de massas LCQ Fleet da ThermoScientific (San Jose, CA, USA) com ionização por eletrospray, nas seguintes condições: Faixa de varredura: 100-2000 m/z, temperatura do capilar: 275 °C, tensão do spray: 25 kV, tensão do capilar: 25 V. As amostras foram dissolvidas em MeOH e foram injetadas no aparelho por infusão direta a um fluxo de 10 $\mu\text{L min}^{-1}$.

As distribuições isotópicas para as espécies propostas foram simuladas com o auxílio do programa Xcalibur para Windows, para efeito de comparação com os espectros obtidos.

2.9 Difração de raios-X em monocristal

2.9.1 Complexo **1** - $[\text{Bi}(\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_2\text{S})_3\text{Cl}_3]$

Monocristais de cor amarelo-pálido foram obtidos através da evaporação lenta da solução do composto em etanol com aquecimento a 70 °C.

As medidas de difração de raios-X em monocristal e a resolução da estrutura do $[\text{Bi}(\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_2\text{S})_3\text{Cl}_3]$ (complexo **1**) foram feitas pelo Professor Nelson Gonçalves Fernandes com a participação do aluno Geanderson Coelho dos Santos, do Departamento de Química-UFMG.

Os dados foram coletados a 293 K em um difratômetro Oxford Gemini Atlas Ultra com monocromador de grafite, λ ($\text{K}\alpha\text{Mo}$) = 0,71073 Å, utilizando o banco de dados CrysAlis-Pro e um software de processamento [125]. Utilizou-se, para esta análise, o programa 1- SIR97 [126] incorporado no conjunto de programas WinGX [127].

Todos os átomos, exceto hidrogênios, foram apurados anisotropicamente sobre F^2 usando a matriz completa e método dos mínimos quadrados [SHELXL-97] [128]. A estrutura do complexo foi desenhada com o auxílio dos programas Mercury [129] e ORTEP-3 para Windows [130].

2.9.2 Complexo **6** – $[\text{Bi}(\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O})\text{Cl}_2]$

Monocristais amarelos hexagonais foram obtidos através da evaporação lenta da solução metanólica filtrada (aproximadamente 15 mL), à qual foram adicionadas 2 gotas de DMSO.

As medidas de difração de raios-X em monocristal e a resolução da estrutura do $[\text{Bi}(\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O})\text{Cl}_2]$ (complexo **6**) foram feitas pelo Professor Richard J. Staples, do Departamento de Química da Michigan State University- MI-USA. Os dados foram coletados a 293 K em um difratômetro Bruker APEX-II CCD (charge coupled device), com monocromador de grafite, λ ($\text{K}\alpha\text{Cu}$) = 1,54178 Å. A estrutura do complexo foi resolvida por métodos diretos usando o programa SHELXZ-97 [131] e o método dos mínimos quadrados em F^2 .

2.10 Atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana foi avaliada através da Concentração Mínima Inibitória (CMI ou MIC), que representa a concentração do composto a partir da qual o crescimento bacteriano é inibido totalmente.

O efeito dos ligantes e dos complexos foi estudado em linhagens de bactérias da coleção do Laboratório de Genética de Microrganismos, no Departamento de Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas- UFMG, em colaboração com a professora Mônica Bucciarelli-Rodriguez.

As bactérias utilizadas nos testes foram as seguintes linhagens da American Type Culture Collection (ATCC) e da coleção do laboratório de genética de microrganismos do ICB-UFMG:

- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
- *Salmonella typhimurium* ATCC 13311
- *Shigella sonnei* ATCC 11060
- *Shigella dysenteriae* ATCC 13313
- *Escherichia coli* MC 1061 ATCC 53338
- *Escherichia coli* MC 1061 ATCC 53338/ pBR 322
- *Escherichia coli* BH 100 (multirresistente)
- *Salmonella* MG 031 (multirresistente)

As linhagens são do tipo Gram-negativa, exceto a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, que é Gram-positiva.

Soluções-estoque dos compostos foram preparadas em quantidade mínima de DMSO ou DMF para a dissolução, sendo obtidas na concentração de 10 mg/mL. Alíquotas dessa solução foram diluídas em 20 mL de meio de cultura MH - Agar Müeller Hinton (Difco®) - previamente fundido, estabilizado a 40 °C em banho-Maria, então homogeneizado e vertido em placa de Petri.

Foram feitas duas séries de placas, uma para o ligante e outra para o complexo, nas concentrações 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 e 128 µg/mL.

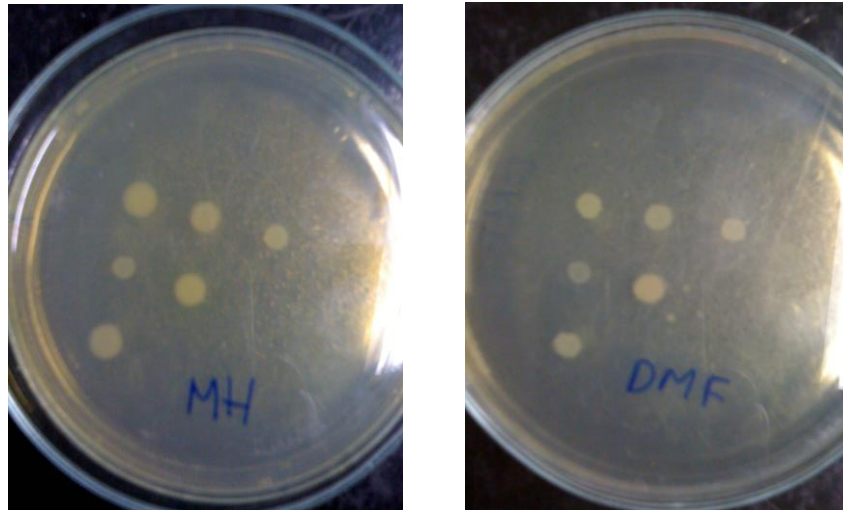
As linhagens bacterianas foram cultivadas em meio apropriado a 37 °C, e estocadas em Lignière (0,8% p/v Difco Nutrient Broth, 0,5% p/v Sigma gelatin, 0,7% p/v Difco Agar). A partir do estoque em Lignière, cada linhagem foi pré-inoculada em 2 mL de meio de cultura BHI - Brain Heart Infusion (Difco), e incubada a 37 °C por 24 h.

A cultura resultante foi diluída 100 vezes em solução estéril de cloreto de sódio a 0,85%, e inoculada nas placas previamente preparadas. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h. A análise das placas foi feita após esse período. A MIC foi determinada pela observação visual da placa onde não houve nenhum crescimento bacteriano.

Duas placas de controle foram feitas (Figura 27):

(a) Bactérias inoculadas apenas no meio de cultura (MH) sem o composto, a fim de se obter uma referência do crescimento de cada linhagem ("branco");

(b) Bactérias inoculadas no meio de cultura ao qual se adicionou o solvente DMF (ou DMSO) na maior concentração utilizada no experimento. A concentração final de DMF ou DMSO no meio de cultura não ultrapassou 0,1%.



(a)

(b)

Figura 27 - Crescimento bacteriano em placas-controle, contendo o meio de cultura Agar Müller Hinton (MH) sem adição de solvente (a), e com adição de DMF 0,1% (b).

Observou-se que o solvente não impediu o crescimento bacteriano nas condições do experimento. Todos os experimentos foram repetidos no mínimo 3 vezes.

2.11 Atividade citotóxica em células tumorais

A sensibilidade de células tumorais aos ligantes e respectivos complexos foi avaliada através da concentração de composto necessária para inibir 50% do crescimento celular, a CI_{50} .

A linhagem celular utilizada nestes estudos foi a K562, adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ-número CR083 do acervo). Esta linhagem celular foi obtida a partir de efusão pleural de uma paciente de 53 anos de idade com leucemia mielóide crônica em fase blástica terminal.

As células foram cultivadas em meio RPMI 1640, contendo L-glutamina e suplementado com 10% de soro fetal bovino a 37 °C, em atmosfera umidificada, contendo 5% de CO_2 . O meio RPMI 1640 e o soro fetal foram adquiridos da Cultilab® - São Paulo.

Para o estudo citotóxico, 1×10^5 células mL^{-1} foram incubadas por 72 h na presença e na ausência do composto em várias concentrações, dependendo da atividade do composto, conforme indicado nos capítulos referentes a estes estudos. Após este período, a viabilidade

de das células foi verificada por exclusão com azul de Tripán, que cora somente as células mortas, e as células viáveis foram contadas em um contador de partículas (modelo 22, série AK32252 da BECKMAN COULTER).

Testes controle foram realizados incubando-se as células apenas com o solvente na concentração máxima usada no experimento e verificou-se que tanto o crescimento quanto a viabilidade celular não foram afetadas pelo solvente nas condições dos experimentos.

A CI_{50} foi determinada com o auxílio do programa computacional OriginPro7, sendo os dados analisados com ajuste sigmoidal (Boltzmann).

2.12 Interação com ADN por titulação na região do UV-Vis

A interação do complexo com o ADN de timo de vitelo (CT-ADN) foi estudada através de uma titulação espectrofotométrica na região do UV-Visível.

Os espectros foram adquiridos em um espectrofotômetro de duplo feixe CARY 100 VARIAN. As medidas foram realizadas em cubetas de quartzo com 0,1 e 1,0 cm de caminho óptico.

Preparou-se uma solução inicial do complexo a $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ em DMSO. Transferiu-se uma pequena alíquota para uma solução tampão HEPES¹⁰, de forma a se obter uma solução do complexo a $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

Preparou-se uma solução de CT-ADN em tampão HEPES. A concentração do ADN foi determinada pela Lei de Lambert-Beer, ($A = \epsilon \times c \times l$), a partir do $\epsilon_{\text{ADN}} = 6600 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ em λ de 258 nm.

Adicionaram-se alíquotas da solução de CT-ADN à solução do complexo. A absorvância do CT-ADN foi subtraída pela adição das mesmas quantidades à uma solução referência.

¹⁰ Tampão HEPES: Solução $2,0 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$ de sal de HEPES, pH 7,22 e a força iônica foi mantida constante em $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de KCl.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo, será descrita a caracterização dos 5 complexos inéditos de bismuto(III) ou Ga(III) obtidos com os antibióticos sulfapiridina, sulfassalazina e tetraciclina e serão apresentados e discutidos os resultados de atividade antibacteriana (MIC) e antitumoral (CI_{50}) desses complexos, que foram sintetizados buscando melhorar essas propriedades biológicas, inclusive em linhagens resistentes.

Também será apresentada a caracterização dos 2 complexos inéditos de bismuto(III) obtidos com ligantes heterocíclicos tridentados do tipo $[NN'O]$ doadores, e os respectivos resultados de atividade antibacteriana e antitumoral, que foram investigadas devido ao fato de que os complexos de gálio(III), cobre(II) e zinco(II) desses ligantes apresentaram efeito antitumoral agindo como inibidores de proteassomas [117, 120, 132-135]. Proteassomas são complexos de proteínas celulares capazes de degradar proteínas como a proteína citoplasmática.

3.1 Complexo 1 – $[Bi(C_{11}H_{11}N_3O_2S)_3Cl_3]$

Composto de bismuto(III) da sulfapiridina

Fac-triclorotris(4-amino-*N*-piridin-2-il-benzenosulfonamida)bismuto(III)

3.1.1 Análise Elementar: C, H, N e Bi

Os teores (%) de C, H, e N, bem como o teor (%) do íon metálico estão apresentados na Tabela 1, juntamente com os valores calculados para a fórmula $[Bi(C_{11}H_{11}N_3O_2S)_3Cl_3]$.

Tabela 1 - Valores de C,H,N e Bi, experimental e calculado, para o composto $[Bi(C_{11}H_{11}N_3O_2S)_3Cl_3]$ na forma cristalina.

Elemento	% C	% H	% N	% Bi
Calculado	37,28	3,14	11,86	19,66
Experimental	37,99	3,18	11,84	19,53

Os resultados de C, H, N e Bi sugerem um composto de fórmula mínima $BiC_{33}H_{33}N_9O_6S_3Cl_3$.

A análise elemental está de acordo com a fórmula proposta $[\text{Bi}(\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_2\text{S})_3\text{Cl}_3]$, em que o bismuto(III) está ligado a três moléculas de sulfapiridina e 3 íons cloreto.

3.1.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

A sulfapiridina possui vários grupos funcionais que absorvem na região do infravermelho. A análise das bandas do espectro de absorção nessa região pode auxiliar na atribuição dos sítios de coordenação dessa molécula a um íon metálico.

O espectro de absorção na região do infravermelho do ligante livre sulfapiridina está apresentado na Figura 28.

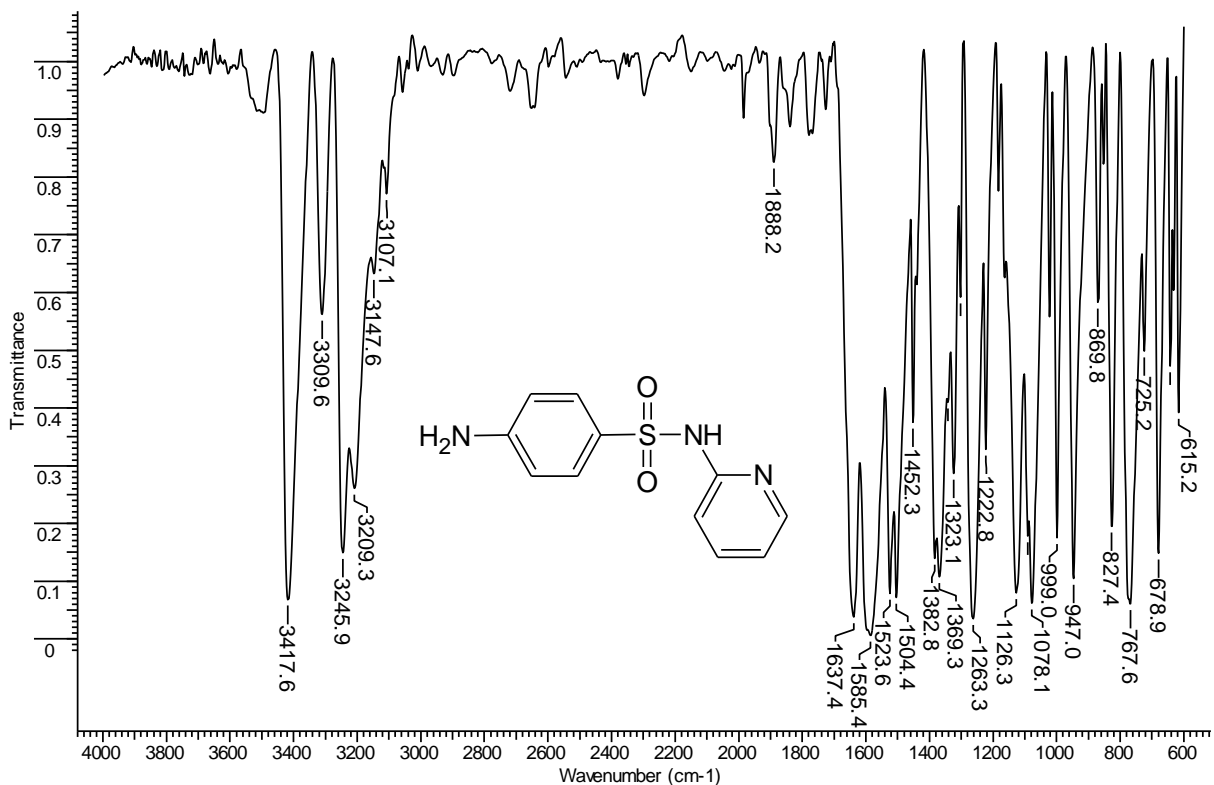


Figura 28 - Espectro na região do infravermelho, obtido para a sulfapiridina - $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$, em KBr.

No espectro da sulfapiridina livre, observam-se várias bandas na região de $3420\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$, que podem ser atribuídas aos modos vibracionais de estiramento νNH dos grupos anilínico e sulfonamídico. As bandas em 3418 e 3310 cm^{-1} são atribuídas a $\nu_{\text{as}}(\text{NH}_2)$ e $\nu_{\text{s}}(\text{NH}_2)$ do grupo anilínico, respectivamente.

As vibrações de estiramento assimétrico e simétrico do grupo $-\text{SO}_2$ aparecem em 1369 e 1126 cm^{-1} , respectivamente.

É difícil atribuir os modos vibracionais do anel piridínico a suas respectivas bandas, pois a maioria é de origem complexa e envolve diferentes modos vibracionais [136].

O espectro de absorção na região do infravermelho obtido para o complexo de bismuto(III) da sulfapiridina está apresentado na Figura 29.

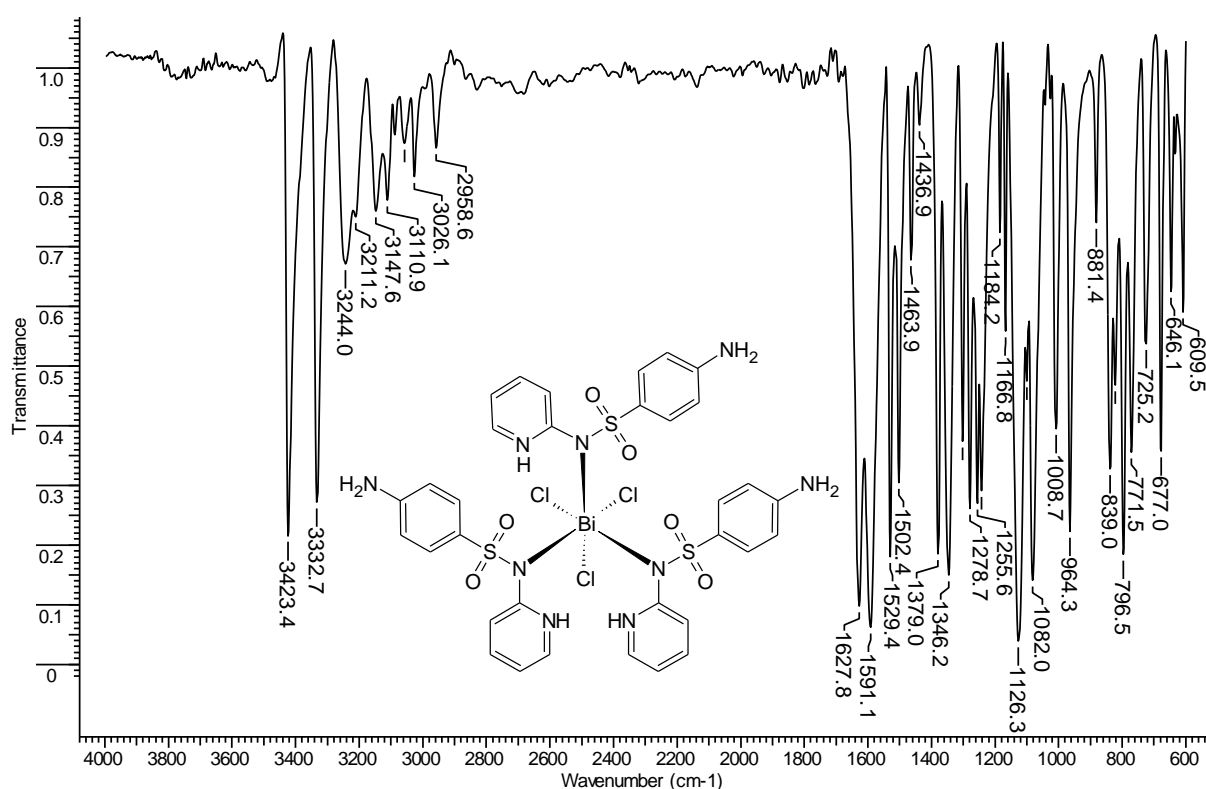


Figura 29 – Espectro, na região do infravermelho, obtido para o complexo $[\text{Bi}(\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_2\text{S})_3\text{Cl}_3]$, em KBr.

IV (cm^{-1}): 3423F; 3333F; 3244m; 3211(ombro); 3148f; 3111f; 3087f; 3059f; 3026f; 2959f; 1628F; 1591F; 1529F; 1501F; 1464f; 1379F; 1346F; 1300F; 1279F; 1255F; 1241F; 1184f; 1167f; 1126F; 1082F; 1009m; 964F; 881f; 839m; 821f; 797F; 772m; 725f; 677F; 644f; 610f.

O espectro do complexo é modificado na região de $3400\text{-}3000 \text{ cm}^{-1}$ devido à desprotonação do nitrogênio sulfonamídico e protonação concomitante do nitrogênio piridínico, que provoca o aparecimento de absorções múltiplas na região $3300\text{-}2960 \text{ cm}^{-1}$ [137]. Esta interpretação está de acordo com a estrutura determinada por difração de raios-X, que é discutida no item 3.1.6.

No espectro da sulfapiridina, as vibrações de estiramento assimétrico e simétrico do grupo $-SO_2$ aparecem em 1369 e 1126 cm^{-1} , respectivamente. No complexo, o $\nu_{as}(SO_2)$ deslocou-se de 1369 cm^{-1} para 1346 cm^{-1} , devido à desprotonação do nitrogênio sulfonamídico e a coordenação do bismuto, enquanto que o $\nu_s(SO_2)$ permanece inalterado. O mesmo efeito foi observado no espectro infravermelho de outros complexos sulfonamídicos em que os sítios de coordenação não envolvem o grupo SO_2 [136, 138, 139].

3.1.3 Condutimetria

A condutividade do composto $[Bi(C_{11}H_{11}N_3O_2S)_3Cl_3]$ em dimetilformamida foi de $10,35\text{ ohm}^{-1}\text{ cm}^2\text{ mol}^{-1}$. Este valor está bem abaixo da faixa de referência para eletrólitos 1:1 (65 a $90\text{ ohm}^{-1}\text{ cm}^2\text{ mol}^{-1}$ [124]), conforme pode ser visto na Tabela 2, sugerindo que o composto é neutro.

Tabela 2- Faixa de valores de condutividade ($\text{ohm}^{-1}\text{ cm}^2\text{ mol}^{-1}$) esperados para complexos a $10^{-3}\text{ mol L}^{-1}$ [124].

Solvente	1:1	2:1	3:1	4:1
Nitrometano	75-95	150-180	220-260	290-330
Dimetilformamida	65-90	110-175	200-240	300

3.1.4 Ressonância magnética nuclear de hidrogênio- RMN de 1H

O espectro de RMN de 1H da sulfapiridina em $DMF-d_7$ apresenta sinais referentes a todos os seus 11 prótons. A atribuição desses sinais foi feita com base no Banco de Dados do “*Spectral Database for Organic Compounds*” do National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Japão [140]. O espectro do ligante está apresentado na Figura 30 e o do seu respectivo complexo, na Figura 31.

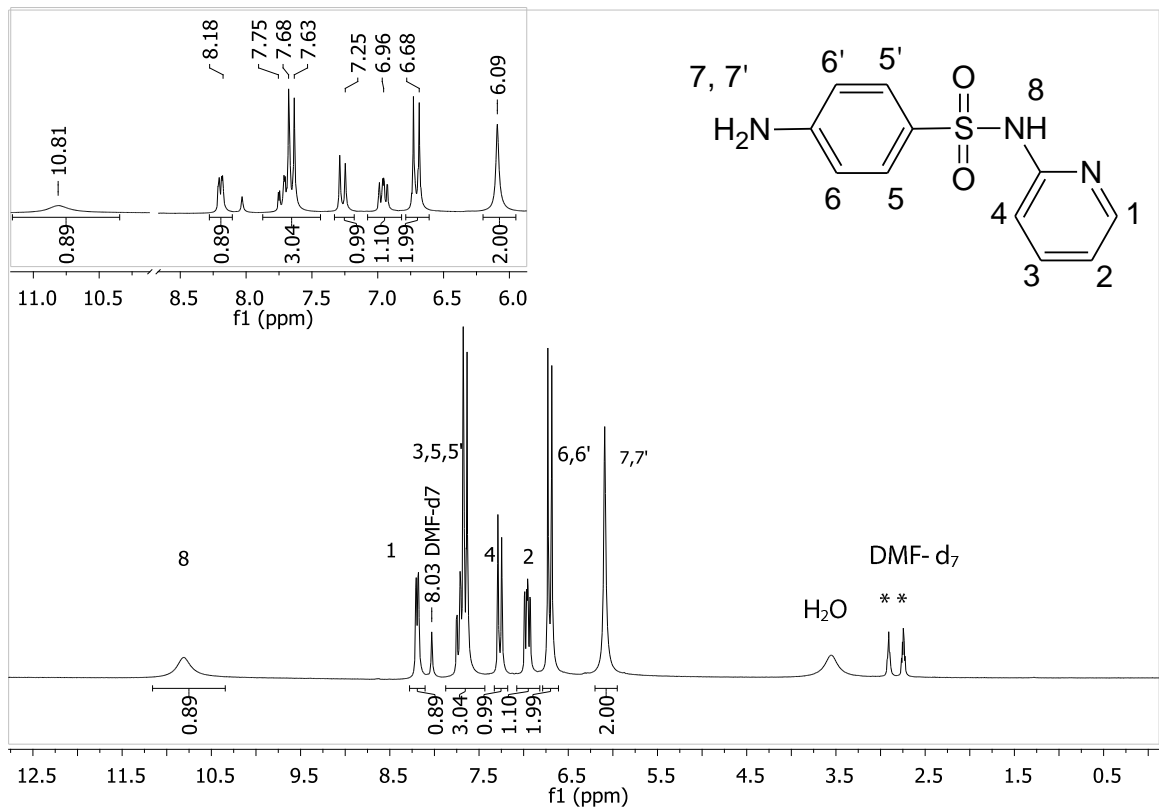


Figura 30 - Espectro de RMN de ^1H da sulfapiridina $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$ em DMF-d_7 .

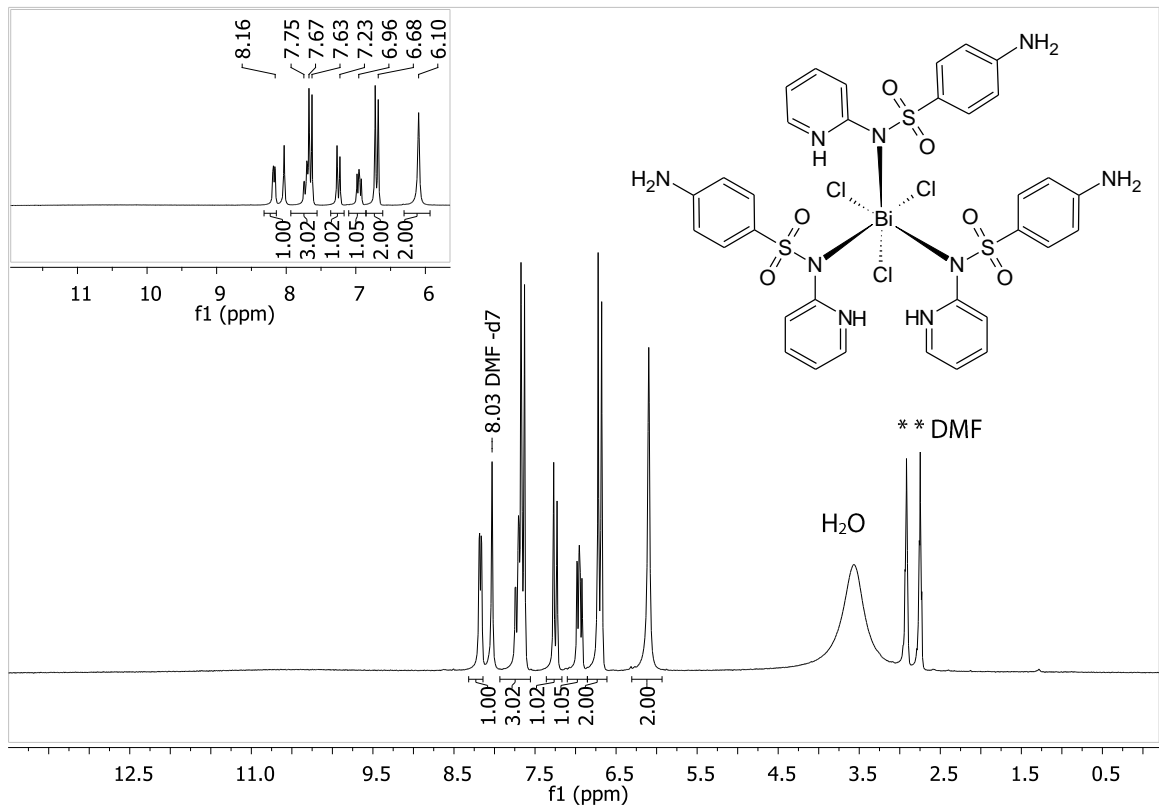


Figura 31 - Espectro de RMN ^1H do complexo $[\text{Bi}(\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_2\text{S})_3\text{Cl}_3]$ em DMF-d_7 .

No espectro do ligante livre (Figura 30), pode-se observar um sinal muito alargado em torno de δ 10,7 – 11,0 ppm na região mais desprotegida do espectro, que se refere ao próton do **NH** sulfonamídico. A ausência desse sinal no espectro do complexo (Figura 31) indica que houve a desprotonação desse grupo na formação do $[\text{Bi}(\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_2\text{S})_3\text{Cl}_3]$. Esta modificação está de acordo com a coordenação do bismuto(III) ao nitrogênio sulfonamídico desprotonado. Os demais sinais praticamente não se alteraram, podendo-se concluir que os outros sítios de coordenação existentes não estão envolvidos na formação do complexo $[\text{Bi}(\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_2\text{S})_3\text{Cl}_3]$.

3.1.5 Espectro de massas

No espectro de massas ESI-MS no modo positivo, um pico em m/z 1062,63 (Figura 32) corresponde ao íon molecular $[\text{Bi}(\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_2\text{S})_3\text{Cl}_3]^+\bullet$ ($M^+\bullet$), formado pela remoção de um elétron da espécie neutra, confirmando a presença do complexo em solução.

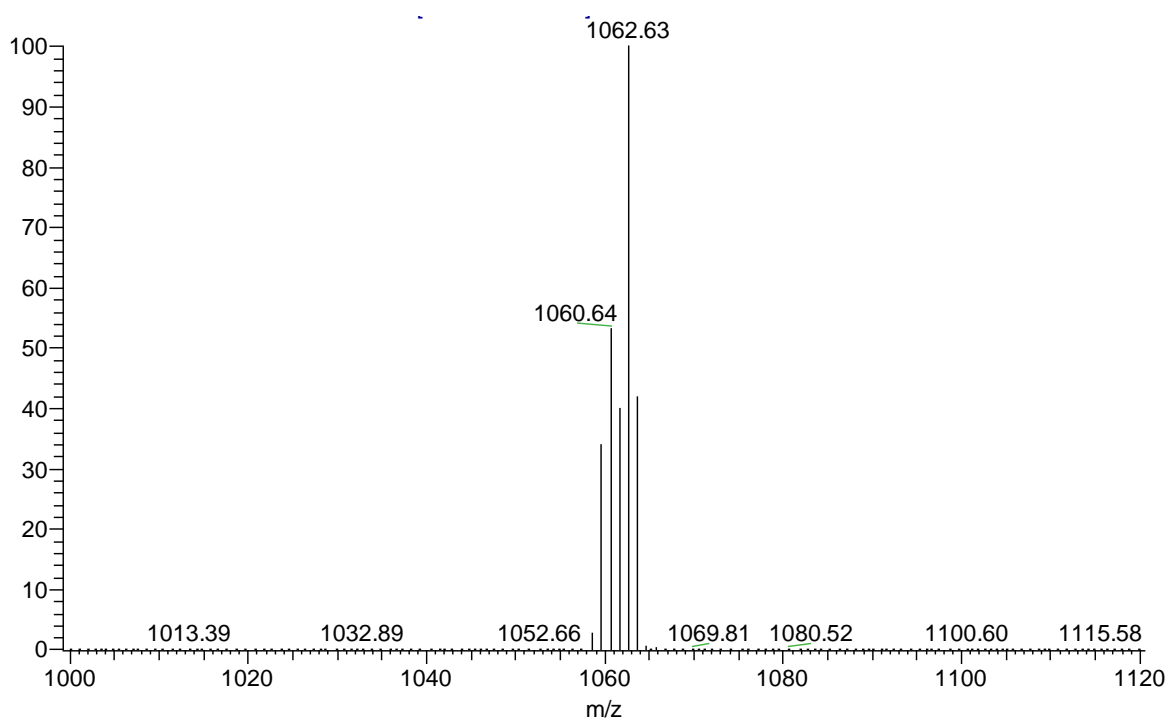


Figura 32 – Região expandida do espectro ESI-MS em metanol, evidenciando o pico em 1062,63, que confirma a presença do complexo $[\text{Bi}(\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_2\text{S})_3\text{Cl}_3]$ em solução.

A dissociação desta espécie, induzida por colisão (ESI-MS/MS) fornece um pico intenso em m/z 814,59 correspondente à perda de $[\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}]^\bullet$ (sulfapiridina- H^\bullet) do íon molecular, conforme pode ser visto na Figura 33.

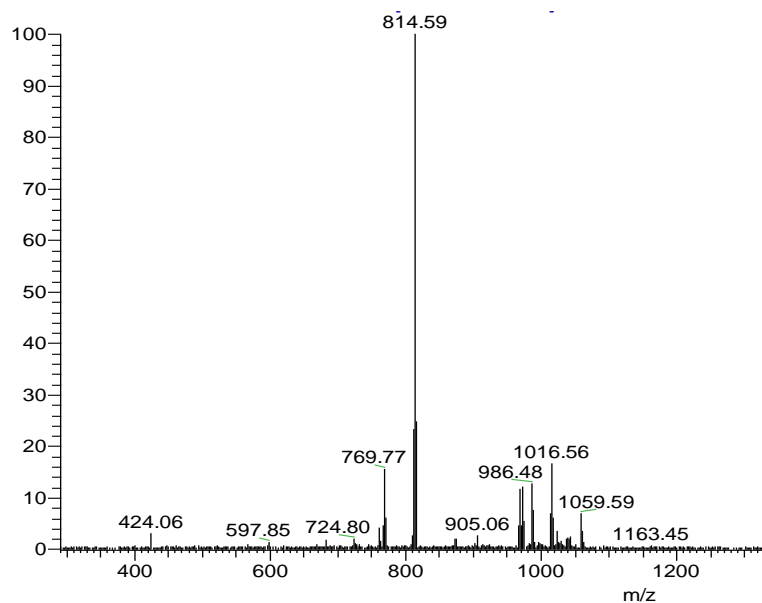


Figura 33 – Região do espectro MS-MS, pico intenso em m/z 814,59, correspondente à perda de $[\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}]^+$ (sulfapiridina- H^+) do íon molecular.

3.1.6 Estrutura do cristal: Análise por difração de raios-X.

Os principais dados sobre as condições de coleta e detalhes do refinamento da estrutura do $[\text{Bi}(\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_2\text{S})_3\text{Cl}_3]$ estão registradas na Tabela 3.

Tabela 3 - Dados de coleta e refinamento da estrutura do $[\text{Bi}(\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_2\text{S})_3\text{Cl}_3]$, obtidos por difração de raios-X em monocristal

Fórmula empírica	$\text{C}_{33}\text{H}_{33}\text{BiCl}_3\text{N}_9\text{O}_6\text{S}_3$
Massa Molar/ g	1063,22
Temperatura	293(2) K
Comprimento de onda	0,71073 Å
Sistema cristalino	Trigonal
Grupo espacial	R 3
Dimensões da célula unitária	a = 17,9557(3), b = 17,9557(3), c = 10,19691 (12) Å, $\alpha = 90$, $\beta = 90$, $\gamma = 120^\circ$
Volume	2847,12(7) Å ³
Z	3
Densidade (calculada)	1,860 Mg/m ³
Coefficiente de absorção	5,08 mm ⁻¹
F(000)	1572
Dimensões do cristal	0,23 × 0,25 × 0,29 mm ³

Faixa de Teta usada na coleta de dados	4,00 a 37,9 °
Faixa de Índices h, k, l.	-27 ≤ h ≤ 30, -29 ≤ k ≤ 15, -9 ≤ l ≤ 17
Reflexões coletadas	6528
Reflexões independentes	4005 (R _{int} = 0.024)
Correção de absorção	Empírica
Método de refinamento	Matriz completa dos mínimos quadrados sobre F ²
Dados/restrições/parâmetros	4005/4/172
Qualidade do ajuste sobre F ²	1,00
Índices R Final (para 3857 reflexões com >2σ(I))	R1 = 0,023, wR2 = 0,055
Índices R (todos os dados)	R1 = 0,024, wR2 = 0,057
Maior diferença (pico e vale)	1,37 e -0,55 eÅ ⁻³
Estrutura absoluta	Parâmetro Flack = 0,003(3)

A estrutura absoluta foi determinada fornecendo um parâmetro Flack de 0,003(3) [141].

A estrutura do complexo [Bi(C₁₁H₁₁N₃O₂S)₃Cl₃] pertence ao sistema cristalino trigonal, grupo espacial R3. Os parâmetros encontrados para a célula unitária são: a = 17,9557(3), b = 17,9557(3), c = 10,19691 (12) Å, α = 90, β = 90, γ = 120 °.

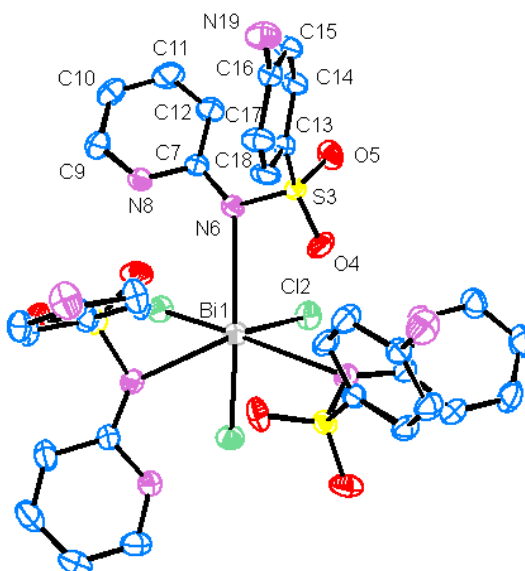


Figura 34 - Estrutura do complexo [Bi(C₁₁H₁₁N₃O₂S)₃Cl₃], *fac*-triclorotris(4-amino-*N*-piridin-2-il-benzenosulfonamida)bismuto(III), determinada por difração de raios-X em monocristal.

A fórmula do complexo possibilitaria a existência de dois isômeros: facial e meridional. A difração de raios-X revelou os três ligantes cloreto numa mesma face do octaedro, indicando a obtenção do isômero facial (*fac*).

Como pode ser visto na Figura 34, o Bi1 está hexacoordenado por 3 íons Cl2 e 3 átomos N6, formando uma geometria octaédrica distorcida em torno do átomo central. Por imposição simétrica, os três ângulos Cl2-Bi1-Cl2 são iguais ($87,74 \pm 3^\circ$) assim como os três ângulos N6-Bi1-N6 são iguais ($108,79 \pm 5^\circ$). Entretanto, esses ângulos diferem do ângulo ideal para uma geometria octaédrica perfeita (90°), principalmente os ângulos N6-Bi1-N6. Essa distorção pode ser causada por efeitos estéreos e eletrônicos do ligante combinados com a presença do par de elétrons não-ligante proveniente do orbital 6s do bismuto(III). Valores de comprimento de ligação selecionados são apresentados na Tabela 4, e serão discutidos em seguida.

Tabela 4 - Comprimentos de ligação /Å, selecionados na estrutura do complexo $[\text{Bi}(\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_2\text{S})_3\text{Cl}_3]$.

Ligação	Distância-(Å)
Bi1—Cl2	2,5442 (7)
C7—N6	1,349 (4)
C9—N8	1,344 (4)
Bi1—N6	2,924 (2)
C7—N8	1,359 (4)
C16—N19	1,383 (4)

Os três íons cloreto neutralizam a carga 3^+ do bismuto. O comprimento da ligação Bi1-Cl2 é 2,5442 Å, o qual está dentro da faixa de valores encontrados para a ligação Bi-Cl em outros complexos de bismuto(III) [142-144].

A distância Bi-N6 é 2,924 Å, o que indica uma interação de força média, pois a soma dos raios covalentes e a soma dos raios de van der Waals¹¹ para Bi-N são $\Sigma_{\text{cov}}(\text{Bi-N})$ 2,27 Å e

¹¹ O raio atômico é definido como a metade da distância entre os núcleos de dois átomos vizinhos (iguais), numa mesma molécula. Se o elemento é metal ou gás nobre, considera-se o estado sólido. Se o elemento é um não-metal, usa-se a distância entre os núcleos de átomos unidos por uma ligação química, sendo também chamado de **raio covalente** de um elemento. Já o **raio de Van der Waals** é a metade da distância entre núcleos de átomos em moléculas vizinhas (átomos não ligados entre si), pertencentes à mesma substância. FONTE: *Princípios de química: questionando a vida moderna e o meio ambiente*, Peter Atkins e Loretta Jones, Porto Alegre, Ed. Bookman, 2001- p.133.

$\Sigma_{\text{vdW}}(\text{Bi-N})$ 3,94 Å, respectivamente [144]. Uma distância Bi-N de 2,9(1) Å também foi encontrada em um composto similar, o triclorotris(3-sulfanilamido-6-metoxipiridazina)bismuto(III) [145]. Distâncias de ligação Bi-N ainda maiores foram descritas para outros compostos de organobismuto(III): Bi-N = 3,170(7) Å no $\text{Bi}[2\text{-}\{\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{NCH}_2\}\text{C}_6\text{H}_4\text{]}_3$, Bi-N=3,211(5) Å no $\text{Bi}[2\text{-}\{\text{MeN}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{NCH}_2\}\text{C}_6\text{H}_4\text{]}_3$ [85] e Bi-N=3,214(7) Å no $\text{Bi}[2\text{-}(\text{Et}_2\text{NCH}_2)\text{C}_6\text{H}_4\text{]}_3$ [146].

O H8 foi encontrado no mapa de diferença, entretanto não foram encontradas diferenças significativas nas distâncias C7-N6, C7-N8 e C9-N8, portanto, as ligações C7-N6 e C7-N8 parecem apresentar a mesma ordem de ligação.

A rede tridimensional de ligações de hidrogênio que contribuem para a estabilização da estrutura cristalina da molécula pode ser visualizada na Figura 35.

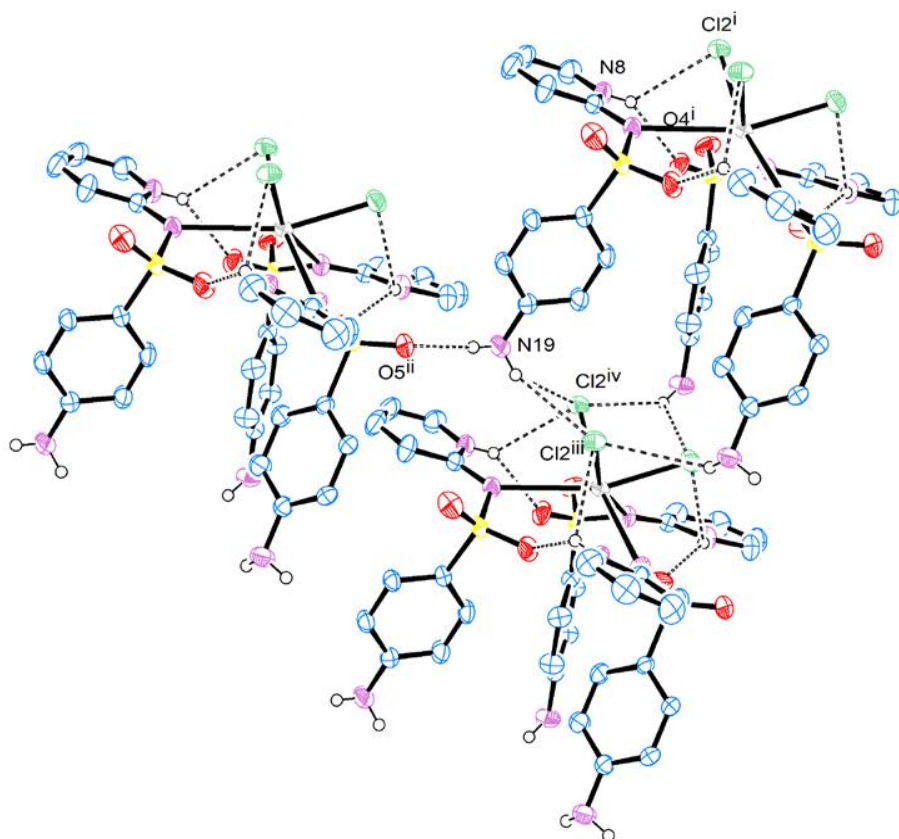


Figura 35 - Interações intermoleculares entre 3 moléculas do complexo $[\text{Bi}(\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_2\text{S})_3\text{Cl}_3]$.

Provavelmente, o átomo H8 está envolvido em uma ligação de hidrogênio intramolecular bifurcada (com O4 e Cl2).

O H19A está envolvido em uma ligação de hidrogênio intermolecular quase linear com o O5 enquanto que o H19B interage com dois cloretos de uma molécula vizinha. As interações N19-H19A...O5 e N19-H19B...Cl2 são ligações de hidrogênio intermoleculares fracas, como sugerem os dados apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Comprimentos de ligação selecionados, ângulos e parâmetros geométricos para ligações de hidrogênio (Å, °). Código de simetria: (i) -y, x-y, z; (ii) -x+y+1/3, -x+2/3, z+2/3; (iii) x, y, z+1; (iv) -y, x-y, z+1

N—H...A	N—H / Å	H...A / Å	N...A / Å	N—H...A / °
N8—H8...O4 ⁱ	0,86	2,13	2,858 (3)	142
N8—H8...Cl2 ⁱ	0,86	2,81	3,340 (3)	122
N19—H19A...O5 ⁱⁱ	0,85 (1)	2,14 (1)	2,995 (4)	177 (5)
N19—H19B...Cl2 ⁱⁱⁱ	0,86 (1)	2,83 (4)	3,568 (3)	146 (5)
N19—H19B...Cl2 ^{iv}	0,85 (1)	3,12 (4)	3,702 (3)	127 (4)

3.1.7 Atividade antibacteriana (determinação da MIC - Concentração mínima inibitória)

O experimento foi realizado conforme o protocolo descrito no item 2.9, e os valores de MIC obtidos encontram-se na Tabela 6.

Tabela 6 - Concentração mínima inibitória (MIC) / $\mu\text{mol L}^{-1}$ da sulfapiridina e do complexo $[\text{Bi}(\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_2\text{S})_3\text{Cl}_3]$.

Linhagem bacteriana		MIC / $\mu\text{mol L}^{-1}$		
		BiCl ₃	sulfapiridina	$[\text{Bi}(\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_2\text{S})_3\text{Cl}_3]$
<i>E. coli</i>	ATCC 25922	> 406	> 1027	241
<i>S. aureus</i>	ATCC 25923	> 406	385	90
<i>P. aeruginosa</i>	ATCC 27853	> 406	1027	120
<i>S. typhimurium</i>	ATCC 13311	> 406	96	30
<i>S. sonnei</i>	ATCC 11060	> 406	1027	241
<i>S. dysenteriae</i>	ATCC 13313	406	128	30

Como pode ser observado na Tabela 6, o sal de bismuto(III) não foi ativo contra as linhagens bacterianas testadas, sendo obtida a MIC de $406 \mu\text{mol L}^{-1}$ apenas para a *Shigella dysenteriae*.

A sulfapiridina livre não apresentou valor de MIC contra a *E. coli* até a maior concentração testada, de $1027 \mu\text{mol L}^{-1}$. Isto significa que esta cepa de *E. coli* é extremamente resistente à sulfapiridina, pois seu crescimento persistiu mesmo com o aumento da concentração de antibiótico. Já o complexo de bismuto(III) foi ativo nesta linhagem de maneira dependente da concentração, inibindo totalmente o crescimento bacteriano na MIC $241 \mu\text{mol L}^{-1}$. A atividade do complexo de bismuto(III) foi no mínimo 4 vezes maior que a do antibiótico livre.

A sulfapiridina livre apresentou MIC de $1027 \mu\text{mol L}^{-1}$ contra a *P. aeruginosa*, enquanto o complexo de bismuto(III) inibiu totalmente o crescimento bacteriano na MIC de $120 \mu\text{mol L}^{-1}$. O complexo foi 8 vezes mais potente que a sulfapiridina livre. Esse resultado também é muito importante, pois a *P. aeruginosa* é uma bactéria Gram-negativa bastante impermeável a muitos antibióticos e faz parte dos 6 patógenos multirresistentes (“ESKAPE”) [21] que mais ameaçam à saúde pública global, conforme citado na introdução deste trabalho (1.1.4, pág35).

Além disso, o complexo de bismuto(III) foi 3 vezes mais potente que a sulfapiridina livre contra *S. typhimurium* e 4 vezes mais ativo contra *S. dysenteriae*, *S. sonnei* e a Gram-positiva *S. aureus*, também incluída no grupo “ESKAPE” de patógenos multirresistentes.

O complexo $[\text{Bi}(\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_2\text{S})_3\text{Cl}_3]$, descrito neste trabalho, apresentou-se mais ativo do que o ligante livre nas 6 linhagens de bactérias resistentes à sulfapiridina. Este resultado é importante porque a resistência bacteriana é o maior obstáculo no tratamento de infecções causadas por bactérias.

Entretanto, o mecanismo pelo qual o complexo reverteu a resistência bacteriana ainda não pôde ser esclarecido. Fato é que a atividade do complexo foi aumentada de 3, 4 ou 8 vezes nas diferentes linhagens. Os mecanismos de resistência são diversos, podendo em uma bactéria operar vários mecanismos combinados. Por exemplo, no caso da resistência às sulfas, podem ocorrer hiperprodução de PABA, alterações na enzima DHPS fazendo com

que esta perca a afinidade pela sulfa, ou modificações na membrana, afetando a permeabilidade ao fármaco.

Existem poucos trabalhos relatando estudos de compostos metálicos com sulfapiridina. MONDELLI *et al.* [139] sintetizaram e caracterizaram um composto de níquel(II) com sulfapiridina no qual o níquel está em um ambiente octaédrico distorcido, coordenado pelo nitrogênio anilínico de duas moléculas de sulfa atuando como ligante monodentado, e os átomos de nitrogênio sulfonamídico e piridínico de outras duas moléculas de sulfa atuando como ligantes bidentados. Infelizmente, o complexo foi menos ativo que o ligante livre contra *S. aureus* e *E. coli*. Os autores propõem que uma absorção reduzida do composto pelas bactérias poderia ser a razão da menor atividade.

KREMER *et al.* [136] sintetizaram complexos metálicos de Cu(II) com 8 diferentes sulfas heterocíclicas, dentre elas a sulfapiridina. A atividade antibacteriana foi testada e observou-se que os complexos com anéis heterocíclicos de 5 membros foram mais ativos que as sulfonamidas livres, enquanto que os complexos de sulfas contendo anéis de 6 membros (como é o caso da sulfapiridina) apresentaram atividade igual ou menor que a sulfa de origem. Os autores propuseram, a partir de resultados de coeficiente de partição em octanol/água, que a maior atividade de um complexo de sulfa deve estar relacionada à sua maior lipofilia em relação à sulfonamida livre, o que poderia aumentar a penetração do complexo na célula bacteriana.

Por outro lado, a forma ativa das sulfonamidas é a sua forma ionizada [1]. COWLES e BRUEKNER sugeriram que as sulfonamidas penetram na célula bacteriana em sua forma não-ionizada, mas uma vez dentro da célula, devem-se ionizar de alguma maneira para produzir o efeito antibacteriano [136].

3.1.8 Atividade citotóxica em células tumorais (determinação da CI50)

O fato de alguns compostos de bismuto, como ditiocarbamatos de bismuto(III) e complexos de tropolona, apresentarem atividade antitumoral [72, 85], nos incentivou a investigar o efeito do composto de bismuto(III) da sulfapiridina no crescimento de células tumorais (conforme o protocolo descrito no item 2.11).

As curvas dose-resposta obtidas para o complexo e a sulfapiridina estão mostradas na Figura 36.

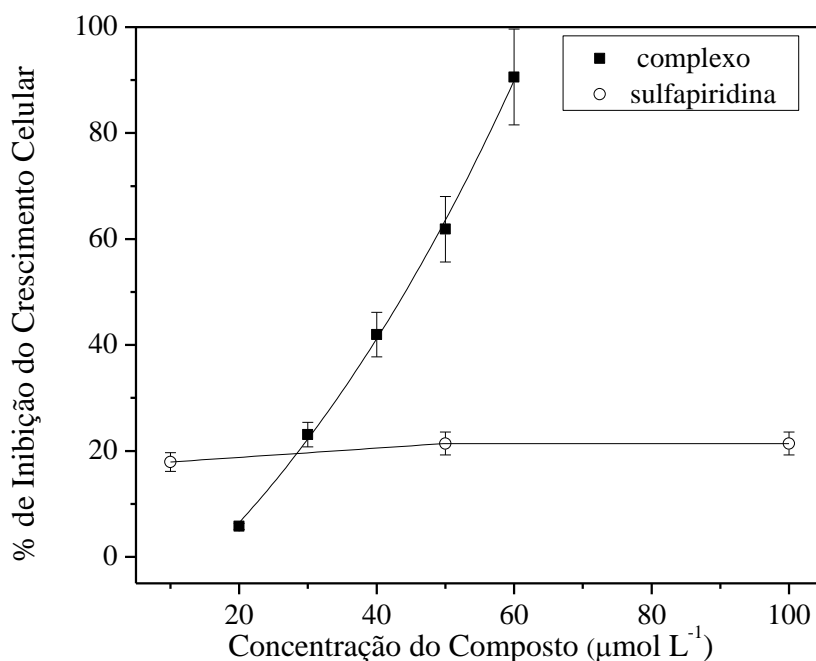


Figura 36 - Inibição do crescimento celular das células K562 em função da concentração de sulfapiridina livre e do complexo $[\text{Bi}(\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_2\text{S})_3\text{Cl}_3]$.

O composto inibiu o crescimento das células tumorais na $\text{CI}_{50} = 44 \mu\text{mol L}^{-1}$ enquanto a sulfapiridina livre não foi ativa até a maior concentração testada de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$.

O mecanismo da ação citotóxica de fármacos de bismuto parece ocorrer através da inibição de enzimas, como proteases, lipases, glicosidases e fosfolipases, etc. [88].

Fármacos sulfonamídicos têm sido apontados como promissores agentes antitumorais [147]. No entanto, o mecanismo da ação antitumoral parece ser multifatorial, podendo envolver inibição da polimerização dos microtúbulos, inibição da anidrase carbônica, inibição da angiogênese, indução da parada do ciclo celular na fase G1, etc. [147, 148]. Recentemente, GONZÁLEZ-ÁLVAREZ *et al* demonstraram que complexos ternários de Cu(II), contendo 2,2-bipiridina e um derivado sulfonamídico como ligantes, ligam-se ao ADN e exibem atividade citotóxica em células Caco-2 (adenocarcinoma de cólon) e linfócitos Jurkat T (leucemia). O complexo mais ativo, $[\text{Cu}(\text{L}2)_2(\text{bipy})]$, onde $\text{HL}2 = N$ -(benzo[d]tiazol-2-il)-4-

metilbenzenosulfonamida, foi capaz de clivar a molécula do ADN e induzir a morte celular por apoptose [149].

No caso do complexo de bismuto(III) da sulfapiridina, o mecanismo da ação citotóxica não foi esclarecido. Como as células de mamíferos não possuem a enzima dihidropteroato sintetase, que é o alvo farmacológico da sulfapiridina, a ação citotóxica deste composto na linhagem K562, que é de origem humana, está relacionada à coordenação ao bismuto(III).

3.2 Complexo 2 – $[\text{Bi}(\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}_5\text{S})_2\text{Cl}]$

Composto de bismuto(III) da sulfassalazina

Clorobis(sulfassalazinato)bismuto(III)

3.2.1 Análise Elementar: C, H, N e Bi

Os teores (%) de C, H, e N, bem como o teor (%) do íon metálico estão apresentados na Tabela 7, juntamente com os valores calculados para fórmula $[\text{Bi}(\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}_5\text{S})_2\text{Cl}]$, $\text{MM} = 1039,20 \text{ g mol}^{-1}$.

Tabela 7 - Valores de C,H,N e Bi, experimental e calculado, para o composto $[\text{Bi}(\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}_5\text{S})_2\text{Cl}]$.

Elemento	% C	% H	% N	% Bi
$\text{Bi}(\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}_5\text{S})_2\text{Cl}$	41,61	2,52	10,78	20,11
Experimental	41,74	2,41	10,62	19,59

Os resultados de C, H, N e Bi sugerem um composto de fórmula mínima $\text{BiC}_{36}\text{H}_{26}\text{N}_8\text{O}_{10}\text{S}_2\text{Cl}$.

A análise elementar está de acordo com a fórmula $[\text{Bi}(\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}_5\text{S})_2\text{Cl}]$, em que o bismuto(III) está coordenado a duas moléculas de sulfassalazina (desprotonadas), e a um íon cloreto.

3.2.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

A sulfassalazina possui vários grupos funcionais que absorvem na região do infravermelho, que poderiam auxiliar na atribuição do sítio de coordenação a íons metálicos. Entretanto, seu espectro é complexo devido à presença dos 3 anéis aromáticos diferentes (o anel salicílico, o anel central *p*-substituído e o anel piridínico), dos grupos oxigenados -OH, -COOH e -SO₂, e do -NH sulfonamídico, o que leva a várias bandas de absorção, algumas sobrepostas ou combinadas, de difícil atribuição.

O espectro da sulfassalazina livre está apresentado na Figura 37 e a região abaixo de 1800 cm⁻¹ do espectro foi ampliada para melhor distinção das bandas (Figura 38).

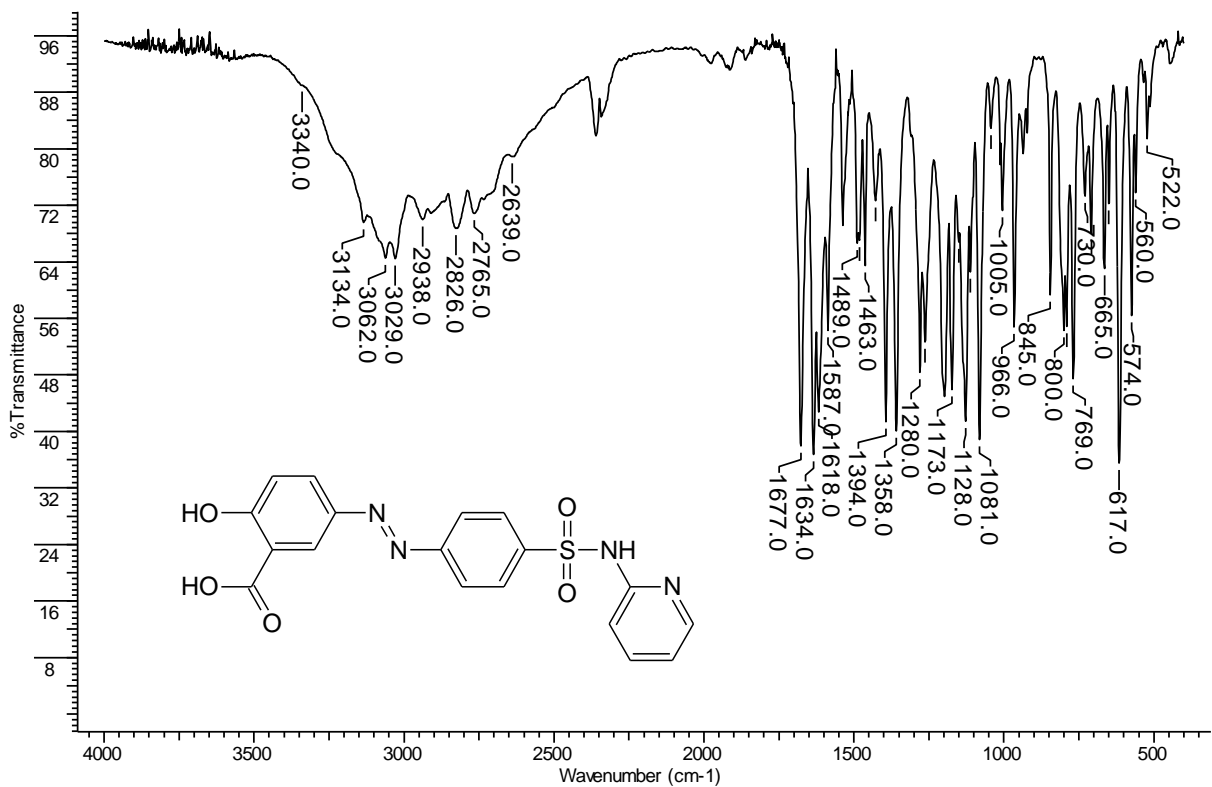


Figura 37 - Espectro na região do infravermelho para o ligante sulfassalazina livre, em KBr.

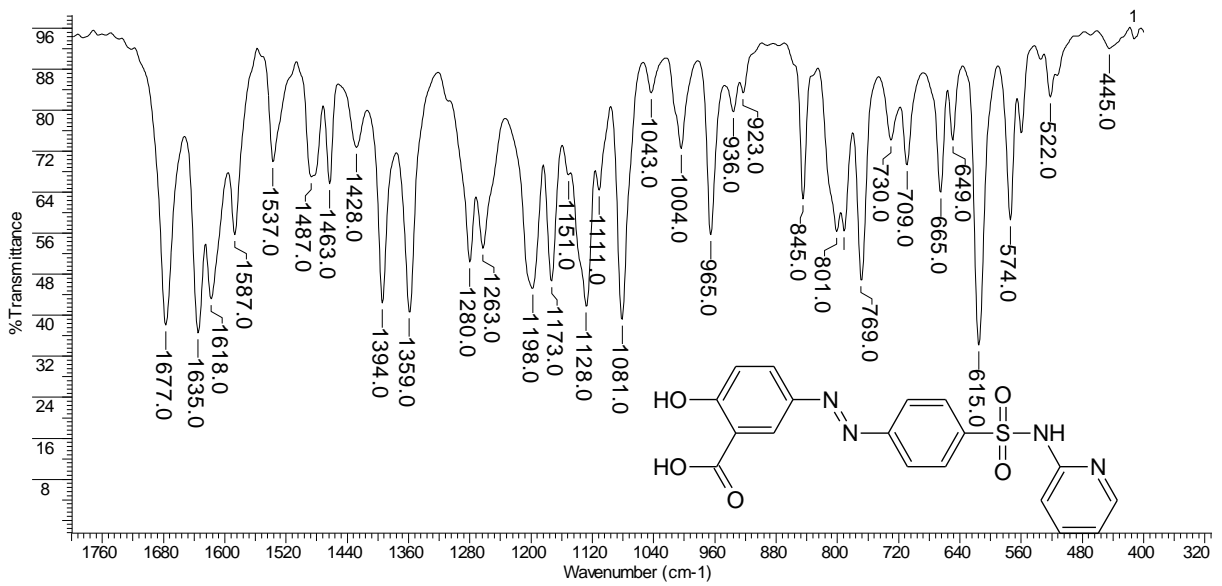


Figura 38 - Região selecionada e ampliada do espectro IV da sulfassalazina, em KBr.

O espectro do complexo de bismuto(III) da sulfassalazina (Figura 39) apresenta várias mudanças na região do infravermelho em relação ao espectro do ligante sulfassalazina livre, indicando que houve coordenação.

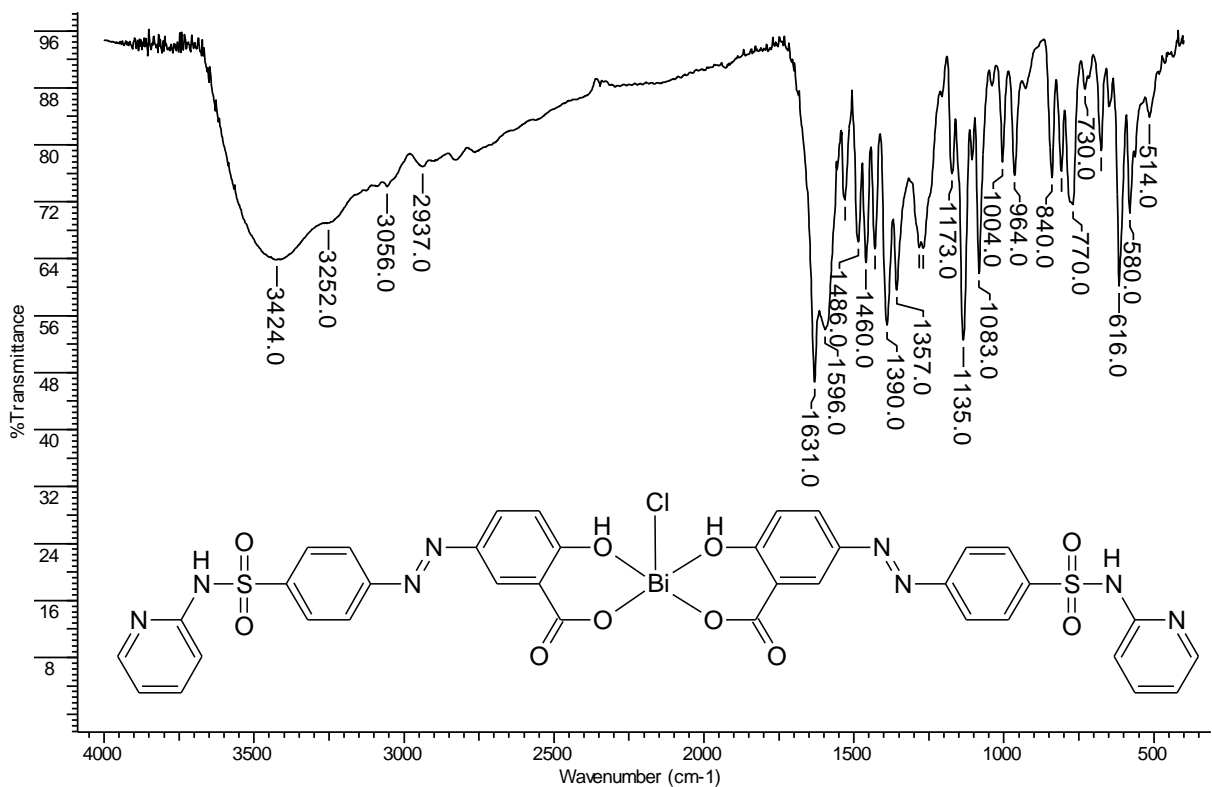


Figura 39 - Espectro na região do infravermelho para o complexo $[\text{Bi}(\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}_5\text{S})_2\text{Cl}]$, em KBr.

A região abaixo de 1800 cm^{-1} foi ampliada para melhor distinção das bandas (Figura 40).

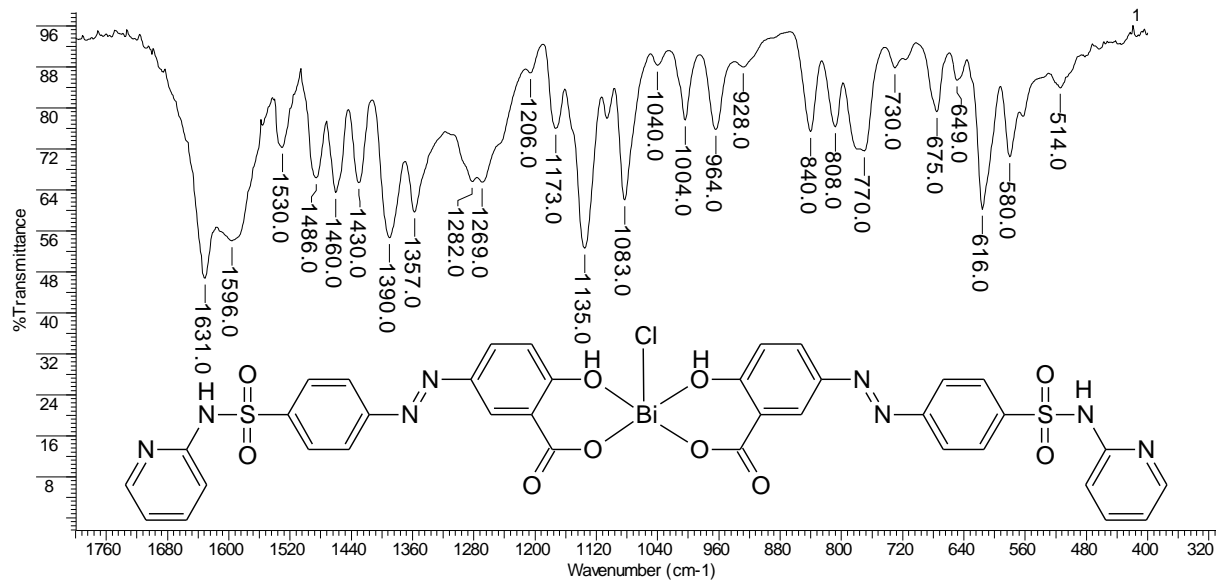


Figura 40 - Região selecionada e ampliada do espectro IV do complexo $[\text{Bi}(\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}_5\text{S})_2\text{Cl}]$, em KBr.

No espectro do complexo de bismuto, uma banda larga em 3424 cm^{-1} refere-se ao estiramento $\nu\text{O-H}$.

Uma banda muito forte em 1677 cm^{-1} no espectro do ligante livre, referente ao $\nu\text{C=O}$ do grupo COOH , desloca-se para 1631 cm^{-1} no espectro do complexo. Esse deslocamento da banda $\nu\text{C=O}$ para região de menor energia no espectro do complexo indica a participação do grupo carboxilato na coordenação ao bismuto(III) [150].

Um ombro largo em 1596 cm^{-1} é observado no espectro do complexo, proveniente da sobreposição das bandas em 1618 e 1587 cm^{-1} , associadas a modos vibracionais presentes no anel salicílico [150]. Modificações nestas bandas provavelmente resultam de um novo ambiente químico envolvendo o anel salicílico na coordenação.

A banda em 1280 cm^{-1} perde intensidade e se alarga no espectro do complexo. Essa modificação também foi observada em complexos ternários de sulfassalazina, aminoácidos e Ni(II) , em que o grupo fenol participa na coordenação da sulfassalazina ao Ni(II) [151]. Além

disso, uma banda referente δ OH fora do plano em 1357 ou 1390 cm^{-1} confirma que o fenol está protonado.

Uma banda muito forte em 1263 cm^{-1} , no espectro do ligante referente a ν C-O perde intensidade e desloca-se para 1269 cm^{-1} , em maior frequência.

As modificações observadas no espectro infravermelho do complexo comparado ao espectro do ligante livre sugerem a coordenação do bismuto (III) à sulfassalazina através de uma ligação com o oxigênio do carboxilato e através do oxigênio fenólico.

3.2.3 Condutimetria

A condutividade do composto $[\text{Bi}(\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}_5\text{S})_2\text{Cl}]$ em nitrometano foi de 11,64 $\text{ohm}^{-1} \text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$. Este valor está bem abaixo da faixa de referência para eletrólitos 1:1 em nitrometano, em condições semelhantes, 75 a 95 $\text{ohm}^{-1} \text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$ [124], sugerindo que o composto é neutro.

3.2.4 Ressonância magnética nuclear de hidrogênio- RMN ^1H e ^1H - ^1H -COSY

As atribuições dos sinais de RMN de ^1H da sulfassalazina não foram encontradas na literatura, exceto referentes aos átomos de hidrogênio lábeis, carboxílico e sulfonamídico, na região desprotegida do espectro, em torno de 11 ppm [150]. Fizemos um estudo por RMN de ^1H e espectroscopia de correlação ^1H - ^1H (COSY) do ligante sulfassalazina e atribuímos os sinais do espectro de RMN de ^1H a seus respectivos átomos de hidrogênio. Os acoplamentos no espectro bidimensional COSY podem ser observados na Figura 41.

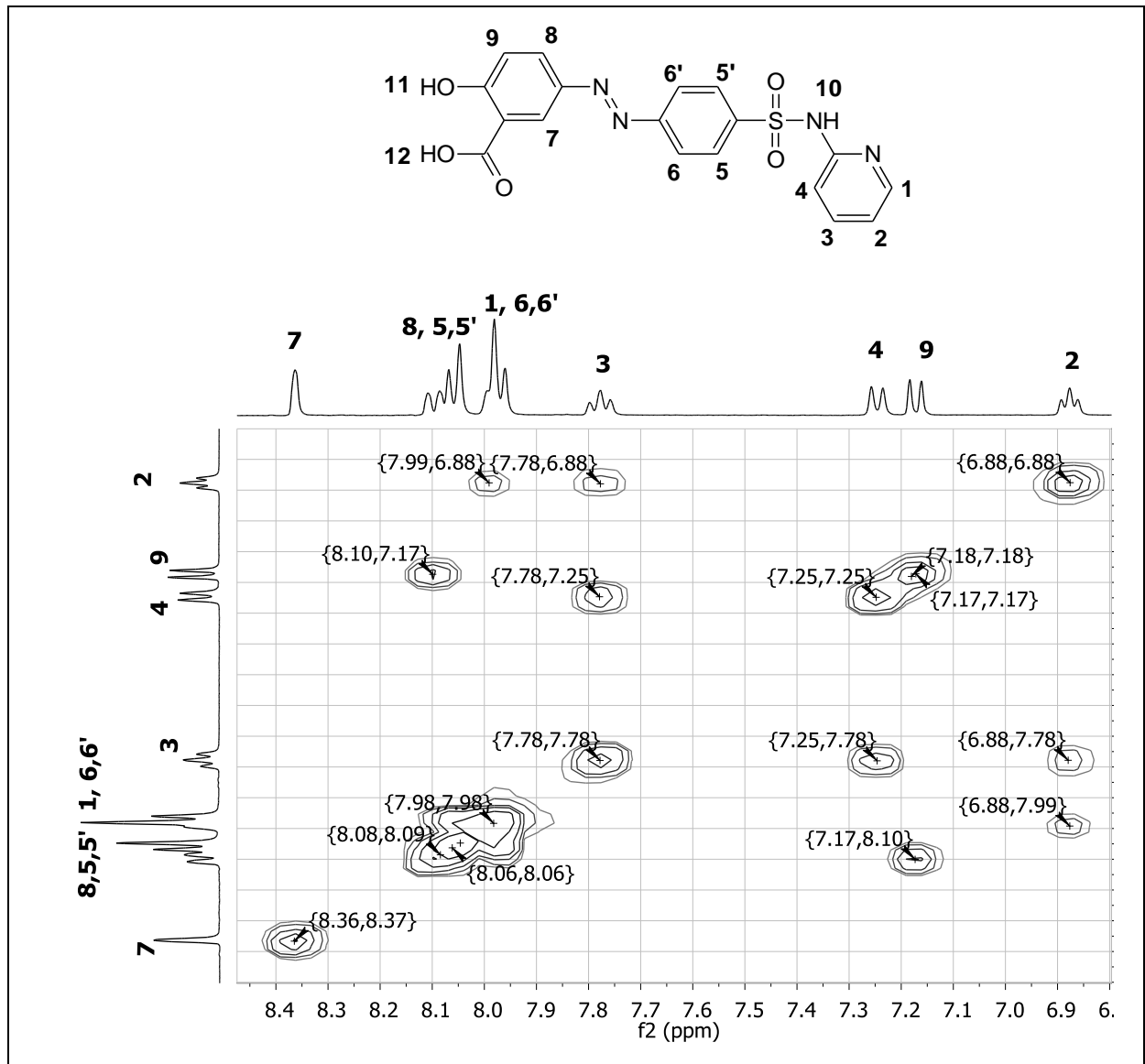


Figura 41 – Espectro de RMN ^1H - ^1H – COSY, da sulfasalazina em DMSO-d_6 , 400 MHz.

Na Figura 41, podem-se observar os contornos referentes aos 9 hidrogênios não lábeis da sulfasalazina ao longo da diagonal. Os contornos fora da diagonal são os contornos de correlação, que se localizam na mesma direção horizontal (ou vertical, pois o espectro é simétrico) dos contornos da diagonal, evidenciando os respectivos acoplamentos.

Foram observados os seguintes acoplamentos entre os sinais (contornos) na diagonal e os sinais (contornos) de correlação, fora da diagonal:

H1 acopla-se com H2 (sinal do H1 em δ 7,99, porém está no multiplete, juntamente com os sinais do H6 e H6', contribuindo para o aumento da intensidade do pico maior do multiplete, onde situa-se o sinal dos prótons H6 e H6').

H2 (triplete) acopla-se com H1 e H3.

H3 (triplete) acopla-se com H2 e H4.

H4 (duplete) acopla-se com H3.

H5 (multiplete) acopla-se com H6.

H6 (multiplete) acopla-se com H5.

H7 (simpleto) não se acopla.

H8 (duplete) acopla-se com o H9.

H9 (duplete) acopla-se com o H8.

A integração e a multiplicidade dos sinais também foram essenciais para a atribuição. Os espectros de hidrogênio do ligante livre sulfassalazina e do complexo estão apresentados na Figura 42 e na Figura 43, respectivamente.

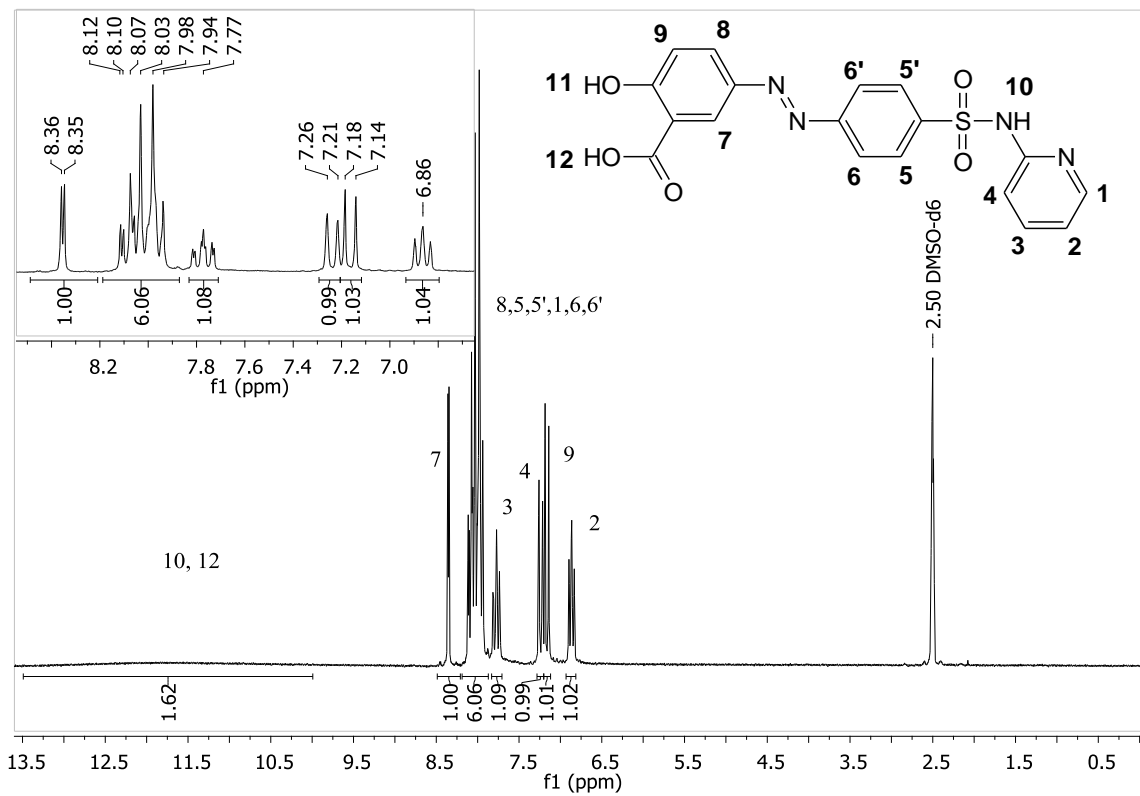


Figura 42 - Espectro de RMN ^1H da sulfassalazina ($\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_5\text{S}$) em DMSO-d_6 .

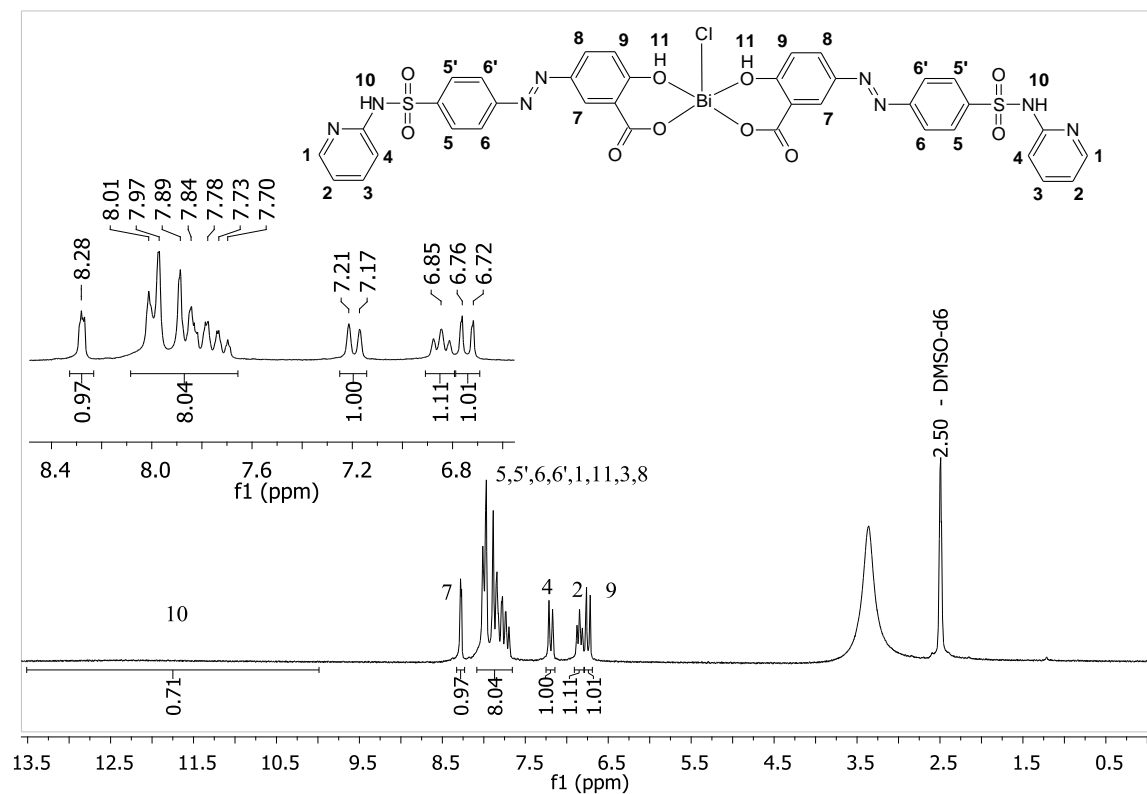


Figura 43 - Espectro de RMN ^1H do composto $[\text{Bi}(\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}_5\text{S})_2\text{Cl}]$ em DMSO-d_6 .

Os sinais nos espectros de RMN de ^1H obtidos para o ligante sulfassalazina e seu complexo de bismuto foram atribuídos e estão discriminados na Tabela 8.

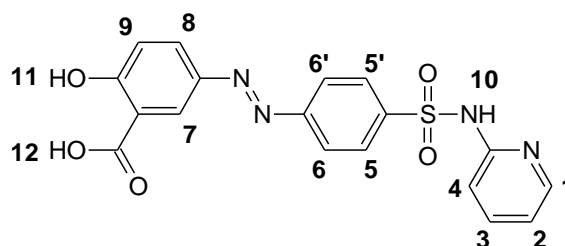
Tabela 8 – Atribuições dos sinais de RMN de ^1H do ligante $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_5\text{S}$ e do composto $[\text{Bi}(\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}_5\text{S})_2\text{Cl}]$ em DMSO-d_6 a 298K, 200 MHz.

Atribuição (integral)	Sulfassalazina ($\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_5\text{S}$) δ / ppm (multiplicidade)	composto $[\text{Bi}(\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}_5\text{S})_2\text{Cl}]$ δ / ppm (multiplicidade)
Hs: 8, 5, 5', 1, 6, 6' (6H)	8,20 – 7,90 (multipleteo)	8,13 - 7,65 (multipleteo)
H2 (1H)	6,86 (t)	6,85 (t)
H3 (1H)	7,77 (m)	7,78 (m)
H4 (1H)	7,23 (d)	7,19 (d)
H7 (1H)	8,35 (d)	8,28 (m)
H9 (1H)	7,16 (d)	6,74 (d)
H10 (NH)	13,00 – 10,50 (s) largo	13,00 – 11,50 (s) largo
H11 (OH)	ausente	8,13 – 7,65 (m)
H12 (OH)	13,00 – 10,50 (s) largo	Ausente

Um sinal pouco intenso e muito alargado pode ser observado na região mais desprotegida do espectro da sulfassalazina, em torno de δ 13,0 - 10,5 ppm. Esse sinal refere-se aos prótons lábeis dos grupos **NH** sulfonamídico e o **COOH** carboxílico [150]. No espectro do complexo, observa-se a perda de um desses prótons, indicando o envolvimento de um dos grupos, desprotonado, na coordenação.

Os sinais dos prótons do anel salicílico, H9, H8 e H7, deslocaram-se consideravelmente tornando-se mais blindados no complexo:

- O sinal do próton H9 é o que sofre o maior deslocamento, deslocando-se de $\Delta\delta = -0,42$ ppm.



- O deslocamento do sinal do H8 não se pode mensurar, pois está na região do multipletto. Entretanto, sabe-se que desloca-se em sentido de campo alto, devido ao desaparecimento do dupletto em 8,12 ppm (parte do sinal do H8) e a outras mudanças como alargamento, intensidade e aparecimento de novos picos na região do multipletto.
- O sinal do H7 desloca-se de $\Delta\delta = -0,07$ ppm.

Os sinais dos prótons do anel piridínico, H1, H2, H3 e H4, parecem não sofrer modificações que indiquem o envolvimento desse anel na coordenação:

- O sinal do H1 não pode ser avaliado por estar completamente dentro do multipletto.
- O sinal do H2, em δ 6,86 no espectro do ligante, permanece praticamente inalterado em δ 6,85 no espectro do complexo.
- No espectro do complexo, os sinais dos prótons que constituem o multipletto fazem parecer que o sinal do H3 está deslocado. Entretanto, uma observação criteriosa nas intensidades e formas dos picos em torno de δ 7,78 parece indicar que este é o pico central do sinal do H3, localizado em δ 7,77 no espectro do ligante, mantendo-se praticamente inalterado.
- O H4 varia de -0,04 ppm.

A coordenação de um íon metálico ao nitrogênio piridínico provocaria uma alteração significativa no deslocamento dos prótons do anel [132].

- Outra observação feita é quanto ao valor da integral do multipletto, que corresponde a 6 prótons no espectro do ligante e a 8 prótons no espectro do complexo:
- Um desses 2 prótons a mais no multipletto do complexo refere-se ao próton H3, cujo sinal passa a fazer parte do multipletto após a coordenação.
- O outro próton adicional no multipletto pode ser o próton fenólico. O próton fenólico não é observável no espectro do ligante livre, mas poderia permanecer na estru-

tura do complexo e ser detectado no espectro em função do novo ambiente químico após a coordenação. Essa conclusão foi elaborada a partir da análise de sinais de próton lábil em espectros de RMN de ^1H de outros ligantes e respectivos complexos onde não ocorreu a desprotonação na formação do complexo. Observou-se, por exemplo, que o próton lábil do grupo NH diminui sua labilidade no complexo: sinal ausente no espectro do ligante torna-se presente no espectro do $[\text{BiC}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{OCl}_2]$ (item 3.6.6), ou sinal muito alargado no espectro do ligante torna-se mais agudo na forma de um simpleto no espectro do complexo $[\text{BiC}_{13}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{I}_2\text{OCl}_2]$ (item 3.6.7) e do complexo $\text{CoC}_{28}\text{H}_{24}\text{CoI}_4\text{N}_4\text{O}_2$ [132].

Essas modificações estão em acordo com a proposta de coordenação da sulfassalazina ao bismuto(III), envolvendo o grupo carboxílico desprotonado e o grupo fenólico do ligante (Figura 20, pág 64).

3.2.5 Espectro de massas

No espectro de massas ESI-MS no modo positivo, um pico em m/z 1073,91 (Figura 44) corresponde à espécie $[\text{Bi}(\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}_5\text{S})_2(\text{H}_2\text{O})_2\text{Cl}]^{+\bullet}$ ($\text{M}^{+\bullet}$) em solução, formada pela remoção de um elétron da espécie neutra onde ocorreu a coordenação de 2 moléculas de água. A expansão do espectro na região do pico está de acordo com a distribuição isotópica simulada para a espécie sugerida (Figura 45).

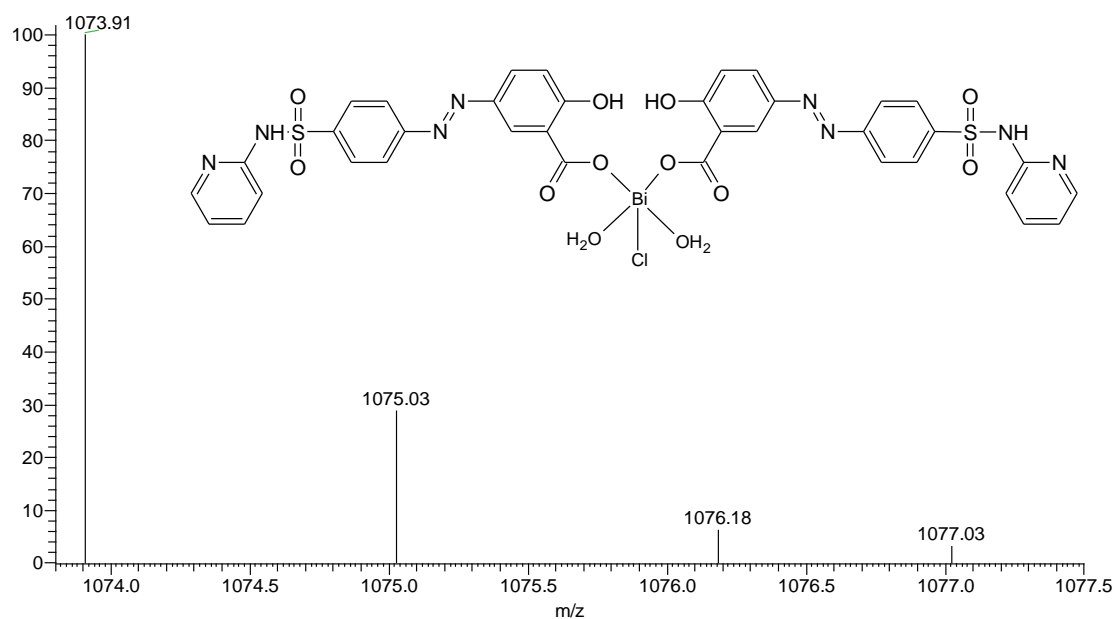


Figura 44 – Região expandida do espectro ESI-MS em metanol, evidenciando o pico em 1073,91, atribuído à espécie $[\text{Bi}(\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}_5\text{S})_2(\text{H}_2\text{O})_2\text{Cl}]^{+\bullet}$ em solução.

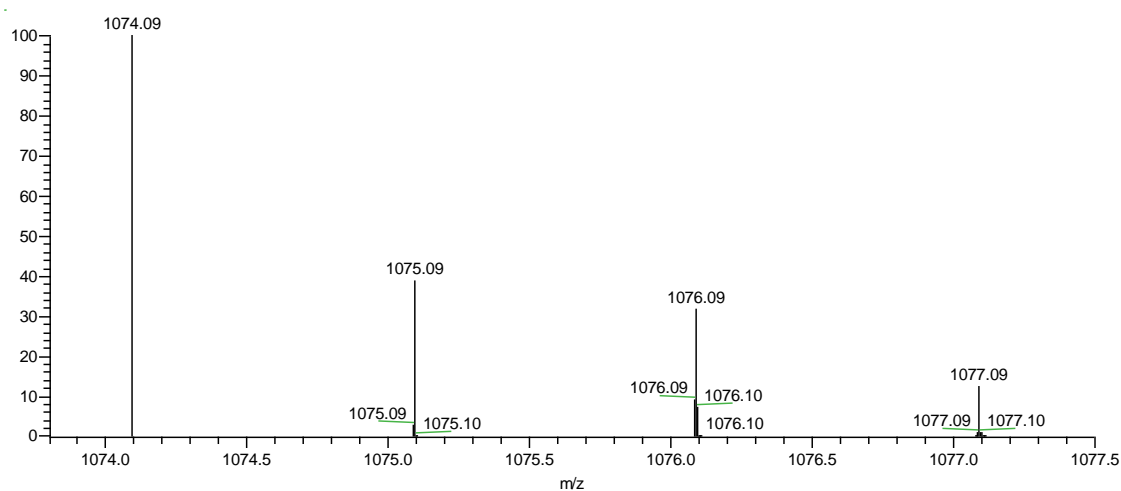


Figura 45 – Distribuição isotópica simulada para a espécie $[\text{Bi}(\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}_5\text{S})_2(\text{H}_2\text{O})_2\text{Cl}]^{+\bullet}$.

3.2.6 Atividade antibacteriana (MIC - Concentração mínima inibitória)

O efeito antibacteriano da sulfassalazina e do complexo $[\text{Bi}(\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_2\text{S})_3\text{Cl}_3]$ foi estudado em 6 linhagens de bactérias e os valores de MIC obtidos encontram-se na Tabela 9.

Tabela 9 - Concentração mínima inibitória (MIC) / $\mu\text{mol L}^{-1}$ da sulfassalazina ($\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_5\text{S}$) e do complexo $[\text{Bi}(\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}_5\text{S})_2\text{Cl}]$

Linhagem de bactéria		MIC / $\mu\text{mol L}^{-1}$		
		BiCl_3	sulfassalazina	$\text{Bi}(\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}_5\text{S})_2(\text{H}_2\text{O})_2\text{Cl}$
<i>E. coli</i>	ATCC 25922	> 406	> 643	> 246
<i>S. aureus</i>	ATCC 25923	> 406	> 643	> 246
<i>P. aeruginosa</i>	ATCC 27853	> 406	> 643	> 246
<i>S. typhimurium</i>	ATCC 13311	> 406	> 643	> 246
<i>S. sonnei</i>	ATCC 11060	> 406	> 643	> 246
<i>S. dysenteriae</i>	ATCC 13313	406	643	246

O sal de bismuto(III), a sulfassalazina, e o complexo de bismuto(III) foram praticamente inativos em todas as linhagens testadas, sendo que a MIC foi atingida apenas para a *S. dysenteriae*, na maior concentração testada, tanto para o ligante livre quanto para o complexo.

Para ligar-se à enzima DHPS, alguns requisitos estruturais são necessários às sulfas, dentre eles, o grupo amino não deve ser substituído, ou seja, a amina deve ser primária [1]. A sulfassalazina é um pró-fármaco que é metabolizado *in vivo* por bactérias entéricas azorreduzoras, gerando a sulfapiridina e o ácido 5-amino salicílico. A atividade antibacteriana depende, portanto, do metabolismo que ocorre no intestino, liberando a sulfapiridina e o ácido 5-aminosalicílico. Uma possível explicação para a menor atividade da sulfassalazina comparada à sulfapiridina nas linhagens bacterianas testadas pode estar relacionada à substituição no nitrogênio anilínico. E a inatividade do complexo metálico pode ter a mesma razão.

Existem poucos estudos de atividade antibacteriana de complexos metálicos de sulfassalazina na literatura. EL-WAHED *et al* sintetizaram e investigaram o efeito antibacteriano contra *E.coli* de complexos de Mn(II), Hg(II), Cr(III) ZrO(II), VO(II) e Y(III) com a sulfassalazina, onde o íon metálico coordenou-se ao anel salicílico da sulfassalazina. Somente o complexo de Mn(II) apresentou atividade semelhante à da sulfassalazina livre (1 cm de diâmetro de inibição por difusão em disco), enquanto os demais complexos não apresentaram atividade antibacteriana *in vitro* [152]. No composto inédito aqui descrito, o bismuto(III) também se coordenou ao anel salicílico da sulfassalazina e também não melhorou a atividade anti-

bacteriana, *in vitro*, em relação ao fármaco livre. Para verificar esta possível explicação, estudos *in vivo* seriam necessários.

3.2.7 Atividade citotóxica em células tumorais

O efeito do composto $[\text{Bi}(\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}_5\text{S})_2\text{Cl}]$ no crescimento das células tumorais foi estudado e a curva dose-resposta obtida para o complexo $[\text{Bi}(\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}_5\text{S})_2\text{Cl}]$ e para a sulfassalazina está apresentada na Figura 46.

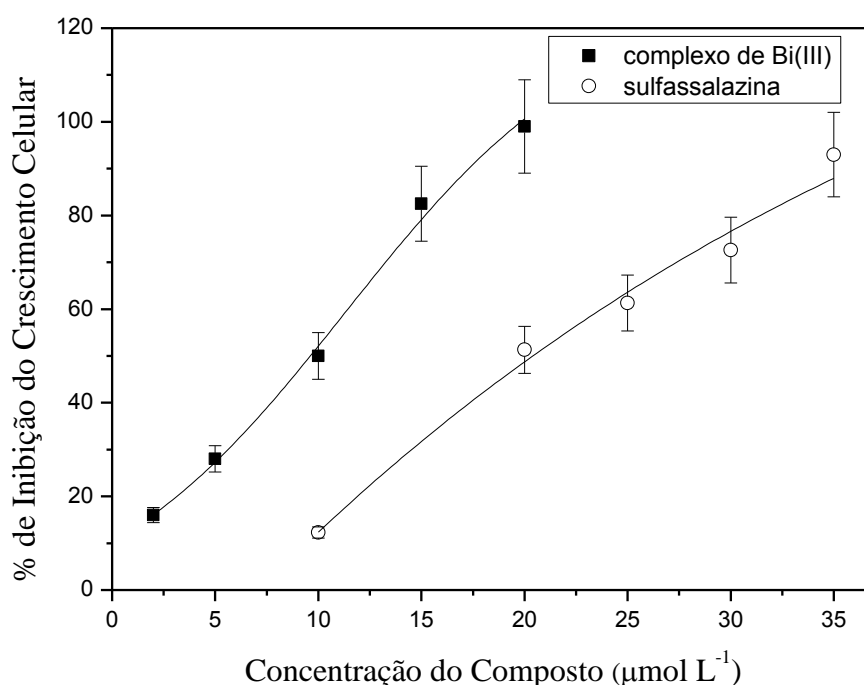


Figura 46 - Inibição do crescimento celular das células K562 em função da concentração do complexo $[\text{Bi}(\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}_5\text{S})_2\text{Cl}]$ e da sulfassalazina livre.

O complexo inibiu o crescimento das células K562 na $\text{CI}_{50} = 9,7 \mu\text{mol L}^{-1}$ enquanto que a sulfassalazina livre apresentou valor de $\text{CI}_{50} = 21,1 \mu\text{mol L}^{-1}$, ou seja, a coordenação ao bismuto(III) dobrou a atividade da sulfassalazina. Para efeito de comparação, a carboplatina usada na clínica apresenta $\text{CI}_{50} = 10 \mu\text{mol L}^{-1}$, determinada nas mesmas condições experimentais.

REFAT *et al* testaram complexos de Mg(II) ou Ca(II) com sulfassalazina contra células de carcinoma do cólon e fígado [153]. O complexo de Mg(II) apresentou atividade antitumoral

comparável ao antibiótico antineoplásico doxorrubicina nas células do cólon, enquanto que o complexo de Ca(II) apresentou atividade comparável à doxorrubicina nas células do fígado. Os autores sugeriram que o mecanismo de ação desses complexos envolve a ligação no ADN e ARN das células tumorais.

O mecanismo de ação antitumoral da sulfassalazina tem sido motivo de discussão em inúmeros trabalhos. Foi relatada a sua capacidade de inibir processos imunológicos como síntese de interleucinas, que são proteínas envolvidas na ativação de linfócitos e na indução de divisão de outras células. A sulfassalazina inibe a fosforilação do fator nuclear kappaB, que ativado parece promover a origem e a sobrevivência de células tumorais. Outra abordagem para o mecanismo de ação da sulfassalazina é a inibição do sistema de transporte Xc^- , um aminoácido transportador essencial para o influxo de cisteína e a sobrevivência de linfomas [154].

3.3 Complexo 3- [Ga(C₁₈H₁₂O₅N₄S)(H₂O)(OH)]

Composto de gálio(III) da sulfassalazina

Aquahidroxo(sulfassalazinato)gálio(III)

3.3.1 Análise Elementar: C, H, N e Ga

Os teores (%) de C, H, e N, bem como o teor (%) de metal estão apresentados Tabela 10, juntamente com os respectivos valores calculados para a estrutura [Ga(C₁₈H₁₂O₅N₄S)(H₂O)(OH)], MM = 501,12 g mol⁻¹.

Tabela 10 – Valores de C,H,N e Ga, experimental e calculado, para a proposta [Ga(C₁₈H₁₂O₅N₄S)(H₂O)(OH)].

Elemento	% C	% H	% N	% Ga
Calculado	43,14	3,02	11,08	13,91
Experimental	42,42	3,13	11,34	12,75

Os resultados de C, H, N e Ga sugerem um composto de fórmula mínima GaC₁₈H₁₅N₄O₇S.

A análise elementar está de acordo com a fórmula proposta $[\text{Ga}(\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{O}_5\text{N}_4\text{S})(\text{H}_2\text{O})(\text{OH})]$, em que uma molécula de sulfassalazina (desprotonada nos grupos fenol e carboxílico) se coordena de forma bidentada ao gálio(III), a uma molécula de água, e a um ligante hidróxido.

3.3.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

Os espectro de absorção na região do infravermelho para a sulfassalazina livre está apresentado na Figura 47 e a região abaixo de 1800 cm^{-1} do espectro foi ampliada para melhor distinção das bandas (Figura 48).

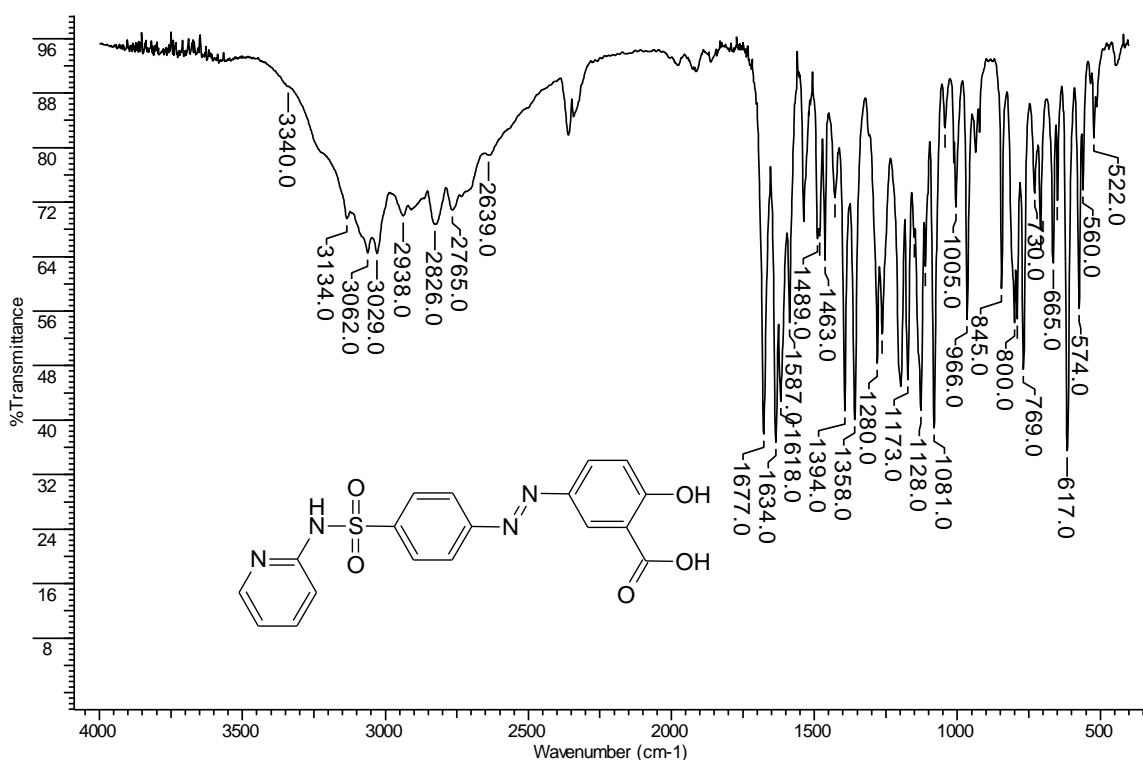


Figura 47 - Espectro na região do infravermelho para o ligante sulfassalazina, em KBr.

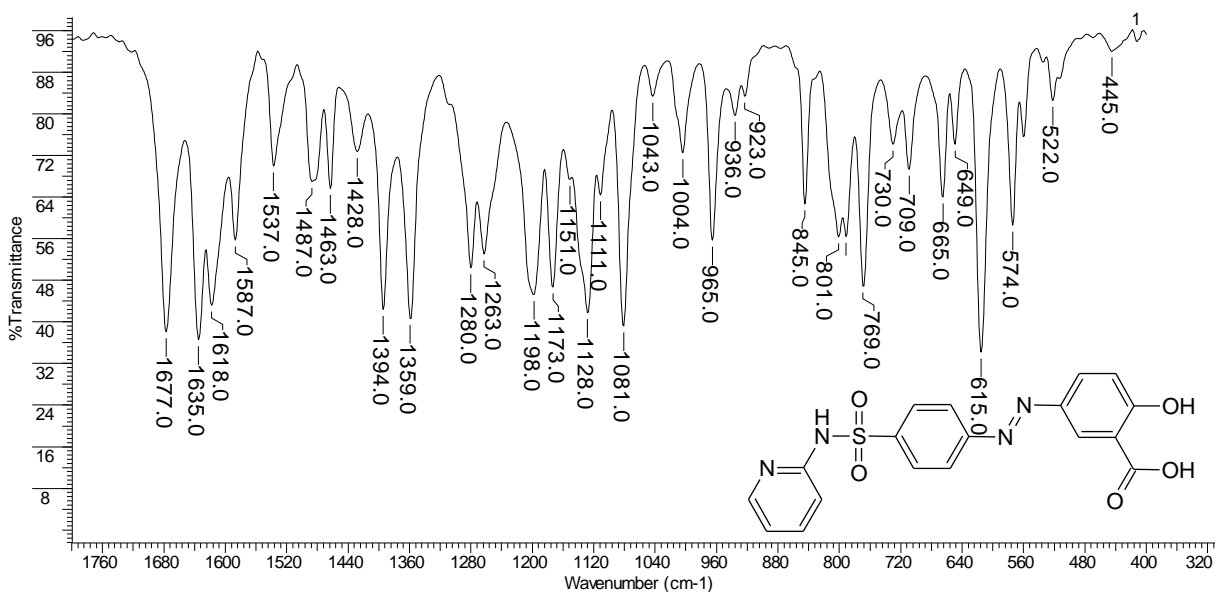


Figura 48 – Região selecionada e ampliada do espectro IV da sulfassalazina, em KBr.

- As bandas de estiramento ν O-H e ν N-H estão presentes na região de maior frequência no espectro, em torno de 3340- 3029 cm^{-1} .
- Uma banda muito forte em 1677 cm^{-1} é atribuída ao estiramento ν C=O do grupo COOH.
- A banda em 1280 cm^{-1} e a banda muito forte em 1263 cm^{-1} , no espectro do ligante, podem ser atribuídas ao ν C-O [139, 150]
- As bandas de estiramento assimétrico e simétrico do grupo SO_2 , $\nu_{\text{as}}(\text{SO}_2)$ e $\nu_{\text{s}}(\text{SO}_2)$, são atribuídas às bandas em 1359 e 1173 cm^{-1} , respectivamente.

O espectro do complexo de gálio(III) da sulfassalazina (Figura 49) apresenta várias mudanças na região do infravermelho em relação ao espectro do ligante sulfassalazina livre, indicando que houve coordenação. A região abaixo de 1800 cm^{-1} do espectro foi ampliada para melhor distinção das bandas (Figura 50).

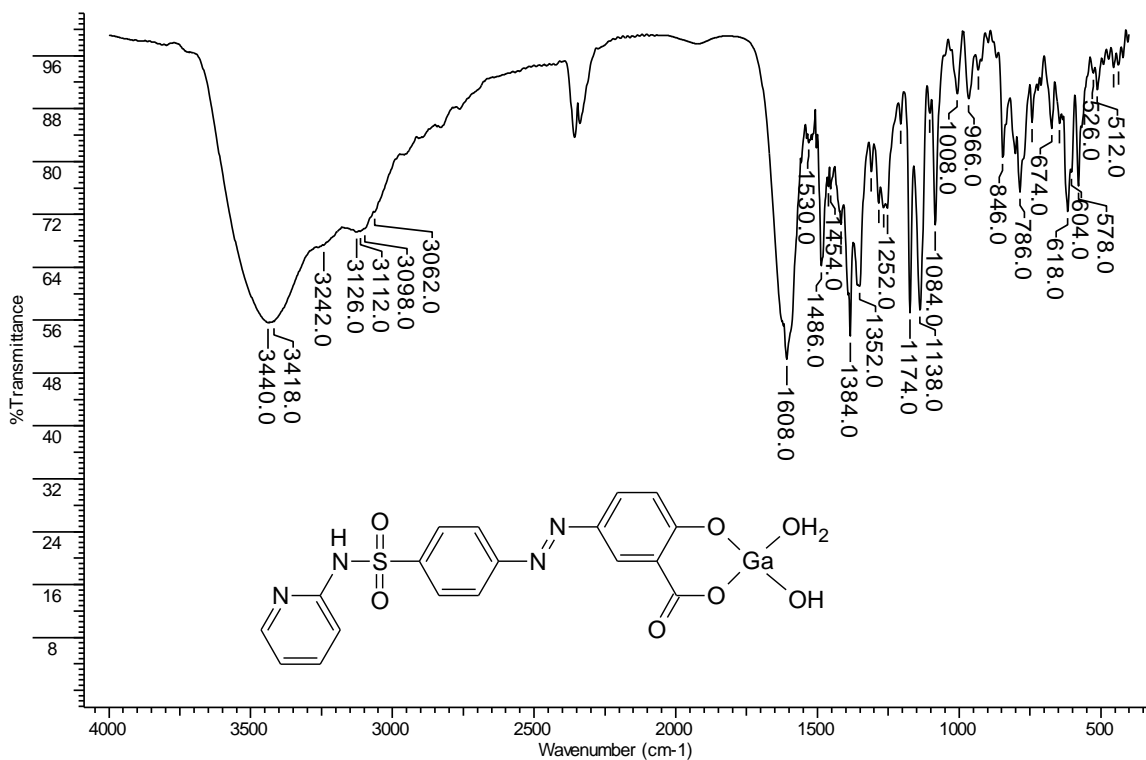


Figura 49 - Espectro na região do infravermelho para o complexo $[Ga(C_{18}H_{12}O_5N_4S)(H_2O)(OH)]$, em KBr.

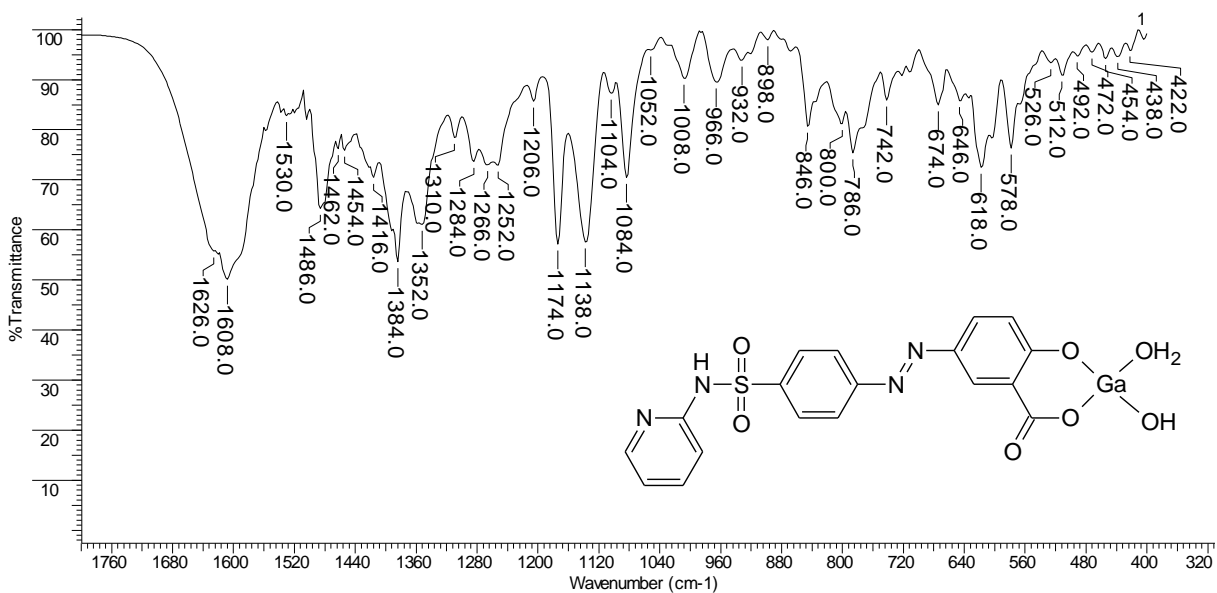


Figura 50 - Região selecionada e ampliada do espectro IV do complexo $[Ga(C_{18}H_{12}O_5N_4S)(H_2O)(OH)]$, em KBr.

As bandas na região de 3000-3400 no espectro da sulfassalazina livre, referente aos estiramentos $\nu(\text{OH})$ e $\nu(\text{NH})$, encontram-se alargadas no espectro do complexo. Uma banda larga em 3440 cm^{-1} no espectro do complexo é atribuída ao estiramento νOH , provavelmente devido à presença de OH e H_2O água no complexo.

Uma banda muito forte em 1677 cm^{-1} no espectro do ligante é atribuída ao estiramento $\nu\text{C}=\text{O}$ do grupo COOH. Essa banda perde intensidade e desloca-se para região de menor frequência, tornando-se um "ombro" em 1626 cm^{-1} no espectro do complexo, o que indica a participação do grupo carboxilato na formação do complexo [150].

No espectro da sulfassalazina livre, observa-se três bandas em 1635, 1616, 1587 cm^{-1} , associadas aos estiramentos νCC e νCN dos anéis aromáticos [150]. Já no espectro do complexo de gálio, essas três bandas se sobrepõem formando uma banda intensa e alargada em 1608 cm^{-1} , provavelmente devido ao envolvimento do anel salicílico na coordenação. A presença de água na esfera de coordenação do complexo também contribuiria para essa banda larga devido ao modo vibracional $\delta(\text{H}_2\text{O})$ [151].

A banda em 1280 cm^{-1} no espectro do ligante é atribuída ao estiramento C-O [151]. No complexo, essa banda perde intensidade e se alarga. Essa modificação também foi observada em complexos ternários de sulfassalazina, aminoácidos e Ni(II), em que o grupo fenol participa na coordenação da sulfassalazina ao Ni(II) [151].

Uma banda em 512 cm^{-1} e outra em 454 cm^{-1} referem-se a $\nu\text{M}-\text{O}$ no espectro do complexo.

Com base nos resultados apresentados, propõe-se que o gálio(III) se liga a uma molécula de sulfassalazina que atua como ligante bidentado, através dos oxigênios desprotonados do grupo fenólico e do grupo carboxílico, de acordo com a Figura 51-a. (O mesmo modo de coordenação foi proposto para um complexo de Mn(II) ligado a sulfassalazina [155]). Outra possibilidade de coordenação seria a formação de um dímero (Figura 51-b), com duas pontes hidróxido, o que não afetaria a análise elementar.

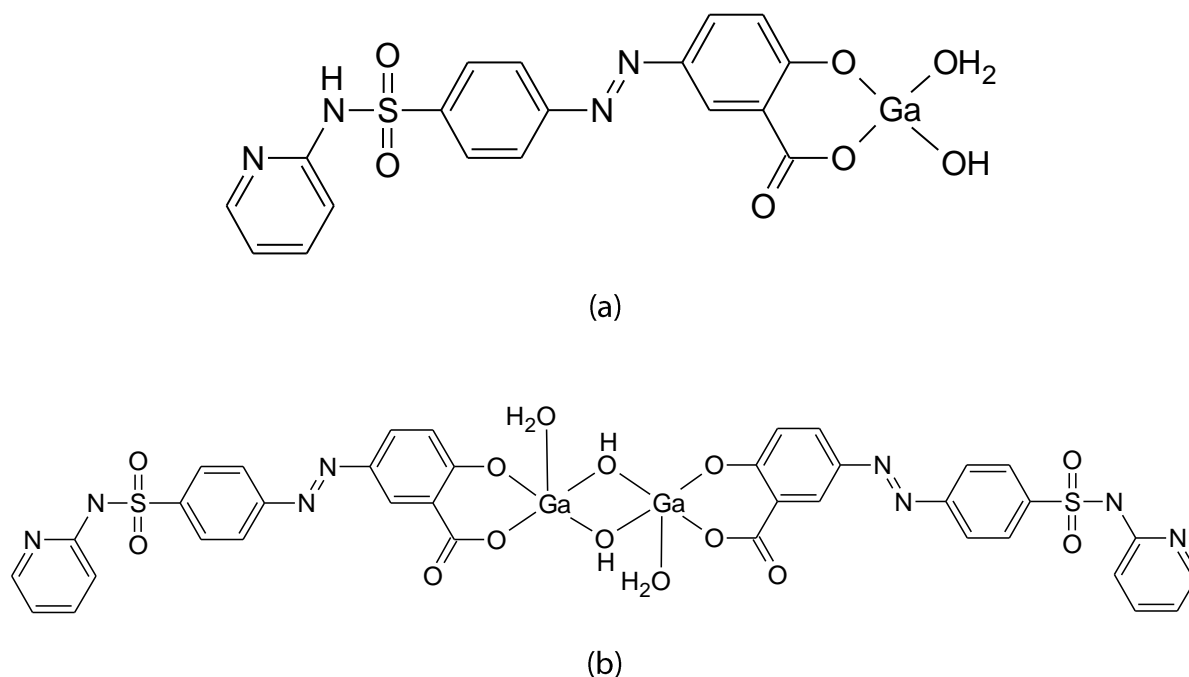


Figura 51 - Estruturas propostas para o complexo de gálio(III) da sulfassalazina: (a) $[Ga(C_{18}H_{12}O_5N_4S)(H_2O)(OH)]$ e (b) o complexo na forma de um dímero.

3.3.3 Condutimetria

A condutividade do composto $[Ga(C_{18}H_{12}O_5N_4S)(H_2O)(OH)]$ em DMF foi de $13,28 \text{ ohm}^{-1} \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$. Este valor está bem abaixo da faixa de referência para eletrólitos 1:1 em dimetilformamida, 65 a $90 \text{ ohm}^{-1} \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ [124], o que sugere um composto neutro.

3.3.4 Ressonância magnética nuclear de hidrogênio- RMN 1H

O espectro de RMN 1H da sulfassalazina e do respectivo complexo de gálio(III) estão apresentados na Figura 52 e Figura 53, respectivamente.

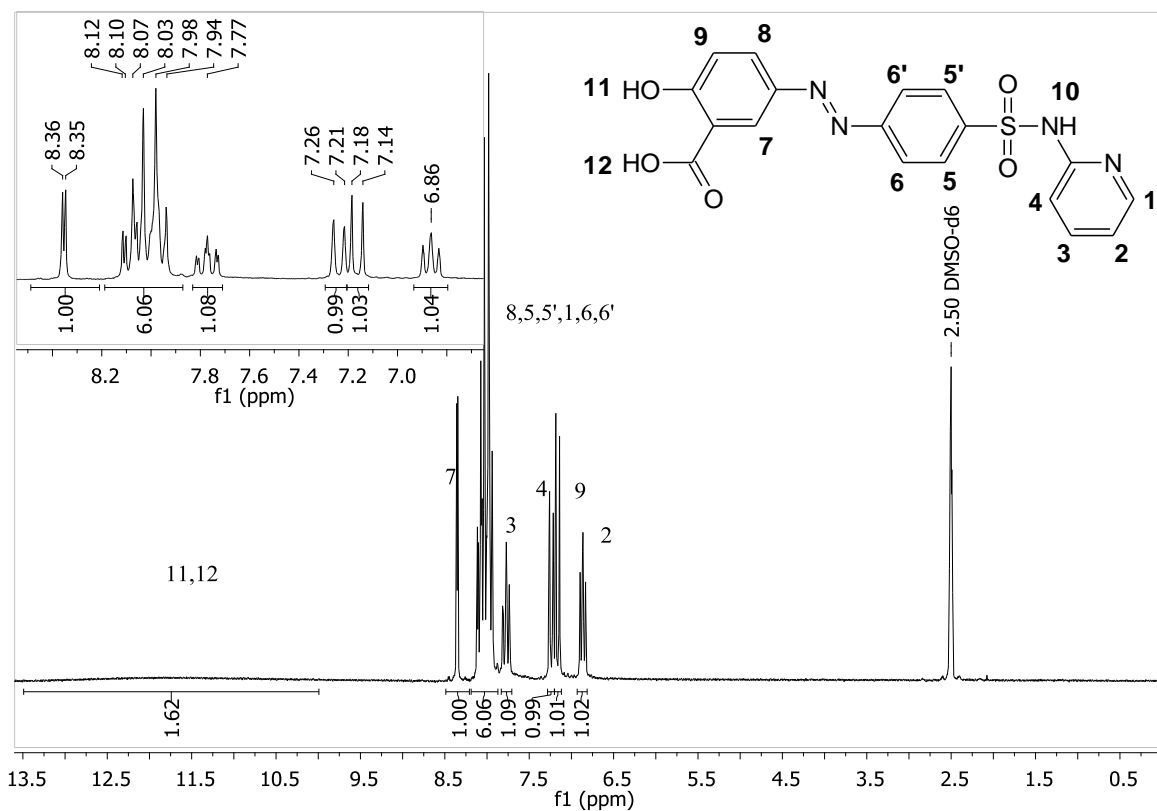


Figura 52 - Espectro de RMN ^1H da sulfassalazina ($\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_5\text{S}$) em DMSO-d_6 .

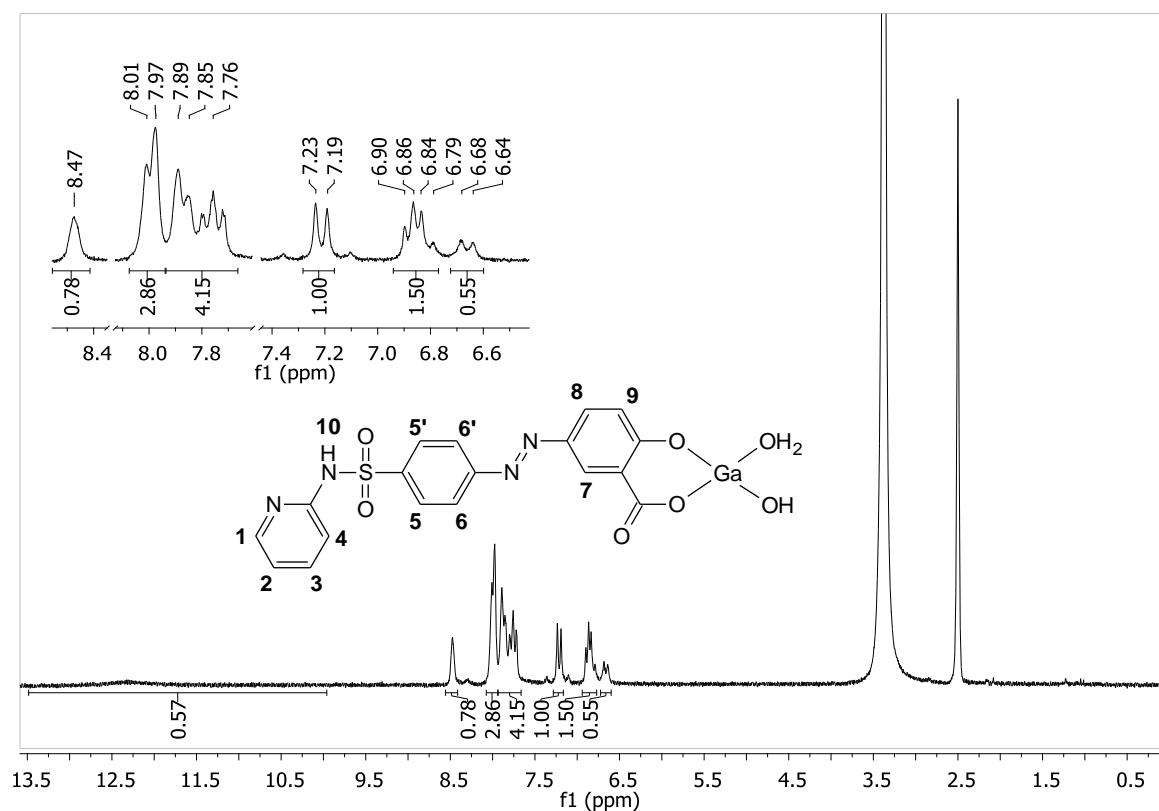


Figura 53 - Espectro de RMN ^1H do composto $[\text{Ga}(\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{O}_5\text{N}_4\text{S})(\text{H}_2\text{O})(\text{OH})]$ em DMSO-d_6 .

As atribuições dos sinais de RMN ^1H aos respectivos prótons da sulfassalazina e do complexo $[\text{Ga}(\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{O}_5\text{N}_4\text{S})(\text{H}_2\text{O})(\text{OH})]$ estão listadas na Tabela 11.

Tabela 11 - Atribuições dos sinais de RMN ^1H da sulfassalazina e do complexo $[\text{Ga}(\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{O}_5\text{N}_4\text{S})(\text{H}_2\text{O})(\text{OH})]$ em DMSO- d_6 a 298K.

Atribuição (integral)	sulfassalazina ($\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_5\text{S}$) δ / ppm (multiplicidade)	$[\text{Ga}(\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{O}_5\text{N}_4\text{S})(\text{H}_2\text{O})(\text{OH})]$ δ / ppm (multiplicidade)
Hs: 8, 5, 5', 1, 6, 6' (6H)	8,20 – 7,90 (m)	8,13 - 7,65 (m)
H2 (1H)	6,86 (t)	6,86 (t)
H3 (1H)	7,77 (m)	7,78 (m)
H4 (1H)	7,23 (d)	7,19 (d)
H7 (1H)	8,35 (d)	8,28 (m)
H9 (1H)	7,16 (d)	6,74 (dd, sobreposto)
H10 (-1NH)	13,00 – 10,50 (s) largo	13,00 – 10,50 (s) largo
H11 (1-OH)	ausente	ausente
H12 (1-OH)	13,00 – 10,50 (s) largo	ausente

Em relação aos sinais de RMN H^1 da sulfassalazina, previamente discutidos no item 3.2.4, as seguintes modificações foram observadas no espectro do complexo de gálio(III) em relação aos prótons do anel salicílico - H7, H8, H9, H11 e H12:

O duplete em δ 8,36 no espectro da sulfassalazina, atribuído ao próton H7 do anel salicílico, se desloca para δ 8,47 ppm no espectro do complexo ($\Delta = 0,11$ ppm).

O deslocamento do sinal do H8 não pode ser mensurado, pois está na região do multipletto; entretanto, sabe-se que desloca-se em sentido de campo alto devido ao desaparecimento do sinal do H8 em 8,12 ppm e outras mudanças como alargamento, intensidade e novos picos na região do multipletto.

O sinal do próton H9 desloca-se significativamente de $\Delta\delta = -0,22$ ppm, gerando um duplo duplete, com parte sobreposta ao sinal vizinho à esquerda.

No espectro do ligante, o sinal alargado em torno de δ 10,5 – 13,0 ppm referem-se aos dois prótons lábeis **NH** sulfonamídico e **COOH** carboxílico (H10 e H12 respectivamente). A integração dessa região no espectro do complexo revela a perda de um dos prótons lábeis na coordenação do gálio(III) à sulfassalazina. As modificações anteriormente discutidas sugerem a desprotonação do H12, carboxílico, e a coordenação do grupo carboxilato ao gálio(III).

No espectro da sulfassalazina, o sinal centrado em δ 7,77 e o sinal centrado em δ 6,86 correspondem aos prótons do anel piridínico nas posições *para* e *meta* ao heteroátomo N. No espectro do complexo, esses sinais não se deslocam, o que pode ser um indício do não envolvimento da piridina na coordenação.

Essas modificações estão em acordo com a proposta de coordenação da sulfassalazina ao gálio(III) de forma bidentada, através dos grupos carboxilato e fenolato resultantes da desprotonação de ambos os oxigênios.

3.3.5 Espectro de massas

No espectro de massas ESI-MS no modo positivo, um pico em m/z 482,77 (Figura 54-a) corresponde à espécie $[\text{Ga}(\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{O}_5\text{N}_4\text{S})(\text{H}_2\text{O})]^+$ em solução, formada pela perda do ligante OH⁻ da espécie neutra. A expansão do espectro na região do pico está de acordo com a distribuição isotópica simulada para a espécie sugerida (Figura 54-b)

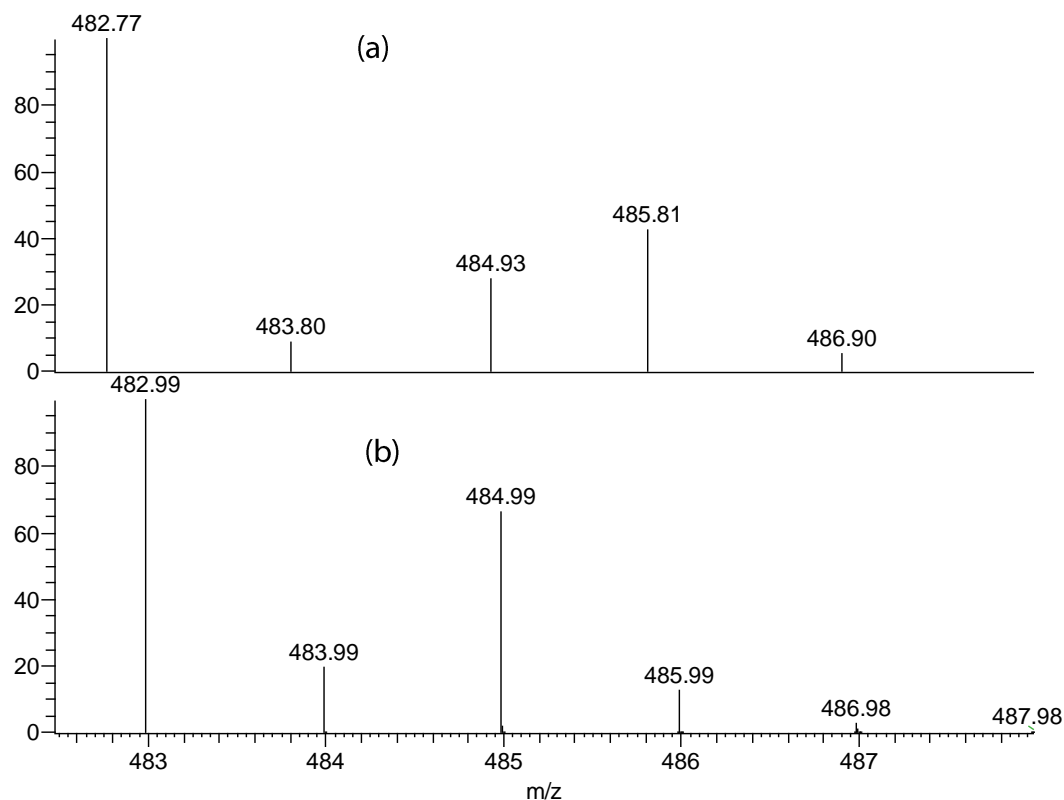


Figura 54 - Região expandida do espectro ESI- MS em metanol, evidenciando o pico em 482,77, atribuído à espécie $[\text{Ga}(\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{O}_5\text{N}_4\text{S})(\text{H}_2\text{O})]^+$ em solução (a), e sua respectiva distribuição isotópica simulada (b).

3.3.6 Atividade antibacteriana (MIC - Concentração mínima inibitória)

O efeito antibacteriano da sulfassalazina e do complexo $[\text{Ga}(\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{O}_5\text{N}_4\text{S})(\text{H}_2\text{O})(\text{OH})]$ foi estudado em 6 linhagens bacterianas e os valores de MIC obtidos encontram-se na Tabela 12.

Tabela 12 - Concentração mínima inibitória (MIC) / $\mu\text{mol L}^{-1}$ da sulfassalazina ($\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_5\text{S}$) e do complexo $[\text{Ga}(\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{O}_5\text{N}_4\text{S})(\text{H}_2\text{O})(\text{OH})]$.

Linhagem de bactéria		MIC / $\mu\text{mol L}^{-1}$		
		$\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$	sulfassalazina	$[\text{Ga}(\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{O}_5\text{N}_4\text{S})(\text{H}_2\text{O})(\text{OH})]$
<i>E. coli</i>	ATCC 25922	> 501	> 643	>511
<i>S. aureus</i>	ATCC 25923	> 501	> 643	>511
<i>P. aeruginosa</i>	ATCC 27853	501	> 643	255
<i>S. typhimurium</i>	ATCC 13311	> 501	> 643	>511
<i>S. sonnei</i>	ATCC 11060	> 501	> 643	>511
<i>S. dysenteriae</i>	ATCC 13313	> 501	643	511

À semelhança do complexo de bismuto(III), o complexo de gálio(III) da sulfassalazina não apresentou atividade antibacteriana significativa. Entretanto, nota-se atividade contra a *P. aeruginosa*, embora o valor de MIC encontrado não tenha sido baixo.

Sabe-se que o gálio(III) é capaz de mimetizar o Fe(III), principalmente pelo fato de que a razão carga/raio desses íons é similar. Assim, muitos sistemas biológicos são incapazes de distingui-los, possibilitando ao gálio(III) ser adquirido em vez do Fe(III), ligando-se a sítios de Fe(III) da transferrina, e impedindo processos biológicos que dependem do Fe(III), uma vez que o gálio(III) não é eletroativo [74].

O íon Fe(III) é essencial para o crescimento da maioria dos microrganismos, uma vez que é necessário em vários caminhos metabólicos e na síntese do ADN. gálio(III) é adquirido por certas bactérias através da ligação a sítios de Fe(III) da transferrina, sendo incorporado por fagócitos mononucleares em sítios de inflamação [74].

KANEKO *et al* demonstraram que o nitrato de gálio(III) inibe o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* e a formação de biofilme *in vitro*, e que o gálio atua diminuindo a entrada de íons ferro, essencial no metabolismo bacteriano. Portanto, é provável que a atividade do complexo de gálio da sulfassalazina contra *P. aeruginosa* esteja relacionada com a absorção de gálio(III) em lugar de Fe(III), perturbando processos celulares que dependem essencialmente do Fe(III) [74].

REFAT *et al* sintetizaram uma série de complexos de sulfassalazina do tipo $[M(\text{saz})(\text{H}_2\text{O})_4]$ com os metais alcalinos terrosos Mg(II), Ca(II), Sr(II) e Ba(II) onde a sulfassalazina também atuou como ligante bidentado através do carboxilato e do fenolato. Os compostos obtidos foram testados pelo método de disco-difusão em 5 linhagens de bactérias, dentre as quais a *Pseudomonas aeruginosa*. O ligante sulfassalazina e os complexos não foram ativos contra a *Pseudomonas aeruginosa*, exceto o composto de Sr(II), que apresentou zona de inibição de 2 cm [153].

3.3.7 Atividade citotóxica em células tumorais

O efeito do composto $[\text{Ga}(\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{O}_5\text{N}_4\text{S})(\text{H}_2\text{O})(\text{OH})]$ no crescimento das células tumorais foi estudado e observou-se que o composto inibiu o crescimento das células K562 na $\text{CI}_{50} =$

18,6 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Entretanto, esta atividade não difere significativamente da atividade antitumoral da sulfassalazina livre, que foi $\text{Cl}_{50} = 21,1 \mu\text{mol L}^{-1}$. Uma possível explicação para este resultado seria a dissociação do complexo dentro das células liberando a sulfassalazina livre. O nitrato de gálio apresentou $\text{Cl}_{50} = 35,6 \mu\text{mol L}^{-1}$ nas mesmas condições.

3.4 Complexo 4 – $[\text{Bi}(\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_8)(\text{H}_2\text{O})\text{Cl}_2]$

Composto de bismuto(III) da tetraciclina

Aquadicloro(tetraciclinato)bismuto(III)

3.4.1 Análise Elementar: C, H, N e Bi

Os teores (%) de C, H, e N, bem como o teor (%) do íon metálico estão apresentados na Tabela 13, juntamente com os valores calculados para a estrutura $[\text{Bi}(\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_8)(\text{H}_2\text{O})\text{Cl}_2]$, $\text{MM} = 741,33 \text{ g mol}^{-1}$.

Tabela 13 - Valores de CHN e Bi, experimental e calculado para a proposta $[\text{Bi}(\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_8)(\text{H}_2\text{O})\text{Cl}_2]$.

Elemento	% C	% H	% N	% Bi
Calculado	35,64	3,40	3,78	28,19
Experimental	35,99	3,58	3,64	26,66

Os resultados de C, H, N e Bi sugerem um composto de fórmula mínima $\text{BiC}_{22}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_9\text{Cl}_3$, de acordo com a fórmula proposta $[\text{Bi}(\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_8)(\text{H}_2\text{O})\text{Cl}_2]$, em que o bismuto(III) está coordenado a uma molécula de tetraciclina desprotonada, dois íons cloreto e uma molécula de água.

3.4.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

A tetraciclina possui vários grupos ativos na região do infravermelho. DZIEGIELEWSKI *et al.* [156] estudaram os espectros de vários compostos da família das tetraciclina e fizeram atribuições bastante precisas aos modos vibracionais apresentados pelos compostos, entre eles o cloridrato de tetraciclina.

O espectro de absorção na região do infravermelho, obtido para o cloridrato de tetraciclina, está apresentado na Figura 55 e a região abaixo de 1800 cm^{-1} do espectro foi ampliada para melhor distinção das bandas (Figura 56).

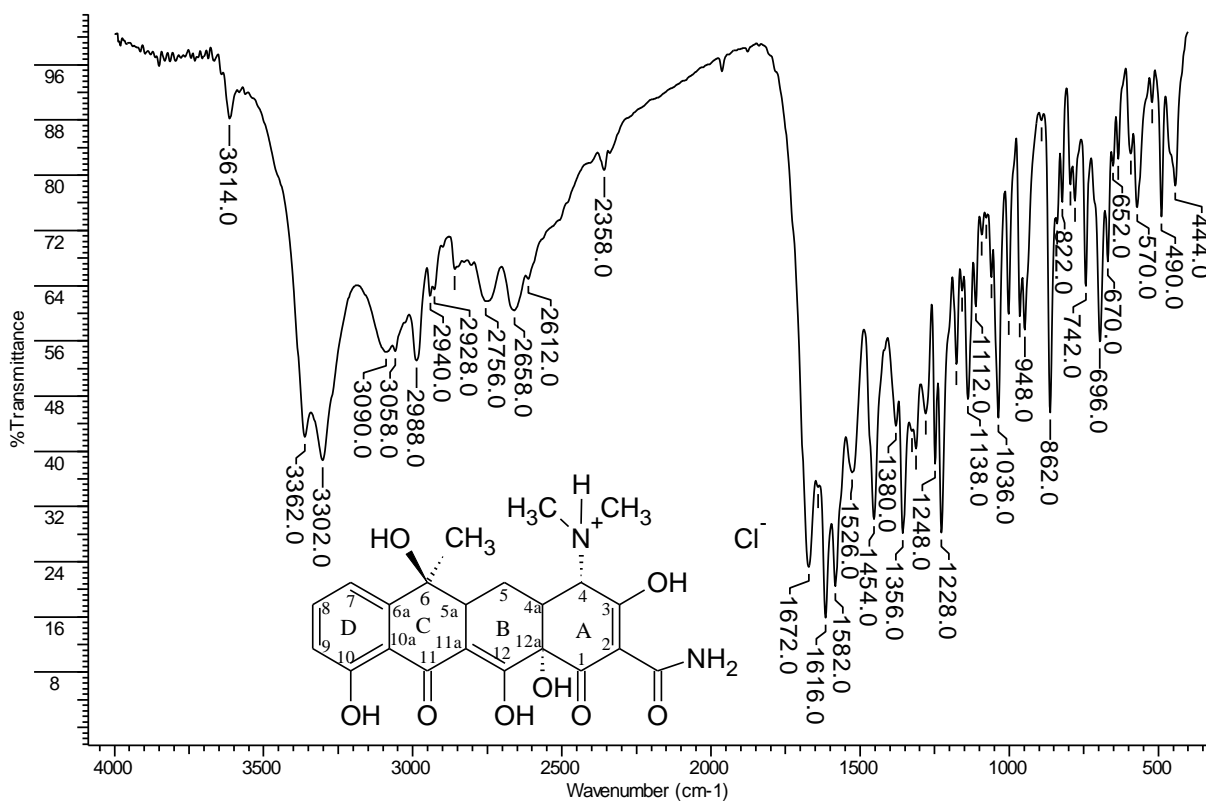


Figura 55 - Espectro na região do infravermelho para o cloridrato de tetraciclina ($\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_8$)Cl, em KBr.

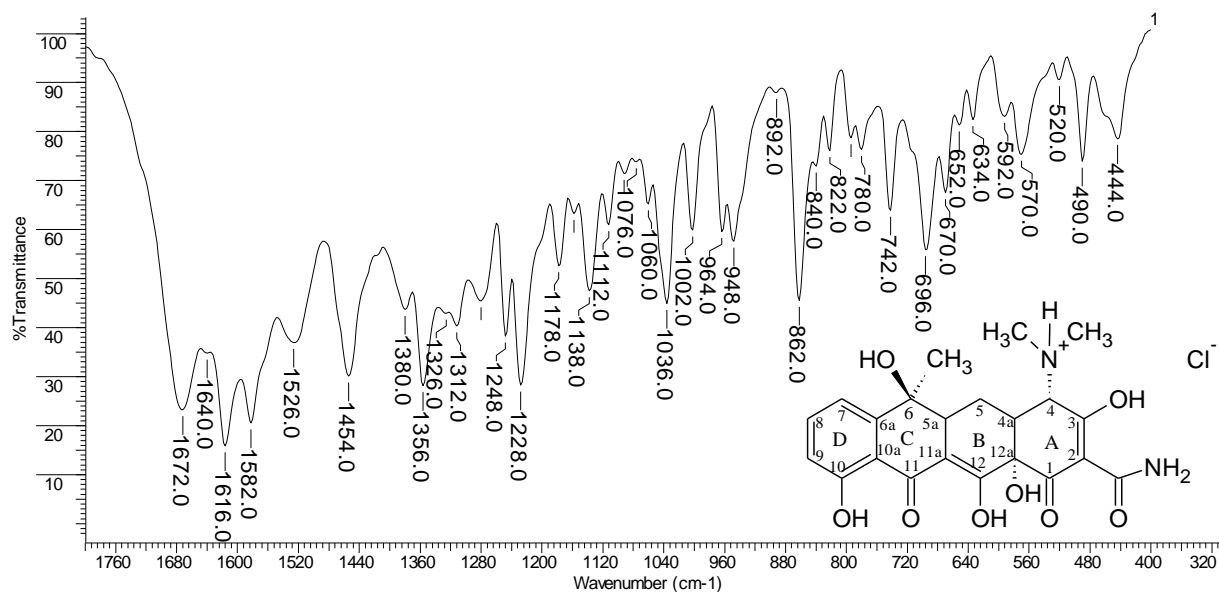


Figura 56 - Região ampliada do espectro de infravermelho do cloridrato de tetraciclina ($C_{22}H_{25}N_2O_8$)Cl, em KBr.

Na região de alta frequência do espectro da tetraciclina, observam-se as bandas de estiramento ν_{OH} (3614 cm^{-1}), $\nu_s NH_2$ (3362 cm^{-1}) e $\nu_{as} NH_2$ (3302 cm^{-1}).

A tetraciclina apresenta um conjunto de bandas muito fortes na região das carbonilas:

- A banda de estiramento $\nu_{C=O}$ da amida, em 1672 cm^{-1} .
- A banda de estiramento da carbonila $\nu_{C_1=O}$, em 1616 cm^{-1} .
- A banda de estiramento da carbonila $\nu_{C_{11}=O}$, em 1582 cm^{-1}

O grupo amida apresenta vários modos vibracionais que absorvem na região do infravermelho. Uma banda em 1526 cm^{-1} e outra em 696 cm^{-1} referem-se a modos vibracionais deste grupo.

Estas e outras bandas atribuídas ao espectro de absorção da tetraciclina na região do infravermelho foram listadas na Tabela 14, com base na literatura [156].

Tabela 14 – Atribuição de bandas (cm^{-1}) na região do infravermelho para o cloridrato de tetraciclina em KBr.

Atribuição	Número de ondas (cm^{-1})
v (OH)	3614
ν_{as} (NH_2)	3362 (forte)
ν_{s} (NH_2)	3302 (forte)
v (CH) (esqueleto)	2988 (média)
Ligação de hidrogênio	2756, 2658, 2612 (muito fraca)
Amida I	1672 (muito forte)
v (C_1O) (anel A)	1616 (muito forte)
v (C_{11}O) (anel C e anel D)	1582 (muito forte)
Amida II	1526 (forte)
CC anel e ν_{as} (CH_3)	1454 (forte)
δ_{s} ($\text{C}-\text{CH}_3$), δ (COH)	1356
Amida II	1326 (média)
Amida III	1248 (forte) e 1228 (m. forte)
γ (CH)	862, 780, 742
Amida V	696
Amida IV	670, 570

O espectro do complexo de bismuto(III) da tetraciclina apresenta várias modificações em relação ao espectro da tetraciclina livre, indicando que houve complexação. O espectro do complexo de bismuto(III) está apresentado na Figura 57.

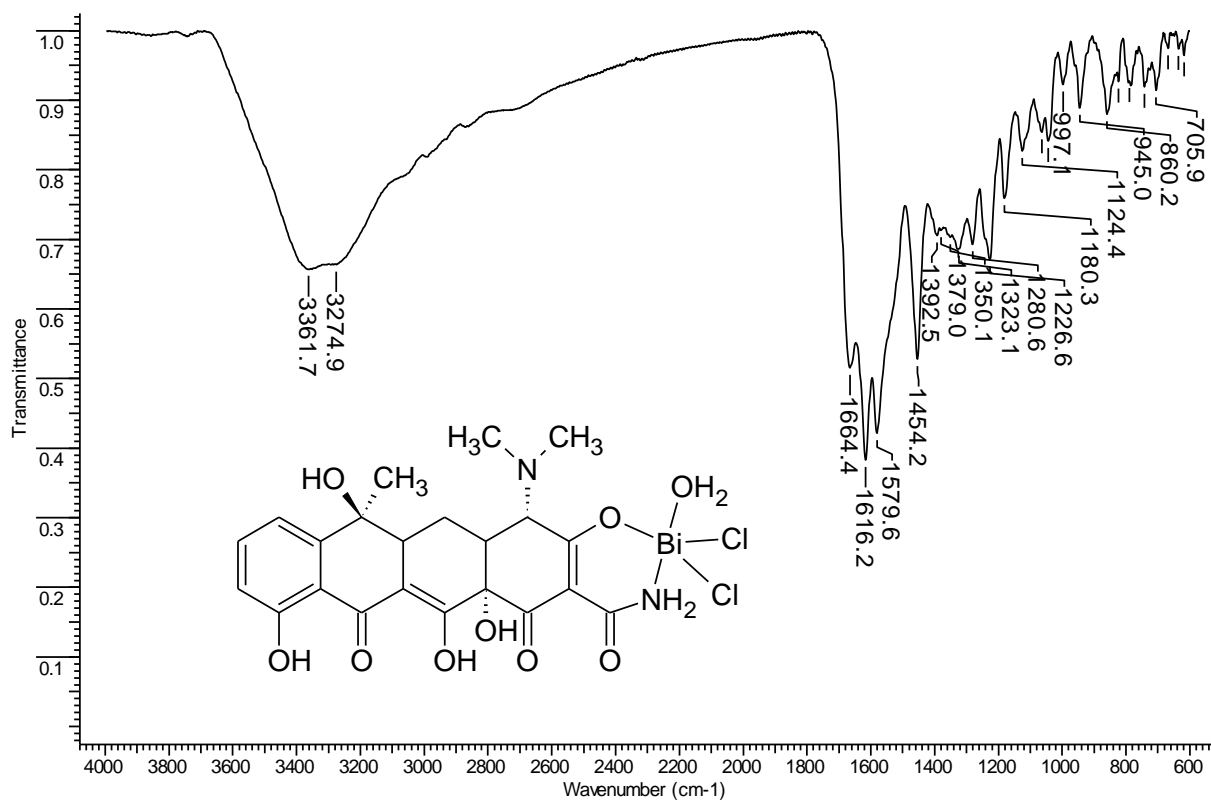


Figura 57 - Espectro na região do infravermelho, obtido para o complexo $[\text{Bi}(\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_8)(\text{H}_2\text{O})\text{Cl}_2]$, em KBr.

A região abaixo de 1800 cm^{-1} do espectro do complexo de bismuto(III) foi ampliada para melhor distinção das bandas (Figura 58).

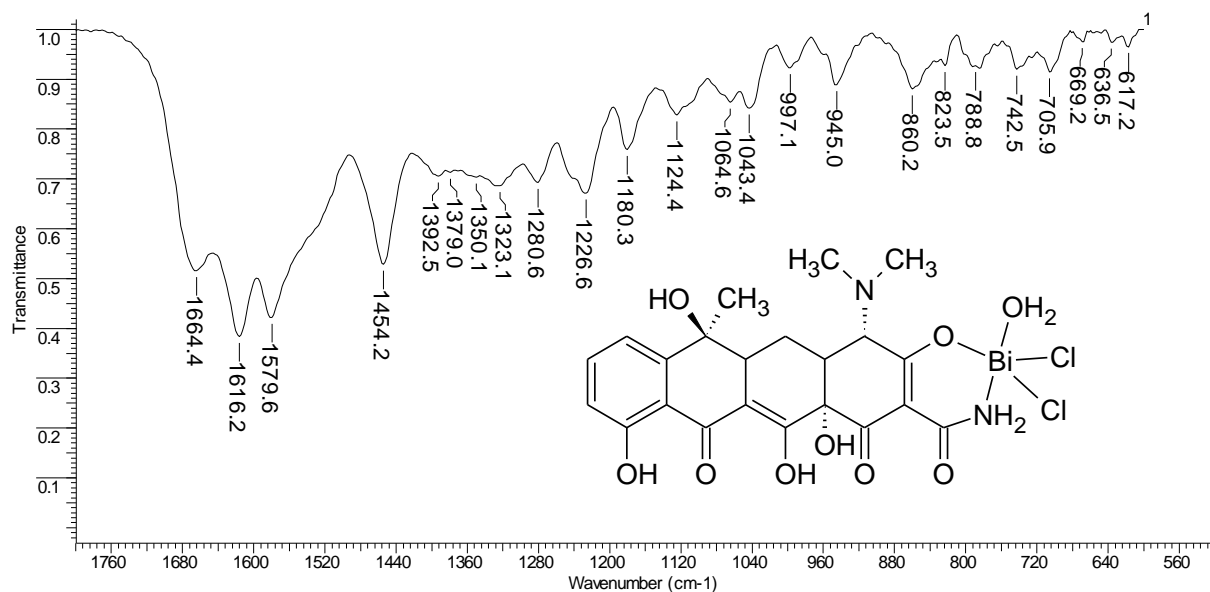


Figura 58 - Região ampliada do espectro IV do complexo $[\text{Bi}(\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_8)(\text{H}_2\text{O})\text{Cl}_2]$.

Em relação ao espectro da tetraciclina, várias modificações no espectro do complexo de bismuto(III) podem ser observadas.

As bandas de ν_{OH} (3614 cm^{-1}), $\nu_{\text{as}}\text{NH}_2$ (3362 cm^{-1}) e $\nu_{\text{s}}\text{NH}_2$ (3302 cm^{-1}) no espectro da tetraciclina, se juntam constituindo uma banda muito larga em 3362 e um ombro largo em 3275 cm^{-1} no espectro do complexo.

A banda $\nu_{\text{C=O}}$ da amida, em 1672 cm^{-1} no espectro da tetraciclina, aparece em 1664 cm^{-1} no espectro do complexo, região de menor energia, o que sugere a participação do grupo amida na coordenação ao bismuto(III).

A banda em 1526 cm^{-1} (amida II) no espectro da tetraciclina, está ausente no espectro do complexo de bismuto(III), ou desloca-se para maior frequência sobrepondo-se com a banda $\nu_{\text{C}_{11}=\text{O}}$ em 1580 cm^{-1} . A banda do modo vibracional amida V em 696 cm^{-1} no espectro da tetraciclina, aparece deslocada no espectro do complexo, em 706 cm^{-1} .

As bandas referentes às carbonilas $\nu_{\text{C}_1=\text{O}}$ e $\nu_{\text{C}_{11}=\text{O}}$, respectivamente em 1616 e 1582 no espectro da tetraciclina, permanecem praticamente inalteradas no espectro do complexo,

sendo observadas em 1616 e 1580 cm^{-1} . A permanência dessas bandas inalteradas no espectro do complexo descarta a possibilidade de coordenação desses sítios ao bismuto(III).

Esses resultados sugerem o envolvimento do grupo amida da tetraciclina na coordenação ao bismuto(III).

3.4.3 Condutimetria

A condutividade do composto $[\text{Bi}(\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_8)(\text{H}_2\text{O})\text{Cl}_2]$ em DMF foi $12,76 \text{ ohm}^{-1} \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$. Este valor está bem abaixo da faixa de referência para eletrólitos 1:1 (65 a $90 \text{ ohm}^{-1} \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$) [124], o que sugere um composto neutro.

3.4.4 Ressonância magnética nuclear de hidrogênio- RMN ^1H

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^1H pode ser usada para monitorar os sítios de ligação da tetraciclina a íons metálicos. Duas regiões no espectro de RMN ^1H da tetraciclina são de interesse especial na atribuição do sítio de ligação: os prótons do grupo dimetilamônio, o próton em C4 no anel A, e os prótons aromáticos no anel D, que podem indicar se a coordenação ocorre no anel A ou no sistema ceto-fenólico dos anéis BCD [123, 157].

Há vários estudos na literatura utilizando RMN ^1H como ferramenta de análise sobre a estereoquímica e reatividade das tetraciclinas [158-161]. Entretanto, devido à complexidade da estrutura molecular das tetraciclinas e ao grande número de sítios potencialmente complexantes, a literatura apresenta algumas controvérsias sobre a localização destes sítios.

CASY e YASIN [158] estudaram o espectro de RMN de ^1H de vários antibióticos da família das tetraciclinas. ASLESON *et al.* [162] fizeram um estudo dos sinais observados no espectro de RMN ^1H do cloridrato de tetraciclina e atribuíram 4 sinais do espectro, cuja atribuição era anteriormente controversa. Através de comparações com espectros de tetraciclinas modificadas e compostos-modelo, os autores atribuíram os sinais em δ 9,10 e δ 9,59 aos dois prótons da amida. A não-equivalência desses prótons foi justificada pela contribuição das formas canônicas mostradas na Figura 59.

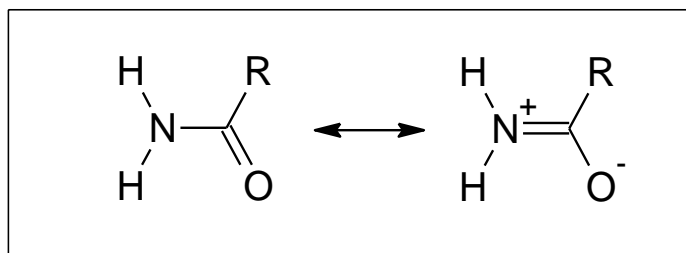


Figura 59 – Formas canônicas não-equivalentes, do grupo amida das tetraciclina.

O sinal em δ 11,80 foi atribuído ao próton da hidroxila em (C10)OH, e o sinal em δ 15,11 foi atribuído ao próton da hidroxila em (C12)OH.

Os espectros de RMN ^1H da tetraciclina e do complexo $[\text{Bi}(\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_8)(\text{H}_2\text{O})\text{Cl}_2]$ estão na Figura 60 e Figura 61, respectivamente.

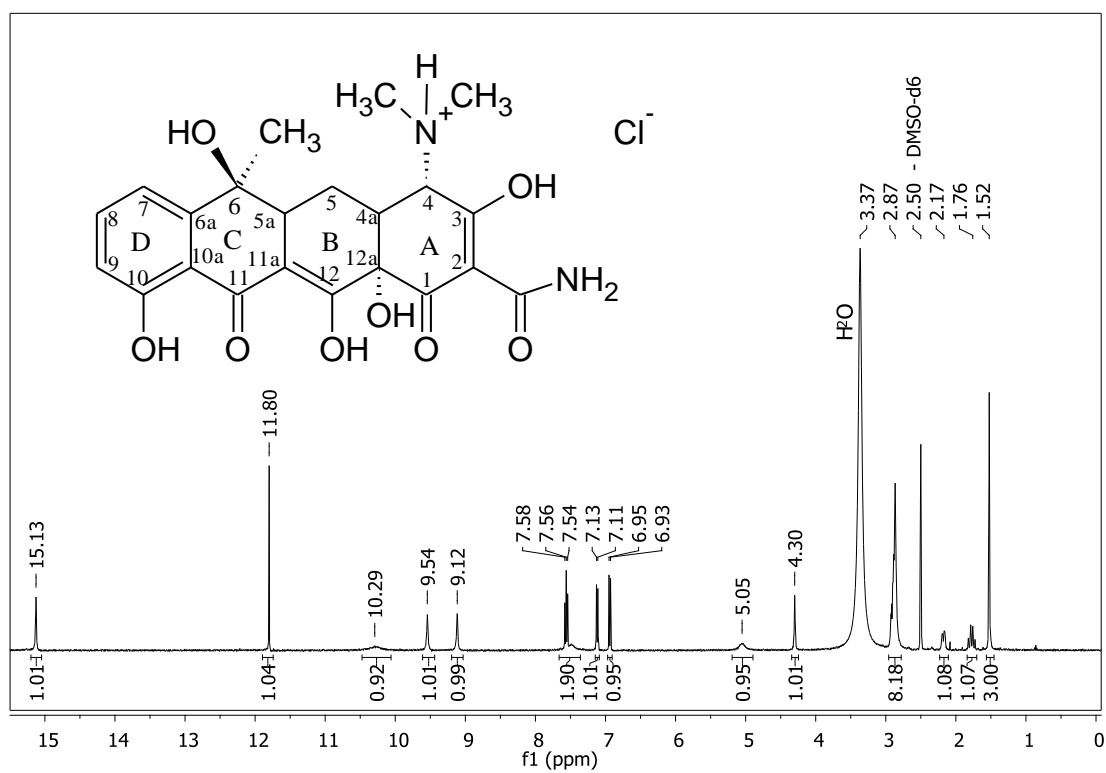


Figura 60 - Espectro de RMN ^1H obtido para o cloridrato de tetraciclina, $(\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_8)\text{Cl}$, em DMSO-d_6 .

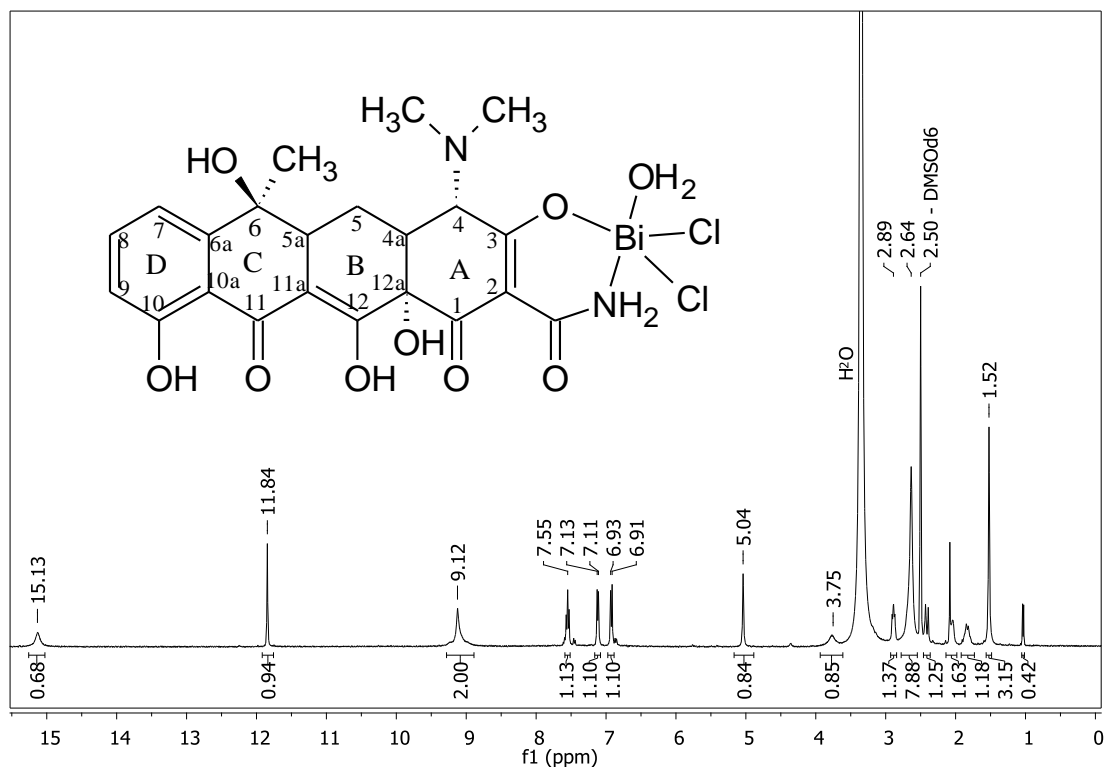


Figura 61 - Espectro de RMN ^1H , em DMSO-d_6 , para o complexo $[\text{Bi}(\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_8)(\text{H}_2\text{O})\text{Cl}_2]$ obtido no espectrômetro de 400 MHz

As atribuições dos sinais de RMN ^1H aos respectivos prótons da tetraciclina e do complexo $[\text{Bi}(\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_8)(\text{H}_2\text{O})\text{Cl}_2]$ estão descritas Tabela 15.

Tabela 15 – Atribuições dos sinais de RMN ^1H do cloridrato de tetraciclina- $(\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_8)\text{Cl}$, e do composto $[\text{Bi}(\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_8)(\text{H}_2\text{O})\text{Cl}_2]$, em DMSO-d_6

Atribuição (Integral)	tetraciclina δ / ppm (multiplicidade)	$[\text{Bi}(\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_8)(\text{H}_2\text{O})\text{Cl}_2]$ δ / ppm (multiplicidade)
(C6) CH_3	1,52 (s)	1,52 (s)
(C4) $\text{N}(\text{CH}_3)_2$	2,87 (s)	2,64 (s)
(C4) H	4,30 (s)	3,75 (s)
(C6) OH	5,05 (s)	5,04 (s)
(C9) H (arom.)	6,94 (d)	6,92 (d)
(C7) H (arom.)	7,12 (d)	7,12 (d)
(C8) H (arom.)	7,56 (t)	7,55 (t)
(C2) CO-NH_2	9,12 e 9,54 (s)	9,12 (s)
(C10) OH	11,80 (s)	11,84 (s)
(C12) OH	15,13 (s)	15,13 (s)

O sinal em δ 2,87 é atribuído aos 6 prótons do grupo dimetilamônio. Esses prótons não são lábeis e seu deslocamento químico é afetado pela coordenação metálica em sítios do anel A. No espectro do complexo observa-se que a coordenação ao bismuto deslocou este sinal para δ 2,64 ($\Delta\delta = -0,23$ ppm).

O sinal em δ 4,30 ppm referente ao próton em C4 no espectro do ligante, desloca-se para 3,75 no espectro do complexo ($\Delta\delta = -0,55$ ppm).

Essas mudanças indicam a coordenação nos sítios do anel A. Entretanto, existem duas possibilidades de coordenação bidentada neste anel envolvendo o oxigênio em C3 (após desprotonação) e a amida em C2:

- Através do oxigênio em C3 e do **oxigênio da amida**;
- Através do oxigênio em C3 e do **nitrogênio da amida**.

Os sinais observados no espectro da tetraciclina em δ 9,12 e 9,54 são atribuídos aos dois prótons do grupo amida, cujas formas canônicas existentes por efeito mesomérico não são equivalentes, conforme explicado anteriormente. Analisando o espectro do complexo de bismuto, podemos observar que os dois sinais referentes aos prótons da amida tornaram-se apenas um sinal em δ 9,12 no espectro do complexo, cuja integral é igual a 2, ou seja, os prótons da amida tornaram-se equivalentes após a coordenação ao bismuto. Essa mudança sugere a coordenação via **nitrogênio da amida**, no qual o único par de elétrons disponível para a ressonância com a carbonila se tornaria indisponível, uma vez que estaria envolvido na ligação covalente coordenada com o bismuto no complexo.

Os prótons aromáticos do anel D aparecem em δ 6,94, 7,12 e 7,56 no espectro da tetraciclina, e praticamente estão inalterados no espectro do complexo (δ 6,92, 7,12 e 7,55) indicando que o sistema ceto-enólico contendo C10 e C11 está preservado no complexo, não participando da coordenação.

No espectro da tetraciclina, o próton da hidroxila em C10 dá origem a um sinal em δ 11,80 e o próton da hidroxila em C12 tem sinal em δ 15,13. Esses prótons permanecem no complexo, indicando o não envolvimento desses sítios na coordenação.

A hidroxila em C6 dá origem a um sinal em δ 5,05 na tetraciclina que permanece no complexo. O sinal em δ 1,52, cuja integração corresponde a 3 hidrogênios, é atribuído ao grupo metila em C6 e não sofre qualquer deslocamento.

Com base nos resultados apresentados, analisados em conjunto com aqueles discutidos nos itens anteriores, propomos que a tetraciclina coordena-se ao bismuto(III) de modo bidentado através do nitrogênio da amida e do oxigênio da hidroxila em C3, após desprotonação.

3.4.5 Espectro de massas

No espectro de massas ESI-MS no modo positivo, um pico em m/z 705,08 corresponde ao íon molecular $[\text{Bi}(\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_8)(\text{H}_2\text{O})\text{Cl}_2]^{+\bullet}$ ($\text{M}^{+\bullet}$), formado pela remoção de um elétron da espécie neutra, confirmando a presença do complexo em solução. Na Figura 62, podem ser observados o pico experimental isolado (a) e a distribuição isotópica simulada para a espécie, (b).

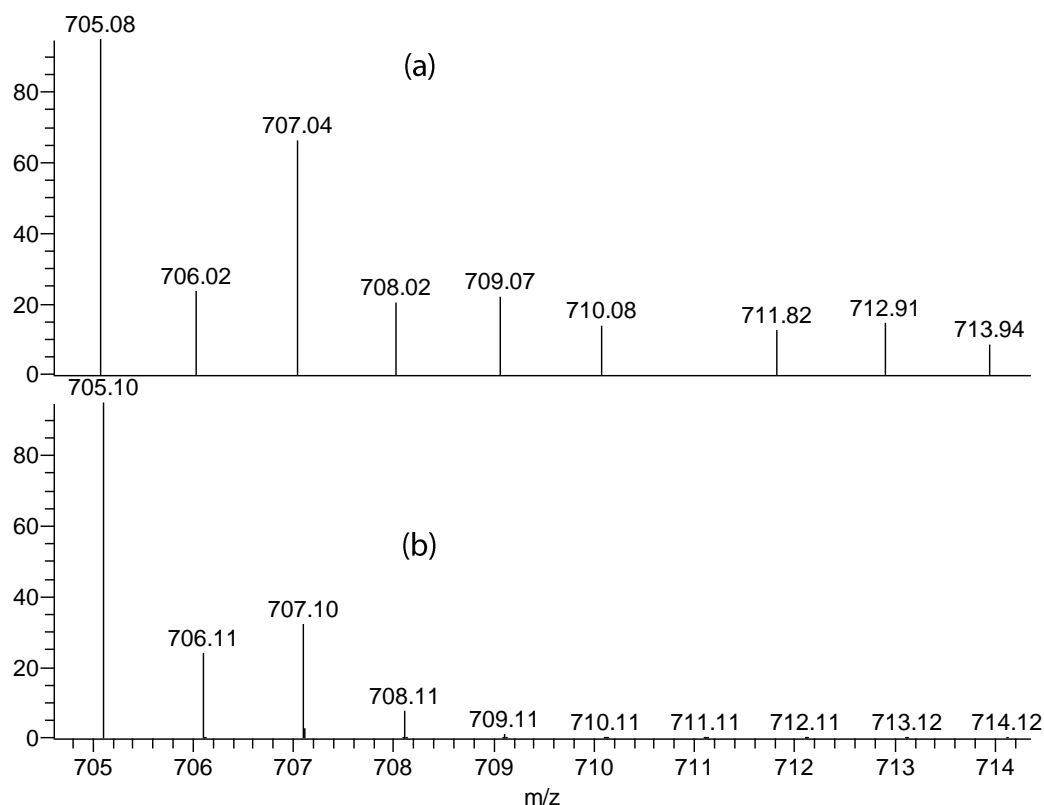


Figura 62 - Região expandida do espectro ESI-MS em metanol, evidenciando o pico em 705,08, atribuído à espécie $[\text{Bi}(\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_8)(\text{H}_2\text{O})\text{Cl}_2]^+\bullet$ em solução (a), e sua respectiva distribuição isotópica simulada (b).

3.4.6 Atividade antibacteriana (MIC - Concentração mínima inibitória)

O efeito antibacteriano da tetraciclina e do complexo $[\text{Bi}(\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_9)\text{Cl}_2(\text{H}_2\text{O})]$ foi estudado em 9 linhagens de bactérias e os valores de MIC obtidos estão indicados na Tabela 16.

Tabela 16 - MIC/ $\mu\text{mol L}^{-1}$, da tetraciclina e do complexo $[\text{Bi}(\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_9)\text{Cl}_2(\text{H}_2\text{O})]$.

Linhagem de Bactéria		MIC / $\mu\text{mol L}^{-1}$		
		BiCl_3	tetraciclina	$[\text{Bi}(\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_9)\text{Cl}_2(\text{H}_2\text{O})]$
1- <i>S. dysenteriae</i>	ATCC 13313	406	1	1
2- <i>S. sonnei</i>	ATCC 11060	> 406	2	5
3- <i>S. aureus</i>	ATCC 25923	> 406	1	1
4- <i>S. tiphymurium</i>	ATCC 13311	> 406	2	3
5- <i>P. aeruginosa</i>	ATCC 27853	> 406	66	22
6- <i>E. coli</i> BH 100		> 406	33	1

7- <i>Salmonella</i> MG 031	> 406	266	173
8- <i>E. coli</i> MC 1061	> 406	1	6
9- <i>E. coli</i> MC 1061 / pBR 322	> 406	266	65

Não há um limite pré-estabelecido e único de MIC no qual um microrganismo é considerado sensível ou resistente a um fármaco. Estes valores dependem do fármaco e da linhagem bacteriana. Para a tetraciclina, em geral, são consideradas sensíveis as linhagens que foram totalmente inibidas em concentração menor que $8 \mu\text{mol L}^{-1}$ [30].

Na Tabela 16, observa-se que a MIC foi atingida para todas as linhagens de bactérias até a concentração testada, tanto para a tetraciclina livre quanto para o complexo de bismuto(III).

Na linhagem Gram-positiva *S. aureus*, a tetraciclina livre e o complexo de bismuto foram igualmente ativos.

Nas linhagens Gram-negativas sensíveis à tetraciclina (linhagens nº 1, 2, 4 e 8) observa-se que a atividade do complexo de bismuto foi ligeiramente menor que a da tetraciclina livre, com exceção da linhagem 1, onde a MIC foi igual para a tetraciclina livre e para o complexo de Bismuto. As tetraciclina atravessam a membrana externa das bactérias Gram-negativas por difusão passiva, através de canais hidrofílicos nas porinas da membrana externa. Uma explicação possível para a atividade ligeiramente reduzida do complexo nas linhagens Gram-negativas sensíveis à tetraciclina é que o complexo de bismuto tenha menor afinidade pelos canais hidrofílicos das porinas na membrana externa dessas bactérias e o influxo do complexo tenha sido reduzido.

Por outro lado, o resultado relevante (que é o objetivo central deste trabalho) é que o complexo de bismuto foi mais ativo contra todas as linhagens **resistentes** à tetraciclina.

O complexo de bismuto foi 3 vezes mais ativo que a tetraciclina livre contra a linhagem resistente Gram-negativa *P. aeruginosa*. Essa bactéria é comumente encontrada em infecções hospitalares e, por causa da alta resistência a antibióticos e do grande arsenal de fatores de virulência desta bactéria, as infecções causadas por ela são de difícil controle. A *P. aeruginosa* é intrinsecamente resistente a vários antimicrobianos, incluindo cloranfenicol, tetraciclina, algumas quinolonas e betalactâmicos. Os mecanismos de resistência mais

comumente descritos nesta linhagem são a redução da permeabilidade da membrana da bactéria e bombas de efluxo, que transportam o antibiótico para fora da célula bacteriana [6].

O complexo de bismuto(III) foi apenas ligeiramente mais ativo contra a linhagem resistente *Salmonella MG 031*, enquanto que o ligante livre foi ligeiramente mais ativo que o complexo contra *S. sonnei* e *S. tiphymurium*.

As bactérias apresentam diferentes mecanismos de absorção, podendo a nova estrutura (do complexo) favorecer a sua absorção em relação ao ligante livre em uma espécie, ou dificultar a sua absorção em outra espécie.

O complexo e o ligante apresentaram a mesma atividade contra *S. aureus* e *S. dysenteriae*.

Vale a pena destacar a atividade do complexo de bismuto nas linhagens resistentes de *E. coli*. A linhagem *E. coli BH 100*, da coleção do Laboratório de Genética de Microrganismos da UFMG, possui o gene *aadA*, o qual confere resistência à estreptomicina, espectiomicina e aos aminoglicosídeos, sendo portanto multirresistente [163]. O complexo de bismuto(III) da tetraciclina foi 33 vezes mais ativo do que o antibiótico livre nesta linhagem multirresistente, apresentando MIC de $1 \mu\text{mol L}^{-1}$. Esse valor de MIC está abaixo do limite para cepas sensíveis à tetraciclina ($< 8 \mu\text{mol L}^{-1}$), enquanto a MIC de $33 \mu\text{mol L}^{-1}$ obtida para a tetraciclina livre está acima desse limite. Ou seja, o complexo de bismuto(III) reverteu totalmente a resistência nesta linhagem multirresistente.

É igualmente importante salientar que, embora o complexo de bismuto(III) tenha sido 6 vezes menos ativo que a tetraciclina contra a linhagem sensível *E. coli MC 1061*, o complexo foi 4 vezes mais ativo que a tetraciclina contra a linhagem resistente *E. coli MC 1061 / pBR 322*, onde foi inserido o plasmídeo pBR 322¹², carreador de genes que conferem resistência à tetraciclina. Um fator de resistência (FR) pode ser calculado dividindo-se o valor da MIC na cepa resistente *E. coli MC 1061 / pBR 322* pela MIC na cepa sensível parental *E. coli MC 1061*. Obtém-se um FR de 266 para a tetraciclina e de apenas 11 para o complexo. Em

¹² pBR322 é um dos plasmídios mais utilizados de clonagem em *E. coli*. Foi o primeiro plasmídio artificial. Criado em 1977, o seu nome deriva de p (plasmídio) e BR, Bolivar e Rodriguez, os criadores, de origem mexicana. Possui genes que codificam proteínas de resistência à ampicilina e à tetraciclina (wikipédia).

outras palavras, a inserção do plasmídeo pBR 322 tornou esta cepa de *E. coli* 266 vezes resistente à tetraciclina e apenas 11 vezes resistente ao complexo de bismuto(III).

Esta linhagem resistente apresenta em sua membrana plasmática uma proteína transportadora, a Tet(A), que transporta a tetraciclina, na forma de um complexo de magnésio, para fora da célula contra a entrada de um próton. O modo pelo qual os complexos conseguem driblar o mecanismo da resistência à tetraciclina não foi elucidado. Pode-se especular que a Tet(A) não seja capaz de reconhecer e transportar o complexo de bismuto para fora da célula.

Estes resultados são extremamente importantes devido à crescente resistência apresentada às tetraciclina, sendo que esta resistência tem sido o maior obstáculo para a continuidade de seu uso clínico.

3.4.7 Atividade citotóxica em células tumorais

O efeito do composto $[\text{Bi}(\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_8)(\text{H}_2\text{O})\text{Cl}_2]$ no crescimento de células tumorais foi estudado e a curva dose-resposta obtida está apresentada na Figura 63.

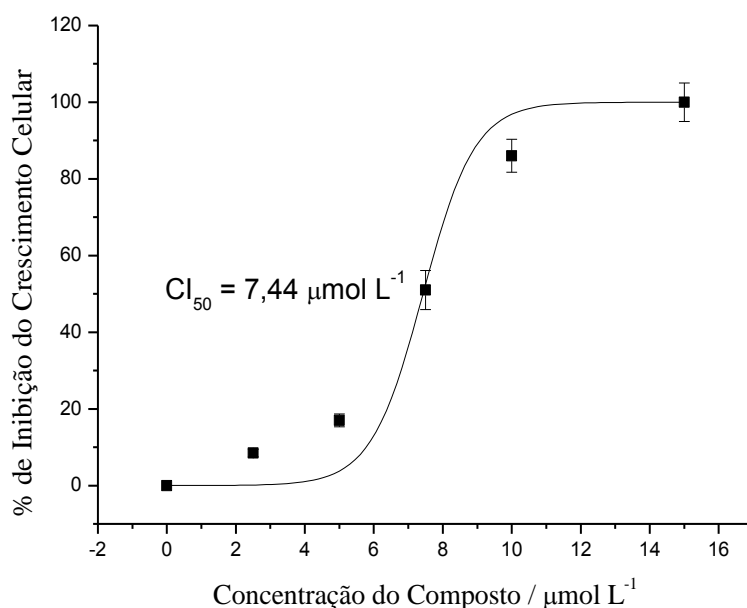


Figura 63 - Efeito do composto $[\text{Bi}(\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_8)(\text{H}_2\text{O})\text{Cl}_2]$ no crescimento de células K562, incubadas por 72 h.

O complexo de bismuto(III) inibiu o crescimento das células tumorais com um valor de $Cl_{50} = 7,44 \mu\text{mol L}^{-1}$, enquanto que a tetraciclina apresentou a $Cl_{50} = 52,4 \mu\text{mol L}^{-1}$, ou seja, o complexo é 7 vezes mais ativo que o ligante livre. Este valor de Cl_{50} é significativo, situando-se entre os valores obtidos para a cisplatina, que é de $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ e para a carboplatina, que é de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ nas mesmas condições. O complexo de bismuto(III) da tetraciclina também foi mais ativo do que um complexo de platina(II) da tetraciclina, $[\text{PtCl}_2(\text{tc})]$, sintetizado no grupo de pesquisa da prof^a Elene C. Pereira Maia, cuja Cl_{50} foi de $9,39 \mu\text{mol L}^{-1}$ na mesma linhagem celular [164]. Estes resultados colocam este composto como um promissor agente antitumoral.

3.5 Complexo 5 – $[\text{Ga}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_8)_2](\text{NO}_3)$

Composto de gálio(III) da tetraciclina

Nitrato de diaquabis(tetraciclinato)gálio(III)

3.5.1 Análise Elementar: C, H, N e Ga

Os teores (%) de C, H, e N, bem como o teor (%) do íon metálico estão apresentados na Tabela 17, juntamente com os valores calculados para a fórmula $[\text{Ga}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_8)_2](\text{NO}_3)$, $MM = 1054,61 \text{ g mol}^{-1}$

Tabela 17 - Valores de CHN e Ga, experimental e calculado para $[\text{Ga}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_8)_2](\text{NO}_3)$.

Elemento	% C	% H	% N	% Ga
Calculado	50,11	4,78	6,64	6,61
Experimental	49,65	4,75	6,67	6,59

Os resultados de C, H, N e Bi sugerem um composto de fórmula mínima $\text{GaC}_{44}\text{H}_{50}\text{N}_5\text{O}_{21}$, e estão de acordo com a fórmula proposta $\text{Ga}(\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_8)_2(\text{H}_2\text{O})_2(\text{NO}_3)$, em que o gálio(III) está coordenado a duas moléculas de tetraciclina desprotonadas e duas moléculas de água. O íon nitrato atua como contra-íon.

3.5.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

O espectro de absorção da região do infravermelho para a tetraciclina já foi discutido no item 3.4.2, pág 116, e está rerepresentado na Figura 64. A região abaixo de 1800 cm^{-1} foi ampliada na Figura 65, para melhor visualização das bandas.

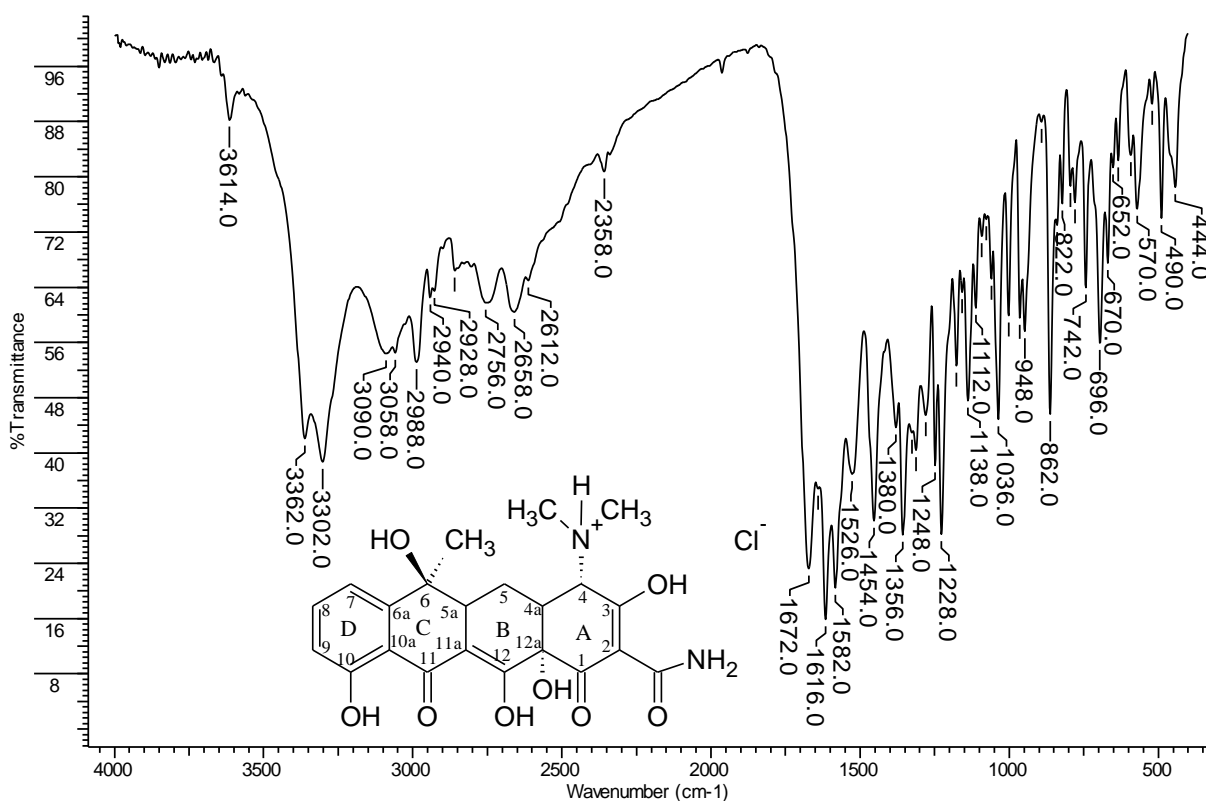


Figura 64 - Espectro na região do infravermelho para o cloridrato de tetraciclina ($\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_8$)Cl, em KBr.

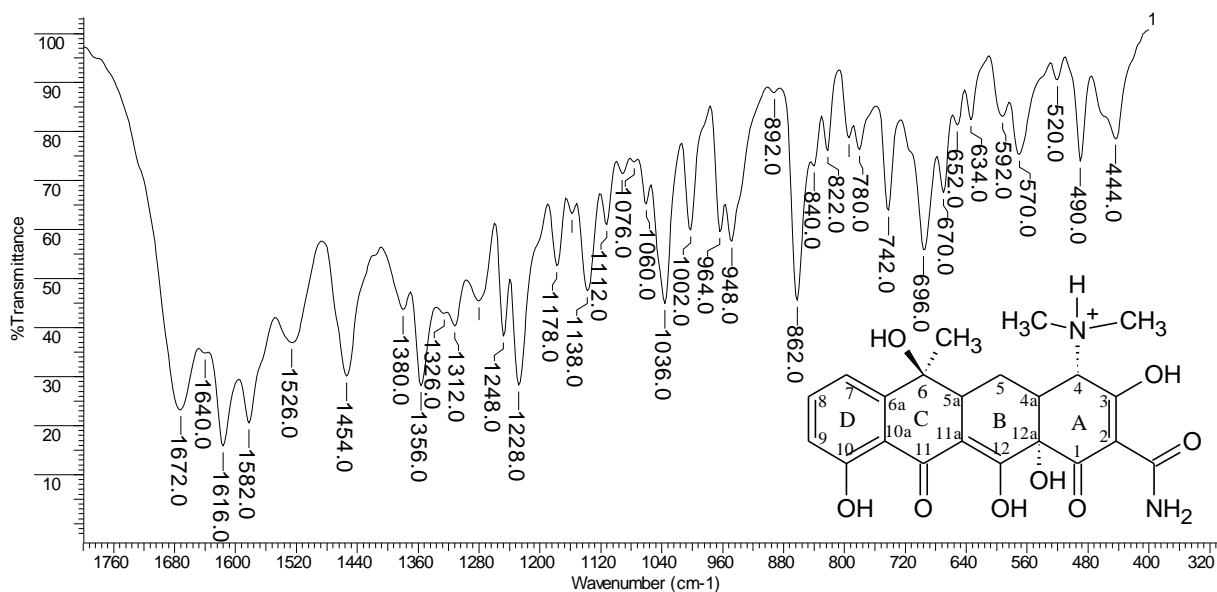


Figura 65 - Região ampliada do espectro de infravermelho da tetraciclina (C₂₂H₂₅N₂O₈)Cl, em KBr.

O espectro de absorção da região do infravermelho obtido para o complexo de gálio(III) está apresentado na Figura 66. A região abaixo de 1800 cm⁻¹ foi ampliada na Figura 67.

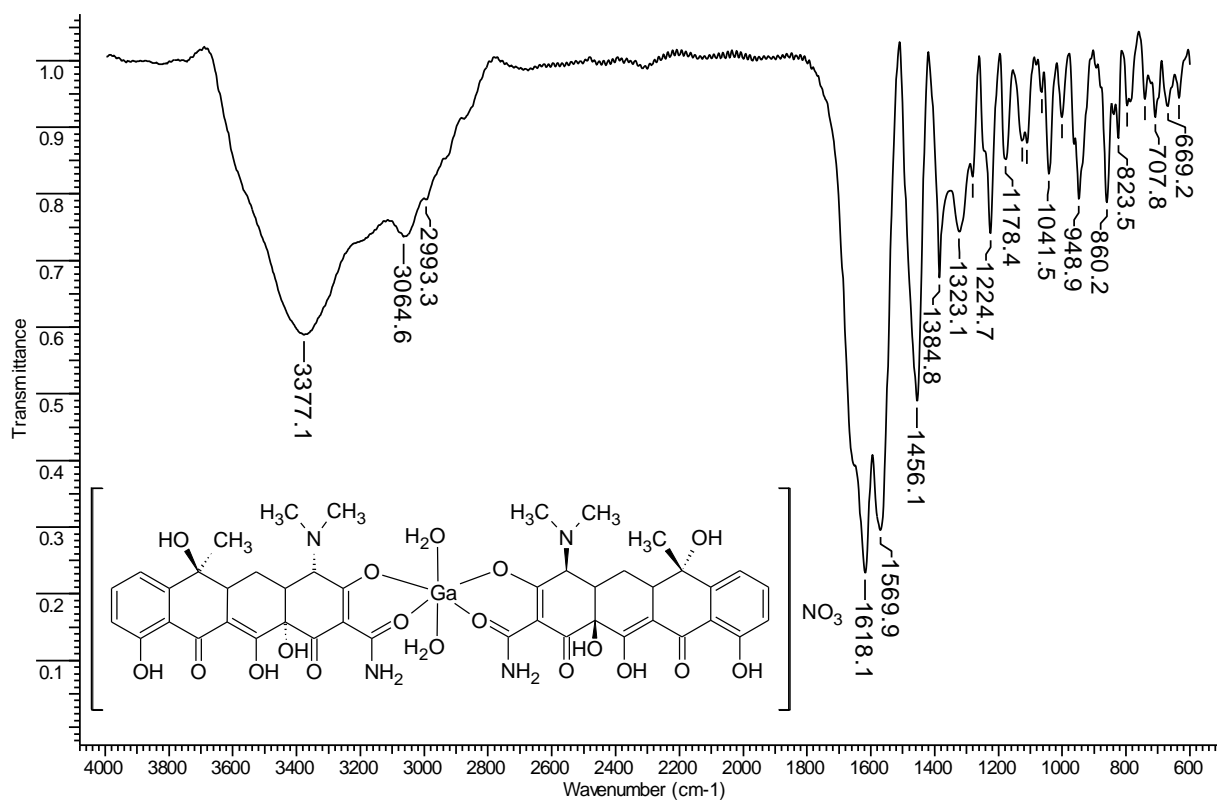


Figura 66 – Espectro na região do infravermelho do composto [Ga(H₂O)₂(C₂₂H₂₃N₂O₈)₂](NO₃), em KBr.

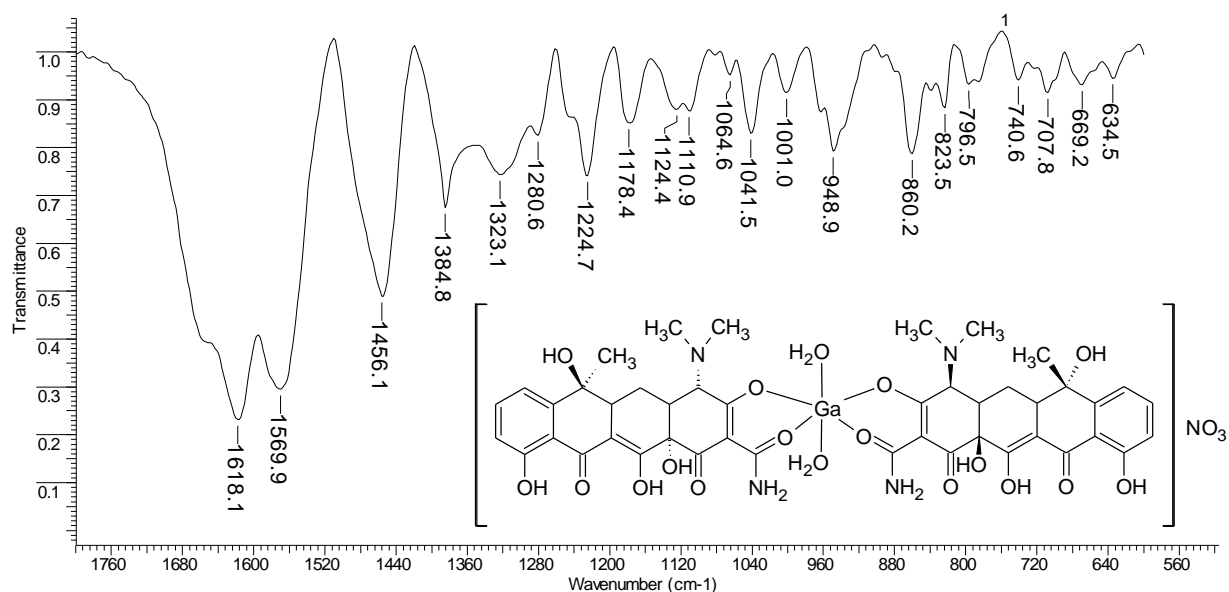


Figura 67 - Região ampliada do espectro de infravermelho $[Ga(H_2O)_2(C_{22}H_{23}N_2O_8)_2](NO_3)_3$, em KBr.

A banda de estiramento $\nu_{C=O}$ da amida, presente em 1672 cm^{-1} no espectro da tetraciclina livre, aparece deslocada para região de menor energia no espectro do complexo, sobrepondo-se com as bandas das outras carbonilas, o que indica a participação da carbonila da amida na coordenação ao gálio.

As bandas em 1526 cm^{-1} e 696 cm^{-1} no espectro da tetraciclina livre correspondem a modos vibracionais da amida. No espectro do complexo, encontram-se deslocadas para 1570 cm^{-1} e 706 cm^{-1} , respectivamente, indicando o envolvimento do grupo amida na coordenação.

A banda de estiramento da carbonila $\nu_{C_1=O}$ em 1616 cm^{-1} no espectro da tetraciclina permanece praticamente inalterada em 1618 cm^{-1} , indicando a não participação desse oxigênio na coordenação ao anel.

Uma banda característica de absorção referente ao estiramento simétrico $\nu_3 N-O$ é observada em 1384 cm^{-1} no espectro do complexo, o que indica a presença do íon nitrato livre.

Essas observações reforçam a proposta de coordenação da tetraciclina ao Gálio(III) através da carbonila da amida e confirma a presença do íon nitrato no composto.

3.5.3 Condutimetria

A condutividade do composto $[\text{Ga}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_8)_2](\text{NO}_3)$ em DMF foi de $103,8 \text{ ohm}^{-1} \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$. Este valor está próximo da faixa de referência para eletrólitos 1:1 em DMF (65 a $90 \text{ ohm}^{-1} \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$) [124], o que indica que o composto é um eletrólito 1:1.

3.5.4 Ressonância magnética nuclear de hidrogênio- RMN ^1H

Os espectros de RMN ^1H da tetraciclina e do complexo $[\text{Bi}(\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_8)(\text{H}_2\text{O})\text{Cl}_2]$ estão apresentados na Figura 68 e na Figura 69, respectivamente.

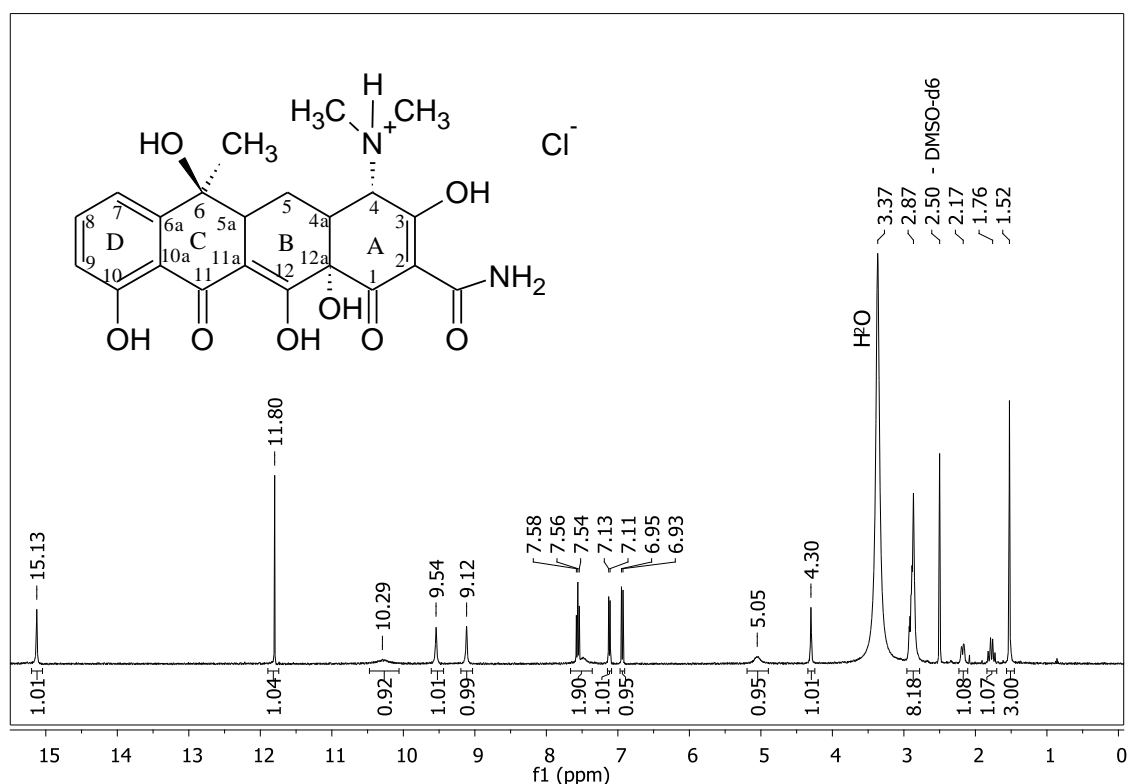


Figura 68 - Espectro de RMN ^1H obtido para cloridrato de tetraciclina, $(\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_8)\text{Cl}$, em DMSO-d_6 .

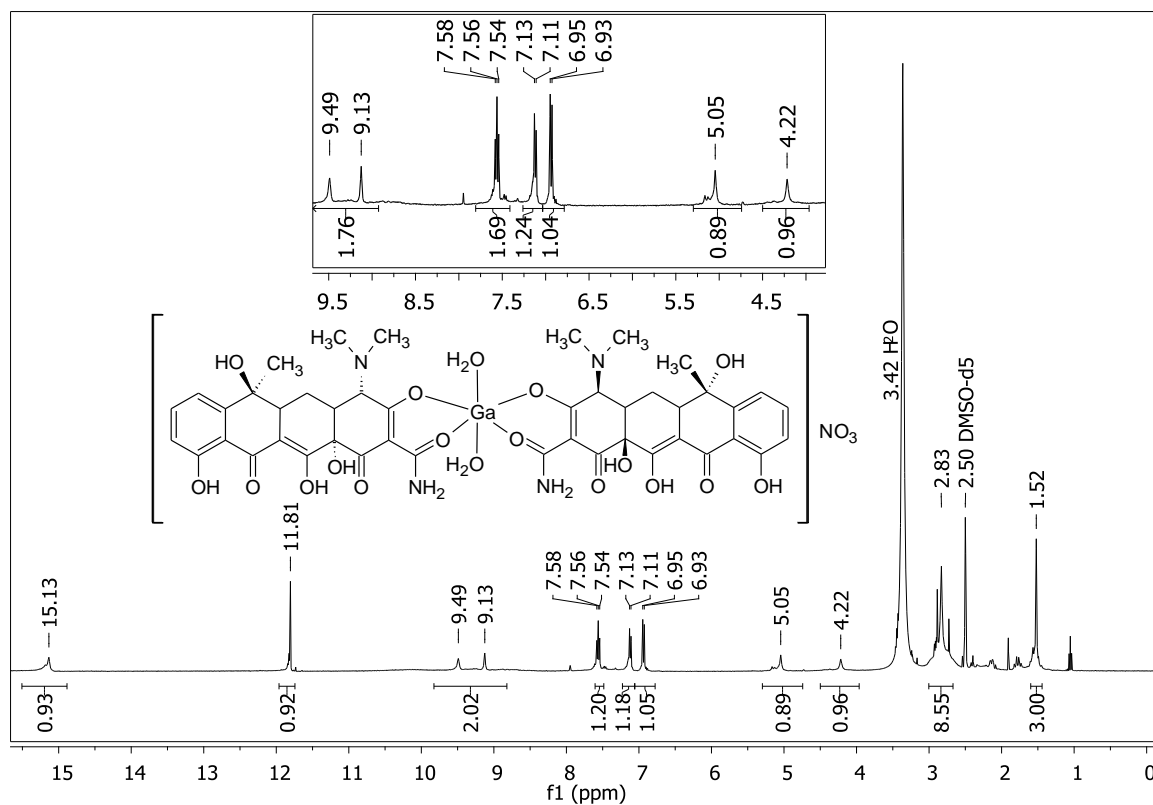


Figura 69 - Espectro de RMN ^1H obtido para o complexo $[\text{Ga}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_8)_2](\text{NO}_3)$ em DMSO-d_6

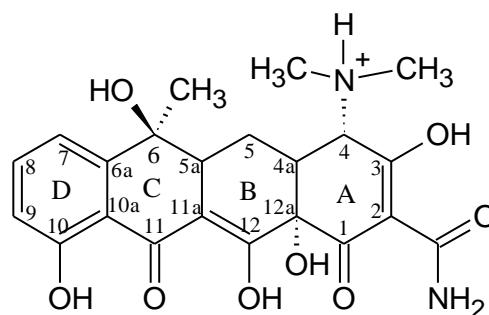
Os deslocamentos químicos dos principais sinais seguem na Tabela 18, com as respectivas atribuições, para a tetraciclina e o complexo de gálio.

Tabela 18 – Atribuição dos sinais de RMN de ^1H do cloridrato de tetraciclina- $(\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_8)\text{Cl}$, e do complexo $[\text{Ga}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_8)_2](\text{NO}_3)$ em DMSO-d_6 .

Atribuição (Integral)	tetraciclina δ /ppm (multiplicidade)	$[\text{Ga}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_8)_2](\text{NO}_3)$ δ /ppm (multiplicidade)
(C6) CH_3	1,52 (s)	1,52 (s)
(C4) $\text{N}(\text{CH}_3)_2$	2,87 (s)	2,83 (m)
(C4) H	4,30 (s)	4,22 (s)
(C9) H (aromático.)	6,94 (d)	6,94 (d)
(C7) H (aromático)	7,12 (d)	7,12 (d)
(C8) H (aromático)	7,56 (d)	7,56 (s)
(C2) CO-NH	9,12 e 9,54 (s)	9,13 e 9,49 (s)
(C10) OH	11,80 (s)	11,81 (s)
(C12) OH	15,13 (s)	15,13 (s)

Conforme discutido anteriormente no item 3.4.4, as regiões no espectro de RMN de ^1H da tetraciclina, de especial interesse na atribuição do sítio de coordenação a íons metálicos, são os prótons do grupo dimetilamônio, o próton em C4 no anel A, e os prótons aromáticos no anel D [123, 157].

A principal modificação causada pela coordenação ao gálio concerne ao próton em C4, cujo sinal deslocou-se de δ 4,30 para δ 4,22 ppm, o que representa uma variação $\Delta\delta = -0,08$ ppm. A intensidade do sinal também diminuiu bastante. Essa modificação indica que o anel A está envolvido na coordenação.



Os sinais dos prótons do grupo dimetilamônio deslocaram-se de δ 2,87 para δ 2,83, resultando em $\Delta\delta = -0,05$ ppm. O sinal também alargou-se e perdeu intensidade. Essas modificações indicam o envolvimento do anel A na formação do complexo. Existem duas possibilidades de coordenação bidentada neste anel envolvendo o oxigênio em C3 e a amida: uma através do **nitrogênio** da amida, e a outra via oxigênio em C3 e **oxigênio** da amida. Entretanto, a presença de dois sinais distintos em δ 9,13 e δ 9,54, referentes aos prótons da amida, descarta a ligação ao nitrogênio da amida.

Outra observação em relação aos sinais da amida é que se aproximaram de 0,05 ppm se comparados com os respectivos sinais no espectro da tetraciclina. Essa aproximação dos sinais é provavelmente devido ao envolvimento do grupo amida na coordenação ao gálio, porém através do oxigênio, o que tornaria as formas canônicas do grupo amida magneticamente mais parecidas.

Conclui-se então que o complexo de gálio se forma através da coordenação bidentada envolvendo o oxigênio da hidroxila em C3 após desprotonação e o oxigênio da carbonila da amida, ambos os grupos localizados no anel A da tetraciclina.

3.5.5 Espectro de massas

No espectro de massas ESI-MS no modo positivo, um pico em m/z 955,15 (Figura 70-a) corresponde à espécie $\text{Ga}(\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_8)_2^+$ em solução, formada pela perda de duas moléculas de água e do contra-íon nitrato. A expansão do espectro na região desse pico está de acordo com a distribuição isotópica simulada para a espécie sugerida (Figura 70-b).

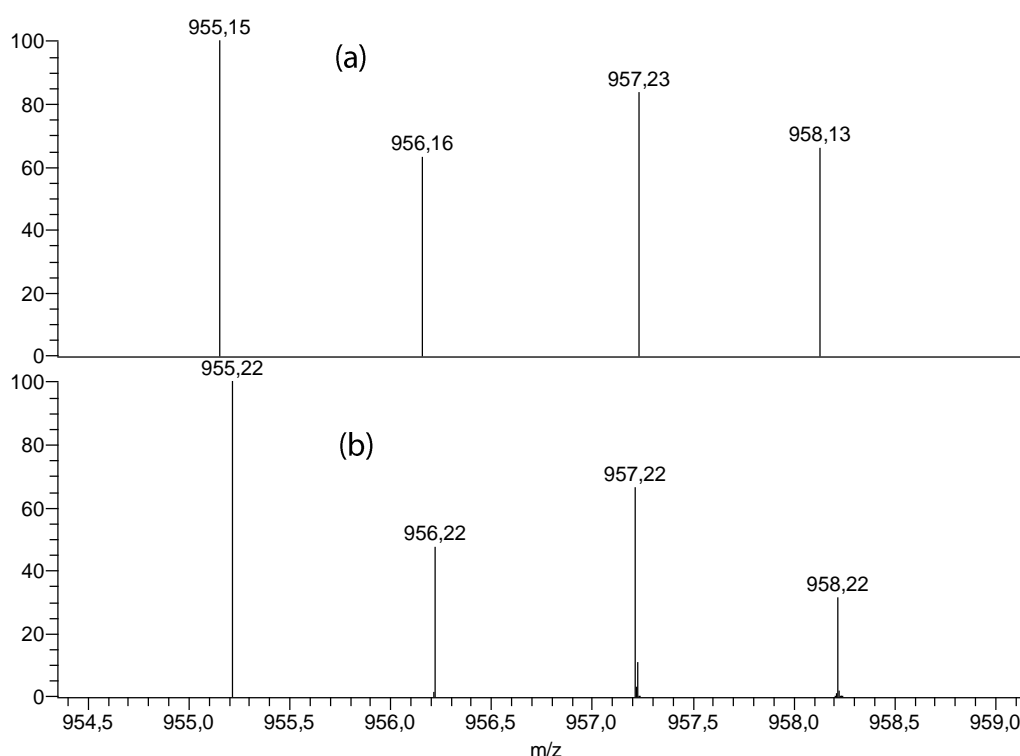


Figura 70 – Região expandida do espectro ESI-MS em metanol, evidenciando o pico em 955,15 atribuído à espécie $\text{Ga}(\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_8)_2^+$ em solução (a), e sua respectiva distribuição isotópica simulada (b).

Combinando os resultados de análise elementar C, H, N, Ga, condutimetria, espectro de massas, RMN de H^1 e espectro de absorção da região do infravermelho, propomos que o gálio(III) se liga a duas moléculas de tetraciclina desprotonadas atuando como ligante bidentado: através do oxigênio da carbonila da amida e da hidroxila em C3 após desprotonação. Duas moléculas de água completariam a geometria octaédrica em torno do átomo central, de acordo com a fórmula $[\text{Ga}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_8)_2](\text{NO}_3)$ e a seguinte estrutura:

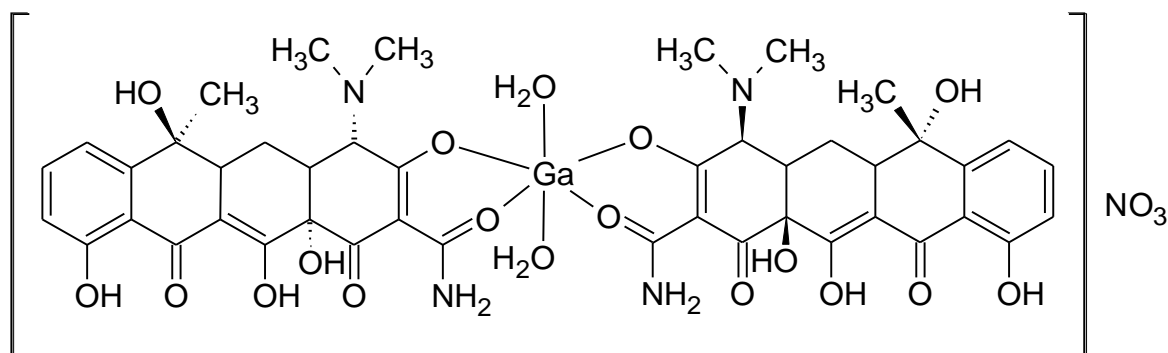


Figura 71 - Estrutura para o complexo $[Ga(H_2O)_2(C_{22}H_{23}N_2O_8)_2](NO_3)$.

Baker e Brown [165] sintetizaram complexos de várias tetraciclinas (incluindo a tetraciclina) com Co(II) e Ni(II) e obtiveram complexos do tipo $(ML_2)(H_2O)_2$ propondo o mesmo tipo de coordenação octaédrica que o composto de gálio aqui apresentado. Os espectros eletrônicos que obtiveram indicaram a coordenação da tetraciclina de forma bidentada, através do anel A, envolvendo átomos de oxigênio.

3.5.6 Atividade antibacteriana (MIC - Concentração mínima inibitória)

O efeito antibacteriano da tetraciclina livre e do complexo $[Ga(H_2O)_2(C_{22}H_{23}N_2O_8)_2](NO_3)$ foi estudado em 9 linhagens de bactérias e os resultados de MIC encontram-se na Tabela 19.

Tabela 19 - MIC / $\mu\text{mol L}^{-1}$, para a tetraciclina e o complexo $[Ga(H_2O)_2(C_{22}H_{23}N_2O_8)_2](NO_3)$.

Linhagem de Bactéria	MIC / $\mu\text{mol L}^{-1}$		
	Ga(NO ₃) ₃	tetraciclina	$[Ga(H_2O)_2(C_{22}H_{23}N_2O_8)_2](NO_3)$
1- <i>S. dysenteriae</i> ATCC 13313	> 501	1	<1
2- <i>S. sonnei</i> ATCC 11060	> 501	2	1
3- <i>S. aureus</i> ATCC 25923	> 501	1	1
4- <i>S. typhimurium</i> ATCC 13311	> 501	2	1
5- <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	501	66	29
6- <i>E. coli</i> BH 100	> 501	33	1
7- <i>Salmonella</i> MG 031	> 501	266	115
8- <i>E. coli</i> MC 1061	> 501	1	1
9- <i>E. coli</i> MC 1061 + pBR 322	> 501	266	14

Na linhagem Gram-positiva *S. aureus*, a tetraciclina livre e o complexo de bismuto foram igualmente ativos.

Nas linhagens Gram-negativas sensíveis à tetraciclina, *S. desinteriae*, *S. sonnei* e *S. typhimurium* (nº 1, 2, 4 respectivamente), observa-se que a atividade do complexo de gálio(III) foi 2 vezes maior que a da tetraciclina livre e maior também do que a do complexo de bismuto(III) do mesmo antibiótico. Como já dito, a tetraciclina atravessa a membrana externa das bactérias Gram-negativas através de canais hidrofílicos formados pelas porinas da membrana externa. Uma explicação possível para a melhor atividade do complexo de gálio(III), pode ser o fato de o complexo se ionizar em solução, gerando a espécie catiônica $[\text{Ga}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_8)_2]^+$, que possuiria maior afinidade pelos canais hidrofílicos das porinas na membrana externa dessas bactérias.

Entretanto, os resultados de maior impacto foram obtidos nas linhagens resistentes, onde o complexo de gálio(III) reverteu a resistência à tetraciclina.

A linhagem (6), *E. coli* BH 100 multirresistente, apresentou-se resistente à tetraciclina livre (MIC de $33 \mu\text{mol L}^{-1}$), mas foi sensível ao complexo de gálio(III) com a MIC de $1 \mu\text{mol L}^{-1}$, ou seja, houve reversão completa da resistência, e aumento da atividade antibacteriana em 33 vezes devido a coordenação do antibiótico ao gálio(III).

É interessante comparar o resultado obtido na linhagem(8) *E. coli* MC 1061, sensível à tetraciclina (MIC $1 \mu\text{mol L}^{-1}$), com o resultado obtido na linhagem resistente *E. coli* MC 1061 / pBR 322 (MIC $266 \mu\text{mol L}^{-1}$), a qual abriga o plasmídeo pBR 322, carreador de genes que conferem resistência à tetraciclina. O complexo de gálio foi igualmente ativo na linhagem sensível (MIC $1 \mu\text{mol L}^{-1}$), mas foi 19 vezes mais ativo na linhagem resistente (MIC $14 \mu\text{mol L}^{-1}$). O fator de resistência (MIC da cepa resistente *E. coli* MC 1061 / pBR 322 dividido pela MIC da cepa sensível parental *E. coli* MC 1061) para o complexo foi 14 e para a tetraciclina, 266. Em outras palavras, a inserção do plasmídeo pBR 322 tornou esta cepa de *E. coli* 266 vezes resistente à tetraciclina, e apenas 14 vezes resistente ao complexo de gálio(III).

Conforme dito anteriormente, esta linhagem resistente apresenta em sua membrana plasmática uma proteína transportadora, a Tet(A), que transporta a tetraciclina para fora da

célula. Pode-se especular que a Tet(A) não seja capaz de reconhecer e transportar o complexo de gálio(III) para fora da célula.

Em trabalhos anteriores do grupo de pesquisa da prof^a. Elene C. Pereira Maia, um complexo de paládio(II) com a tetraciclina apresentou atividade antibacteriana 16 vezes maior que o ligante livre contra a linhagem resistente (*E. coli* HB101/pBR322) [157] e um complexo de platina ligado à tetraciclina foi 6 vezes mais ativo quando comparado à tetraciclina nessa mesma linhagem resistente [123].

Nas linhagens resistentes *P. aeruginosa* e *Salmonella* MG 031, o complexo foi 3 e 2 vezes mais ativo que a tetraciclina livre, respectivamente.

3.5.7 Atividade citotóxica em células tumorais

O efeito do composto $[\text{Ga}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_8)_2](\text{NO}_3)$ no crescimento das células tumorais foi estudado e a curva dose-resposta obtida para o composto $[\text{Ga}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_8)_2](\text{NO}_3)$ está apresentada na Figura 72.

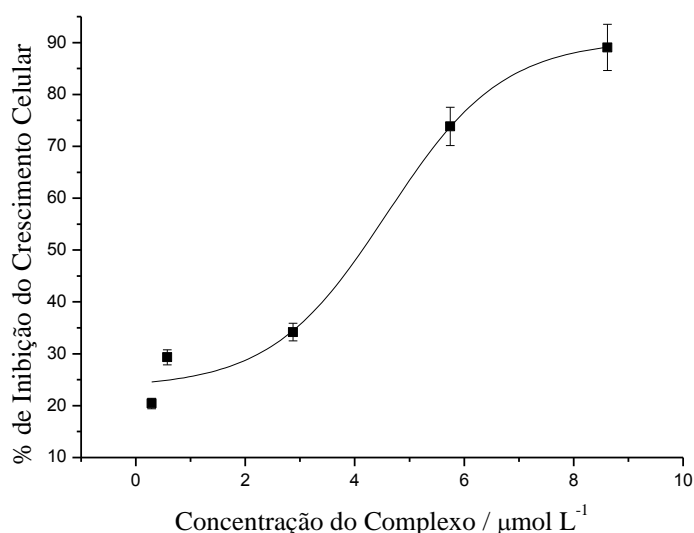


Figura 72 - Efeito do composto $[\text{Ga}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_8)_2](\text{NO}_3)$ no crescimento de células K562.

O composto inibiu o crescimento das células K562 de modo dependente da concentração: o aumento da concentração do composto leva a um aumento da inibição do crescimento celular. O valor da concentração necessária para inibir o crescimento celular em 50%, a CI_{50} ,

foi de $4,14 \mu\text{mol L}^{-1}$ enquanto que a Cl_{50} encontrada para a tetraciclina foi de $52,4 \mu\text{mol L}^{-1}$. O nitrato de gálio apresentou $\text{Cl}_{50} = 35,6 \mu\text{mol L}^{-1}$ nas mesmas condições. A coordenação ao gálio aumenta consideravelmente a atividade citotóxica; o composto foi aproximadamente 13 vezes mais ativo que o ligante livre.

3.5.8 Interação com o ADN

A interação do complexo com o ADN (de timo de vitelo) foi estudada através de uma titulação espectrofotométrica na região do UV-vis, segundo descrito no item 2.12.

Os espectros obtidos estão representados na Figura 73.

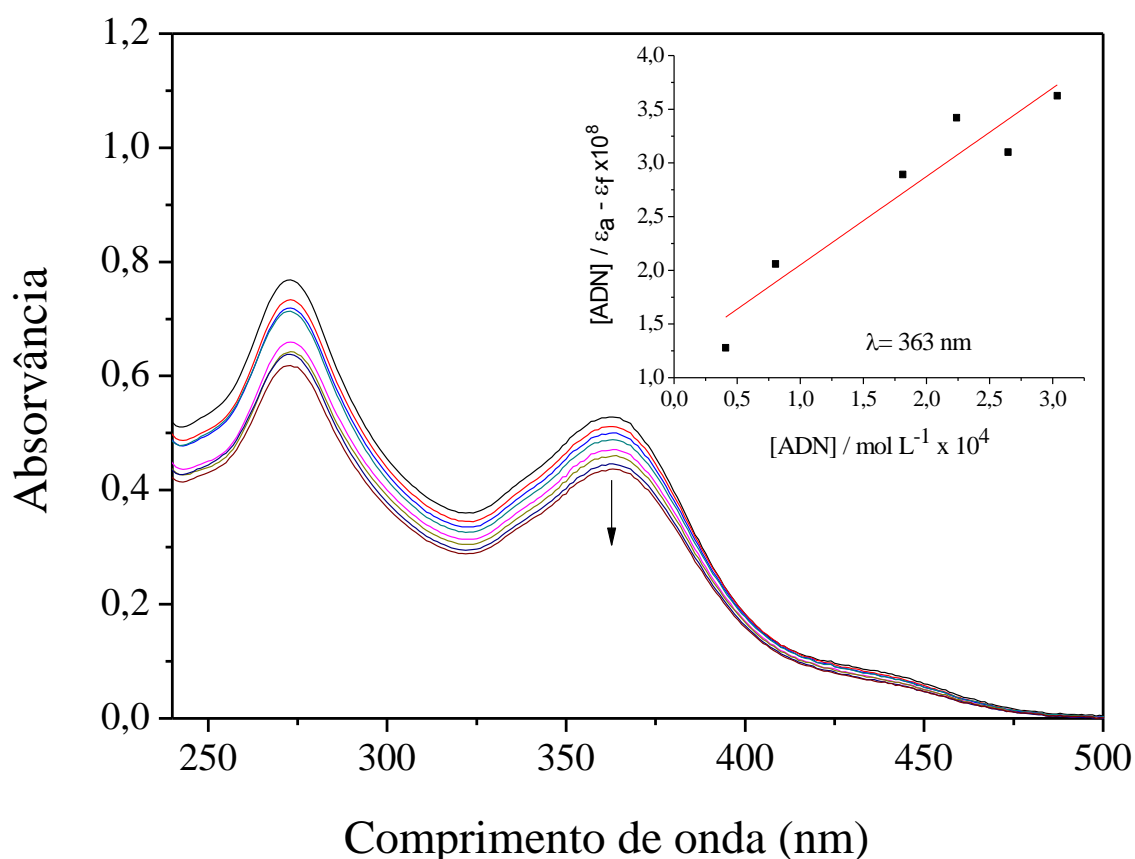


Figura 73 - Espectros UV-Vis de solução do composto $[\text{Ga}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_8)_2](\text{NO}_3)$, inicialmente a $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e adições crescentes de solução de ADN.

Observou-se que a adição de ADN induz um efeito hipocrômico no espectro do complexo, indicando a formação de uma espécie ternária com o ADN. Este resultado é relevante, pois

o ADN é o alvo mais importante de medicamentos antitumorais. O efeito hipocrômico observado não pode ser atribuído à diluição, uma vez que os volumes de solução de ADN adicionados foram muito pequenos e o decréscimo observado na absorvância, muito maior do que o calculado para as diluições efetuadas. Este tipo de efeito hipocrômico é muito comum quando um composto intercala-se entre os pares de base do ADN. A constante de afinidade, K, foi calculada a partir dos dados espectrofotométricos de acordo com a equação 1:

$$[\text{ADN}] / (\epsilon_a - \epsilon_f) = [\text{ADN}] / (\epsilon_0 - \epsilon_f) + 1/K (\epsilon_0 - \epsilon_f) \quad (1)$$

Onde:

- [ADN] é a concentração de ADN em pares de bases,
- ϵ_a é a relação entre a absorvância / [Ga],
- ϵ_f é o coeficiente de extinção do complexo livre,
- ϵ_0 é o coeficiente de extinção do complexo na forma totalmente ligada.

Vale a pena destacar que o efeito da diluição foi descontado no cálculo das concentrações usadas. A razão entre a inclinação e a interseção do gráfico $[\text{ADN}] / (\epsilon_a - \epsilon_f)$ versus [ADN] fornece o valor da constante de afinidade do complexo pelo ADN. Obteve-se um valor de $K = 6,7 \times 10^3$.

O valor da constante de ligação do complexo de gálio(III) da tetraciclina ao ADN é menor que o do brometo de etídeo, que é um intercalador clássico com $K = 4,94 \times 10^5$ [158].

AHMAD *et al.* estudaram as interações do nitrato de gálio com o ADN de timo de vitelo em solução aquosa por espectroscopia de infravermelho. Para a razão molar gálio(III)/ADN=1/80, os íons gálio(III) ligaram-se ao fosfato do ADN sem interação com as bases nucleicas. Para razões molares maiores que 1/20 interações fortes foram observadas entre o íon metálico e a adenina ou guanina, e para razões maiores que 1/10 ocorreram interações com a citosina ou timina. A relevância dessas interações para a atividade anti-tumoral do gálio(III) ainda não está muito clara [167].

3.6 Complexo 6 –[BiC₂₁H₂₉N₂OCl₂]

Composto de bismuto(III) do C₂₁H₃₀N₂O

Dicloro(2,4-di-terc-butil-6-[[piridina-2-il-metil]amino]metil}fenol)bismuto(III)

3.6.1 Análise Elementar: C, H, N e Bi

Os teores (%) de C, H, e N, bem como o teor (%) do íon metálico estão apresentados na Tabela 20, juntamente com os valores calculados para a fórmula [Bi(C₂₁H₂₉N₂O)Cl₂].

Tabela 20 - Valores de CHN e Bi, experimental e calculado para [BiC₂₁H₂₉N₂OCl₂]

Elemento	%C	%H	%N	%Bi
Calculado	41,67	4,83	4,63	34,52
Experimental	42,66	4,72	4,57	35,89

Os resultados de C, H, N e Bi sugerem um composto de fórmula mínima BiC₂₁H₂₉N₂OCl₂.

3.6.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

O espectro na região do infravermelho para o ligante C₂₁H₃₀N₂O está apresentado na Figura 74, e a região abaixo de 1700 cm⁻¹ foi ampliada para melhor distinção das bandas (Figura 75).

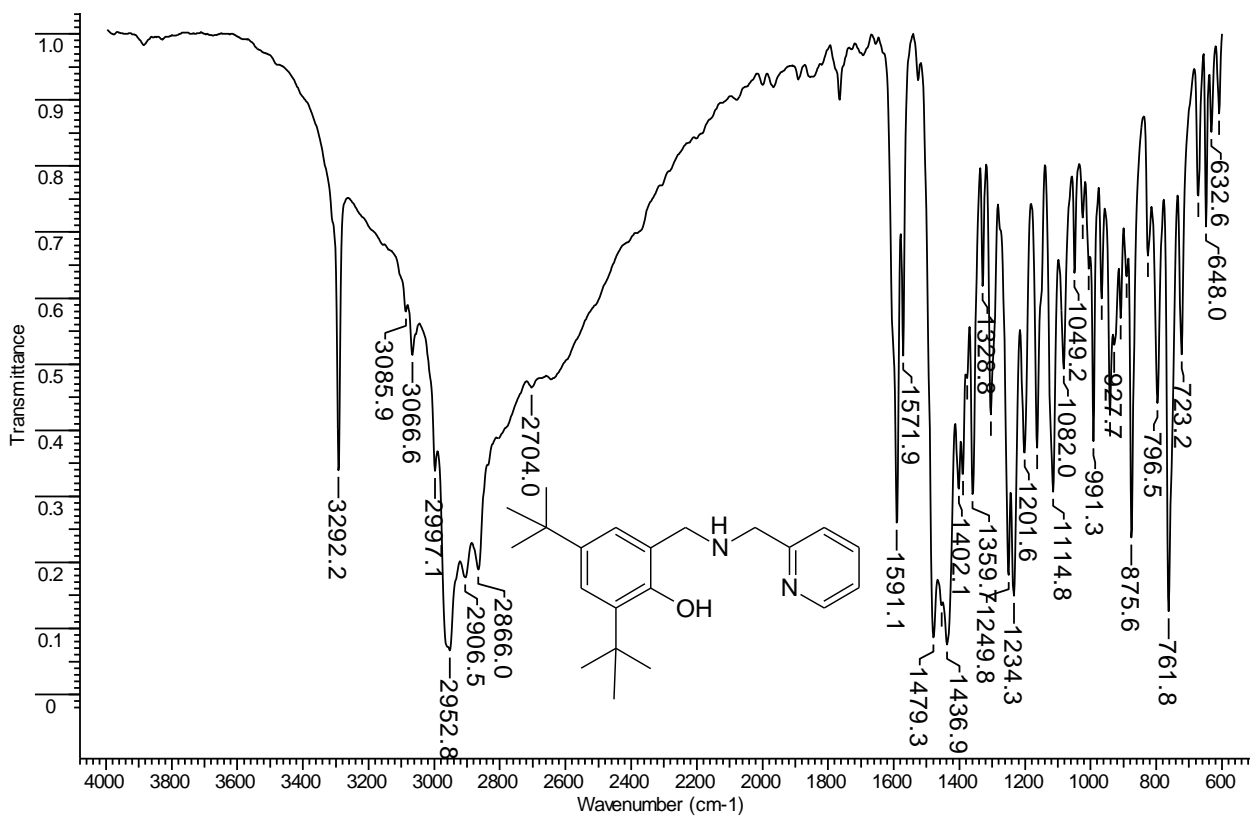


Figura 74 – Espectro na região do infravermelho, obtido para o ligante $C_{21}H_{30}N_2O$, em KBr.

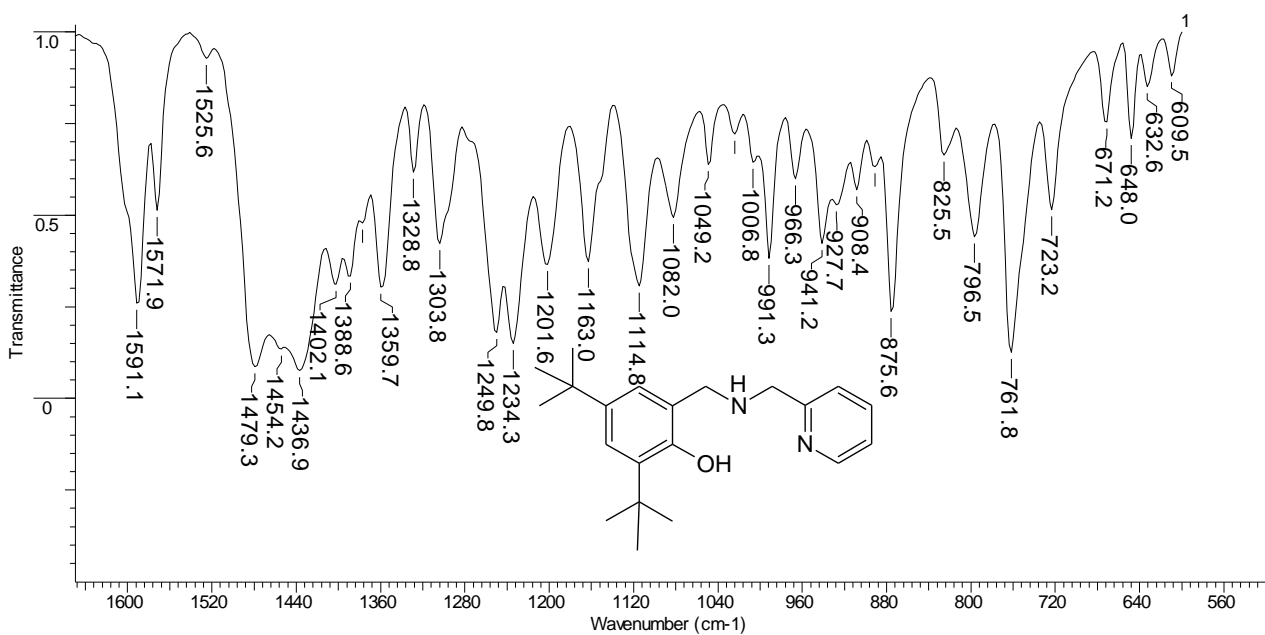


Figura 75 - Região ampliada do espectro de infravermelho para o ligante $C_{21}H_{30}N_2O$, em KBr.

Uma banda aguda, muito forte, observada no espectro do ligante livre $C_{21}H_{30}N_2O$ em 3292 cm^{-1} pode ser atribuída a νNH do grupo amina secundária [168].

As bandas de estiramento νCH_3 dos grupos terbutila do $C_{21}H_{30}N_2O$ podem ser vistas na região entre 2953 e 2866 cm^{-1} .

As bandas de estiramento νCC do anel fenólico dissustituído, bem como as bandas de νCC e νCN da piridina absorvem na região entre $1600 - 1400\text{ cm}^{-1}$, dificultando a atribuição precisa dessas bandas do anel fenólico e do anel piridínico.

O espectro de absorção na região do infravermelho obtido para o complexo $[\text{Bi}(C_{21}H_{29}N_2O)\text{Cl}_2]$ está apresentado na Figura 76, e a região abaixo de 1700 cm^{-1} do espectro foi ampliada para melhor distinção das bandas (Figura 77).

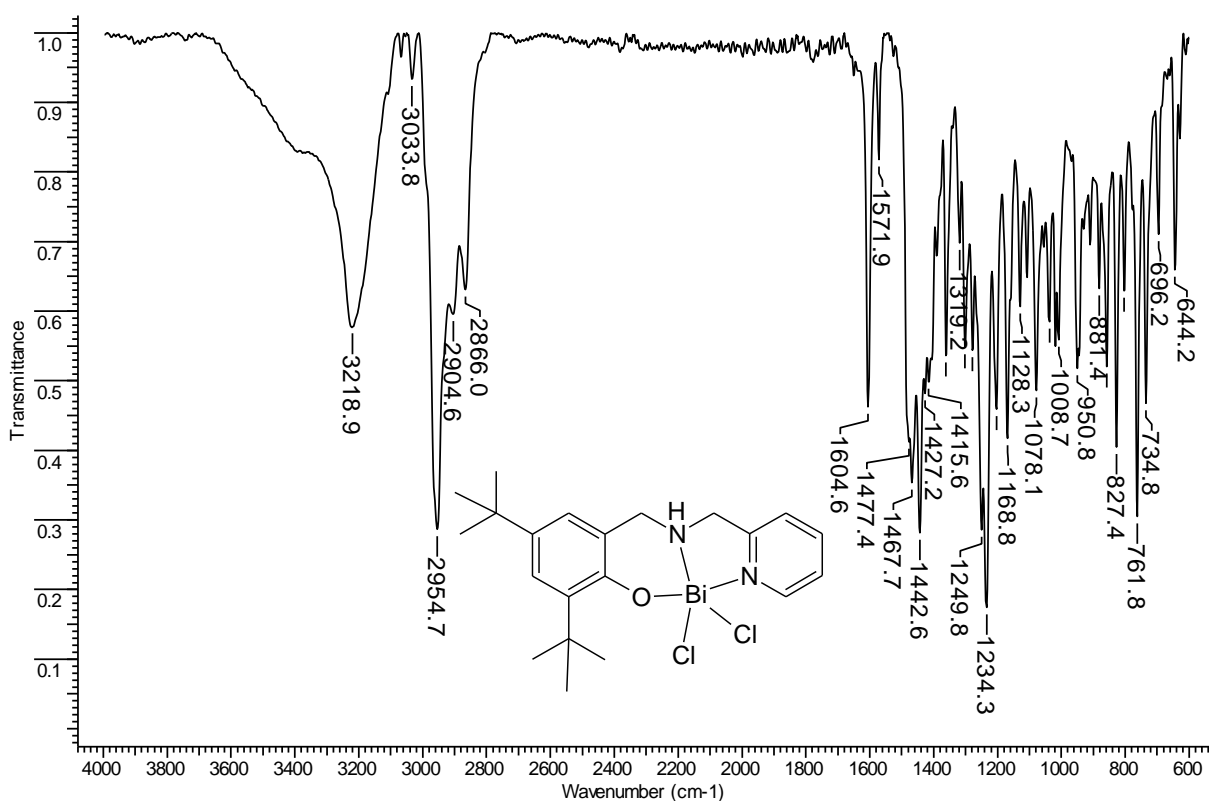


Figura 76 - Espectro na região do infravermelho, obtido para o complexo $[\text{Bi}(C_{21}H_{29}N_2O)\text{Cl}_2]$, em KBr.

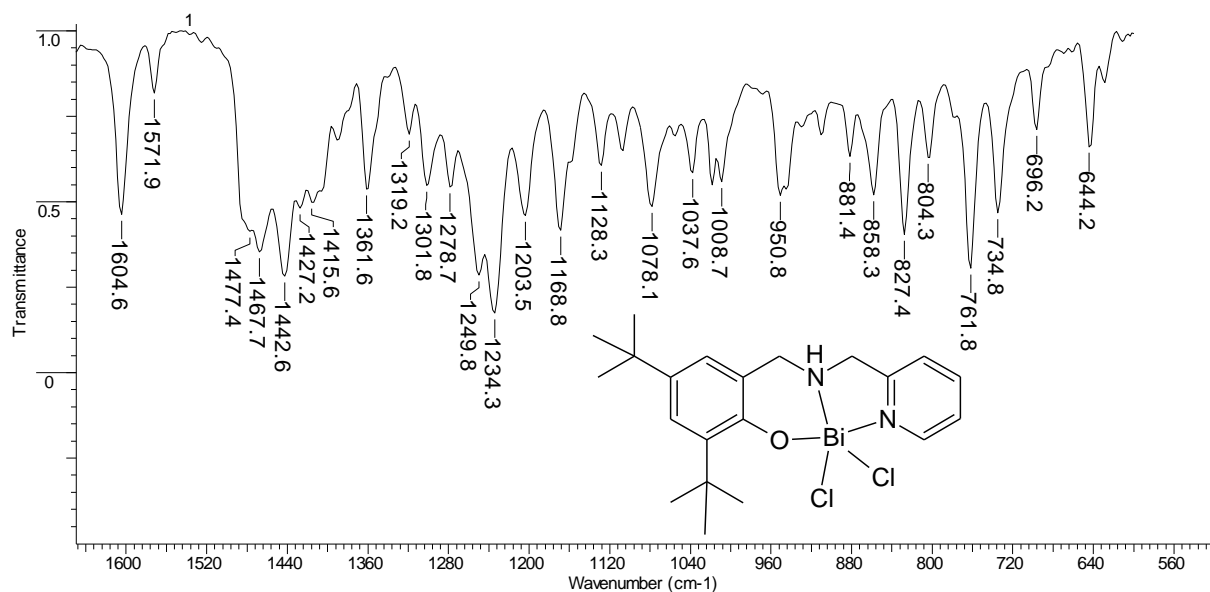


Figura 77 - Região ampliada do espectro de infravermelho para o complexo $[\text{Bi}(\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O})\text{Cl}_2]$, em KBr.

IV (cm⁻¹): 3219m, 3107f; 3069f; 3034m; 2955MF; 2905F; 2866F; 1605F; 1572m; 1468F; 1443F; 1427F; 1416m; 1391m; 1362m; 1319f; 1302m; 1279m; 1250F; 1234MF; 1203F; 1169F; 1128m; 1107m; 1078m; 1055f; 1038m; 1018m; 1009m; 951m; 928f; 910m; 881f; 858m; 827F; 804m; 777f; 762s; 735m; 696f; 644m; 629f

Uma banda aguda muito forte observada no espectro do ligante em 3292 cm⁻¹, que pode ser atribuída a νNH da amina secundária [168] desloca-se para região de menor frequência, sendo observada em 3219 cm⁻¹ no espectro do complexo devido à coordenação do nitrogênio da amina ao bismuto(III).

As bandas de estiramento νCH_3 dos grupos terbutila do ligante e do complexo podem ser vistas na região entre 2992 e 2866 cm⁻¹.

As bandas de estiramento C=C do fenol e da piridina absorvem na mesma região entre 1600- 1400 cm⁻¹, dificultando a distinção entre esses dois grupos, entretanto várias modificações nas bandas dessa região podem ser atribuídas à coordenação envolvendo o oxigênio fenólico e o nitrogênio piridínico na coordenação.

A maioria dos modos vibracionais da piridina é de difícil atribuição, entretanto, as bandas em 1591 e 1437 cm⁻¹ no espectro do ligante livre, apresentam-se deslocadas para valores

de maior frequência, 1605 e 1443 cm^{-1} , respectivamente. Deslocamentos para maiores frequências também foram observados em bandas de outros complexos relacionados na literatura, em que o nitrogênio piridínico participa da coordenação [169, 170].

3.6.3 Análise condutimétrica

A condutividade do composto $[\text{Bi}(\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O})\text{Cl}_2]$ em DMF foi de $16,08 \text{ ohm}^{-1} \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$. Este valor está bem abaixo da faixa de valores de referência para eletrólitos 1:1 em dimetilformamida, 65 a $90 \text{ ohm}^{-1} \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ [124], o que indica que o composto é neutro.

3.6.4 Ressonância magnética nuclear de hidrogênio- RMN ^1H

Os sinais de RMN ^1H foram atribuídos com base em atribuições feitas para complexos de cobalto com o mesmo ligante por TOMCO *et al.* [132]. O espectro de RMN ^1H do ligante está apresentado na figura 78 e o do respectivo complexo de bismuto(III) na Figura 79.

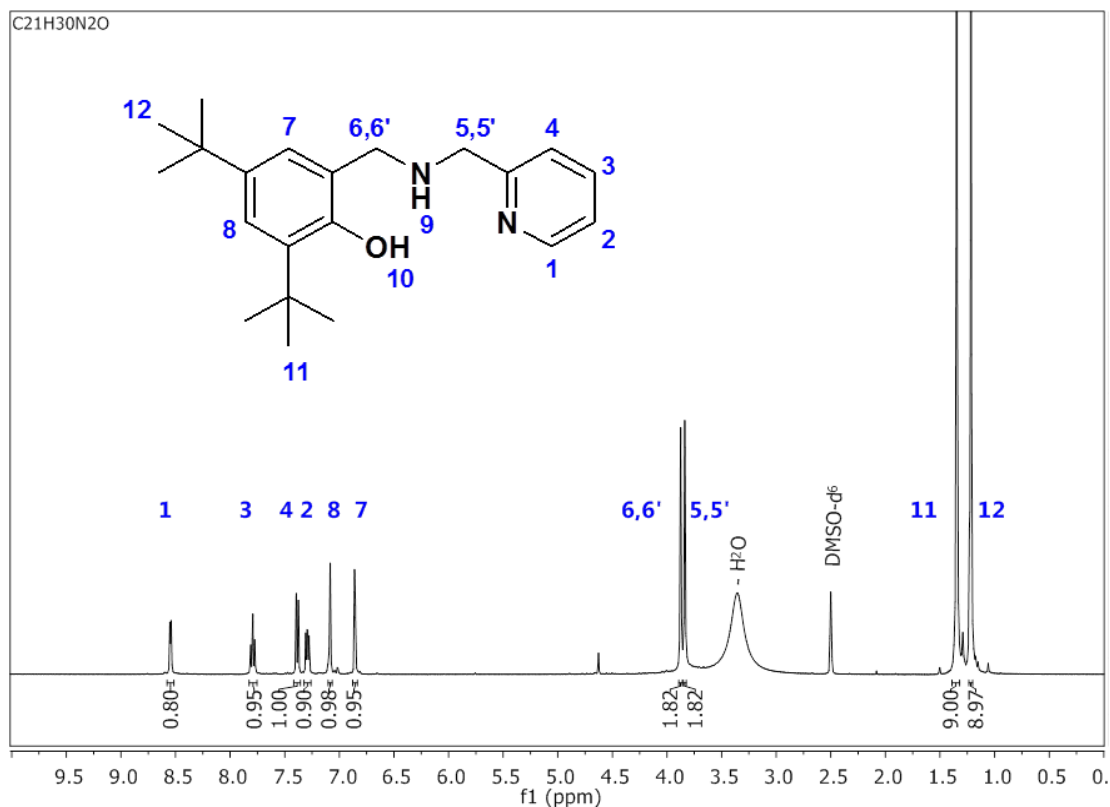


figura 78 - Espectro de RMN ^1H do ligante $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}$ em DMSO-d_6

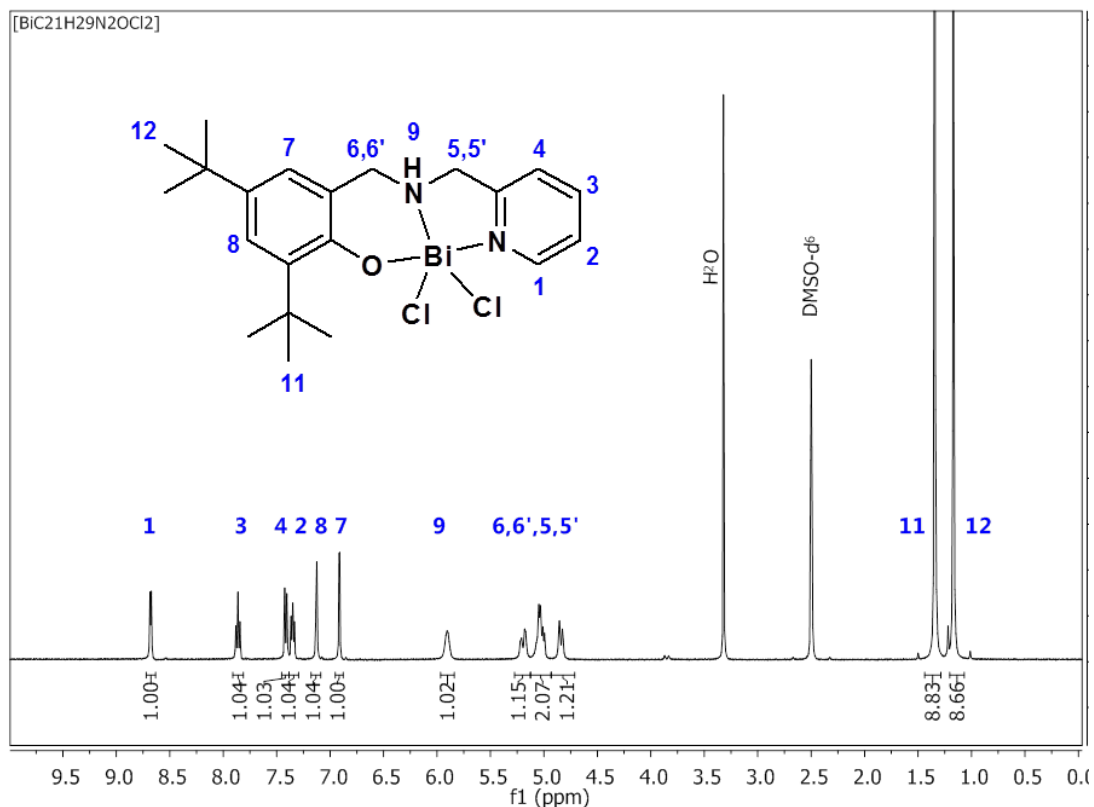


Figura 79 - Espectro de RMN ^1H do complexo $[\text{Bi}(\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O})\text{Cl}_2]$ em DMSO-d_6

As atribuições dos sinais de RMN ^1H aos respectivos prótons do ligante $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}$ e do complexo $[\text{Bi}(\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O})\text{Cl}_2]$ estão descritas na Tabela 21.

Tabela 21 - Atribuições dos sinais de RMN ^1H do ligante $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}$ e do complexo $[\text{Bi}(\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O})\text{Cl}_2]$ em DMSO-d_6 a 298K.

Atribuição (integral)	$\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}$	$[\text{Bi}(\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O})\text{Cl}_2]$
	δ / ppm (mult., J / Hz)	δ / ppm (mult., J / Hz)
H1 (1H; pir.)	8,55 (d, J = 4,7)	8,68 (d, J = 5,0)
H2 (1H; pir.)	7,29 (dd, J = 7,3; 5,0)	7,35 (t, J = 8,0)
H3 (1H; pir.)	7,79 (dt, J = 7,6; 1,2)	7,86 (t, J = 7,7)
H4 (1H; pir.)	7,39 (d, J = 7,8)	7,41 (d, J = 7,8)
H5' (2H; CH_2)	3,84 (s)	5,19 (dd, J = 15,5; 4,1) 1H
H6' (2H; CH_2)	3,88 (s)	5,02 (dd, J = 15,3; 6,1) 2H
		4,84 (d, J = 11,5) 1H

H7 (1H; ar.)	6,86 (d, J = 2,0)	6,91 (d, J = 2,2)
H8 (1H; ar.)	7,08 (d, J = 2,0)	7,13 (d, J = 2,0)
H9 (1H; NH)	ausente	5,90 (s)
H10 (1H; OH)	ausente	ausente
H11 (9H; Bu ^t)	1,35 (s)	1,34 (s)
H12 (9H; Bu ^t)	1,22 (s)	1,17 (s)

A coordenação ao bismuto modifica significativamente o espectro de RMN de ¹H se comparado ao espectro do ligante livre. A principal modificação concerne aos prótons H5, H5' e H6, H6'. Esses prótons metilênicos aparecem como 2 simpletos distintos em δ 3,84 e 3,88, respectivamente. Esses simpletos se dividem, indicando que H5 e H5' não permanecem equivalentes no complexo assim como H6 e H6' também não. Além dessa mudança de multiplicidade, esses sinais se deslocam de $\Delta\delta=1,35$ e $\Delta\delta=1,14$ ppm respectivamente, para a região mais desblindada do espectro do complexo.

O próton aromático H1, que é vizinho do nitrogênio piridínico, também se desloca de $\Delta\delta=0,13$ ppm. Todos os outros sinais se deslocam em torno de 0,06 ppm para a região desprotegida do espectro do complexo como consequência da coordenação metálica.

3.6.5 Espectro de massas

O espectro de massas ESI-MS obtido no modo negativo apresentou um pico em 603,1418 m/z (Figura 80), atribuído à espécie $[\text{Bi}(\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O})\text{Cl}_2]^-$, formada pela perda de um próton do complexo $[\text{Bi}(\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O})\text{Cl}_2]$ em solução. A distribuição isotópica foi simulada para a espécie $[\text{Bi}(\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O})\text{Cl}_2]^-$ (Figura 81), para efeito de comparação.

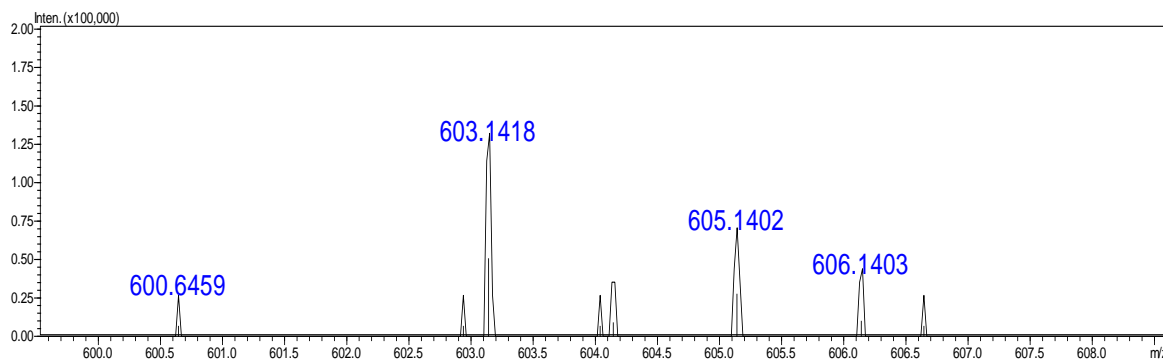


Figura 80- Região expandida do espectro ESI- MS em metanol, evidenciando o pico em 603,1418, atribuído à espécie $[\text{Bi}(\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O})\text{Cl}_2]^-$, formada pela perda de um próton do complexo em solução.

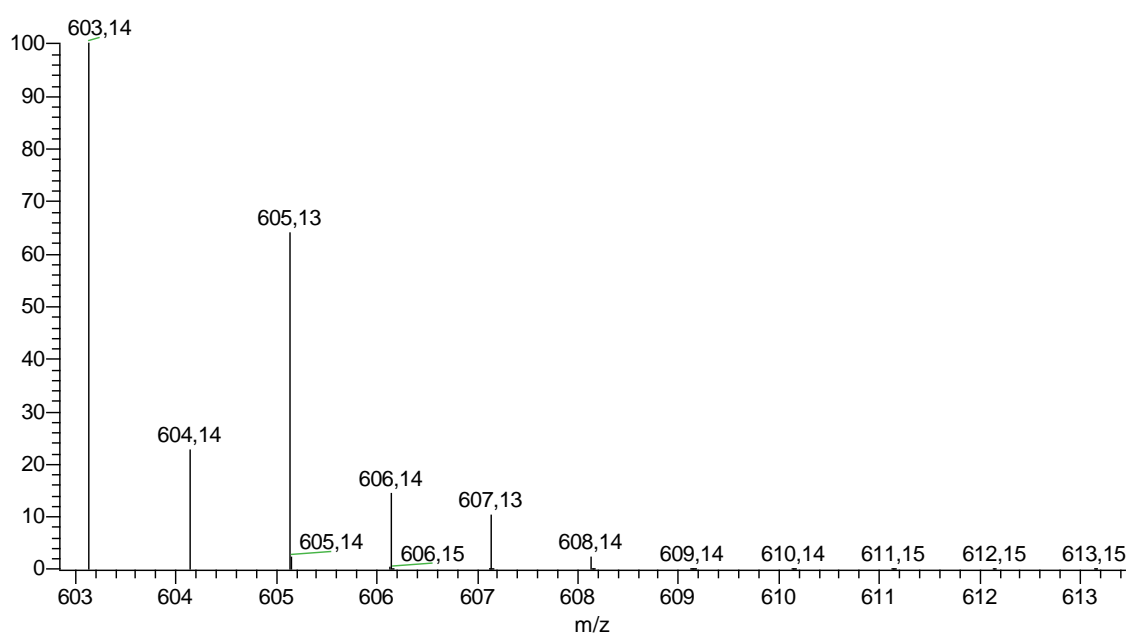


Figura 81 - Distribuição isotópica simulada para a espécie $[\text{Bi}(\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O})\text{Cl}_2]^-$, formada pela perda de um próton.

3.6.6 Estrutura do cristal: Análise por difração de raios-X

Os principais dados da coleta e do refinamento da estrutura do composto $[\text{Bi}(\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O})\text{Cl}_2]$ estão na Tabela 22.

Tabela 22 - Dados da coleta e detalhes do refinamento da estrutura $[\text{Bi}(\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O})\text{Cl}_2]$, obtidos por difração de raios-X em monocristal.

Fórmula empírica	$\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{BiCl}_2\text{N}_2\text{O}$
Massa Molar/ g	605,34
Temperatura	293(2) K
Comprimento de onda	0,71073 Å

Sistema cristalino	monoclínico
Grupo espacial	P2/c
Dimensões da célula unitária	a= 18,0722(2), b = 8,31640(10), c = 15,1900(2) Å, $\alpha = 90, \beta = 99,5250(10), \gamma = 90^\circ$
Volume	2251,52(5) Å ³
Z	4
Densidade (calculada)	1,786 Mg/m ³
Coefficiente de absorção	17,648 mm ⁻¹
F(000)	1176
Dimensões do cristal	0,255 × 0,247 × 0,032 mm ³
Faixa de 2 θ para a coleta de dados	9,22 a 136,42 °
Faixa de Índices h,k,l.	-27 ≤ h ≤ 30, -29 ≤ k ≤ 15, -9 ≤ l ≤ 17
Reflexões coletadas	17259
Reflexões independentes	4040(R _{int} = 0.0499)
Correção de absorção	Empírica
Método de refinamento	Matriz completa dos mínimos quadrados sobre F ²
Dados/restrições/parâmetros	4040/0/244
Qualidade do ajuste sobre F ²	1,111
Índices R Final (I > 2 σ (I))	R1 = 0,0398, wR2 = 0,1069
Índices R (todos os dados)	R1 = 0,024, wR2 = 0,057
Maior diferença (pico e vale)	3,83 e -2,03 eÅ ⁻³

A estrutura molecular do complexo [BiC₂₁H₂₉N₂OCl₂], apresentada na Figura 82, pertence ao sistema monoclínico, grupo espacial P2/c (n. 13).

Os parâmetros de rede encontrados para a célula unitária são: a = 18,0722(2), b = 8,31640(10), c = 15,1900 (2) Å, $\alpha = 90, \beta = 99,5250(10), \gamma = 90^\circ$.

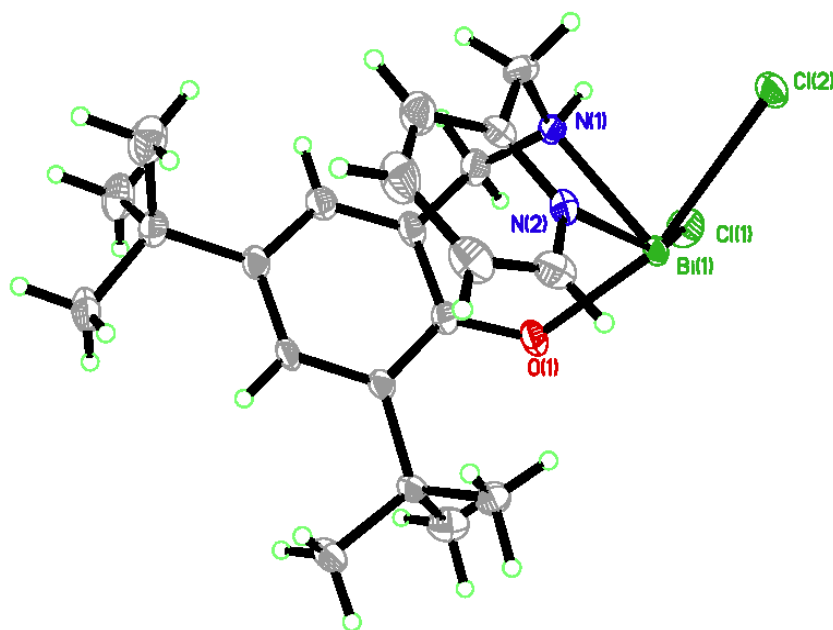


Figura 82 – Estrutura do complexo $[\text{Bi}(\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O})\text{Cl}_2]$ determinada por difração de raios-X em monocristal.

Como pode ser visto na Figura 82, o bismuto(III) está pentacoordenado, ocupando a posição central de uma pirâmide de base quadrada distorcida. Uma molécula de ligante desprotonado atua de modo tridentado através dos átomos N da amina secundária, N piridínico e O fenólico, e dois outros ligantes cloretos completam a esfera de coordenação ($N=5$) em torno do bismuto(III).

A posição axial da pirâmide é ocupada pelo N do grupo amina.

O oxigênio desprotonado do anel fenólico e o nitrogênio do anel piridínico estão em posições vizinhas na base quadrática distorcida. Dois íons cloreto atuam como ligantes ocupando as outras duas posições vizinhas na base.

O complexo $[\text{Bi}(\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O})\text{Cl}_2]$ é neutro, no qual a carga do bismuto(III) é neutralizada pelas cargas dos dois íons cloreto e pela carga do fenolato proveniente da desprotonação do ligante.

Os comprimentos de ligação entre o bismuto(III) e os átomos doadores envolvidos na esfera de coordenação foram listados na Tabela 23.

Tabela 23 – Comprimentos de ligação selecionados (Å), na estrutura cristalina do $[\text{Bi}(\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O})\text{Cl}_2]$.

Ligação	Distância /Å
Bi1—Cl1	2,6089(13)
Bi1—Cl2	2,7742(12)
Bi1—O1	2,196(4)
Bi1—N1	2,341(4)
Bi1—N2	2,472(5)

O comprimento da ligação Bi-N1 (posição axial) é 2,341(4) Å, menor que o comprimento da ligação Bi1-N2 (piridínico), que é 2.472(5) Å. Entretanto, esses valores estão dentro da faixa de 2.398(8) a 2.84(2), referente a comprimentos de ligação Bi-N de complexos de bismuto(III) com ligantes N doadores relatados na literatura [171].

A ligação Bi1-O de 2.196(4) Å pode ser comparada com ligações Bi-O de 2.1060 Å [172].

As ligações Bi1-Cl1 e Bi1-Cl2 apresentam comprimento ligeiramente diferentes. A ligação Bi1-Cl1 2.6089(13) Å é mais forte que a ligação Bi1-Cl2 2.7742(12), mas está de acordo com a faixa observada para outros complexos de bismuto(III) com ligantes cloreto na literatura [143, 173-175].

O grau de distorção de estruturas pentacoordenadas pode ser calculado pelo parâmetro $\tau = (\beta - \alpha)/60$ (onde β e α são os dois maiores ângulos; $0 \leq \tau \leq 1$), desenvolvido por ADDISON, REEDJIK e colaboradores [176]. O valor de τ pode variar continuamente entre 0 (zero) e 1 (um), cuja distorção pode variar continuamente entre duas geometrias ideais: a geometria piramidal de base quadrada (quando $\tau=0$) e a geometria bipiramidal trigonal (quando $\tau=1$). Os valores dos ângulos que possuem o bismuto(III) no vértice estão listados Tabela 24, e foram utilizados para calcular o parâmetro τ para o grau de distorção geométrica da estrutura do complexo.

Tabela 24 – Ângulos selecionados /°, na estrutura cristalina do $[\text{Bi}(\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O})\text{Cl}_2]$.

Átomos	Ângulo /°
Cl1—Bi1—Cl2	89,00(4)
O1—Bi1—Cl1	91,71(11)

O1—Bi1—Cl2	161,66(11)
O1—Bi1—N1	83,22(15)
O1—Bi1—N2	84,11(14)
N1—Bi1—Cl1	80,27(11)
N1—Bi1—Cl2	78,84(11)
N1—Bi1—N2	70,23(16)
N2—Bi1—Cl1	150,48(11)
N2—Bi1—Cl2	86,27(10)

O complexo $[\text{Bi}(\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O})\text{Cl}_2]$ apresenta a geometria piramidal de base quadrada com parâmetro τ calculado = 0,19. Essa distorção provavelmente é devida a efeitos estéricos e eletrônicos do ligante assimétrico, combinados com a presença do par de elétrons não-ligante proveniente do orbital 6s do bismuto(III).

Na Figura 83 pode ser visto o empacotamento das moléculas de $[\text{Bi}(\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O})\text{Cl}_2]$ na rede cristalina, ao longo do eixo b.

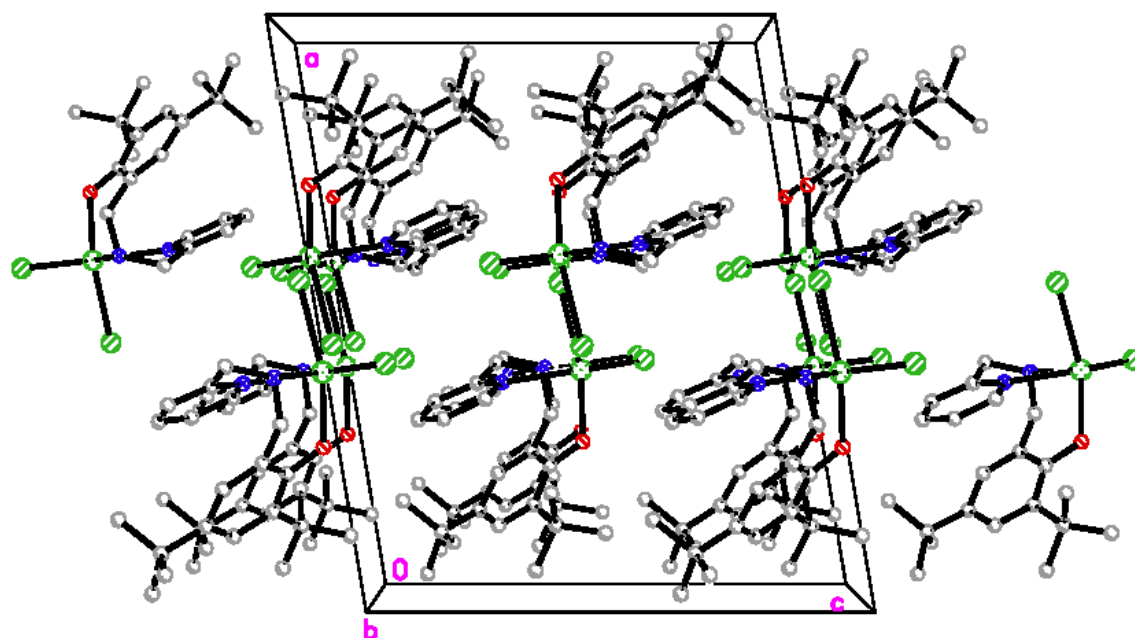


Figura 83 – Desenho do empacotamento das moléculas de $[\text{Bi}(\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O})\text{Cl}_2]$ na rede cristalina, ao longo do eixo b.

3.6.7 Atividade antibacteriana (MIC - Concentração mínima inibitória)

O efeito antibacteriano do ligante $C_{21}H_{30}N_2O$ e do $[Bi(C_{21}H_{29}N_2O)Cl_2]$ foi estudado em 9 linhagens de bactérias e os valores de MIC obtidos encontram-se na Tabela 25.

Tabela 25 - MIC / $\mu\text{mol L}^{-1}$, para o $C_{21}H_{30}N_2O$ e o respectivo complexo $[Bi(C_{21}H_{29}N_2O)Cl_2]$

Linhagem bacteriana	MIC / $\mu\text{mol L}^{-1}$		
	$BiCl_3$	$C_{21}H_{30}N_2O$ (ligante livre)	$[Bi(C_{21}H_{29}N_2O)Cl_2]$
1 - <i>E. coli</i> ATCC 25922	> 406	>393	>212
2 - <i>E. coli</i> BH 100	> 406	>393	53
3 - <i>E. coli</i> MC 1061	> 406	>393	>212
4 - <i>E. coli</i> MC 1061 / <i>pBR 322</i>	> 406	>393	>212
5 - <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	> 406	>393	>212
6 - <i>S. aureus</i> ATCC 25923	> 406	98	7
7 - <i>S. sonnei</i> ATCC 11060	> 406	>393	>212
8 - <i>S. dysenteriae</i> ATCC 13313	406	>393	53
9 - <i>Salmonela</i> MG 031	> 406	>393	>212
10 - <i>S. tiphymurium</i> ATCC 13311	> 406	>393	>212

Analisando os valores de MIC na Tabela 25, obtidos para o ligante livre, nota-se que a MIC foi atingida apenas para a linhagem Gram-positiva, *S. aureus*, cujo valor foi de $98 \mu\text{mol L}^{-1}$. Novamente podemos salientar que a coordenação ao bismuto foi muito importante na reversão da resistência, pois foi 14 vezes mais ativo contra esta bactéria, apresentando valor de MIC igual a $7 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Todas as outras linhagens de bactérias (Gram-negativas) foram resistentes ao ligante livre até a concentração testada (MIC >393). Já que nenhuma exceção foi observada, acreditamos que o ligante livre não conseguiu penetrar a parede celular das bactérias Gram-negativas e a resistência seja devida à impermeabilidade da membrana.

Por outro lado, o complexo de bismuto(III) foi mais de 7 vezes ativo em duas linhagens Gram-negativas, *E. coli* BH 100 multirresistente e *S. dysenteriae* ATCC 13313, revertendo a

resistência. Esse resultado é muito relevante, uma vez que essas linhagens foram resistentes ao ligante livre não apresentando valores de MIC até a concentração $393 \mu\text{mol L}^{-1}$ testada.

3.6.8 Atividade citotóxica em células tumorais

O efeito do ligante $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}$ e do complexo $[\text{Bi}(\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O})\text{Cl}_2]$ no crescimento de células tumorais foi estudado e observou-se que ambos, ligante livre e complexo, inibiram o crescimento celular de maneira dependente da concentração.

Foi determinada a Cl_{50} de $(0,88 \pm 0,09) \mu\text{mol L}^{-1}$ para o ligante e de $(0,30 \pm 0,04) \mu\text{mol L}^{-1}$ para o complexo. O complexo de bismuto(III) foi aproximadamente 3 vezes mais ativo que o ligante, que já apresentou atividade significativa.

Para efeito de comparação, pode-se citar o complexo de bismuto com a 2-acetilpiridina-N(4)-piridiltiosemicarbazona que apresentou o valor de Cl_{50} de $1,8 \mu\text{mol L}^{-1}$ na mesma linhagem celular, K562 [177]. Outro complexo de bismuto, $[\text{Bi}(\text{H}_2\text{L})(\text{NO}_3)_2]\text{NO}_3$, no qual $\text{H}_2\text{L} = 2,6$ -diacetilpiridina bis(4N-metiltiosemicarbazona), também foi testado contra as células K562 e apresentou $\text{Cl}_{50} = 26,8 \mu\text{mol L}^{-1}$ [178]. Um complexo organometálico de Bi(V), $(\text{Lp})_2(\text{Ph}_3\text{Bi})_2\text{O}$, onde Lp = lapachol, apresentou a Cl_{50} de $1,8 \mu\text{mol L}^{-1}$ [179].

Portanto, em comparação com outros complexos de bismuto com atividade citotóxica relevante encontrados na literatura, o complexo descrito neste trabalho $[\text{Bi}(\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O})\text{Cl}_2]$ está entre os mais ativos (Cl_{50} de $0,30 \mu\text{mol L}^{-1}$).

3.7 Complexo 7 – [Bi(C₁₃H₁₁N₂I₂O)Cl₂]

Composto de bismuto(III) do C₁₃H₁₂N₂I₂O

Dicloro(2,4-diiodo-6-[[piridina-2-il metil]amino]metil}fenolato)bismuto(III)

3.7.1 Análise condutimétrica

A condutividade do composto [Bi(C₁₃H₁₁N₂I₂O)Cl₂], em DMF foi de 15,09 ohm⁻¹ cm² mol⁻¹. Este valor está bem abaixo da faixa de valores de referência para eletrólitos 1:1 em dimetilformamida, 65 a 90 ohm⁻¹ cm² mol⁻¹ [124], o que indica que o composto é neutro.

3.7.2 Análise Elementar: C, H, N e Bi

Os teores (%) de C, H, e N, bem como o teor (%) do íon metálico estão apresentados na Tabela 26, juntamente com os valores calculados para a fórmula [Bi(C₁₃H₁₁N₂I₂O)Cl₂], MM= 744,93 g mol⁻¹.

Tabela 26 - Valores de CHN e Bi, experimental e calculado para [Bi(C₁₃H₁₁N₂I₂O)Cl₂]

Elemento	%C	%H	%N	%Bi
Calculado	20,96	1,49	3,76	28,05
Experimental	21,62	1,46	3,60	27,37

Os resultados de C, H, N e Bi sugerem um composto de fórmula mínima BiC₁₃H₁₁N₂I₂OCl₂.

3.7.3 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

O espectro de absorção na região do infravermelho para o ligante livre C₁₃H₁₂N₂I₂O está apresentado na Figura 84. A região abaixo de 1700 cm⁻¹ foi ampliada para melhor distinção das bandas (Figura 85).

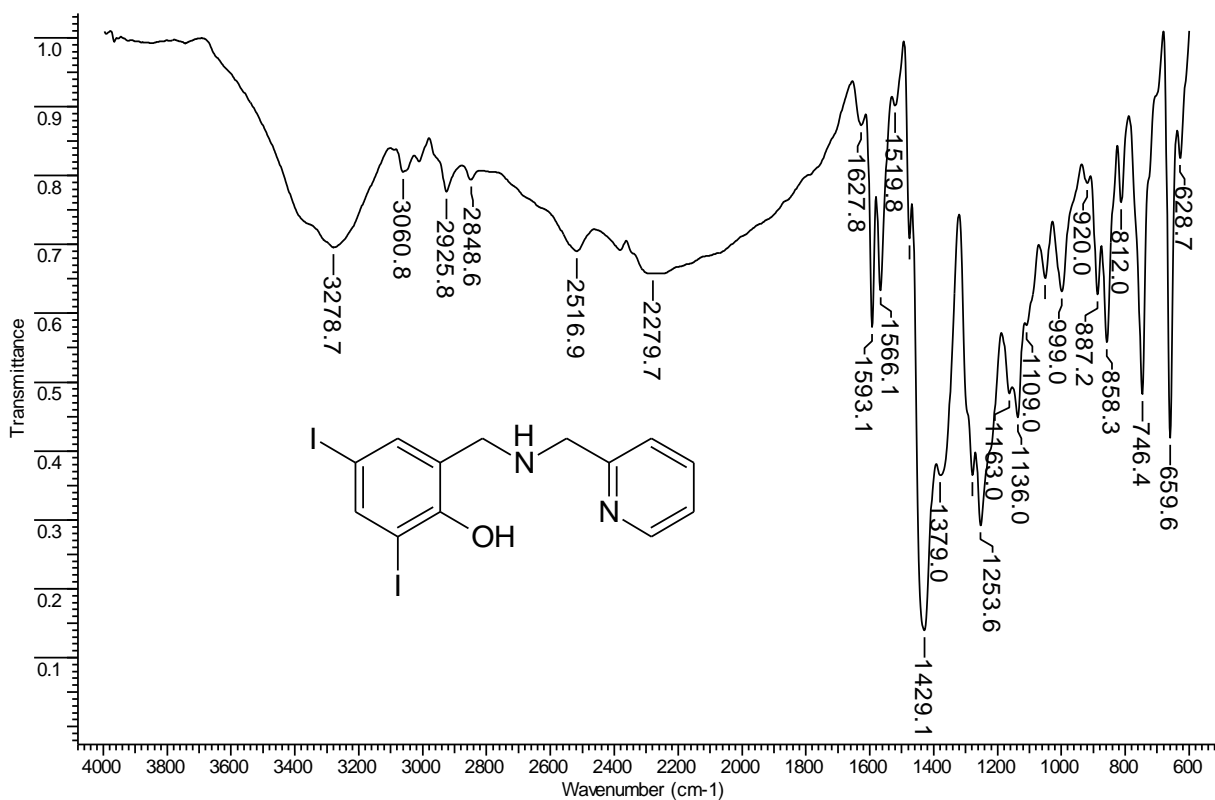


Figura 84 – Espectro na região do infravermelho, obtido para o ligante $C_{13}H_{12}N_2I_2O$, em KBr.

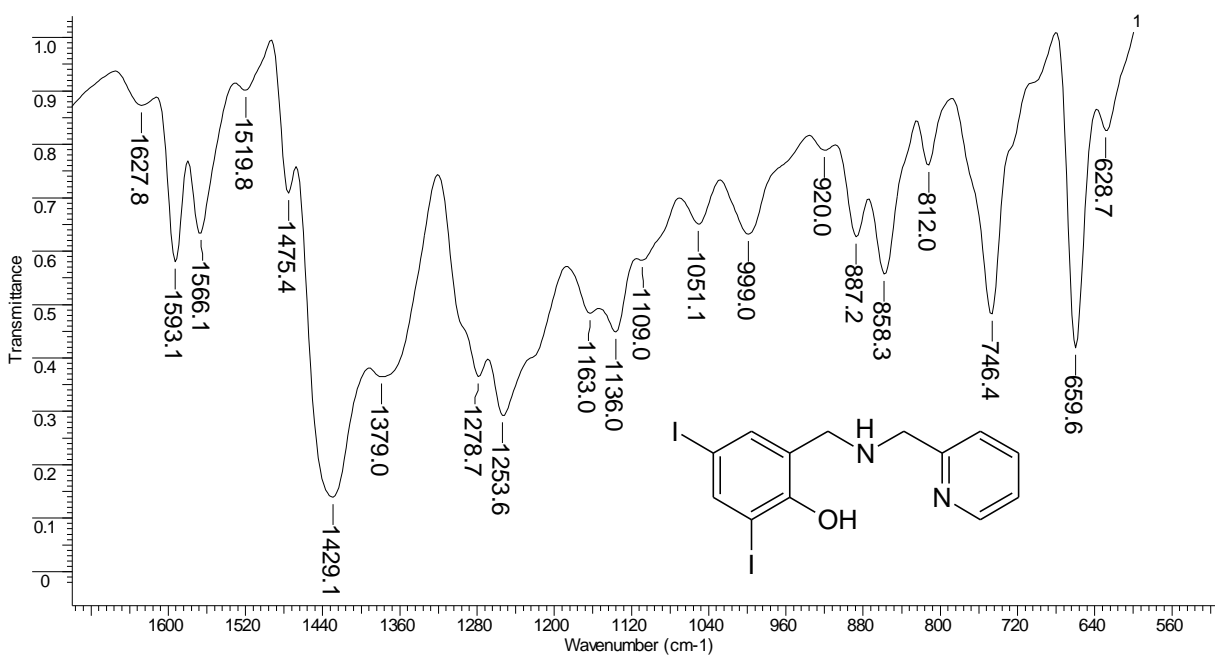


Figura 85 - Região selecionada e ampliada do espectro de infravermelho do ligante $C_{13}H_{12}N_2I_2O$, em KBr.

No espectro do ligante livre $C_{13}H_{12}N_2I_2O$, um ombro em torno de 3440 cm^{-1} pode ser atribuído ao estiramento νOH fenólico. Ligações de hidrogênio também podem contribuir para essa banda larga.

Uma banda larga em 3279 cm^{-1} no espectro do ligante livre pode ser atribuída a νNH da amina secundária [168].

As bandas de estiramento νCC (fenol), νCC (piridina) e νCN (piridina) absorvem na mesma região, entre $1600 - 1400\text{ cm}^{-1}$, dificultando a discriminação entre as bandas desses dois grupos no espectro. Entretanto, as bandas em 1593 e 1254 cm^{-1} no espectro do ligante livre $C_{13}H_{12}N_2I_2O$ são associadas a esses grupos [132].

O espectro de absorção na região do infravermelho para o complexo $[\text{Bi}(\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{I}_2\text{O})\text{Cl}_2]$ está apresentado na Figura 86. A região abaixo de 1700 cm^{-1} foi ampliada para melhor distinção das bandas (Figura 87).

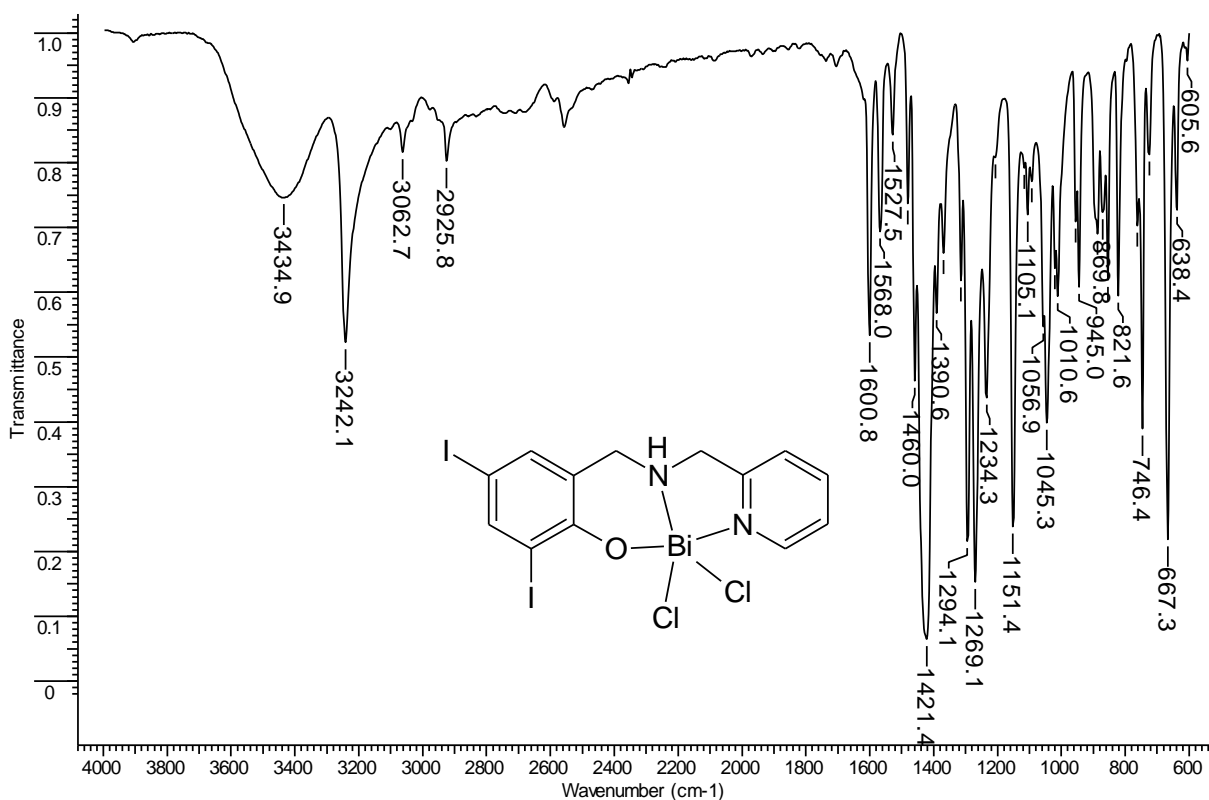


Figura 86 - Espectro na região do infravermelho, obtido para o complexo $[\text{Bi}(\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{I}_2\text{O})\text{Cl}_2]$, em KBr.

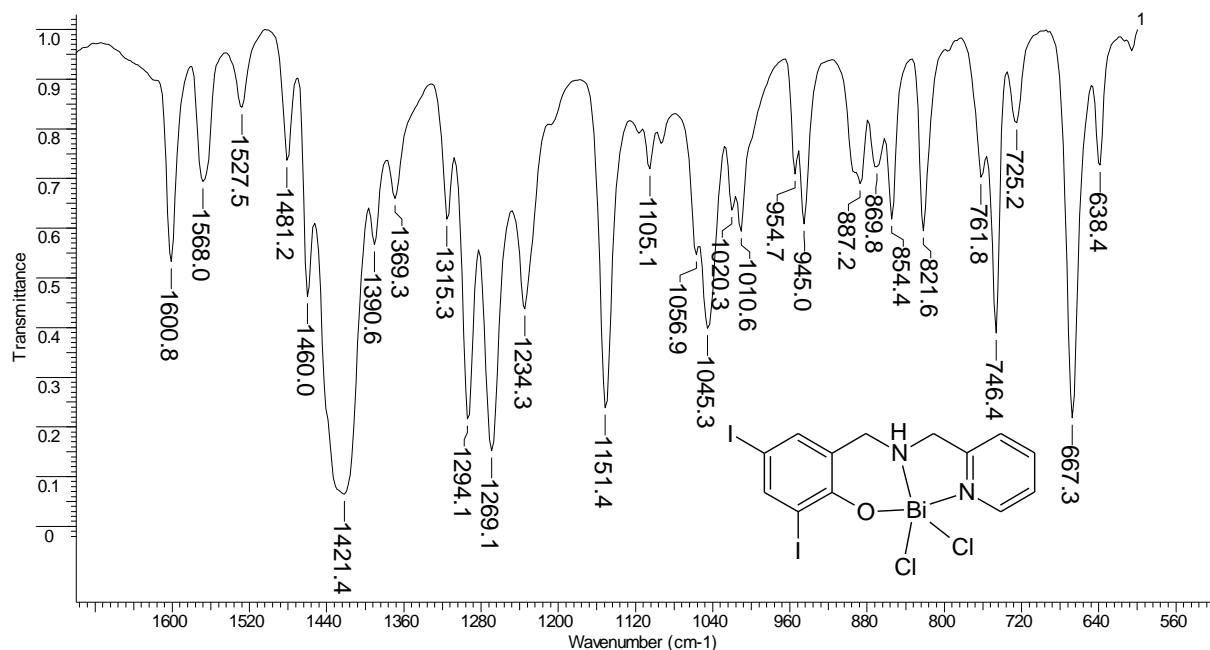


Figura 87 - Região ampliada do espectro de infravermelho do complexo $[\text{BiC}_{13}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{l}_2\text{OCl}_2]$, em KBr.

IV (cm⁻¹): 3435(larga), 3242F, 1601m, 1568m, 1528f, 1481m, 1460m, 1421mF, 1391m, 1369f, 1315m, 1294F, 1269F, 1234m, 1151F, 1105f, 1056m, 1045m, 1020f, 1011f, 955f, 945m, 887f, 872f, 870f, 854m, 822m, 762f, 746F, 725f, 667F, 638f, 606mf.

Observam-se várias modificações no espectro do complexo de bismuto(III) em relação ao espectro do ligante livre, indicando que houve a coordenação.

No espectro do ligante, um ombro largo em torno de 3440 cm⁻¹ pode ser atribuído a ligações de hidrogênio e ao estiramento νOH fenólico. No espectro do complexo, há a permanência de uma banda larga nessa região, em 3435 cm⁻¹.

Uma banda larga em 3279 cm⁻¹ no espectro do ligante desloca-se para 3242 cm⁻¹ no espectro do complexo. Essa banda pode ser atribuída a νNH da amina secundária [168], que desloca-se para região de menor frequência no espectro do complexo devido à coordenação do nitrogênio da amina ao bismuto(III).

As bandas de estiramento $\nu\text{C}=\text{C}$ do fenol e da piridina absorvem na mesma região entre 1600 - 1400 cm⁻¹, dificultando a distinção entre esses dois grupos no espectro. Entretanto, as bandas no espectro do ligante livre em 1593 e 1254 cm⁻¹ [132] ($\nu\text{C}=\text{N}$, $\nu\text{C}=\text{C}$ e $\nu\text{C}=\text{C}$)

deslocaram-se para maiores frequências, podendo ser observadas em 1601 e 1269 cm^{-1} no espectro do complexo, respectivamente.

Outras bandas de difícil atribuição devem estar associadas à coordenação do N piridínico e do oxigênio do fenolato, respectivamente: A banda em 1429 cm^{-1} no espectro do ligante livre, deslocou-se para menor frequência no espectro do complexo, aparecendo em 1421, e a banda em 660 cm^{-1} no espectro do ligante livre, deslocou-se para 667 cm^{-1} no espectro do complexo de bismuto(III).

3.7.4 Ressonância magnética nuclear de hidrogênio- RMN ^1H

O espectro de RMN ^1H do ligante $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{I}_2\text{O}$ e do complexo $[\text{Bi}(\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{I}_2\text{O})\text{Cl}_2]$ estão apresentados na Figura 88 e Figura 89, respectivamente.

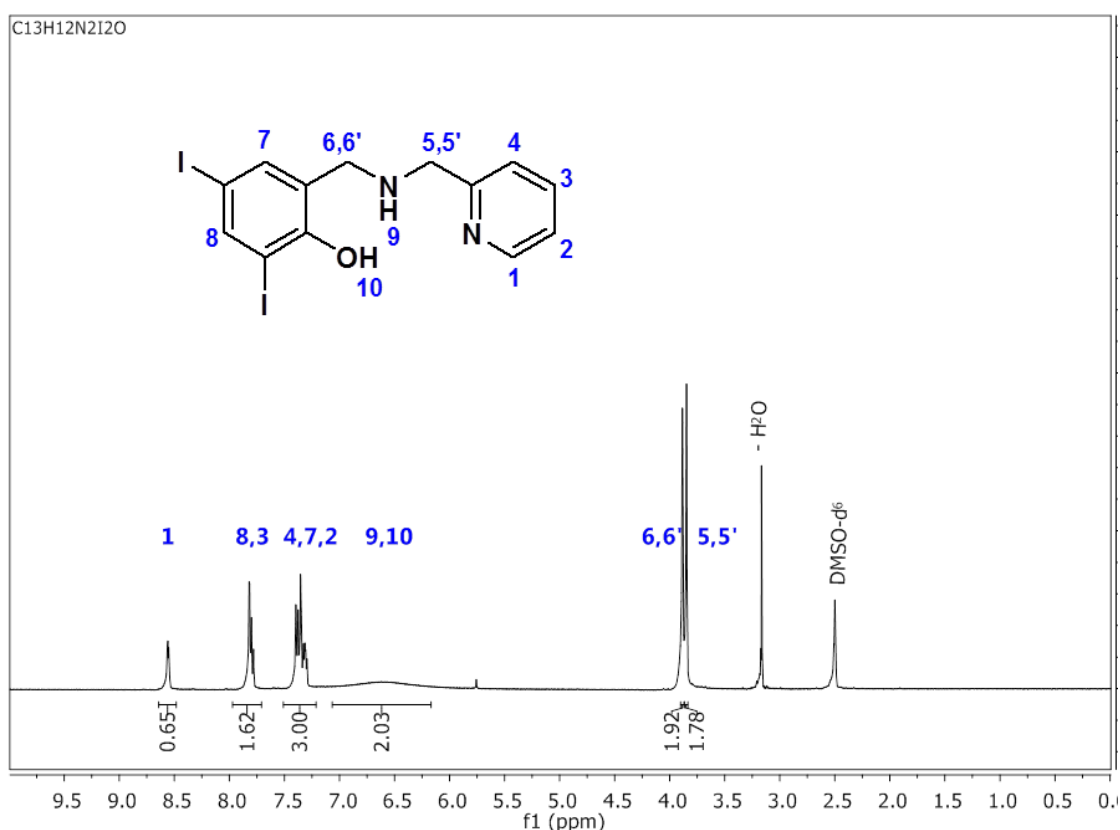


Figura 88 – Espectro de RMN ^1H do ligante $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{I}_2\text{O}$ em DMSO-d_6 .

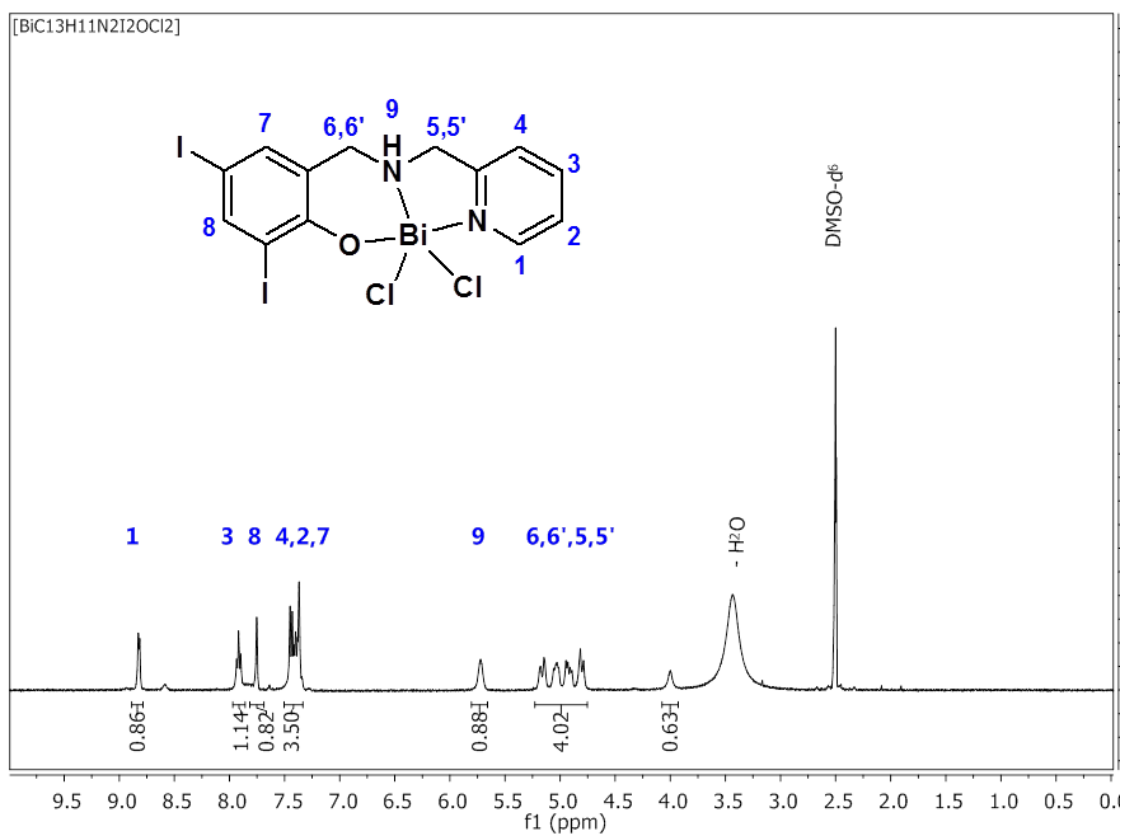


Figura 89 – Espectro de RMN ¹H do complexo [BiC₁₃H₁₁N₂I₂OCl₂] em DMSO-d₆.

As atribuições dos sinais de RMN ¹H aos respectivos prótons do ligante C₁₃H₁₂N₂I₂O e do complexo [Bi(C₁₃H₁₁N₂I₂O)Cl₂] estão descritas na Tabela 27.

Tabela 27 – Atribuições dos sinais de RMN ¹H do ligante C₁₃H₁₂N₂I₂O e do complexo [BiC₁₃H₁₁N₂I₂OCl₂] em DMSO-d₆ a 298K.

Atribuição	C ₁₃ H ₁₂ N ₂ I ₂ O δ / ppm (mult., J / Hz)	[Bi(C ₁₃ H ₁₁ N ₂ I ₂ O)Cl ₂] δ / ppm (mult., J / Hz)
H1 (1H; piridina)	8,55 (d, J = 4,8)	8,82 (d, J = 4,9)
H2 (1H; piridina)	7,31 (dd, J = 7,6; 4,8)	7,40 (t, J = 6,8)
H3 (1H; piridina)	7,80 br (td, J = 7,6; 1,6)	7,92 (t, J = 7,4)
H4 (1H; piridina)	7,39 (d, J = 8,0)	7,44 (d, J = 7,9)
H5 H5' (2H; CH ₂)	3,85 (s)	5,03 (dd, J = 1,0; 6,5) 5,16 (d, J = 11,9)
H6 H6' (2H; CH ₂)	3,88 (s)	4,80 (d, J = 11,7) 4,92 (dd, J = 14,9; 7,0)

H7 (1H; arila)	7,35 (d, J = 2,0)	7,37 (s)
H8 (1H; arila)	7.82 (d, J = 2,0)	7,76 (s)
H9 (1H; NH)	6 - 7 - largo (s)	5,72 (s)
H10 (1H; OH)	6 - 7 - largo (s)	ausente

As mudanças observadas no espectro do complexo $[\text{Bi}(\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{I}_2\text{O})\text{Cl}_2]$ são bastante similares às aquelas descritas anteriormente no item 3.6.4 para o complexo $[\text{Bi}(\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O})\text{Cl}_2]$. A principal modificação concerne aos prótons H5, H5' e H6, H6'. O simpleto observado no espectro do ligante em δ 3,84 (H5 e H5') aparece como dois dupletos em δ 5,06 e δ 5,16 ppm no espectro do complexo. Da mesma forma, os prótons metilênicos H6 e H6', um simpleto em δ 3,88 no espectro do ligante, divide-se em dois dupletos distintos em δ 4,80 e δ 4,92 ppm no espectro do complexo $[\text{Bi}(\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{I}_2\text{O})\text{Cl}_2]$. Também é notável a ausência do sinal alargado em δ 6,6 ppm, atribuído ao próton lábil do grupo fenol, indicando sua desprotonação.

3.7.5 Espectro de massas

O espectro de massas ESI-MS obtido no modo negativo apresentou um pico em 742,8125 m/z (Figura 90), atribuído à espécie $[\text{Bi}(\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{I}_2\text{O})\text{Cl}_2]^-$, formada pela perda de um próton do complexo $[\text{Bi}(\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{I}_2\text{O})\text{Cl}_2]$ em solução.

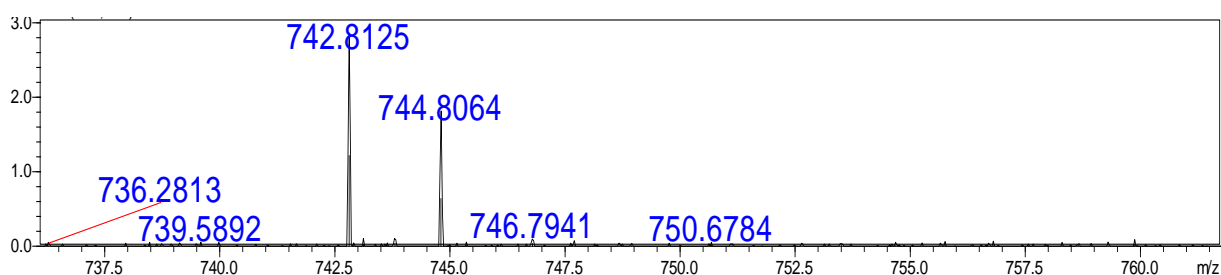


Figura 90 – Região expandida do espectro ESI-MS em metanol, evidenciando o pico em 742,8125, atribuído à espécie $[\text{Bi}(\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{I}_2\text{O})\text{Cl}_2]^-$, formada pela perda de um próton do complexo em solução.

A distribuição isotópica foi simulada para a espécie $[\text{Bi}(\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{I}_2\text{O})\text{Cl}_2]^-$ (Figura 91), para efeito de comparação.

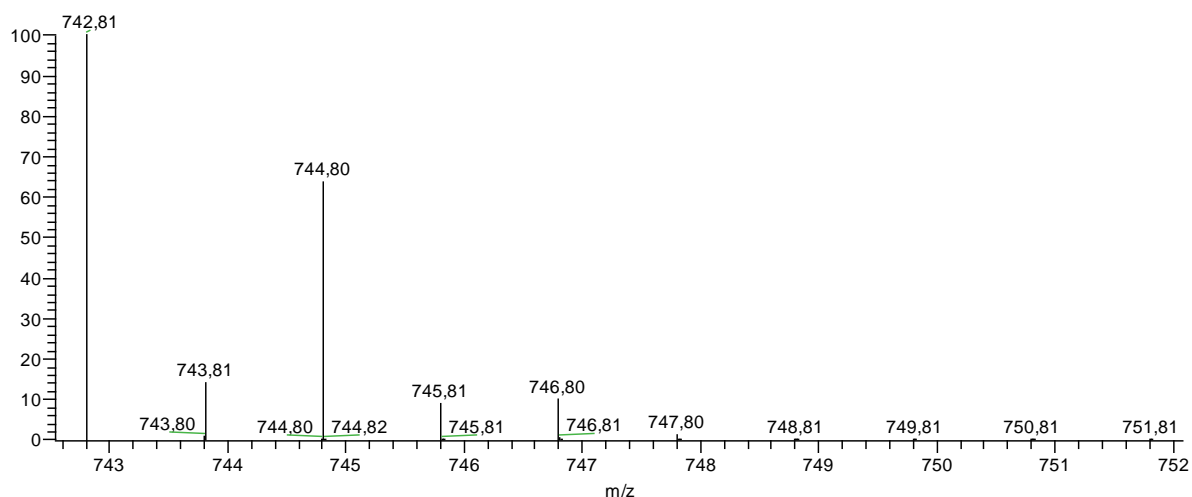


Figura 91- Distribuição isotópica simulada para a espécie $[\text{BiC}_{13}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{I}_2\text{OCl}_2]^-$.

3.7.6 Atividade antibacteriana - (MIC - Concentração mínima inibitória)

O efeito antibacteriano do ligante $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{I}_2\text{O}$ e do complexo $[\text{Bi}(\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{I}_2\text{O})\text{Cl}_2]$ foi estudado em 9 linhagens de bactérias e os valores de MIC obtidos encontram-se na Tabela 28.

Tabela 28 – MIC / $\mu\text{mol L}^{-1}$, para o $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{I}_2\text{O}$ e o respectivo complexo $[\text{Bi}(\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{I}_2\text{O})\text{Cl}_2]$.

Linhagem bacteriana	MIC / $\mu\text{mol L}^{-1}$		
	BiCl_3	$\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{I}_2\text{O}$	$[\text{Bi}(\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{I}_2\text{O})\text{Cl}_2]$
1 - <i>E. coli</i> ATCC 25922	> 406	275	172
2 - <i>E. coli</i> BH 100	> 406	17	3
3 - <i>E. coli</i> MC 1061	> 406	137	43
4 - <i>E. coli</i> MC 1061 / pBR 322	> 406	137	86
5 - <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	> 406	>275	>172
6 - <i>S. aureus</i> ATCC 25923	> 406	69	11
7 - <i>S. sonnei</i> ATCC 11060	> 406	275	86
8 - <i>S. dysenteriae</i> ATCC 13313	406	69	5
9 - <i>Salmonela</i> MG 031	> 406	275	43
10- <i>S. tiphymurium</i> ATCC 13311	> 406	275	21

O ligante e o complexo inibiram o crescimento bacteriano em todas as linhagens de maneira dependente da concentração, apresentando valores de MIC, exceto para a *P. aeruginosa*.

Pode-se destacar que o complexo de bismuto(III) foi 6 vezes mais ativo que o ligante livre contra a linhagem(2) *E. coli* BH 100, resistente aos aminoglicosídeos, estreptomicina e espectomicina [163]. Além disso, o valor da MIC $3 \mu\text{mol L}^{-1}$ obtido para o complexo é um valor relativamente baixo, o que é importante para fins farmacológicos.

Ainda mais notável foi a atividade do complexo de bismuto(III) contra a linhagem(8), *S. dysenteriae*. A MIC do complexo foi de $5 \mu\text{mol L}^{-1}$, correspondendo a uma atividade 14 vezes maior em comparação ao ligante livre.

O complexo também foi 6 vezes mais ativo que o ligante contra a linhagem(9) *Salmonella* MG 031, também multirresistente.

O complexo foi 6 vezes mais ativo que o ligante livre contra a Gram-positiva *S. aureus*, com valor de MIC de $11 \mu\text{mol L}^{-1}$.

A atividade do complexo foi 13 vezes maior que a do ligante livre na linhagem(10), *S. typhimurium*, com valor de MIC de $21 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Esses resultados são bastante relevantes e validam a estratégia de coordenação de íons metálicos a ligantes de interesse biológico para o combate à resistência bacteriana.

3.7.7 Atividade citotóxica em células tumorais

O efeito do ligante livre $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{I}_2\text{O}$ e do complexo $[\text{Bi}(\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{I}_2\text{O})\text{Cl}_2]$ no crescimento de células tumorais foi estudado e a Cl_{50} determinada foi de $(1,02 \pm 0,10) \mu\text{mol L}^{-1}$ e $(0,38 \pm 0,04) \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. O complexo foi aproximadamente 3 vezes mais ativo que o ligante livre. O valor de IC_{50} obtido para o precursor metálico BiCl_3 foi de $41,16 \pm 4,20$, ou seja, o complexo é 100 vezes mais ativo.

A coordenação do bismuto(III) aos dois ligantes heterocíclicos tridentados do tipo NN'O doadores estudados aumentou a atividade citotóxica: ambos os complexos são aproxima-

damente 3 vezes mais ativos do que os respectivos ligantes. Vale a pena destacar que estes compostos estão entre os compostos de bismuto(III) mais ativos já descritos.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES

Complexos de bismuto(III) da sulfapiridina e de bismuto(III) e gálio(III) da sulfassalazina

Foram sintetizados dois compostos de bismuto(III) com antibióticos da família das sulfas. A estrutura do complexo de bismuto(III) da sulfapiridina - $[\text{Bi}(\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_2\text{S})_3 \text{Cl}_3]$ – apresenta geometria octaédrica e número de coordenação (NC) 6. O bismuto(III) coordenou-se à sulfapiridina de modo monodentado através do nitrogênio sulfonamídico.

Já a sulfassalazina formou um composto do tipo ML_2 com o bismuto(III), coordenando-se de maneira bidentada através de dois oxigênios do anel salicilato. A sulfassalazina é formada através da ligação da sulfapiridina ao ácido 5-aminosalicílico, possuindo na sua estrutura os sítios da sulfapiridina e do ácido 5-aminosalicílico. Portanto, quando as duas opções de coordenação estão presentes, o bismuto possui maior afinidade pelo sítio bidentado formado por dois oxigênios do salicilato do que pelo nitrogênio sulfonamídico.

O complexo de bismuto(III) da sulfapiridina melhorou o efeito antibacteriano em relação à sulfapiridina livre. Já o complexo de bismuto(III) da sulfassalazina não foi muito ativo em nenhuma das linhagens bacterianas testadas. Por outro lado, ambos os complexos de bismuto(III) apresentaram melhor atividade citotóxica em células tumorais que seus ligantes livres, sendo que a Cl_{50} do composto de bismuto(III) da sulfassalazina foi de $9,7 \mu\text{mol L}^{-1}$.

O gálio(III) também coordenou-se à sulfassalazina de maneira bidentada, através de dois oxigênios do anel salicilato na estequiometria 1:1. A coordenação do gálio(III) à sulfassalazina não incrementou a atividade antibacteriana em proporção considerável, e sua atividade biológica contra células tumorais foi relativamente próxima à do ligante.

Complexos de bismuto(III) e gálio(III) da tetraciclina

A tetraciclina coordenou-se de forma bidentada tanto ao bismuto(III) quanto ao gálio(III) através de sítios do anel A. Os sítios envolvidos foram o oxigênio desprotonado em C3 (enólico) e a amida em C2. Entretanto, o bismuto(III), que é um íon mais macio que o gá-

lio(III), ligou-se ao nitrogênio da amida enquanto o gálio(III), um ácido duro, ligou-se ao oxigênio da amida. A razão estequiométrica íon metálico / tetraciclina foi de 1 / 1 para o complexo de bismuto(III), e de 1 / 2 para o composto de gálio(III).

O complexo de bismuto(III) da tetraciclina mostrou-se um agente antibacteriano bastante promissor, apresentando atividade antibacteriana semelhante à da tetraciclina nas linhagens sensíveis e capaz de reverter a resistência bacteriana em linhagens resistentes de *Escherichia coli* que carregam o plasmídeo pBR 322. Igualmente, o complexo de gálio(III) da tetraciclina conseguiu reverter a resistência bacteriana ao antibiótico livre. Esta linhagem resistente apresenta em sua membrana plasmática uma proteína transportadora, a Tet(A), que transporta a tetraciclina, na forma de um complexo de magnésio, para fora da célula contra a entrada de um próton. O modo pelo qual os complexos conseguem driblar o mecanismo da resistência à tetraciclina não foi elucidado. Pode-se especular que a Tet(A) não seja capaz de reconhecer e transportar estes complexos de gálio e bismuto para fora da célula.

O complexo de bismuto da tetraciclina foi 7 vezes mais ativo e o complexo de gálio foi aproximadamente 13 vezes mais ativo que a tetraciclina livre contra células tumorais.

Compostos de bismuto(III) com ligantes NN'O doadores

Os ligantes NN'O doadores coordenaram-se ao bismuto(III) de forma tridentada, formando compostos neutros, similares, do tipo $[\text{Bi}(\text{L})\text{Cl}_2]$, onde $\text{L1} = \text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}$ ou $\text{L2} = \text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{I}_2\text{O}$.

Com relação ao potencial antitumoral, vale a pena destacar que estes complexos de bismuto estão entre os mais ativos contra células tumorais descritos até o presente. Os valores de Cl_{50} obtidos para $[\text{Bi}(\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O})\text{Cl}_2]$ e $[\text{Bi}(\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{I}_2\text{O})\text{Cl}_2]$ foram 0,30 e 0,38 $\mu\text{mol L}^{-1}$ respectivamente. Esses compostos tem um grande potencial biotecnológico e merecem estudos futuros mais detalhados, como o de sua atividade em modelo animal.

Podemos concluir que a coordenação metálica a ligantes de interesse biológico mostrou-se uma estratégia eficiente para a obtenção de compostos mais ativos, principalmente em linhagens resistentes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

"As pessoas podem duvidar do que você diz, mas elas acreditarão no que você faz."

Lewis Cass

- [1] Graham L. Patrick, *An Introduction to Medicinal Chemistry*, 4ª Edição, Oxford University Press Inc., New York, (2009).
- [2] R. Bentley, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 36 (2009) 775-86 (review).
- [3] B. Rosemberg, L. van Camp, *Cancer Research*, 30 (1970) 1799-1802.
- [4] <http://www.dw.de/bact%C3%A9rias-super-resistentes-amea%C3%A7am-a-base-da-medicina-moderna/a-17180844> - acessado em 17/12/2013).
- [5] A. Albert, *Selective Toxicity* (Chapman & Hall, New York, ed. 7. (1985) 206-265.
- [6] Scott L. Dax, *Antibacterial Chemotherapeutic Agents*, Chapman & Hall, 2-6 Boundary Row, London SE1 8HN, UK, (1997) 31-35.
- [7] A.C. Bowen, R.A. Lilliebridge, S.Y.C. Tong, R.W. Baird, P.W. Malcolm, I. McDonald, B.J. Currie, J.R. Carapetisa, *J. Clin. Microbiol.*, 50 (2012) 4067-4072.
- [8] S.F. Queener, V. Cody, J. Pace, P. Torkelson, A. Gangjee, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 57 (2013) 4990-4998.
- [9] <http://www.cives.ufrj.br/informacao/dm/dm-iv.html> - acessado em 09/11/2013
- [10] L. Huang, K. Crothers, C. Atzori, T. Benfield, R. Miller, M. Rabodonirina, J. Helweg, *Emerging Infectious Diseases*, 10 (2004) 1721-1728.
- [11] P.A. Robe, D. Martin, A. Albert, M. Deprez, A. Chariot, V. Bours, *BMC Câncer*, 6 (2006) 1-4.
- [12] C.P. Rains, S. Noble, D. Faulds, *Drugs*, 50 (1995) 137-156.
- [13] K.E. Donahue, G. Gartlehner, D.E. Jonas, L.J. Lux, P. Thieda, B.L. Jonas, R.A. Hansen, L.C. Morgan, K.N. Lohr, *Ann. Intern. Med.*, 148 (2008) 124-134.
- [14] J. Eaden, *Aliment Pharmacol. Ther.*, 2 (2003) 15-21.
- [15] M.D. Chengalroyen, E.R. Dabbs, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 29 (2013) 389-399.

- [16] M.K Yun, Y.Wo, Z. Li, Y. Zhao, M.B. Waddell, A.M. Ferreira, R.E. Lee, D. Bashford, S.W. White, *Science*, 335 (2012) 1110-1114.
- [17] A.M. Baca, R. Sirawaraporn, S. Turley, W. Sirawaraporn, W.G. Hol, *J. Mol. Biol.*, 302 (2000) 1193-1212.
- [18] V. A. Agertt, L.L. Marques, P.C. Bonez, T.V. Dalmolin, G.N.M. Oliveira, M.M.A. Campos, *Tuberculosis*, 93 (2013) 318-321.
- [19] F.S.D. Fiol, L.C. Lopes, M.I. Toledo, S.B. Filho, *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 43 (2010) 68-72.
- [20] M.E.J. Woolhouse, M.J. Ward, *Science*, 341 (2013) 1460-1461.
- [21] M. Bassetti, M. Merelli C. Temperoni, A. Astilean, *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* (2013) 12-22.
- [22] N. Bionda, J-P. Pitteloud, *Future Med. Chem.*, 5 (2013) 1311–1330.
- [23] M.A. Riley, S.M. Robinson, C.M. Roy, R.L. Dorit *Future Med. Chem.* 5 (2013) 1231–1242.
- [24] K.J Labby, S. Garneau-Tsodikova, *Future Med. Chem.*, 5 (2013) 1285-1309.
- [25] A.P. Magiorakos, A. Srinivasan, R. B. Carey, Y. Carmeli, M. E. Falagas, C.G. Giske, S. Harbarth, J.F. Hindler, G. Kahlmeter, B.Olsson-Liljequist, D.L. Paterson, L.B. Rice, J. Stelling, M.J. Struelens, A. Vatopoulos, J.T. Weber, D.L. Monnet, *Clin. Microbiol. Infect.*, 18 (2012) 268–281.
- [26] K.J. Towner, The problem of resistance. In: David Greenwood; *Antimicrobial Chemotherapy*, 3rd ed. Oxford University Press. Oxford, 1997.
- [27] R. Wise, H. Tony, C. Otto, S. Marc, H. Reinen, H. Pentti, *BMJ*. 317 (1998) 609-610.
- [28] H.S. Gold, R.C.Jr. Moellering, *N. Engl. J. Med.* 355 (1996) 1445-53.
- [29] G.P. Silveira, F. Nome, J.C. Gesser, M.M. Sá, *Quim. Nova*, 29 (2006) 844-855.
- [30] L.L. brunton, B.A. Chabner, B.C. Knollmann, McGraw, *As bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman*, Hill Brasil, Porto Alegre, Artmed, 2007 – acesso online em 15/11/2013.
- [31] M. Doumith, Matthew. J. Ellington, D.M. Livermore, N. Woodford, *J. Antimicrob. Chemother.*, 63 (2009) 659-667.
- [32] B.G. Spratt, *Science*, 264 (1994) 388- 393.
- [33] H. Nikaido, *Science*, 264 (1994) 382-388.

- [34] J.A. Bohnert, S. Schuster, W.V. Kern, *Open Microbiol. J.*, 7 (2013) 83-86.
- [35] C. Rumbo, E. Gato, M. López, C.R. Alegría, F. Fernández-Cuenca, L. Martínez-Martínez, J. Vila, J. Pachón, J.M. Cisneros, J. Rodríguez-Baño, A. Pascual, G. Bou, M. Tomás, *Antimicrobial Agents and chemotherapy*, 57 (2013) doi:10.1128/AAC.00730-13.
- [36] E.C. Pereira-Maia, P.P. Silva, W.B. de Almeida, H.F. dos Santos, B.L. Marcial, R. Ruggiero, W. Guerra, *Quim. Nova*, 33 (2010) 700-706.
- [37] J.H. Han, I. Nachamkin, P. Tolomeo, X. Mao, W.B. Bilker, E. Lautenbach., *J. Infect. Dis.*, 206 (2012) 1597-1603.
- [38] G.O. Gutkink, J. Di Conza, P. Power, M. Radice, *Curr. Pharm. Des.*, 19 (2013) 164-208.
- [39] S. Khanal, D.R. Joshi, D.R. Bhatta, U. Devkota, B.M. Pokhrel, *ISRN Microbiology*, 2013 (2013) 5p., doi:10.1155/2013/847569.
- [40] S. Sun, W. Zhang, B. Mannervik, D. I. Andersson, *J. Biol. Chem.*, 288 (2013) 2314-2324.
- [41] W. Tao, M.H. Lee, J. Wu, N.H. Kim, J.C. Kin, E. Chung, E.C. Hwang, S.W. Lee, [Appl. Environ. Microbiol.](#), 78 (2012) 6295-6301.
- [42] B.S. Speer, N.B. Shoemaker, A.A. Salyers, *Clin. Microbiol. Rev.*, 5 (1992) 387-399.
- [43] Y. Zhou, [L. Yu](#), J. Li, L. Zhang, Y. Tong, B. Kan, [Int. J. Antimicrob. Agents](#), 42 (2013) 72-75.
- [44] Y.H. Lee, K.H. Nam, J.D. Helmann, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 57 (2013) 56-65.
- [45] V. Molodtsov, I.N. Nawarathne, N.T. Scharf, P.D. Kirchhoff, H.D. Showalter, G.A. Garcia, K.S. Murakami, *J. Med. Chem.*, 56 (2013) 4758-4763.
- [46] M.K Yun, Y. Wo, Z. Li, Y. M.B. Waddell, A.M. Ferreira, R.E. Lee, D. Bashford, S.W. White, *Science*, 335 (2012) 1110-1114.
- [47] X.Z. Huang, J.G. M.A. Chahine, L.M. Glenn, J.A. Ake, W. Su, M.P. Nikolich, E.P. Lesho, *Plos One*, 7 (2012) e40360 (8p.).
- [48][46] W. Buwembo, S. Aery, C.M. Rwenyony, g. Swedberb, F. Kironde, *International Journal of Microbiology*, (2013) (6p.) ID 367021
- [49] S. Wu, A. Dalsgaard, A.M. Hammerum, L.J. Porsbo, L.B. Jensen, *Acta Vet. Scand.*, 30 (2010) 7p. doi: 10.1186/1751-0147-52-47.

- [50] D.P. Rocha, G.F. Pinto, R. Ruggiero, C.A. de Oliveira, W. Guerra, A.P. Soares, T.T. Tavares, I.M. Marzano, E.C. Pereira-Maia, *Quim. Nova*, 34 (2011) 111-118.
- [51] C.L. Fox, B.W. Rappole, W. Stanford, *Arch. Surg.*, 96 (1968) 184-188.
- [52] J. Luan, J. Wu, Y. Zheng, W. Song, G. Wang, J. Guo, X. Ding, *Biomedical materials*, 7 (2012) 11p.
- [53] N.M. Morsi, G.A. Abdelbary, M.A. Ahmed, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 38(2013) 2227-2236.
- [54] M. Prosdocimi, C. Belivacqua, *Minerva Médica*, 103 (2012) 533-539.
- [55] M. Brion, G. Berthon, J.B. Fourtillan, *Inorg. Chim. Acta*, 55 (1981) 47-56.
- [56] I. Chopra, M. Roberts, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 65 (2001) 232-260.
- [57] L. Lambs, M. Venturini, B. Decock-Le Révérend, H. Kozłowski, G. Berthon. *J.Inorg. Biochem.*, 33 (1988) 193-210.
- [58] D.O. Guimarães, L.S. Momesso e M.T. Pupo, *Quim. Nova*, 33 (2010) 667-679.
- [59] D.M. Shlaes, *Current Opinion in Investigational Drugs*, 7 (2006) 167-171.
- [60] G.G. Zhanel, K. Homenuik, K. Nichol, A. Noreddin, L. Vercaigne, J. Embil, A. Gin, J.A. Karłowski, D.J. Hoban, *Drugs*, 64 (2004) 63-88.
- [61] M. Roberts, *Clin. Infect. Dis.*, 36 (2003) 462-467.
- [62] J.L. Ramos, M. Martinez-Bueno, A.J. Molina-Henares, W. Teran, K. Watanabe, X. Zhang, M.T Gallegos, R. Brennan, R. Tobes, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 69 (2005) 326-356.
- [63] W. Li, G.C. Atkinson, N.S. Thakor, Ü. Allas, C. Lu, K-Y. Chan, T. Tenson, K. Schulten, K.S. Wilson, V. Haurlyuk, J. Frank, *Nat. Commun.*, 12 (2013) 1477. doi:10.1038/ncomms2470.
- [64] S.R. Connell, D.M. Tracz, H. Knud, D.E. Taylor, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 47 (2003) 3675-3681.
- [65] A. Dönhöfera, S. Franckenberga, S. Wicklesa, O. Berninghausena, R. Beckmanna, D.N. Wilson, *PNAS*, 109 (2012) 16900–16905.
- [66] M.C. Roberts, *FEMS Microbiol. Lett.*, 245 (2005) 195 -203.
- [67] D. Felmingham, *J. Chemother.*, 17 (2005) 5-11.
- [68] N.Yang, H. Sun, *Coordination chemistry Reviews*, 251 (2007) 2354-2366.
- [69] Y.Q. Me, Y.Y. Li, H.S.Wu,W.H. Sha, H. Du, S.J. Dai, H.Wang, Q.L. Li, *Helicobacter* 4 (1999) 128.

- [70] I.L.P. Beales, *BMC Gastroenterol.*, 1 (2001) 7-15.
- [71] P.C. Andrews, M. Busse, G.B. Deacon, R.L. Ferrero, P.C. Junk, J.G. MacLellan, A. Vom., *Dalton Trans.*, 42 (2012) 11798–11806.
- [72] E.R.T. Tiekink, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 42 (2002) 217-224.
- [73] S. Ahmad, A.A. Isab, S. Ali, A.R. Al-Arfaj, *Polyhedron*, 25 (2006) 1633-1645.
- [74] Y. Kaneko, M. Thoendel, O. Olakanmi, B.E. Britigan, P.K. Singh, *J. Clin. Invest.*, 117 (2007) 877-888.
- [75] www.inca.gov.br, link (a) <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/index.asp?!D=2> link (b)-
http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?!D=101 (acessado em 29/09/2013)
- [76] S. Garritano, A. Inga, F. Gemignani, S. Landi, *Oncogenesis*, 2 (2013) 1-7.
- [77] P. Brachova, K.W. Thiel, K.K. Leslie, *Int. J. Mol. Sci.*, 14 (2013) 19257-19275.
- [78] M. Kandouz, J. Zhao, A. Bier, S.D. Marco, I. Oviedo-Landaverde, I.M. Gallouzi, G. Batist, *Plos One*, 8 (2013) 1-12.
- [79] B. Rosenberg, L. van Camp, T. Krigas, *Nature* 205 (1965) 698-699.
- [80] S. Neidle & D.E. Thurston, *Nature Reviews Cancer*, 5 (2005) 285-296.
- [81] A.P. Neves, M.D. Vargas, *Rev. Virtual Quim.*, 3 (2011) 196-209.
- [82] A.G. Patel, S.H Kaufmann, *eLife*, 1 (2012) DOI: <http://dx.doi.org/10.7554/eLife.00387>
- [83] B. Denard, C. Lee, J. Ye, *eLife*, 1(2012) e00090. <http://dx.doi.org/10.7554/elife.00090>
- [84] S Zhang, X Liu, T. Bawa-Khalfe, L.S. Lu, Y.L. Lyu, L.F. Liu et al., *Nat. Med*, 18 (2012) 1639-1642.
- [85] H. Li, C.S. Lai, J. Wu, P.C. Ho, D. Vos, E.R.T. Tiekink, *J. Inorg. Biochem.*, 101 (2007) 809–816.
- [86] M. Li, M. Yang, J. Niu, L. Zhang, S. Xie, *Inorg. Chem.*, 51 (2012) 12521-12526.
- [87] L. Zhang, G. An, M. Yang, M. Li, X. Zhu, *Inorg. Chem. Commun.*, 20 (2012) 37-40.
- [88] R. Huang, A. Wallqvist, D.G. Covell, *Biochem. Pharmacol.*, 69 (2005) 1009-1039.
- [89] Y.K. Li, M. Yang, M.X. Li, H. Yu, H.C. Wu, S.Q. Xie, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 23 (2013) 2288-2292.
- [90] S.M. Skinner, R.W. Lewis, *Res. Comum. Chem. Pathol. Pharmacol.*, 17 (1978) 165-168.

- [91] X.Y. Wang, X.M. Zan, J. Lin, J.W. Chem, Q. Xu, Z.J. Guo, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, (2003) 2379-2380.
- [92] Y. Kondo, M. Satoh, N. Imura, M. Akimoto, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 29 (1991) 19-23.
- [93] Y. Kondo, S. Himeno, M. Satoh, A. Naganuma, T. Nishimura, N. Imura, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 53 (2004) 33-38.
- [94] P. Collery, B. Keppler, C. Madoulet, B. Desoize, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 42 (2002) 283-296.
- [95] B.J. Foster, K. Clagett-Carr, D. Hoth, B. Leyland-Jones, *Cancer treatment Reports*, 70 (1988) 1311-1319.
- [96] C.R. Chitambar, D.P. Purpi, J. Woodliff, M. Yang, J.P. Wereley, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 322 (2007) 1228-1236.
- [97] C.R. Chitambar, *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 7 (2010) 2337-2361.
- [98] D. Chen, M. Frezza, R. Shakya, Q.C. Cui, V. Milacic, C.N. Verani, Q.P. Dou, *Câncer Res.*, 19 (2007) 9258-9265.
- [99] A.V. Rudnev, L.S. Foteeva, C. Kowol, R. Berger, M.A. Jakupec, V.B. Arion, A.R. Timerbaev, B.K. Keppler, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 100 (2006) 1819-1826.
- [100] L.R. Bersnstein, T. Taner, C. Godfrey, B. Noll, *Metal-Based Drugs*, 7 (2000) 33-47.
- [101] P. Collery, F. Lechenault, A. Cazabat, E. Juvin, L. Khassanova, A. Evangelou, B. Keppler, *Anticancer Research*, 20 (2000) 955-958.
- [102] S.M. Larson, J.S. Rasey, D.R. Allen, N.J. Nelson, Z. Grunbaum, G.D. Harp, D.L. Williams, *Journal of the National Cancer Institute*, 64 (1980) 41-53.
- [103] C.R. Chitambar, A.Zivkovic, *Cancer Research*, 47 (1987) 3929-3934.
- [104] F.N. Hegge, D.J. Mahler, S.M. Laerson, *European Journal of Cancer Clinical Oncology*, 18 (1982) 661-668.
- [105] M.A. Jakupec, M. Galanski, V.B. Arion, C.G. Hartinger, B.K. Keppler, *Dalton Transactions*, (2008) 183-194.
- [106] C.R. Chitambar, J. Narasimhan, J. Guy, *at al*, *Cancer Research*, 51 (1991) 6199-6201.
- [107] L.R. Bernstein; *Pharmacol. Rev.*, 50 (1998) 665-682.
- [108] J.H. Thurston, E.M. Marlier, K.H. Whitmire, *Chem. Commun.*, 23 (2002) 2834-2835.
- [109] W. Guerra, I.R. Silva, E.A. Azevedo, A.R.S. Monteiro, M. Bucciarelli-Rodriguez, E. Chartone-Souza, J.N. Silveira, A.P.S. Fontes, E.C. Pereira-Maia, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 17 (2006) 1627-1633.

- [110] F.C. Paula, W. Guerra, I.R. Silva, J.N. Silveira, F.V. Botelho, L.Q. Vieira, E.C. Pereira-Maia, *Chemistry & Biodiversity*, 5 (2008) 2124-2130.
- [111] P.P. Silva, F.C.S. Paula, W. Guerra, J.N. Silveira, F.V. Botelho, L.Q. Vieira, T. Bortolotto, F.L. Fischer, G. Bussi, H. Terenzi, E.C. Pereira-Maia, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 21 (2010) 1237-1246.
- [112] W. Guerra, A.P.S. Fontes, E.C. Pereira-Maia, *Eclética Química*, 35 (2010) 39-44.
- [113] T. Bortolotto, P.P. Silva, Neves, E.C. Pereira-Maia, H. Terenzi, *Inorganic Chemistry*, 50 (2011) 10519-10521.
- [114] L.L. Marques, G.M. Oliveira, E.S. Lang, M.M.A. Campos, L.R.S. Gris, *Inorganic Chemistry Communications* 10 (2007) 1083-1087.
- [115] V. A. Agertt, L.L. Marques, P.C. Bonez, T.V. Dalmolin, G.N.M. Oliveira, M.M.A. Campos, *Tuberculosis* 93(2013) 318-321].
- [116] P.P. Silva, W. Guerra, J.N. Silveira, A.M.C. Ferreira, T. Bortolo, F.L. Fisher, H. Terenzi, A. Neves, E.C. Pereira-Maia. |*Inorg. Chem.* 2011, 50, 6414–6424.
- [117] R. Shakya, F. Peng, J. Liu, M.J. Heeg, C.N. Verani, *Inorg. Chem.*, 45 (2006) 6263- 6268.
- [118] Damon Diemente, *Journal of Chemical Education*, 74 (1997) 398-399.
- [119] Y.-L. Wong, Y. Yan, E.S.H. Chan, Q. Yang, T.C.W. Mak, D.K.P. Ng, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* 18 (1998) 3057-3064.
- [120] R. Shakya, C. Imbert, H.P. Hratchian, M. Lanznaster, M.J. Heeg, B.R. McGarvey, M. Allard, H.B. Schlegel, C.N. Verani, *Dalton Transactions*, 21 (2006) 2517-2525.
- [121] W.M. Hosny, *Synth. React. Inorg. Met.-Org. Chem.*, 27 (1997) 189-197.
- [122] H.A. Duarte, S. Carvalho, E.B. Paniago, A.M. Simas, *J. Pharm. Sci.*, 88 (1999) 111-120.
- [123] E. Chartone-Souza, T.L. Loyola, M. Bucciarelli-Rodriguez, M.A. Menezes, N.A. Rey, E.C. Pereira-Maia, *J. Inorg. Biochem.*, 99 (2005) 1001-1008.
- [124] W.J. Geary, *Coord. Chem. Rev.*, 7 (1971) 81-122.
- [125] CRYALISPRO, Oxford Diffraction Ltd., Ver. 1.171.33.55 (release 05-01-2010 CrysAlis 171.NET).
- [126] A. Altomare, M.C. Burla, M. Camalli, G.L. Cascarano, C. Giacovazzo, A. Guagliardi, A.G.G. Moliterni, G. Polidori, R. Spagna, *J. Appl. Crystallogr.*, 32 (1999) 115-119.

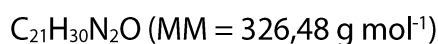
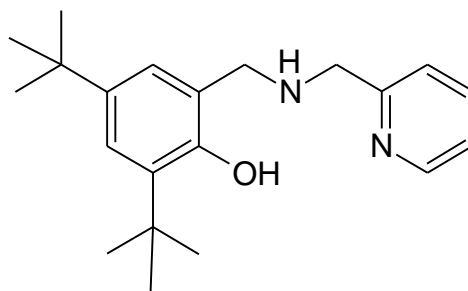
- [127] L.J. Farrugia, *J. Appl. Crystallogr.*, 32 (1999) 837-838.
- [128] G.M. Sheldrick, *SHELXL-97 - A Program for Crystal Structure Refinement*, University of Goettingen, Germany, 1997.
- [129] C.F. Macrae, P.R. Edgington, P. McCabe, E. Pidcock, G.P. Shields, R. Taylor, M. Towler, J. van de Streek, *J. Appl. Crystallogr.*, 39 (2006) 453-457.
- [130] L.J. Farrugia, *J. Appl. Crystallogr.*, 30 (1997) 565-566.
- [131] G.M. Sheldrick, *Acta Cryst. A*, 64 (2008) 112-122.
- [132] D. Tomco, S. Schmitt, B. Ksebati, M.J. Heeg, Q.P. Dou, C.N. Verani, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 105 (2011) 1759-1766.
- [133] D. Chen, M. Frezza, R. Shakya, Q.C. Cui, V. Milacic, C.N. Verani, Q.P. Dou, *Câncer Res.*, 67 (2007) 9258-9265.
- [134] S. Hindo, M. Frezza, D. Tomco, M. J. Heeg, L. Hryhorczuk, B.R. McGarvey, Q.P. Dou, C.N. Verani *European Journal of Medicinal Chemistry*, 44 (2009) 4353-4361.
- [135] C.N. Verani, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 106 (2012) 59-67.
- [136] E. Kremer, G. Facchin, E. Estevez, P. Alborés, E.J. Baran, J. Ellena, M.H. Torre, *J. Inorg. Biochem.*, 100 (2006) 1167-1175.
- [137] D. Cook, *Canad. Jour. Chem.* 39 (1961) 2009-2024.
- [138] B. Macías, I. García, M.V. Villa, J. Borrás, A. Castiñeiras, F. Sanz, *Polyhedron*, 21 (2002) 1229-1234.
- [139] M. Mondelli, V. Bruné, G. Borthagaray, J. Ellena, O.R. Nascimento, C.Q. Leite, A.A. Batista, M.H. Torre, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 102 (2008) 285-292.
- [140] http://sdbs.riondb.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/cre_index.cgi?lang=eng - (Banco de Dados)
- [141] H.D. Flack, *Acta Crystallogr. A*, 39 (1983) 876-881.
- [142] I. Turel, L. Goli, P. Bukovec, M. Gubina, *J. Inorg. Biochem.*, 71 (1998) 53-60.
- [143] I. Turel, I. Leban, N. Bukovec, *J. Inorg. Biochem.* 66, (1997) 241-245.
- [144] H.J. Breunig, M.G. Nema, C. Silvestru, A.S. Richard, A.Z. Varga, *Anorg. Allg. Chem.*, 636 (2010) 2378-2386.
- [145] M.B. Ferrari, L.C. Cappacchi, L. Calvaca, G.F. Gasparri, *Acta Crystallogr. B*, 28 (1972) 1169-1173.

- [146] A. Soran, H.J. Breunig, V. Lippolis, M. Arca, C. Silvestru, *J. Organomet. Chem.*, 695 (2010) 850-862.
- [147] T. Owa, T. Nagasu, *Expert. Opin. Ther. Patol.*, 10 (2000) 1725-1740.
- [148] H.M. Said, C. Hagemann, F. Carta, A. Katzer, B. Polat, A. Staab, A. Scozzafava, J. Anacker, G.H. Vince, M.F. Claudiu, T. Supuran, *Bioorg. Med. Chem.* 21 (2013) 3949–3957.
- [149] M. González-Álvarez, A. Pascual-Álvarez, L. Castillo Agudo, A. Castiñeiras, M. Liu-González, J. Borrás, G. Alzuet-Piña, *Dalton Trans.*, 42 (2013) 10244-10259.
- [150] M.S. Refat, S. A. El-Korashy, I.M. El-Deen, S.M. El-Sayed, *Drug Testing and Analysis*, 3 (2011) 116-131.
- [151] A.A. Soliman, *Spectrochim. Acta Part A*, 65 (2006) 1180-1185.
- [152] M.G.A.El-Wahed, M.S. Refat, S.M. El-Megharbel, *Chem. Pharm. Bull*, 56 (2008) 1585-1591.
- [153] M.S. Refat, S.F. Mohamed, *Spectrochimica Acta Part A*, 82 (2011) 108–117.
- [154] S.E Spiller, N.J. Logsdon, L.A. Deckard, H.Sontheimer, *BMC Cancer*, 11 (2011) 136
- [155] M.G.A. El-Wahed, M.S. Refat, S.M. El-Megharbel, *Bull. Mater. Sci.*, 32 (2009) 205–214.
- [156] J. Dziegielewski, J. Hanuza, B.J. Trzebiatowska, *Bull. Acad. Pol. Sci., Ser. Sci. Chim.*, 24 (1976) 307-322.
- [157] W. Guerra, E.A. Azevedo, A.R.S. Monteiro, M. Bucciarelli-Rodriguez, E. Chartone-Souza, A.M.A. Nascimento, A.P.S. Fontes, L. Le Moyec, E.C. Pereira-Maia, *J. Inorg. Biochem.*, 99 (2005) 2348-2354.
- [158] A.F. Casy and A. Yasin, *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis*, 1 (1983) 281-292.
- [159] N.E. Rigler, S.P. Bag, D.E. Leyden, J.L. Sudmeier, C.N. Reilley, *Analytical Chemistry*, 37 (1965)872-875.
- [160] D.E. Williamson and G.W. Everett Jr., *Journal of the American Chemical Society*, 97 (1975) 2397-2405.
- [161] A.F. Casy and A. Yasin, *Magnetic Resonance in chemistry*, 23 (1985) 767-770.
- [162] G.L. Asleson, L.J. Stoel, E.C. Newman, C.W. Frank, *J. Pharm. Sci.*, 63 (1974) 1144-1146.
- [163] C.O. Pinto, *Dissertação de Mestrado, UFMG ICB- (2013) -Prof.^a A.M.A. Nascimento, Prof. E. Chartone de Souza.*
- [164] P.P. Silva, F.C.S. Paula, W. Guerra, J.N. Silveira, F.V. Botelho, L.Q. Vieira, T. Bortolotto, F.L. Fischer, G. Busi, H. Terenzi, E.C. Pereira-Maia, *J. Braz. Chem. Soc.*, 21 (2010) 1237-1246.
- [165] W.A. Baker, Jr., P.M. Brown, *J. Am. Chem. Soc.*, 88 (1966) 1314-1317.

- [166] P. Jaividhya, R. Dhivya, M.A. Akbarsha, M. Palaniandavar, *J. Inorg. Biochem.*, 114 (2012) 94-105.
- [167] R. Ahmad, M. Naoui, J.F. Neailt, S. Diamantoglou, H.A. Tajmir-Riahi, *J. Biomol. Struct. and Dyn.*, 13 (1996) 795-802.
- [168] R.M. Silverstein, G.C. Bassler, T.C. Morrill, *Identificação Espectrometrica de Compostos Orgânicos*, 5ª Edição, Editora Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro (1994).
- [169] W.L. Driessen, P.Van der Voort, *Inorg. Acta* 21 (1977) 217-222.
- [170] C. Preti, G. Tosi, M. Massacesi, G. Ponticelli, *Spectrochim. Acta Part A* 32 (1976) 1779-1784.
- [171] G.G. Bnand, N. Burford, T.S. Cameron, W. Kwiatkowski, *J. Am. Chem. Soc.*, 120 (1998) 11374.
- [172] P. Mishra, *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* 3 (2010) 145-156.
- [173] F. Lazarini, *Acta Cryst. C*, 43 (1987) 637-638.
- [174] B. Blazic, F. Lazarini, *Acta. Cryst. C*, 41 (1985) 1619-1621.
- [175] Lazarini, *Acta. Cryst.*, 243 (1987) 875
- [176] A.W. Addisson, T.N. Rao, J. Reedijk, J. van Rijn, G.C. Verschoor, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, (1984) 1349-1356.
- [177] M. Li, Y. Lu, M. Yang, Y. Li, L. Zhanga, S. Xie, *Dalton Trans.*, 41 (2012) 12882-12887
- [178] M.Li, M. Yang, J.Y. Niu, L.Z. Zhang, S.Q. Xie, *Inorg. Chem.*, 51 (2012) 12521–12526.
- [179] L.G. Oliveira, M.M. Silva, F.C. S. Paula, E.C. Pereira-Maia, C.L. Donnici, C.A. Simone, F. Frézard, E.N.S. Júnior, C. Demicheli, *Molecules*, 16 (2011) 10314-10323.

ANEXO 1

Síntese do ligante 2,4-di-terc-butil-6-[[piridina-2-il-metil]amino]metil}fenol)



A síntese do ligante $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}$ foi realizada de acordo com a literatura [119].

Dissolveu-se 3,000 g (MM = 234,3 g mol⁻¹) de 3,5-Di-terc-butil-2-hidroxibenzaldeído em 100 mL de metanol sob agitação a 60°C em refluxo. Adicionou-se à solução 1,38 g (MM = 108,14 g mol⁻¹) de 2-aminometilpiridina e imediatamente observa-se a mudança da cor amarelo-pálido para amarelo intenso, correspondente ao produto imina. A reação permaneceu em refluxo por 2 horas.

Adicionou-se, aos poucos, sob banho de gelo (0°C), 1,2000 g (MM=37,83 g mol⁻¹) de bori-dreto de sódio (NaBH_4) (usamos 3x excesso). A solução permaneceu em agitação por 4 horas observando-se a perda da coloração amarela, indicando a redução da imina para amina.

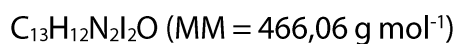
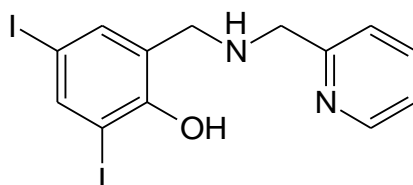
O solvente foi removido por rotavapor e o resíduo foi dissolvido em água (30 mL). A mistura foi neutralizada com ácido acético e o produto orgânico foi extraído em diclorometano (3x 30 mL).

O solvente foi eliminado em rotavapor e o produto obtido, seco a vácuo foi deixado na geladeira por alguns dias para solidificar.

Rendimento: 85%; Ponto de fusão: 69 °C

ANEXO 2

Síntese do ligante (2,4-diiodo-6-[[piridina-2-il metil]amino]metil}fenol)



A síntese do ligante $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{I}_2\text{O}$ foi realizada de acordo com a literatura [117, 120].

- Dissolveu-se 3,0000 g de 3,5 diiodosalicilaldeído (MM = 373,92 g mol⁻¹) em 250 mL de metanol, sob aquecimento moderado (60°C) para auxiliar na dissolução do ligante.
- Adicionou-se 0,8680 g de 2-aminometilpiridina (MM = 108,14 g mol⁻¹).
- Observa-se imediatamente uma intensificação da coloração amarela.
- A solução ficou sob agitação por duas horas. A redução do produto foi realizada com a adição, aos poucos, de 2,5000 g NaBH_4 (excesso), sob banho de gelo (0 °C). O sistema ficou em agitação por 5 horas.
- O solvente foi evaporado no rotavapor e ao óleo amarelo obtido foi adicionado diclorometano e solução saturada de NaCl. A fase orgânica foi separada em funil de separação e coletada em erlenmeyer com Na_2SO_4 anidro. Filtrou-se e evaporou-se o solvente no rotavapor até a secagem completa, obtendo-se um óleo amarelo.
- Adicionou-se 2 mL de diclorometano e aproximadamente 20 mL de metanol e a solução obtida foi deixada por dois dias sob refrigeração. O produto cristalizado foi filtrado, lavado com metanol gelado, e seco a vácuo.
- Rendimento: 90 %; Ponto de fusão: 89 °C