

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO – UENF
CENTRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA – CCT
LABORATÓRIO DE CIÊNCIAS QUÍMICAS – LCQUI

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE FRENTE À *STAPHYLOCOCCUS*
AUREUS DE COMPOSTOS DE COBALTO E ZINCO**

VAGNER MACHADO DE ASSIS

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
OUTUBRO – 2008

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE FRENTE À *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* DE COMPOSTOS DE COBALTO E ZINCO

VAGNER MACHADO DE ASSIS

Monografia apresentada ao Centro de Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para conclusão do curso de graduação em Licenciatura em Química.

ORIENTADOR: PROF^a. CHRISTIANE FERNANDES HORN

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
OUTUBRO – 2008

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE FRENTE À *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* DE COMPOSTOS DE COBALTO E ZINCO

VAGNER MACHADO DE ASSIS

Aprovada em 31 de outubro de 2008.

Comissão Examinadora:

Prof^a. Christiane Fernandes Horn (Orientadora)
UENF/ LCQUI

Prof^o. Luis César Passoni (Doutor, Ciências)
UENF/ LCQUI

Prof^o. Walter Ruggeri Waldman (Doutor, Ciências)
UENF/ LCQUI

Aos meus pais pelo amor, dedicação e confiança em
mim depositados.

AGRADECIMENTOS

- Ao meu Deus, por ter me auxiliado em todos os meus caminhos;
- Aos meus pais, pelos incentivos e orientações pacientemente prestados;
- À Prof^a. Christiane pela dedicação e paciência para me ensinar e auxiliar na realização e orientação deste trabalho;
- Ao Prof. Adolfo pelo auxílio e discussões;
- Aos professores Adailton J. Bortoluzzi (Departamento de Química da UFSC), Marcos N. Eberlin (Laboratório ThomSon da Unicamp) e Olney Vieira da Motta pela colaboração na realização deste trabalho;
- À minha noiva Valéria pela compreensão e paciência;
- À Michelle pelos inúmeros e incondicionais auxílios;
- Aos companheiros de laboratório e amigos Gabrieli, Karem, Leonardo, Josane, Érika, Sarah, Marcione, Rafaela, Camila e os demais alunos do laboratório 103, pelo companheirismo e ajuda nestes três anos;
- Aos amigos de graduação Gabriel, Monique e Ronan;
- Aos professores do LCQUI pelo constante incentivo e ensinamentos;
- Aos professores Luis César Passoni e Walter Ruggeri Waldman, que fizeram parte da banca;
- A UENF pela concessão da bolsa de iniciação científica.

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
1- INTRODUÇÃO	9
2- OBJETIVOS	14
3- MATERIAS E MÉTODOS	14
3.1- Materias Utilizados	14
3.2 – Sínteses Orgânicas.....	16
3.2.1- Síntese do Precursor ((2-hidroxibenzil) (2-piridilmetil) amina) L1.....	16
3.2.2- Sínteses do ligante (N-(2-hidroxibenzil)-N-(2-piridilmetil) [(3-cloro)(2-hidroxi)] propilamina) L2.....	17
3.3- Sínteses Inorgânicas	18
3.3.1- Síntese do complexo [Zn(HBPCINOL)Cl] (1):	18
3.3.2- Síntese do complexo [Co(H ₂ BPCINOL)Cl ₂] (2):	19
4- RESULTADOS E DISCUSSÕES	20
4.1- Compostos Orgânicos	20
4.1.1. Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e de Carbono.....	20
4.1.2. Espectroscopia de Infravermelho	26
4.2- Compostos Inorgânicos	28
4.2.1- Espectroscopia de Infravermelho.....	28
4.2.2- Análise Elementar (CHN).....	31
4.2.3- Difração de Raios X	32
4.2.4- Eletroquímica	35
4.2.5- Espectroscopia Eletrônica.....	37
4.2.6- Condutivimetria	38
4.2.7- Espectrometria de Massas com Ionização por <i>Electrospray</i>	38
5- INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE INIBITÓRIA DOS COMPOSTOS SINTETIZADOS FRENTE A <i>S. aureus</i>	40
5.1- Metodologia	41
5.1.1- Cultivo da bactéria <i>S. aureus</i>	41
5.1.2- Metodologia de Poços.....	41

5.1.3- Turbidimetria	42
5.1.4- Concentração Mínima Inibitória.....	42
5.2. Resultados obtidos	43
5.2.1- Metodologia de Poços.....	43
5.2.2- Turbidimetria	45
5.2.3- Concentração Mínima Inibitória (CMI).....	49
6- CONCLUSÃO	51
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

RESUMO

O presente trabalho teve como meta a síntese, caracterização físico-química, realizada pelas seguintes técnicas físico-químicas de análise: espectroscopia de infravermelho, eletrônica, técnicas eletroquímicas como voltametria cíclica e condutivimetria, análise elementar, difração de raios X de monocristal e espectrometria de massas com ionização por *electrospray*, de dois novos compostos de coordenação de cobalto (II) e zinco (II). Estes foram obtidos a partir de reações de complexação entre o ligante N-(2-hidroxibenzil)-N-(2-piridilmetil)[(3-cloro)(2-hidroxi)]propilamina (H₂BPCINOL) e sais de cobalto e zinco. O ligante foi previamente sintetizado pelo grupo de pesquisa em Química de Coordenação e Bioinorgânica e utilizado na síntese de compostos de coordenação miméticos para várias metaloenzimas de ferro, cobre e níquel. O ligante foi caracterizado por ressonância magnética nuclear de próton e de carbono. Após a completa caracterização dos complexos. Os complexos tiveram sua atividade inibitória avaliada frente ao microorganismo *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), empregando nove cepas deste microorganismo (RN 6390B, COL, ATCC 25923, Smith Diffuse, Wood 46, *Staphylococcus aureus* FRI-100 (SEA+), FRI S-6 (SEB+), FRI-361 (SEC+) e LSA 88). Os resultados obtidos indicam elevada atividade inibitória para estes compostos frente a todas as cepas de *S. aureus* investigadas.

1- INTRODUÇÃO

As bactérias são seres unicelulares aclorofilados, microscópicos, que se produzem por divisão binária. Estas se caracterizam por se apresentarem como células esféricas ou em forma de bastonetes curtos com tamanhos variados, alcançando às vezes micrômetros linearmente. Na maioria das espécies, a proteção da célula é feita por uma camada extremamente resistente, a parede celular, havendo imediatamente abaixo uma membrana citoplasmática que delimita um único compartimento contendo DNA, RNA, proteínas e pequenas moléculas.

Dentre os gêneros das bactérias mais nocivos ao homem e aos animais está o *Staphylococcus*. Os *Staphylococcus* são células esféricas Gram-positivas, não móveis, não-flagelados, cujas células medem entre 0,5 – 1,5 μm de diâmetro, que ao crescerem se dispõem em cachos irregulares semelhantes a cachos de uvas. Este gênero possui 27 espécies conhecidas (Kools e Lambre Jr, 1991), dentre elas a *S. aureus* (Figura 1). A bactéria *S. aureus* é coagulase-positivo, o que a diferencia das outras espécies.

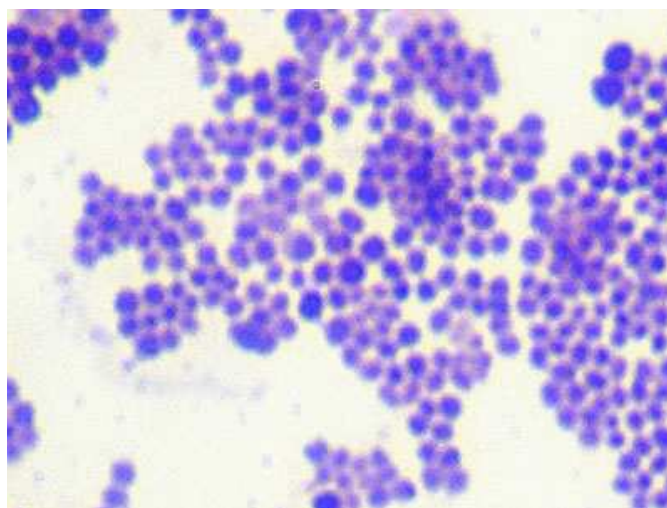


Figura 1. Coloração, pelo método de Gram, de *Staphylococcus aureus*.

Quase todos os indivíduos apresentam algum tipo de infecção por *S. aureus* durante sua vida, cuja gravidade varia desde uma intoxicação alimentar ou infecções cutâneas de pouca importância até infecções graves que podem ser fatais. A tabela 1 lista algumas doenças causadas por *S. aureus* (Lautenschger *et al.*, 1993).

Tabela 1. Doenças causadas por *S. aureus*

Doenças causadas por <i>S. aureus</i>	
Infecções Cutâneas	Meningite
Foliculite	Toxiinfecção Alimentar
Furúnculo	Síndrome do Choque Tóxico
Celulite	Septicemia Estafilocócica
Artrite	Endocardite
Osteomielite	Infecções Pulmonares

Muitas dessas doenças são produzidas através da capacidade de multiplicação e ampla disseminação do *Staphylococcus* nos tecidos, bem como através da produção de muitas substâncias extracelulares. Algumas dessas substâncias são enzimas, como a Catalase, Coagulase, Hialuronidase, Estafiloquinase, Estreptoquinase, Proteinases, Lipases e β -lactamases, e outras substâncias são denominadas de toxinas: Exotoxinas, Leucodidina, Toxina Esfoliativa, Toxina da Síndrome do Choque Tóxico e Enterotoxinas (Micusan e Thibodeau, 1993).

As enterotoxinas são produzidas por quase 50% das cepas de *S. aureus* sendo que existem pelo menos seis toxinas solúveis (A, B, C, D, E e F). As enterotoxinas são termoestáveis e resistentes às enzimas intestinais, sendo estas uma importante causa de intoxicação alimentar (Balaban *et al.*, 2000).

Os agentes antimicrobianos, substâncias utilizadas no controle da multiplicação das bactérias, são classificados em: bacteriostático, bactericida, estéril, desinfetante, séptico e asséptico. Os bacteriostáticos são aqueles com

propriedades de inibir a multiplicação bacteriana, mas quando o agente é retirado, a multiplicação recomeça. Já os bactericidas detêm a propriedade de matar bactérias sendo sua ação irreversível. Os principais agentes antimicrobianos, os antibióticos, utilizados para tratar infecções causadas pela bactéria *S. aureus* são: a penicilina, a metilina (penicilina semi-sintética), a gentamicina e o cloranfenicol. A penicilina pertence ao grupo dos antibióticos β -lactâmicos, os quais interferem na síntese do peptidoglicano da parede celular bacteriana. O evento bactericida final consiste na inativação de um inibidor das enzimas autolíticas na parede celular, levando à lise da bactéria (Amyes e Gemmell, 1997).

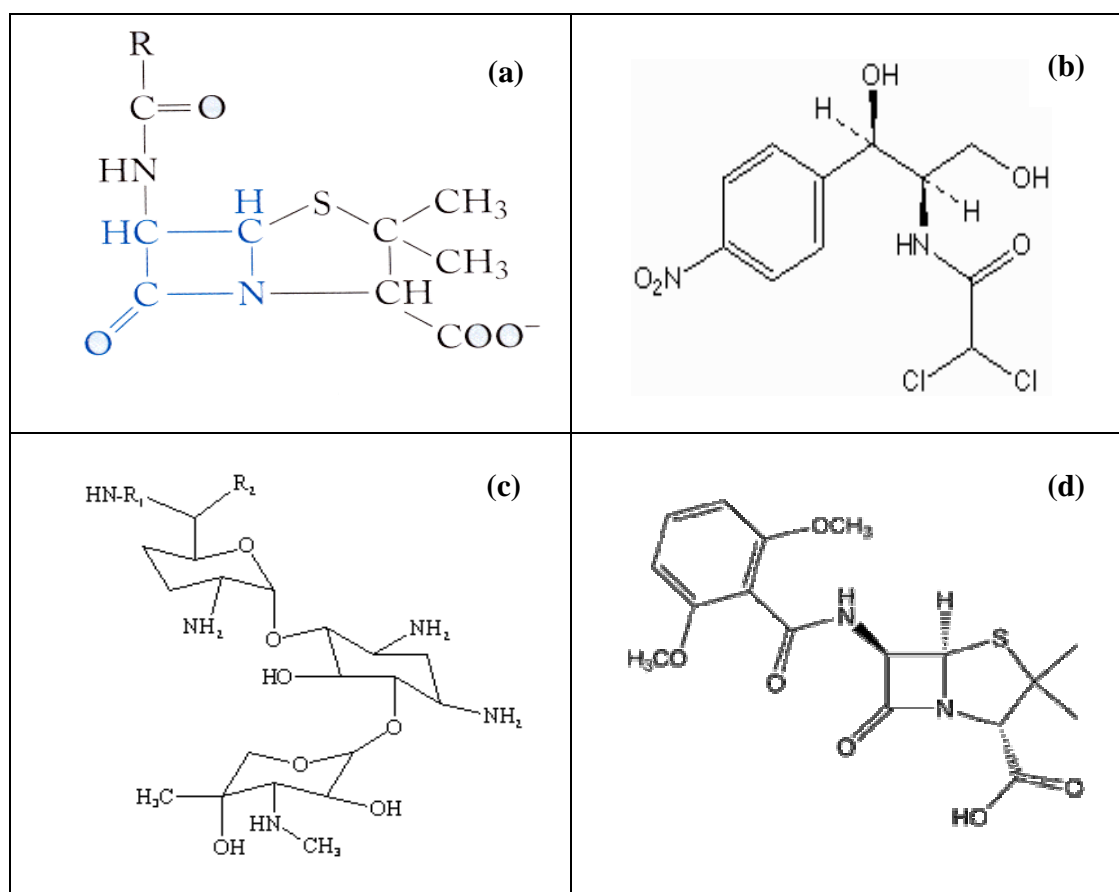
A resistência à penicilina pode ser devida a diferentes causas e a principal dentre elas é a produção da enzima β -lactamase que cliva o anel β -lactâmico das penicilinas. Desde a introdução da penicilina, a resistência dos *Staphylococcus* devida à produção de β -lactamase disseminou-se progressivamente, ocorrendo, em primeiro lugar, em cepas hospitalares e, posteriormente, em cepas da comunidade em geral. As infecções por esses microrganismos, que são designados como *Staphylococcus Aureus* Resistentes a Metilina (MRSA, “methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*”), tornaram-se um grande problema, principalmente nos hospitais, onde podem sofrer rápida disseminação entre pacientes idosos ou gravemente feridos. Nos países desenvolvidos, pelo menos 80% dos *Staphylococcus* atualmente produzem β -lactamases e uma solução para este problema consiste no uso concomitante da penicilina e inibidores da enzima β -lactamase (Gordon, 1998).

A gentamicina faz parte do grupo dos antibióticos aminoglicosídeos, cuja estrutura química é complexa e se assemelham entre si quanto à sua atividade antimicrobiana. O aminoglicosídeo mais utilizado é a gentamicina, a qual inibe a síntese de proteínas bacterianas, seu efeito antimicrobiano é bactericida. A resistência à gentamicina está se tornando um grande problema, ela ocorre através de vários mecanismos diferentes, sendo o mais importante deles a inativação por enzimas microbianas.

O cloranfenicol foi originalmente isolado de culturas da bactéria *Streptomyces*. Sua ação antimicrobiana consiste na inibição da síntese proteica,

seu efeito é bacteriostático para a maioria dos microrganismos. A resistência ao cloranfenicol é devida à produção da enzima cloranfenicol acetil-transferase. A resistência a antibióticos nas bactérias dissemina-se em três níveis: por transferência de bactérias entre pessoas, por transferência de genes de resistência entre bactérias e por transferência de genes de resistência entre elementos genéticos no interior das bactérias (Levy, 1998).

Tabela 2. Estruturas dos antibióticos: **(a)** Penicilina; **(b)** Cloranfenicol; **(c)** Gentamicina; **(d)** Meticilina.



Compostos inorgânicos têm sido utilizados em medicina por muitos séculos, entretanto de forma empírica e em muitos casos sem a compreensão do mecanismo de ação dos mesmos (Schwietert e McCUE, 1999). A partir dos sucessos obtidos na utilização de compostos de coordenação como a cisplatina, no tratamento de câncer, e compostos de gadolínio como agente de contraste

para RMI (ressonância magnética por imagem), estabeleceram-se às condições para a solidificação de uma nova área de estudo: a química inorgânica medicinal. A comprovação da atuação dos íons metálicos na potencialização da atividade biológica de compostos orgânicos utilizados como fármacos sugere que os metais têm um efeito considerável no modo de ação de alguns medicamentos. Como exemplo pode-se citar o medicamento Sparfloxacina o qual possui alta atividade contra bactérias como *S. pneumoniae* e *M. tuberculosis*. A complexação do medicamento Sparfloxacina com cobre aumenta consideravelmente a atividade antiproliferativa do medicamento, sugerindo que a atividade biológica de muitos medicamentos pode estar associada com a capacidade quelante dos mesmos (Schwietert e McCUE, 1999).

Por outro lado, se faz necessário o desenvolvimento de novos fármacos com atividade antimicrobiana contra uma série de bactérias pois constata-se que 95% dos pacientes infectados com *S. aureus* no mundo não respondem à primeira linha de antibióticos como a penicilina ou ampicilina (Balaban *et al.*, 2000).

Desta forma, este trabalho descreve a síntese e caracterização de novos complexos de cobalto(II) e zinco(II), obtidos com o ligante H₂BPCINOL (N-(2-hidroxibenzil)-N-(2-piridilmetil) [(3-cloro)(2-hidroxi)] propilamina), e o estudo das suas atividades biológicas frente a bactéria *S. aureus*, utilizando a metodologia de poços, turbidimetria e determinação da concentração mínima inibitória (CMI). Neste trabalho serão investigadas 9 cepas de *S.aureus*: (RN 6390B, COL, ATCC 25923, Smith Diffuse, Wood 46, *Staphylococcus aureus* FRI-100 (SEA+), FRI S-6 (SEB+), FRI-361 (SEC+) e LSA 88).

2- OBJETIVOS

-Sintetizar e caracterizar por ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de carbono e espectroscopia de infravermelho, o ligante polidentado: H₂BPCINOL (N-(2-hidroxibenzil)-N-(2-piridilmetil)[(3-cloro)(2-hidroxi)]propilamina);

-Empregar o ligante proposto no estudo de complexação com sais de Co(II) e Zn(II), efetuando-se em seguida a caracterização dos compostos de coordenação obtidos através de técnicas espectroscópicas, eletroquímicas, estruturais sempre que os complexos sintetizados assim permitirem;

-Investigar a ação destes complexos como inibidores de crescimento de nove cepas da bactéria *S. aureus*. Para tal, serão utilizadas técnicas padronizadas de testes de susceptibilidade por meio de crescimento de microrganismos em meio líquido (medida de densidade óptica (D.O) em 510 nm) e meio sólido (metodologia de poços).

3- MATERIAS E MÉTODOS

3.1- Materias Utilizados

As reações foram realizadas utilizando-se solventes grau PA adquiridos de fontes comerciais, sem prévia purificação. Todos os reagentes foram adquiridos de fontes comerciais (Aldrich, Acros, Vetec, Merck e Synth) e utilizados sem prévia purificação, exceto o 2-aminometilpiridina, o qual foi destilado previamente.

As sínteses orgânicas e inorgânicas foram realizadas sob agitação e aquecimento ou apenas agitação magnética, utilizando-se placas de agitação com aquecimento marca Fisatom ou Fisher. Para as reações nas quais aquecimento era necessário, foram utilizados banhos de água ou óleo, de acordo com a temperatura desejada, a qual foi monitorada por um termômetro, colocado dentro do banho. Todas as reações foram realizadas utilizando-se vidrarias de uso

comum em laboratório. Nos experimentos de condutividade e espectroscopia eletrônica, foram utilizadas vidrarias previamente calibradas (balões volumétricos, pipetas).

As sínteses orgânicas foram acompanhadas por cromatografia em camada delgada (F_{254} Merck), as quais foram reveladas com iodo. Nas sínteses orgânicas, quando necessário, o solvente foi removido utilizando-se evaporador rotatório, marca Fisatom. As caracterizações dos compostos orgânicos foram realizadas por ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de carbono, em um espectrômetro Jeol modelo eclipse 400+, operando a 400 MHz para hidrogênio (^1H) e 100 MHz para carbono (^{13}C). As análises de infravermelho dos compostos sintetizados (orgânicos e inorgânicos) foram realizadas no LCQUI/UENF, utilizando-se o equipamento FT-IR Shimadzu. As amostras sólidas foram analisadas sob a forma de pastilhas de KBr e as amostras líquidas na forma de filme sobre pastilhas de KBr.

A determinação do ponto de fusão para o HBPA foi realizada utilizando-se o equipamento MQAPF-301. As análises de C, H e N foram efetuadas no Instituto de Química da UNICAMP em um analisador Perkin-Elmer 2400.

Para medida de condutividade dos complexos sintetizados foi utilizado o Condutímetro de bancada microprocessado mod. PHM, a partir de solução dos complexos em metanol ($1 \times 10^{-3}\text{M}$).

O comportamento eletroquímico do complexo de cobalto foi investigado em dimetilformamida utilizando-se um potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT 10. O experimento foi conduzido sob atmosfera de argônio. Utilizou-se para tal, uma configuração de três eletrodos, sendo:

- Eletrodo de trabalho: Carbono vítreo;
- Eletrodo Auxiliar: Platina;
- Eletrodo de Referência: Platina.

Uma solução $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ de perclorato de lítio em dimetilformamida foi utilizado como eletrólito suporte e ferroceno foi utilizado como padrão interno.

Estudos de espectroscopia eletrônica do complexo sintetizado (cobalto) foram realizados utilizando-se o espectrofotômetro Shimadzu 16001 PC, acoplado a um micro computador. O composto foi analisado em metanol.

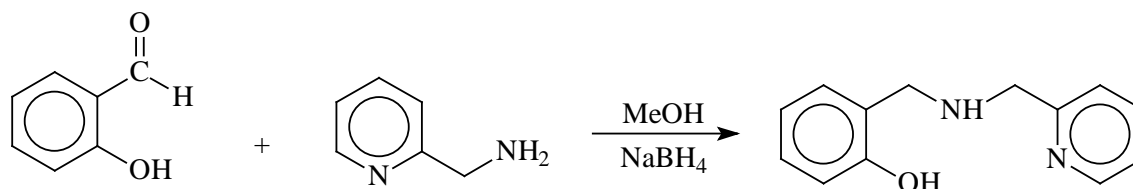
A análise cristalográfica foi realizada na Central de Análises do Departamento de Química da UFSC, pelo Prof. Dr. Adailton J. Bortoluzzi. Os dados foram coletados em um difratômetro CAD-Enraf Nonius, à temperatura ambiente. Para a coleta, resolução e refinamento da estrutura cristalina foram utilizados os programas CAD-4 Express, SHELXS97, SHELXL97, Platon, Helena e Zortep.

Os espectros de massas foram obtidos através do espectrômetro de massas Q-TOF (Micromass, Manchester, UK), em colaboração com o Prof. Marcos N. Eberlin do Laboratório Thomson/UNICAMP. A técnica de ionização utilizada foi a de ionização por elétron-spray, em modo positivo (ESI-(+)-MS). As condições empregadas foram: temperatura da fonte: 80°C, temperatura de dessolvção: 80°C, voltagem: 40V. Os complexos foram diluídos em metanol e água (1:1) em um frasco de 1 mL, sendo as amostra injetadas utilizando-se uma seringa, a uma velocidade de 10 µL/min. Os espectros de massa foram obtidos na faixa de m/z de 50 a 1500.

3.2 – Sínteses Orgânicas

3.2.1- Síntese do Precursor ((2-hidroxibenzil) (2-piridilmetil) amina) L1

O L1 foi sintetizado utilizando-se a metodologia previamente descrita na literatura (Neves *et al.*, 1993).

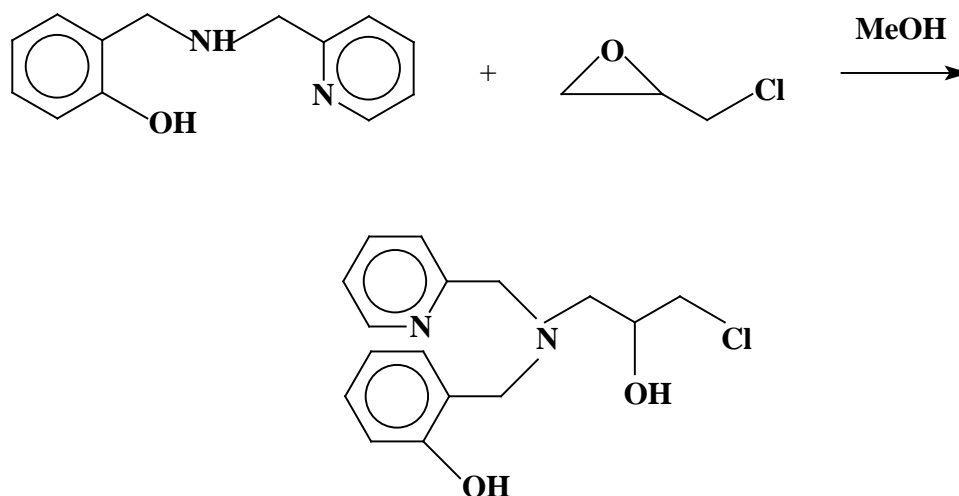


Esquema 1. Esquema de síntese do precursor L1.

Em um balão de fundo redondo, sob banho de gelo, foram adicionados 40 mL de metanol, 3,0 mL (0,028 mol) de salicilaldeído e, lentamente, 3,0 mL (0,028 mol) de 2-aminometilpiridina. Após a adição da amina, a solução adquiriu uma coloração amarelada. A solução ficou sob agitação por 1 hora. Em seguida, adicionou-se lentamente quantidade equimolar de borohidreto de sódio (1,0g). A solução foi deixada sob agitação, a temperatura ambiente, durante a noite. No dia seguinte, concentrou-se a solução no evaporador rotatório à 50° C, obtendo-se um óleo rosado. Este óleo foi dissolvido em diclorometano e sucessivas extrações foram realizadas empregando uma solução “brine” (solução aquosa saturada de cloreto de sódio com uma pequena quantidade de bicarbonato de sódio). À fase orgânica adicionou-se MgSO₄ anidro e após 20 minutos a mesma foi filtrada e concentrada no evaporador rotatório a 50° C até a secura. Obteve-se um óleo amarelo, o qual cristalizou, resultando em um sólido branco. Rendimento: 5,0 g (82,8%). O produto foi submetido a uma análise prévia de cromatografia de camada delgada, empregando-se etanol como eluente, sendo constatada a presença de apenas um produto.

3.2.2- Sínteses do ligante (N-(2-hidroxibenzil)-N-(2-piridilmetil) [(3-cloro)(2-hidroxi)] propilamina) L2

A síntese do **L2** foi realizada seguindo-se metodologia previamente relatada na literatura (Horn *et al.*, 2000).

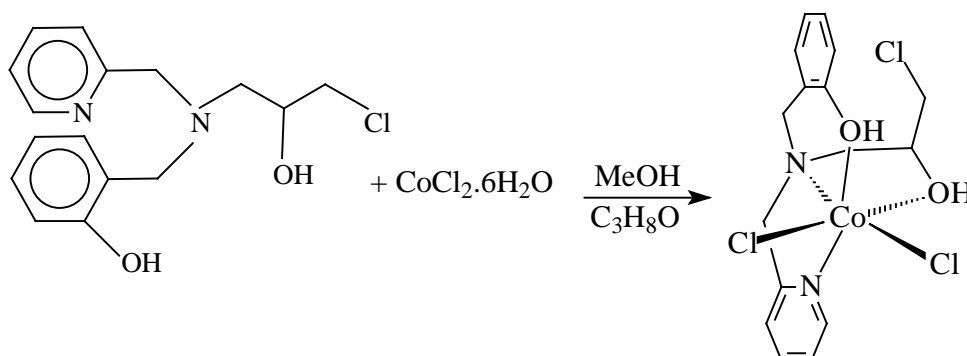


Esquema 2. Esquema de síntese do ligante **L2**, a partir do **L1**.

Em um balão de fundo redondo contendo 100 mL de solução do **L1** (4,0 g; 18,3 mmol) em metanol, foi adicionado quantidade equimolar (1,4 mL) de epicloridrina. A solução foi mantida sob agitação por 24 horas a temperatura ambiente, ao final das quais a solução apresentava uma coloração avermelhada. A solução foi concentrada no evaporador rotatório a 50°C, obtendo-se um óleo laranja avermelhado. Para purificação o óleo foi dissolvido em diclorometano e foram realizadas sucessivas extrações com solução “brine”, e após a purificação, à fase orgânica foi adicionado MgSO₄ anidro (agente secante) por 15 minutos. A solução foi concentrada no evaporador rotatório até secura, obtendo-se um óleo amarelado e denso. A pureza do composto foi avaliada inicialmente por TLC (cromatografia em camada delgada, eluente: acetato de etila/metanol) e a seguir por ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono e espectroscopia de infravermelho. Rendimento = 4,56 g (81%).

3.3- Sínteses Inorgânicas

3.3.1- Síntese do complexo [Zn(HBPCINOL)Cl] (1):



Esquema 4. Esquema de síntese do complexo [Co(H₂BPCINOL)Cl₂] (**2**).

4- RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1- Compostos Orgânicos

4.1.1. Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e de Carbono

A análise de RMN foi realizada para determinação do grau de pureza e confirmação de sua obtenção. A síntese do **L1** ocorre através de uma reação de condensação entre o aldeído e a amina, formando uma base de Schiff. Em seguida, procede-se a redução desta imina através da adição de NaBH₄. Tal reação pode ser descrita como uma aminação redutiva (Solomons e Fryhle, 2002). Já a reação de síntese do ligante **L2** envolve um ataque nucleofílico do nitrogênio amínico sobre o carbono do anel epóxido, promovendo a sua abertura.

A caracterização inicial do composto **L1** foi feita através da determinação de seu ponto de fusão. O valor obtido de 63 °C está em concordância com o valor previamente publicado na literatura (Neves *et al.*, 1993).

O espectro de RMN ¹H do **L1** é apresentado na Figura 2 e a Tabela 3 apresenta os resultados de RMN ¹H e suas respectivas atribuições.

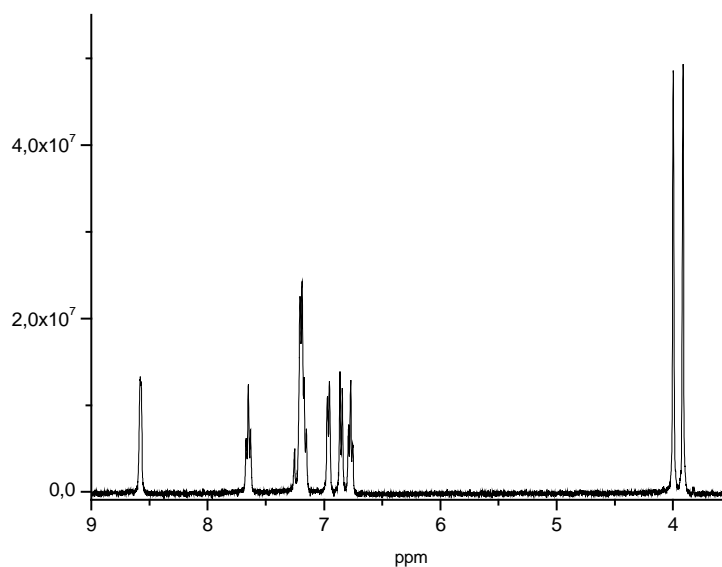


Figura 2. Espectro de RMN ^1H do **L1**, obtido em CDCl_3 .

Tabela 3. Resultados de RMN ^1H para o composto **L1**.

δ observado (ppm)	Multiplicidade	J observado (Hz)	Número de hidrogênios	Atribuição
3,92	Simpleto	-	2	H_1, H_1'
4,00	Simpleto	-	2	H_2, H_2'
6,76 - 6,79	Duplo Dupleto	$J_{4-3}=J_{4-5}= 7,32$ $J_{4-6}= 0,92$	1	H_4
6,85 - 6,87	Dupleto	$J_{6-5}= 8,06$	1	H_6
6,96 - 6,98	Dupleto	$J_{3-4}= 7,32$	1	H_3
7,16 - 7,21	Multipleto	-	3	$\text{H}_5, \text{H}_7, \text{H}_9$
7,64 - 7,68	Duplo Tripleto	$J_{8-7}=J_{8-9}= 7,69$ $J_{8-10}= 1,65$	1	H_8
8,55 - 8,61	Duplo Dupleto	$J_{10-9}= 5,31$ $J_{10-8}= 1,65$	1	H_{10}

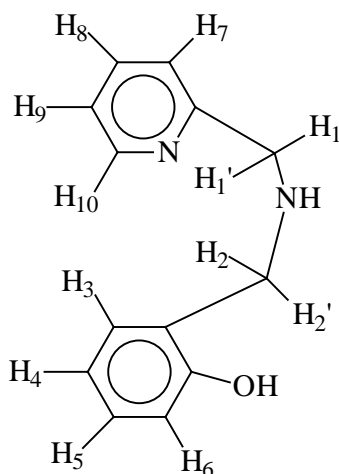


Figura 3. Molécula do precursor **L1** evidenciando os tipos de hidrogênio para auxiliar na compreensão da Tabela 1.

No espectro de RMN ^1H para o **L1** (Figura 2) são observados oito sinais referentes ao composto. O espectro apresenta dois simpletos (3,83 - 4,00 ppm) os quais refere-se aos quatros hidrogênios alifáticos dos metilenos. Os demais sinais são referentes aos hidrogênios aromáticos e encontram-se entre 6,78 a 8,59 ppm.

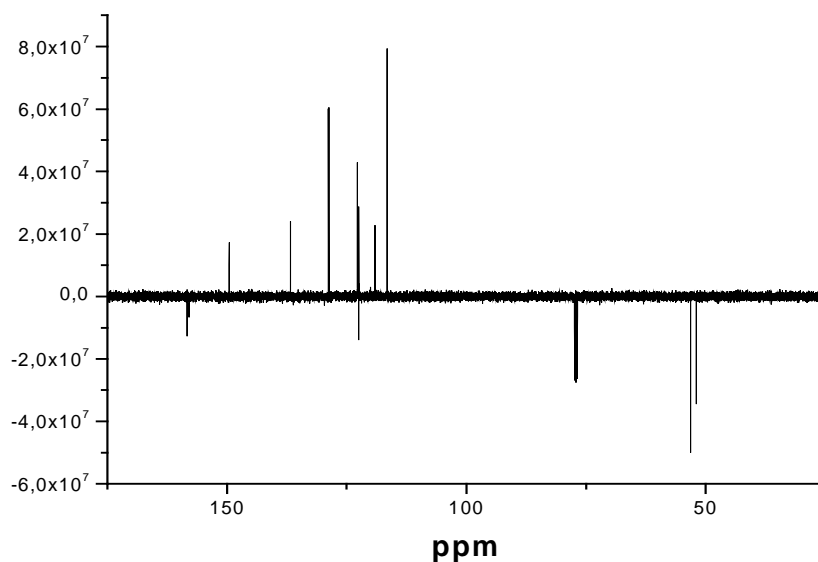


Figura 4. Espectro de RMN ^{13}C do **L1**, em CDCl_3 .

O espectro de ^{13}C do **L1**, apresentado na Figura 4, apresenta treze sinais. Os carbonos aromáticos encontram-se à esquerda do espectro ($\delta > 100$ ppm), enquanto os alifáticos apresentam-se à direita do mesmo, confirmando a obtenção do precursor **L1**. O sinal em 77 ppm é referente ao solvente (CDCl_3).

O espectro de RMN ^1H para o ligante **L2** é apresentado na Figura 5 e a partir dele foram obtidas as informações relatadas na Tabela 4.

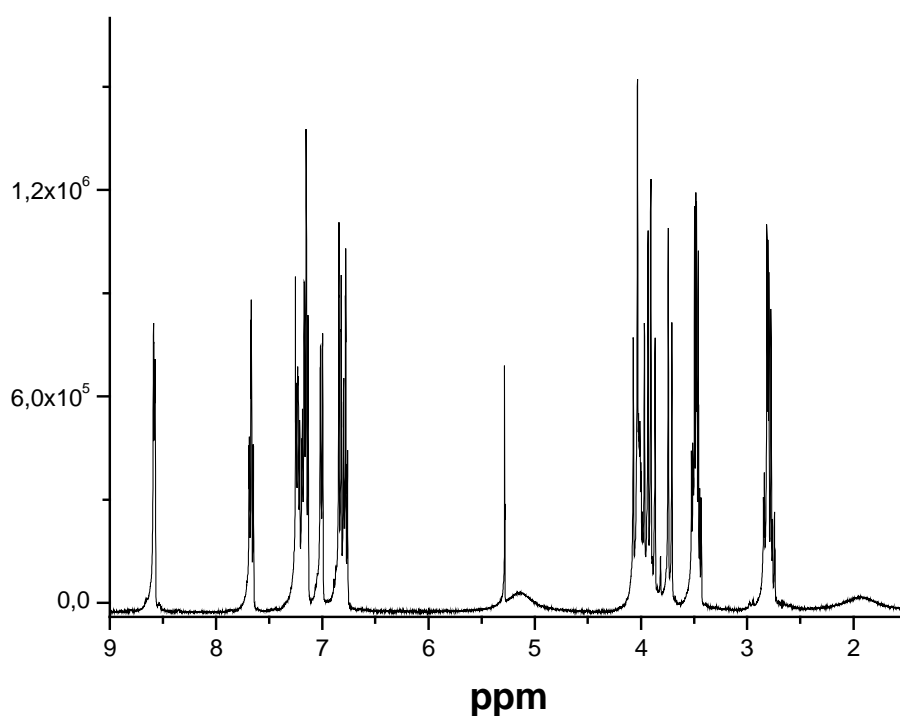


Figura 5. Espectro de RMN ^1H do ligante **L2**, em CDCl_3 .

Tabela 4. Resultados de RMN ^1H para o ligante **L2**.

δ observado (ppm)	Multiplicidade	J observado (Hz)	Número de hidrogênios	Atribuição
2,78 - 2,83	multipleteo	-	2	H ₃ , H ₃ '
3,49 - 3,51	multipleteo	-	2	H ₁ , H ₁ '
3,72 - 4,04	multipleteo	-	5	H ₂ , H ₄ , H ₄ ', H ₅ , H ₅ '
6,79 - 6,85	multipleteo	-	2	H ₇ , H ₉
7,01 - 7,07	dupleteo	J ₆₋₇ = 7,33 J ₆₋₈ = 1,47	1	H ₆
7,14 - 7,26	multipleteo	-	3	H ₈ , H ₁₀ , H ₁₂
7,68 - 7,70	Duplo tripleteo	J ₁₁₋₁₂ =J ₁₁₋₁₀ = 7,69	1	H ₁₁
8,59 - 8,60	Dupleteo	J ₁₁₋₁₃ = 1,83 J ₁₃₋₁₂ = 4,03	1	H ₁₃

A análise de RMN de ^1H concorda com os dados da literatura (Horn et al., 2000). Analisando o espectro apresentado na Figura 5, observam-se sinais na faixa de 2,78 a 8,6 ppm sendo que o sinal em 5,29 é referente à presença de diclorometano residual. Na região de 3,72 – 4,04 ppm observa-se um multipleteo referente aos hidrogênios 2, 4, 4', 5 e 5', isto ocorre devido a semelhança do ambiente químico que se encontram. Assim, de acordo com o espectro de RMN ^1H , os sinais referentes aos hidrogênios aromáticos encontram-se entre 6,79 e 8,60 ppm, gerando um total de cinco sinais, sendo os demais sinais correspondentes aos hidrogênios alifáticos.

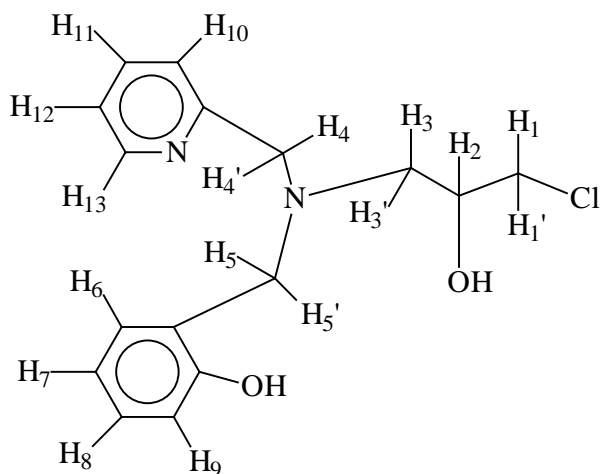


Figura 6. Molécula do **L2** evidenciando os tipos de hidrogênio para auxiliar na compreensão da Tabela 2.

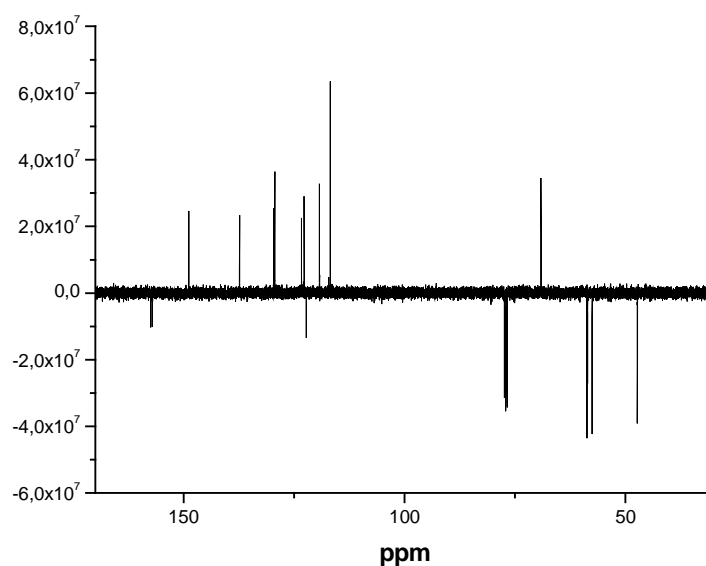


Figura 7. Espectro de RMN ¹³C para o ligante **L2**.

O espectro de RMN ¹³C do **L2** é apresentado na Figura 7. Tal espectro apresenta 15 sinais, os quais confirmam a presença dos 14 átomos de carbono em ambientes químicos diferentes e dois átomos de carbono com semelhantes ambientes químicos. Os carbonos aromáticos encontram-se à esquerda do espectro, enquanto os alifáticos apresentam-se à direita do mesmo. Desta forma, os resultados de RMN ¹³C confirmam a obtenção do ligante.

4.1.2. Espectroscopia de Infravermelho

O espectro de infravermelho para o precursor **L1** é apresentado na Figura 8.

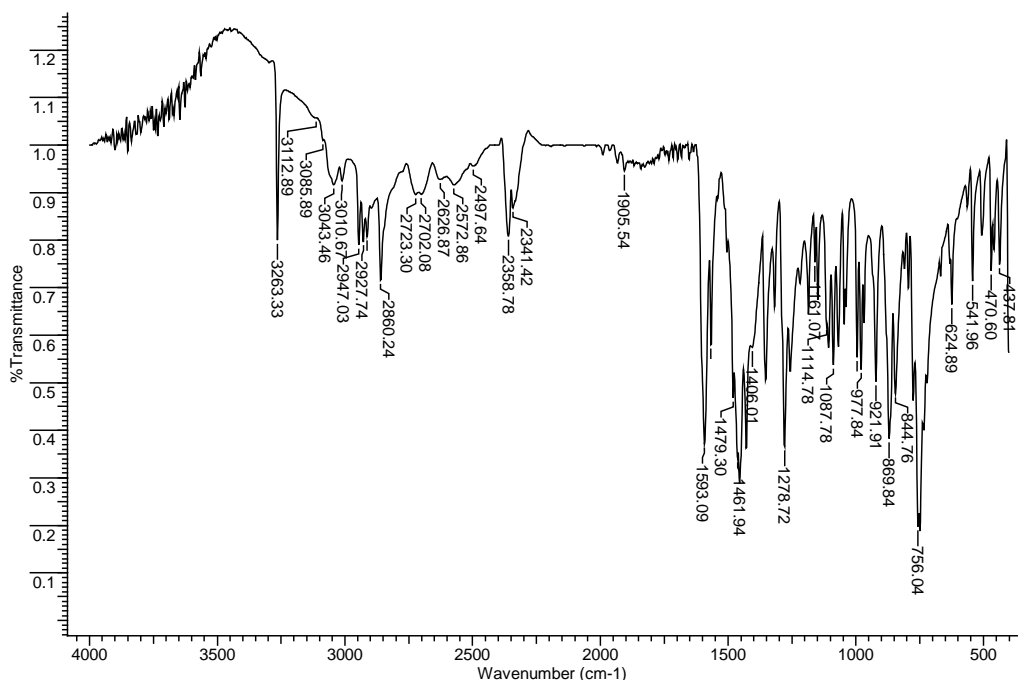


Figura 8. Espectro de infravermelho para o intermediário **L1**.

No espectro de infravermelho do **L1** é possível observar a absorção referente à vibração de amina secundária (ν N-H, 3263 cm^{-1}) em que o próton ligado ao nitrogênio amínico, por apresentar fracas interações por ligação de hidrogênio com átomos vizinhos, apresenta banda mais aguda que o grupo hidroxila, sendo, assim facilmente distinguido deste grupo. O espectro também confirma a presença de anel aromático o qual é verificado pelas vibrações características do esqueleto do anel (C=C, C=N) e pelos estiramentos e vibrações fora do plano dos grupos C-H aromáticos, e também, observa-se as vibrações da deformação axial do grupo C-O do fenol, confirmando sua presença na molécula.

Os resultados de espectroscopia de infravermelho para o **L1** são apresentados na Tabela 5, com atribuição das principais bandas apresentadas por este composto.

Tabela 5. Resultados de espectroscopia de infravermelho para o ligante **L1**.

Número de onda (cm ⁻¹)	Atribuição
3263	ν N-H (estiramento)
3112 – 3010	ν C-H aromático (estiramento)
2927 - 2497	ν C-H alifático (estiramento)
1593 - 1454	ν C=N e C=C aromático (estiramento)
1278	ν C-O (deformação axial de C-O do fenol)
756	γ-CH; β-Anel (deformação angular fora do plano)

O espectro de infravermelho para o ligante **L2** é apresentado na Figura 9. Os resultados e as atribuições das principais absorções são apresentadas na Tabela 6.

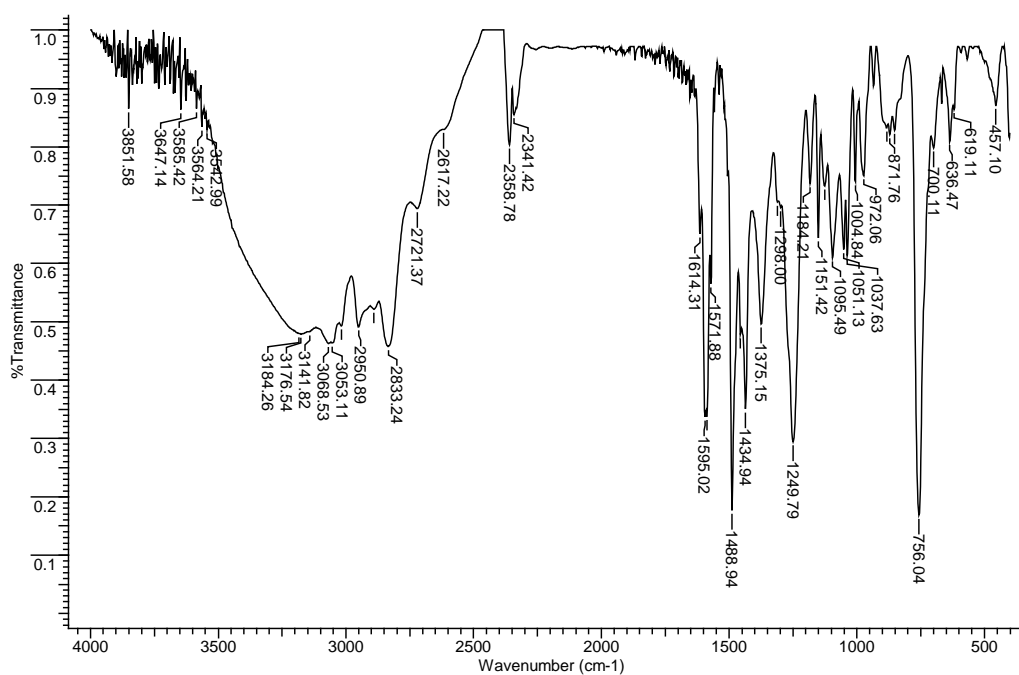


Figura 9. Espectro de infravermelho para o ligante **L2**.

Tabela 6. Resultados de espectroscopia de infravermelho para o ligante **L2**.

Número de onda (cm ⁻¹)	Atribuição
3542 - 2617	ν O-H (estiramento)
3184 - 3053	ν C-H aromático (estiramento)
2950 - 2617	ν C-H alifático (estiramento)
1595 - 1488	ν C=N e C=C aromático (estiramento)
1249	ν C-O (deformação axial de C-O do fenol)
756	γ-CH; β-Anel (deformação angular fora do plano)

Comparando-se o resultado obtido por espectroscopia de infravermelho para o ligante **L2** com o obtido para o precursor **L1**, observa-se que os picos correspondentes ao **L1** encontram-se no espectro do ligante, o que indica que o produto formado apresenta o precursor em sua estrutura. Além disso, a ausência de banda referente à vibração de deformação N-H de amina secundária no espectro de infravermelho para o ligante **L2** indica possível formação de amina terciária, conforme proposto na estrutura do ligante. E observa-se, também, as vibrações características do esqueleto do anel (C=C, C=N), estiramentos e vibrações fora do plano dos grupos C-H aromáticos e vibrações de deformação axial do grupo C-O do fenol.

4.2- Compostos Inorgânicos

4.2.1- Espectroscopia de Infravermelho

O espectro de infravermelho para o complexo [Zn(HBPCINOL)Cl] (**1**) é apresentado na Figura 10. Os resultados e as atribuições das principais absorções são apresentados na Tabela 7.

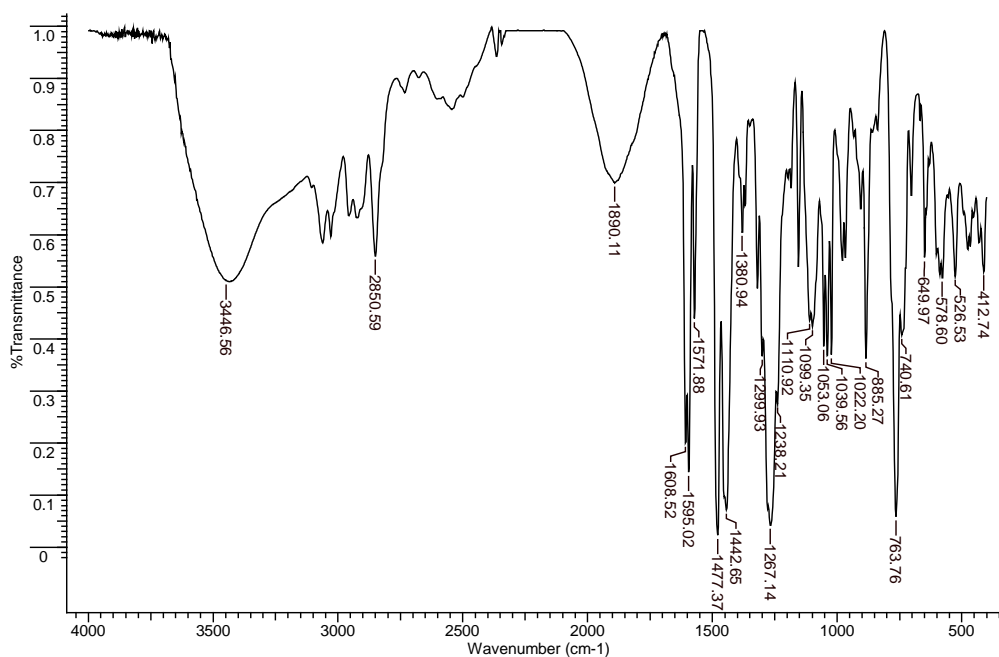


Figura 10. Espectro de infravermelho para o complexo $[Zn(HBPCINOL)Cl]$ (**1**).

Tabela 7. Resultados de espectroscopia de infravermelho para o complexo $[Zn(HBPCINOL)Cl]$ (**1**).

Número de onda (cm^{-1})	Atribuição
3446	ν O-H (estiramento)
3028	ν C-H aromático (estiramento)
2926 – 2850	ν C-H alifático (estiramento)
1595 – 1477	ν C=N e C=C aromático (estiramento)
1261	ν C-O (deformação axial de C-O do fenol)
764	γ -CH (deformação angular fora do plano)
740	β -Anel (deformação angular fora do plano)

Como foi apresentado na Tabela 7, o espectro de infravermelho do complexo (**1**) apresentou bandas características do ligante **L2**, como as bandas entre 1595 e 1477 cm^{-1} referentes as vibrações e estiramento do esqueleto do anel (C=N e C=C), as bandas em 3028 cm^{-1} e entre 2926 e 2850 cm^{-1} ,

características das vibrações das ligações C-H aromáticas e alifáticas e a banda em 1261 cm^{-1} típica de deformação axial do grupo C-O do fenol.

O espectro de infravermelho para o complexo $[\text{Co}(\text{H}_2\text{BPCINOL})\text{Cl}_2]$ (**2**) é apresentado na Figura 11. Os resultados e as atribuições das principais absorções são apresentadas na Tabela 8.

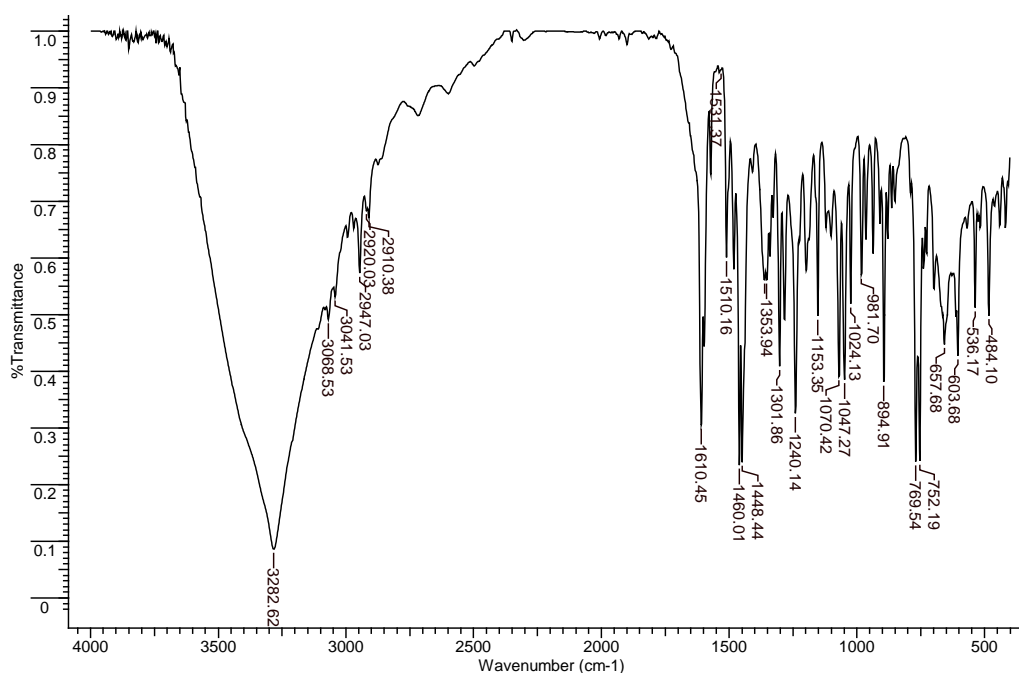


Figura 11. Espectro de infravermelho para o complexo $[\text{Co}(\text{H}_2\text{BPCINOL})\text{Cl}_2]$ (**2**).

De acordo com os dados apresentados na Tabela 8, observa-se que o espectro de infravermelho para o complexo (**2**) apresentou as bandas em 3041 cm^{-1} e entre $2947 - 2873\text{ cm}^{-1}$ referentes as vibrações e estiramentos C-H aromáticos e alifáticos, bandas entre $1598 - 1448\text{ cm}^{-1}$ características das vibrações e estiramento do esqueleto do anel (C=N e C=C) e a banda em 1240 cm^{-1} referente as vibrações de deformação C-O do fenol, todas características do ligante **L2**.

Tabela 8. Resultados de espectroscopia de infravermelho para o complexo $[\text{Co}(\text{H}_2\text{BPCINOL})\text{Cl}_2]$ (**2**).

Número de onda (cm^{-1})	Atribuição
3283	ν O-H (estiramento)
3041	ν C-H aromático (estiramento)
2947 – 2873	ν C-H alifático (estiramento)
1598 – 1448	ν C=N e C=C aromático (estiramento)
1240	ν C-O (deformação axial de C-O do fenol)
769	γ -CH (deformação angular fora do plano)
752	β -Anel (deformação angular fora do plano)

4.2.2- Análise Elementar (CHN)

A análise elementar (CHN) revela que o complexo $[\text{Zn}(\text{HBPCINOL})\text{Cl}]$ (**1**), no estado sólido, apresenta em sua constituição um átomo de zinco e uma molécula do ligante **L2** desprotonado (HBPCINOL), apresentando peso molecular de $406,61 \text{ g.mol}^{-1}$.

Tabela 9. Resultado de análise elementar para o complexo $[\text{Zn}(\text{HBPCINOL})\text{Cl}]$ (**1**).

$\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_2\text{Zn}$	C%	H%	N%
Encontrado	46,79	4,21	7,02
Calculado	47,26	4,46	6,89

O complexo $[\text{Co}(\text{H}_2\text{BPCINOL})\text{Cl}_2]$ (**2**) apresentou dados de análise elementar (CHN) que concordam com a presença de um átomo de cobalto e uma molécula do ligante **L2**, no estado sólido, apresentando peso molecular de $436,63 \text{ g.mol}^{-1}$.

Tabela 10. Resultado de análise elementar para o complexo [Co(H₂BPCINOL)Cl₂] **(2)**.

C ₁₆ H ₁₉ Cl ₃ N ₂ O ₂ Co	C%	H%	N%
Encontrado	43,60	4,47	6,42
Calculado	44,01	4,39	6,42

4.2.3- Difração de Raios X

Na Figura 12 é apresentada a estrutura de raios X para o complexo [Zn(HBPCINOL)Cl] **(1)**.

A difração de raios X para o complexo **(1)** indica que, no estado sólido, o complexo apresenta uma estrutura mononuclear sendo que o átomo de Zn está coordenado a uma molécula do ligante **L2** e a um íon cloreto.

O átomo de zinco apresenta geometria bipirâmide trigonal distorcida, devido aos desvios observados nos ângulos apresentados pelas ligações entre o átomo de zinco e os demais átomos os quais diferem dos ângulos previstos teoricamente: 120° no plano equatorial e 90° no plano axial (Lee, 1999).

No plano equatorial, o átomo de zinco está coordenado a um átomo de oxigênio do grupo álcool O(1), a um átomo de oxigênio do grupo fenol O(10), a um nitrogênio piridínico N(22) com ângulos de 111,28° entre o O(1) e O(10), 116,10° entre o O(1) e N(22) e 126,6° entre N(22) e O(10) e com distâncias Zn-O(1)= 2,083(3)Å, Zn-O(10)= 1,982(3)Å e Zn-N(22) = 2,108(4)Å.

No eixo axial, o átomo de zinco está coordenado a um nitrogênio amínico N(1) e a um átomo de cloro Cl(2) com ângulo de 168,42° entre N(1)-Zn(1)-Cl(2) e com distâncias Zn(1)-Cl(2)= 2,2775(17)Å e Zn(1)-N(1)= 2,253(4)Å.

Observa-se que o átomo de oxigênio do fenol O(10) coordenado ao zinco Zn(1) encontra-se desprotonado, resultando em uma carga negativa, assim como o cloro Cl(2) coordenado ao centro metálico também possui uma carga negativa, somando duas cargas negativas. Como o zinco encontra-se na forma oxidada +2, com duas cargas positivas, anulando as cargas negativas referentes aos átomos coordenados ao zinco, logo o complexo **(1)**, no estado sólido, é neutro.

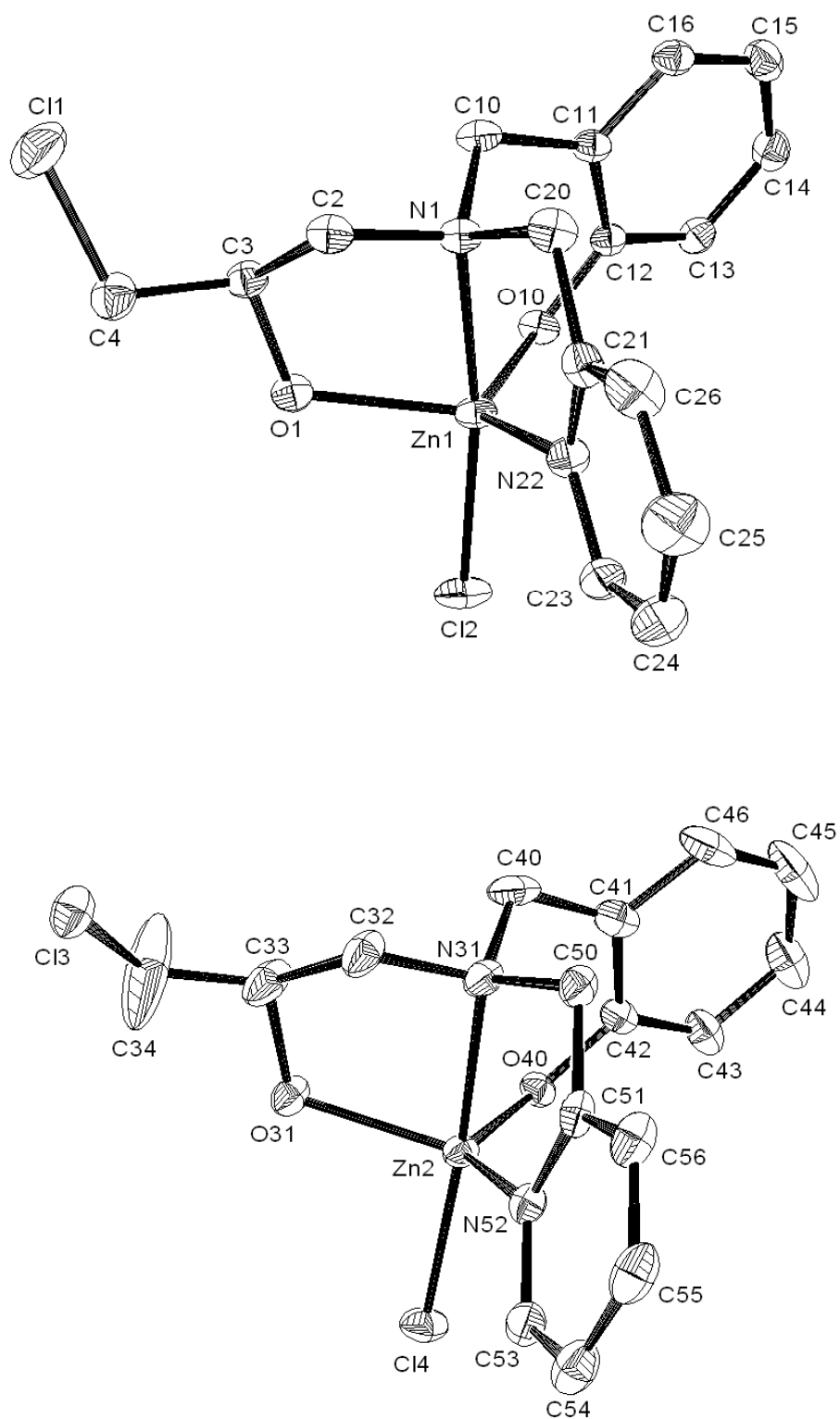


Figura 12. ZORTEP para o complexo [Zn(HBPCINOL)Cl] (**1**), evidenciando a presença de duas estruturas similares por cela unitária.

Tabela 11. Parâmetros cristalográficos para o complexo [Zn(HBPCINOL)Cl] (1).

Fórmula Empírica	C ₁₆ H ₁₈ Cl ₂ N ₂ O ₂ Zn
Peso Molecular	406,59
Temperatura	293(2) K
Comprimento de onda	0,71069 Å
Sistema Cristalino	Triclínico
Grupo Espacial	P-1
Dimensões da Cella Unitária	a = 11,536(6) Å α = 69,61(2)° b = 11,572(2) Å β = 74,17(3)° c = 14,500(2) Å γ = 80,91(2)°
Volume	1741,3(10) Å ³
Z	4
Densidade (calculada)	1,551 Mg/m ³
Coeficiente de Absorção	1,726 mm ⁻¹
F(000)	832
Tamanho do Cristal	0,43 x 0,26 x 0,20 mm ³
Faixa de coleta (θ)	1,54 to 25,07°
Índices	-13 ≤ h ≤ 13, -13 ≤ k ≤ 12, -17 ≤ l ≤ 0
Reflexão coletada	6443
Reflexões independentes	6176 [R(int) = 0,0339]
Correção de absorção	Psi-scan
Transmissão máxima e mínima	0,7064 and 0,6402
Método de refinamento	Full-matrix least-squares on F ²
Dados / restrições/ parâmetros	6176 / 0 / 426
F ²	1,052
Índice R final [I > 2σ(I)]	R1 = 0,0455, wR2 = 0,1017
Índice R (todos os dados)	R1 = 0,1075, wR2 = 0,1178

Tabela 12. Distâncias (Å) e ângulos de ligação (°) selecionados para o complexo (1).

Zn(1)-O(10)	1,982(3)	N(22)-Zn(1)-Cl(2)	99,04(12)
Zn(1)-O(1)	2,083(3)	N(1)-Zn(1)-Cl(2)	168,42(11)
Zn(1)-N(22)	2,108(4)	O(40)-Zn(2)-O(31)	112,12(14)
Zn(1)-N(1)	2,253(4)	O(40)-Zn(2)-N(52)	130,41(14)
Zn(1)-Cl(2)	2,2775(17)	O(31)-Zn(2)-N(52)	111,37(14)
Zn(2)-O(40)	1,988(3)	O(40)-Zn(2)-N(31)	89,36(15)
Zn(2)-O(31)	2,082(3)	O(31)-Zn(2)-N(31)	79,39(13)
Zn(2)-N(52)	2,117(4)	N(52)-Zn(2)-N(31)	76,33(15)
Zn(2)-N(31)	2,228(4)	O(40)-Zn(2)-N(52)	130,41(14)
Zn(2)-Cl(4)	2,2808(15)	O(31)-Zn(2)-N(52)	111,37(14)
O(10)-Zn(1)-O(1)	111,28(13)	O(10)-Zn(1)-O(1)	111,28(13)
O(10)-Zn(1)-N(22)	126,64(15)	O(10)-Zn(1)-N(22)	126,64(15)
O(1)-Zn(1)-N(22)	116,10(14)	O(1)-Zn(1)-N(22)	116,10(14)
O(10)-Zn(1)-N(1)	89,30(13)	O(10)-Zn(1)-N(1)	89,30(13)
O(1)-Zn(1)-N(1)	78,84(13)	O(1)-Zn(1)-N(1)	78,84(13)
N(22)-Zn(1)-N(1)	77,41(15)	N(22)-Zn(1)-N(1)	77,41(15)
O(10)-Zn(1)-Cl(2)	101,49(10)	O(10)-Zn(1)-Cl(2)	101,49(10)
O(1)-Zn(1)-Cl(2)	93,17(10)	O(1)-Zn(1)-Cl(2)	93,17(10)
N(22)-Zn(1)-Cl(2)	99,04(12)	O(40)-Zn(2)-Cl(4)	98,37(10)
N(1)-Zn(1)-Cl(2)	168,42(11)	O(31)-Zn(2)-Cl(4)	96,73(10)
O(40)-Zn(2)-O(31)	112,12(14)	N(52)-Zn(2)-Cl(4)	99,09(12)
		N(31)-Zn(2)-Cl(4)	172,21(13)

4.2.4- Eletroquímica

O complexo de cobalto foi avaliado do ponto de vista eletroquímico, sendo os resultados apresentados e discutidos a seguir. O complexo de zinco foi eletroquimicamente inativo.

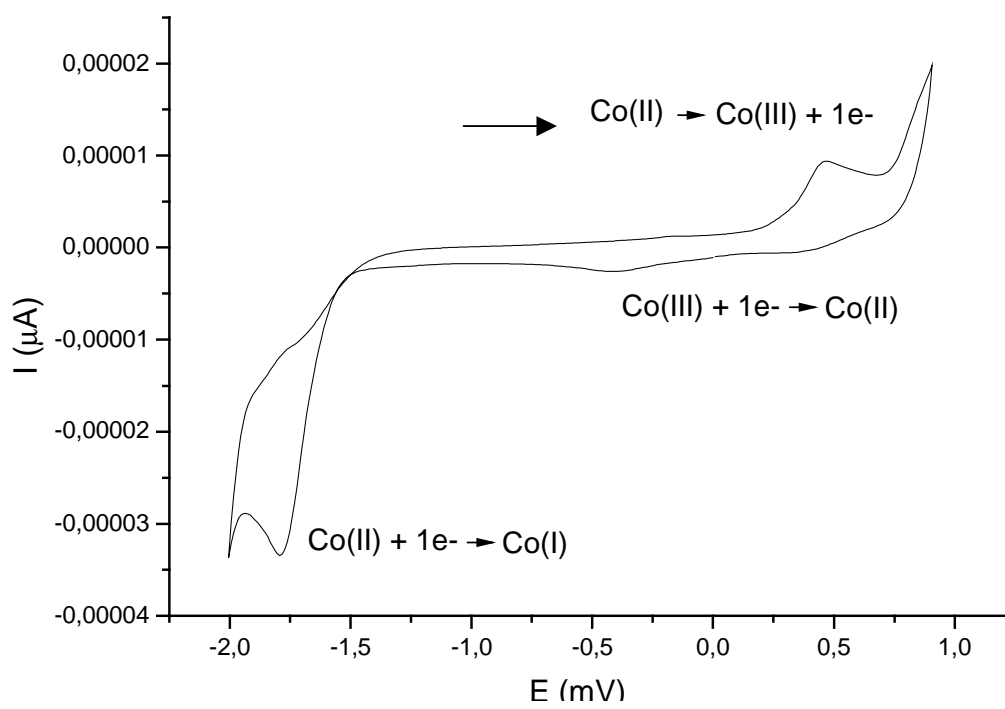


Figura 13. Voltamograma cíclico para o complexo $[\text{Co}(\text{H}_2\text{BPCINOL})\text{Cl}_2]$ (**2**), obtido em DMF.

O voltamograma cíclico para o complexo (**2**) apresenta dois processos sendo um anódico ($E_{pa} = 0,44 \text{ V vs NHE}$) e outro catódico ($E_{pc} = -0,43 \text{ V vs ENH}$). A diferença entre os potenciais de pico anódico e catódico é $\Delta E_p = 87 \text{ mV}$, com características de um processo *quasi-reversível*. Estes processos são atribuídos a oxidação do centro de Co(II) a Co(III) e a redução a Co(II) , respectivamente. A $-1,8 \text{ V vs ENH}$ observa-se um processo redox irreversível, o qual é atribuído a redução de Co(II) a Co(I) . A $1,43 \text{ V vs ENH}$ é observado um processo redox irreversível, bastante intenso, o qual é atribuído a oxidação dos ligantes cloreto, os quais sendo ligantes lábeis, são substituídos por moléculas de solvente a medida que o centro metálico sofre processos redox. Para confirmar que se tratava da oxidação dos ligantes cloretos, foram feitas adições sucessivas de cloreto de tetraetilamônio à solução contendo o complexo e observou-se que a intensidade deste processo aumentou significativamente.

4.2.5- Espectroscopia Eletrônica

Ambos os complexos forma investigados por espectroscopia eletrônica, porém o complexo $[\text{Zn}(\text{HBPCINOL})\text{Cl}]$ (**1**) não apresentou transições eletrônicas, já que não possui elétrons desemparelhados.

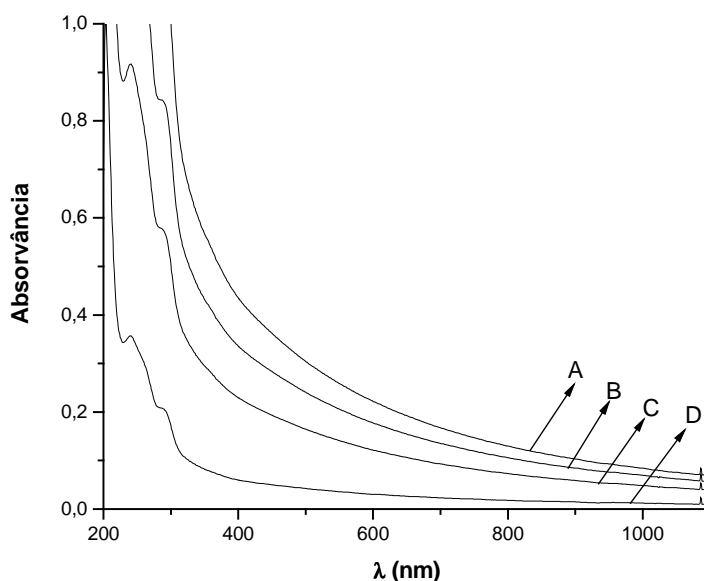


Figura 14. Espectros eletrônicos para o complexo $[\text{Co}(\text{H}_2\text{BPCINOL})\text{Cl}_2]$ (**2**), obtidos em metanol, empregando-se diferentes concentrações do complexo: A= $[\text{complexo}] = 1 \times 10^{-4} \text{ mol/L}^{-1}$, B= $[\text{complexo}] = 7,5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}^{-1}$, C= $[\text{complexo}] = 5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}^{-1}$, D= $[\text{complexo}] = 2,5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}^{-1}$.

São observadas duas transições eletrônicas em 241 e 290 nm, com coeficientes de extinção molar de $1,4 \times 10^4$ e $8,2 \times 10^3 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$, respectivamente. O ligante **L2** apresenta bandas intensas na região de 240 – 280 nm ($\epsilon = 1,1 \cdot 10^3 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$), desta forma as transições observadas para o complexo (**2**) podem ser atribuídas às transições observadas no ligante **L2** ($\pi \rightarrow \pi^*$).

4.2.6- Condutivimetria

A tabela a seguir apresenta os dados da condutivimetria para os complexos $[\text{Zn}(\text{HBPCINOL})\text{Cl}]$ (**1**) e $[\text{Co}(\text{H}_2\text{BPCINOL})\text{Cl}_2]$ (**2**), obtidos em metanol. Segundo a literatura (Geary, 1971) os valores de condutividade entre 80 e 115 $\mu\text{S}/\text{cm}$, correspondem a eletrólitos 1:1, valores entre 160-220 $\mu\text{S}/\text{cm}$, correspondem a eletrólitos 2:1 e valores entre 290 e 350 $\mu\text{S}/\text{cm}$ correspondem a eletrólitos 3:1.

Tabela 13. Valores de condutivimetria para os complexos (**1**) e (**2**), obtidos em metanol.

Complexo	Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	Eletrólito
$[\text{Zn}(\text{HBPCINOL})\text{Cl}]$	77,0	1:1
$[\text{Co}(\text{H}_2\text{BPCINOL})\text{Cl}_2]$	127,5	1:1

Com base nos valores obtidos de condutividade para os complexos sintetizados, conclui-se que em solução metanólica, o complexo (**1**) torna-se um cátion, liberando um íon cloreto para a solução. O mesmo ocorre com o complexo (**2**). Desta forma, pode-se considerar que ambos os complexos apresentam diferentes comportamentos no estado sólido e em solução.

4.2.7- Espectrometria de Massas com Ionização por *Electrospray*

Esta técnica foi utilizada com o objetivo de se avaliar a estabilidade dos complexos sintetizados em solução. Como observado através da medida de condutivimetria, ambos os complexos formam espécies catiônicas em solução, embora os resultados de estado sólido (análise elementar para o complexo (**2**) e análise elementar e dados cristalográficos para o complexo (**1**)) indiquem que ambos são neutros no estado sólido.

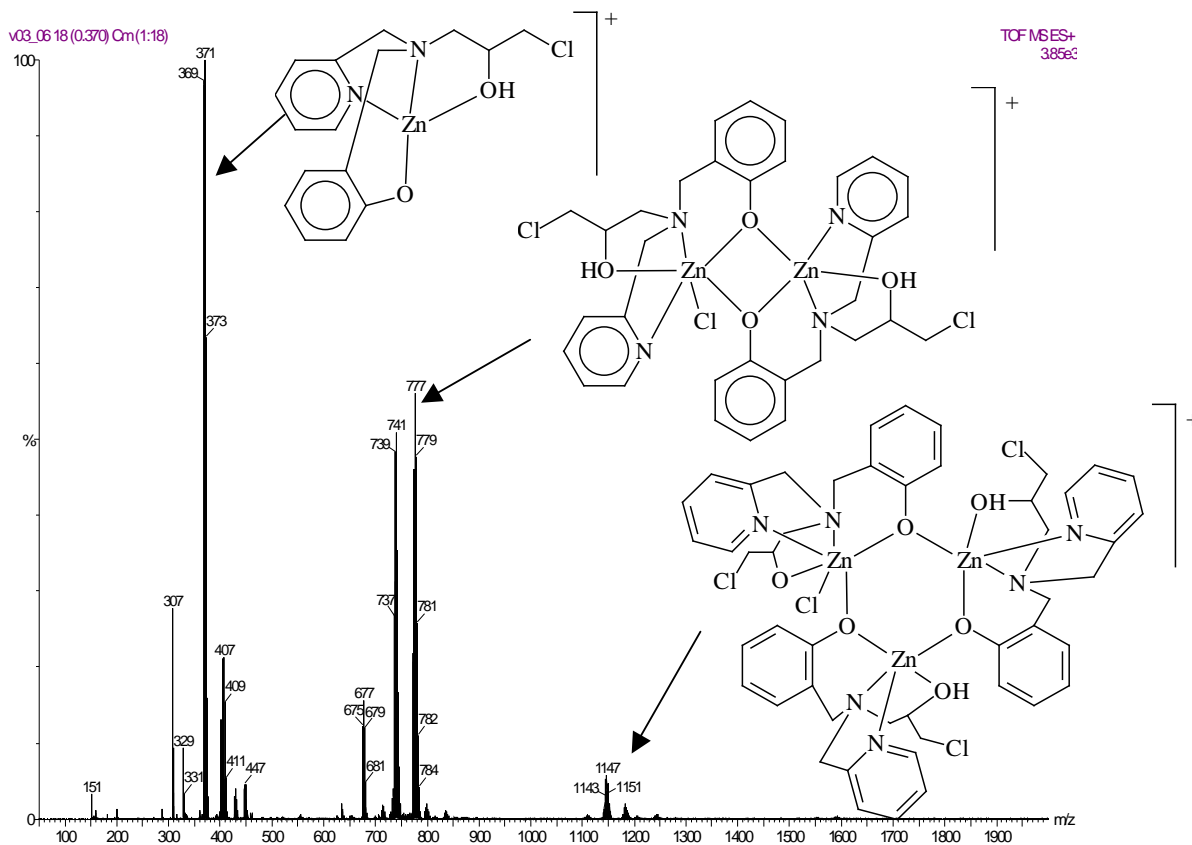


Figura 15. Propostas para as principais estruturas observadas em em H₂O:MeOH (1:1) para o complexo **(1)**, obtidas através de ESI(+)-MS e ESI(+)-MS/MS.

Para os complexos **(1)** e **(2)**, os resultados de ESI(+)-MS e ESI(+)-MS/MS indicam que em solução de H₂O:MeOH (1:1), espécies mononucleares, binucleares e até trinucleares estão presentes.

Para o complexo **(1)**, estão presentes em solução as seguintes espécies: [Zn(H₂BPCINOL)Cl]⁺ (*m/z* 407), [Zn(HBPCINOL)]⁺ (*m/z* 371), [Zn₂(HBPCINOL)(BPCINOL)]⁺ (*m/z* 741), [Zn₂(HBPCINOL)₂Cl]⁺ (*m/z* 777), [Zn₃(HBPCINOL)₂(BPCINOL)Cl]⁺ (*m/z* 1148) e [Zn(H₂BPCINOL)(HBPCINOL)]⁺ (*m/z* 678).

Para o complexo **(2)**, as seguintes espécies estão presentes em solução:
 $[\text{Co}(\text{H}_2\text{BPCINOL})\text{Cl}]^+$ (m/z 401), $[\text{Co}(\text{HBPCINOL})]^+$ (m/z 365),
 $[\text{Co}_2(\text{HBPCINOL})(\text{BPCINOL})]^+$ (m/z 728) e $[\text{Co}_2(\text{HBPCINOL})_2\text{Cl}]^+$ (m/z 765).

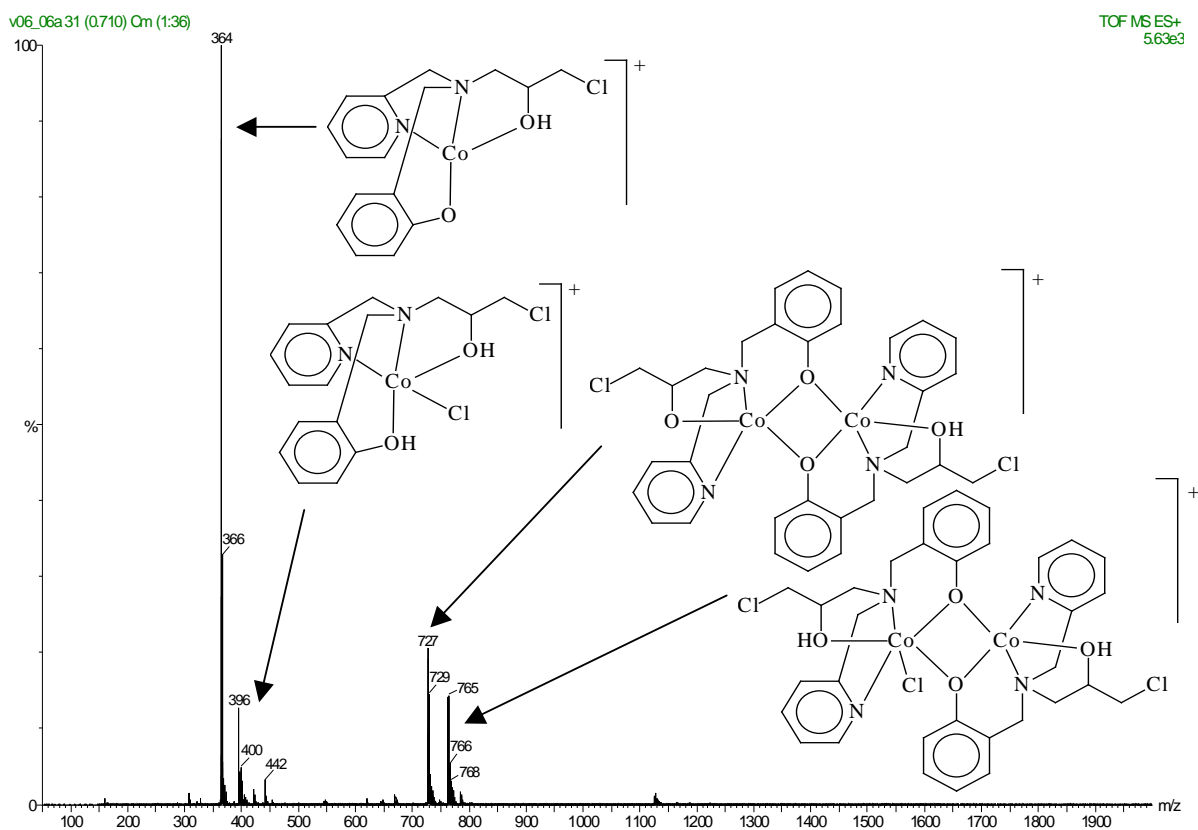


Figura 16. Propostas para as principais estruturas observadas em em $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ (1:1) para o complexo **(2)**, obtidas através de ESI(+)-MS e ESI(+)-MS/MS.

5- INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE INIBITÓRIA DOS COMPOSTOS SINTETIZADOS FRENTE A *S. aureus*

Após a completa caracterização dos complexos **(1)** e **(2)**, ambos foram investigados frente a capacidade de inibir microrganismos como bactérias. Este estudo foi realizado em colaboração com o Prof. Olney Vieira-da-Motta do LSA -

CCTA. Em virtude da pouca solubilidade dos complexos **(1)** e **(2)** em água, os estudos foram realizados em DMSO. Os complexos tiveram sua atividade biológica avaliada por turbidimetria frente às nove cepas de *S. aureus*: *S. aureus* RN 6390B, *S. aureus* COL (MRSA), *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* Smith Diffuse, *S. aureus* Wood 46 e as produtoras de enterotoxinas: *S. aureus* FRI-100 (SEA+), *S. aureus* FRI S-6 (SEB+), *S. aureus* FRI 361 (SEC+) e *S. aureus* LSA 88 (SEC/SED/TSST-1 +). Também foram investigados os sais metálicos ([Cloreto de cobalto(II), cloreto de zinco, e o ligante **L2**).

5.1- Metodologia

5.1.1- Cultivo da bactéria *S. aureus*

Para a preparação do meio de cultura sólido para a bactéria *S. aureus*, utilizou-se agar infusão cérebro e coração (Acumedia) em pó. Preparou-se uma solução contendo 5,2 gramas do meio em pó em 100 mL de água destilada. A seguir, esta solução foi aquecida a 100°C a fim de dissolver todo o sólido. Após a dissolução, a solução foi autoclavada (Autoclave Quimis) a temperatura de 121° C por 15 minutos. Ao término da autoclave a solução foi transferida para uma placa de petri para o arrefecimento e solidificação da mesma. Após a solidificação do meio de cultura, a placa de petri foi tampada, revestida com papel e colocada na geladeira. Este meio de cultura foi utilizado para o cultivo da bactéria *S. aureus*.

5.1.2- Metodologia de Poços

Para o experimento de avaliação da atividade frente a microrganismos por metodologia de poços dos complexos **(1)** e **(2)**, diluiu-se o microrganismo (*S. aureus*) em solução salina até obter-se o valor de densidade óptica de 0,5 na escala McFarland, medido através do densitômetro (BioMérieux). A seguir, 100 µL dessa diluição foram espalhados com uma suabe de algodão sob o meio de cultura sólido, o qual fora previamente preparado em uma placa de petri. Com um

furador de diâmetro de 0,5 centímetros foram feitos poços no meio de cultura e a eles foram adicionados 25 µL de cada substância a ser testada (Gentamicina, DMSO, cloreto de zinco, cloreto de cobalto, complexo **(1)** e **(2)**). As concentrações utilizadas para os complexos, os sais metálicos e o ligante foi de 10^{-2} mol.L⁻¹. As placas foram colocadas na estufa, a 37° C por 24 horas. Após esse período, os halos foram medidos e as placas fotografadas.

5.1.3- Turbidimetria

Os experimentos foram realizados em meios de cultura líquidos, empregando-se caldo BHI (infusão cérebro e coração). A solução utilizada dos complexos, dos sais metálicos e do ligante possuía concentração de 10^{-2} mol.L⁻¹.

Em tubos de vidro foram adicionados 1850 µL do meio de cultura, 100 µL de inóculo do microorganismo (*S. aureus*) diluído a 0,5 McFarland em salina e 50 µL da solução dos complexos para cada cepa estudada. Após esta diluição a concentração dos tratamentos foi de $2,5 \cdot 10^{-4}$ mol.L⁻¹. Os testes foram realizados em triplicata e incubados a 37°C. O grau de inibição foi avaliado por densidade óptica (D.O.) em 510 nm, com intervalos de leitura de 1h.

5.1.4- Concentração Mínima Inibitória

Para este experimento foi empregado o agar Muller-Hinton para o cultivo da *S. aureus*. Os complexos foram diluídos em DMSO e em concentrações entre $1,25 \cdot 10^{-4}$ a 10^{-3} mol.L⁻¹. Em tubos de vidro foram adicionados: o meio de cultura, o inóculo do microorganismo (*S. aureus*) diluído a 0,5 McFarland em salina e a solução dos complexos. Os testes foram realizados em triplicata, e os tubos foram incubados em Shaker rotatório a 35°C por 24h. A concentração mínima inibitória foi determinada como sendo a menor concentração do complexo onde não houve o crescimento do microorganismo.

5.2. Resultados obtidos

5.2.1- Metodologia de Poços

Na figuras 17 são apresentados os resultados de metodologia de poços obtidos frente a *S. aureus*, empregando-se o complexo **(1)**, cloreto de zinco, DMSO e gentamicina.

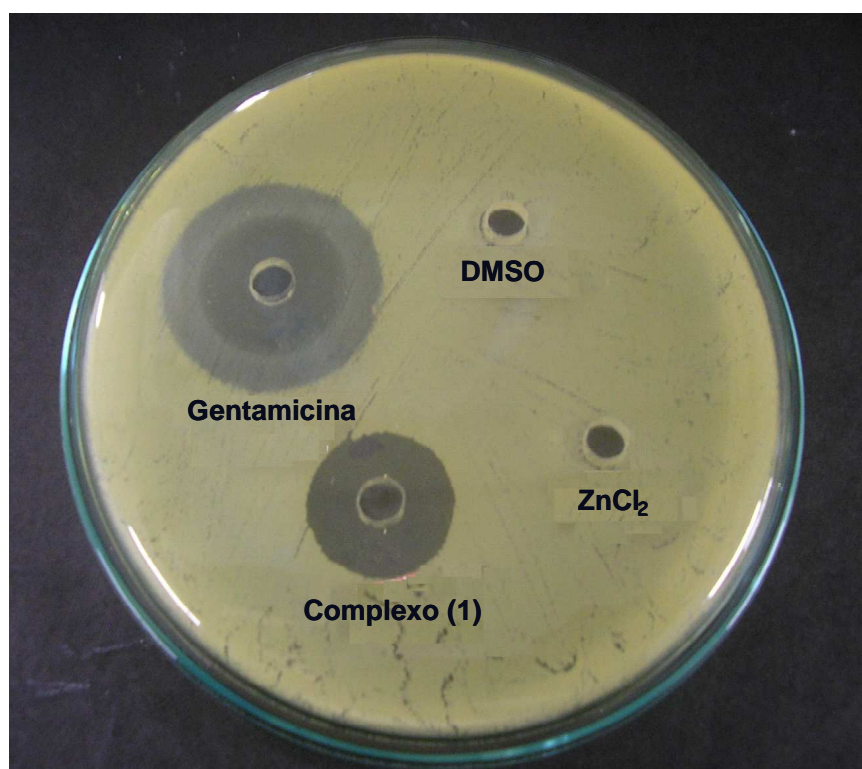


Figura 17. Placa obtida após incubação por 24 h a 37°C, empregando-se a bactéria *S. aureus* na presença de: DMSO (solvente empregado no experimento), Gentamicina (medicamento antibacteriano comercial), complexo **(1)** e sal metálico (cloreto de zinco).

Na figura 18 são apresentados os resultados de metodologia de poços obtidos frente a *S. aureus*, empregando-se o complexo **(2)**, cloreto de cobalto, DMSO e gentamicina.

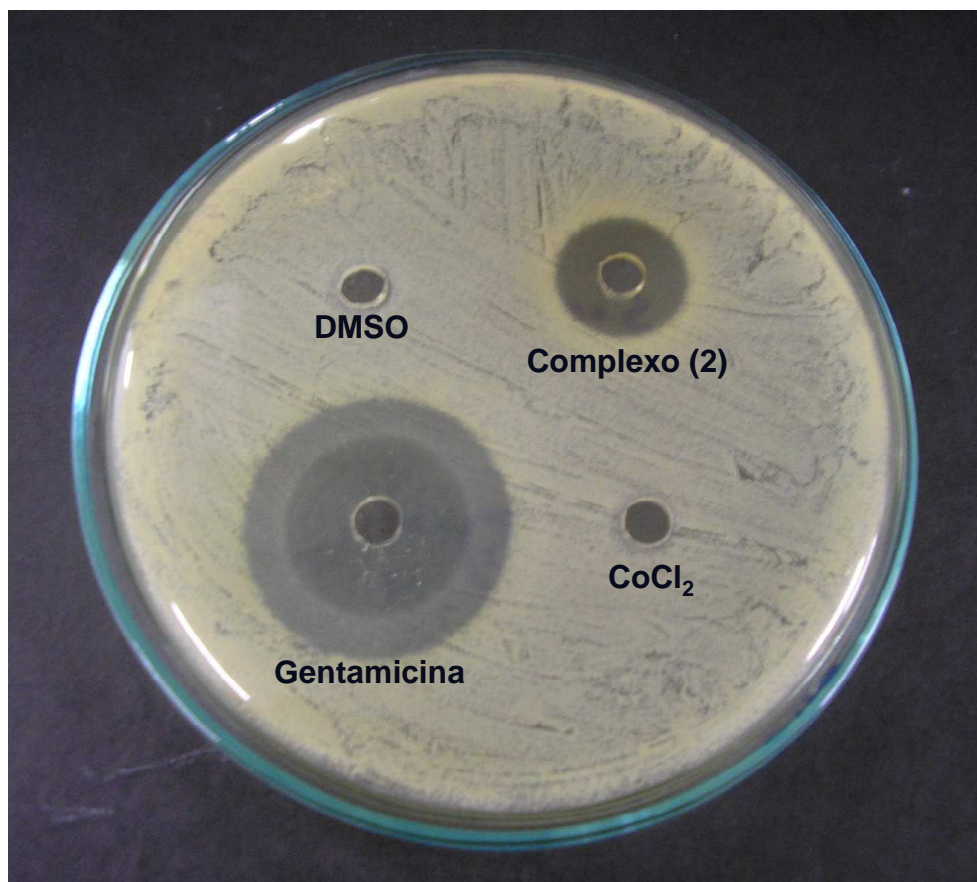


Figura 18. Placa obtida após incubação por 24 h a 37°C, empregando-se a bactéria *S. aureus* na presença de: DMSO (solvente empregado no experimento), Gentamicina (medicamento antibacteriano comercial), complexo **(2)** e o sal metálico (cloreto de cobalto).

Comparando os resultados apresentados nas Figuras 17 e 18, nota-se que os complexos **(1)** e **(2)** inibem o crescimento da bactéria *S. aureus* devido a formação de halo de inibição. Já o solvente e os sais metálicos não têm atuação sobre o crescimento da bactéria *S. aureus*. Nestes estudos foi empregado o tratamento com Gentamicina, para comparar a eficácia dos compostos em estudo com um medicamento convencional. Nota-se que o tratamento com Gentamicina produz um grande halo de inibição, sugerindo que este inibe o crescimento da bactéria. Além deste primeiro halo, é possível detectar um segundo halo, o qual é

denominado de halo de resistência, indicando que o microrganismo apresenta-se resistente ao medicamento.

5.2.2- Turbidimetria

Além dos complexos $[Zn(HBPCINOL)Cl]$ **(1)** e $[Co(H_2BPCINOL)Cl_2]$ **(2)** também tiveram suas atividades inibitória avaliadas os complexos $[Cu(H_2BPCINOL)Cl]Cl \cdot H_2O$ **(3)** e $[Fe^{III}(HBPCINOL)Cl_2] \cdot H_2O$ **(4)**. Estes complexos foram sintetizados e caracterizados anteriormente por integrantes do Grupo de Química de Coordenação e Bioinorgânica/UENF (Parrilha, 2008 e Bull, 2008). Os sais e o ligante utilizados na síntese dos complexos também tiveram suas atividades biológicas avaliadas por turbidimetria e os resultados são apresentados na Tabela 14. Todos os tratamentos tiveram seu estudo de atividade biológica realizado à concentração de $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot L^{-1}$.

Tabela 14. Resultados obtidos para os complexos **(1)**, **(2)**, **(3)**, **(4)**, o ligante **L2** e os sais metálicos frente a *S. aureus*, depois de 10 horas de incubação.

Tratamento ($2,5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$)	% inibição dos complexos								
	S. aureus								
	RN 6390B	COL (MRSA)	LSA 88	ATCC 25923	Smith Diffuse	Wood 46	FRI 100	FRI S-6	FRI 361
(1)	98,67	100	100	100	100	98,67	98	98,67	98,67
(2)	98,67	98,67	97,78	98,67	98	98,67	94,44	98	97,33
(3)	99	100	58,66	59,20	98	98,67	99	98,67	98,67
(4)	98,67	22,67	0	40,3	8,57	6,67	10,18	0	0
ZnCl ₂	1,33	8,83	0	0	4,16	0	3,13	0	2,67
$[Co(OH_2)_6]Cl_2$	2,66	13,97	0	0	9,03	6,67	7,81	0	5,33
$[Cu(OH_2)_4]Cl_2$	18,67	11,75	0	0	13,19	13,33	11,72	2,67	5,78
$[Fe(OH_2)_6]Cl_3$	27,33	0	0	0	0	0	2,34	0	0
L2	0	2,87	0	4,41	0	0	0	0	5,12

Os complexos tiveram sua atividade biológica avaliada por turbidimetria frente às nove cepas de *S. aureus*: *S. aureus* RN 6390B, *S. aureus* COL (MRSA), *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* Smith Diffuse, *S. aureus* Wood 46 e as produtoras de enterotoxinas: *S. aureus* FRI-100 (SEA+), *S. aureus* FRI S-6 (SEB+), *S. aureus* FRI 361 (SEC+) e *S. aureus* LSA 88 (SEC/SED/TSST-1 +).

A cepa *S. aureus* ATCC 25923 é a cepa de origem humana de padrão internacional. A *S. aureus* RN 6390B é uma cepa de referência e a *S. aureus* COL é resistente a metilina (MRSA). As cepas *S. aureus* Smith Diffuse, *S. aureus* Wood 46 são, respectivamente, produtoras de cápsula e baixa produtora de cápsula. E as cepas *S. aureus* FRI-100, *S. aureus* FRI S-6, *S. aureus* FRI 361 e *S. aureus* LSA 88 são produtoras de enterotoxinas, sendo a *S. aureus* LSA 88 de origem animal e produtora de enterotoxinas C, D e a toxina responsável pela síndrome do choque tóxico (TSST-1). A *S. aureus* FRI-100 é produtora de enterotoxina A, a *S. aureus* FRI S-6 é produtora de enterotoxina B e a *S. aureus* FRI 361 é produtora de enterotoxina C.

Os complexos **(1)** e **(2)** apresentaram uma atividade inibitória elevada frente a todas as cepas de *S. aureus*, sendo que o complexo **(1)** inibiu quase que 100% todas as cepas de *S. aureus*, sendo o mais eficiente na inibição das cepas. O complexo **(3)** apresentou uma atividade inibitória menos elevada frente às cepas *S. aureus* ATCC 25923 e LSA 88. O complexo **(4)** apresentou atividade inibitória elevada apenas frente a *S. aureus* RN 6390B, uma atividade inibitória moderada frente a *S. aureus* ATCC 25923 e COL, uma pequena atividade inibitória frente a *S. aureus* FRI-100, Smith Diffuse e Wood 46 e não inibiu o crescimento das cepas *S. aureus* LSA 88, FRI S-6 e FRI 361.

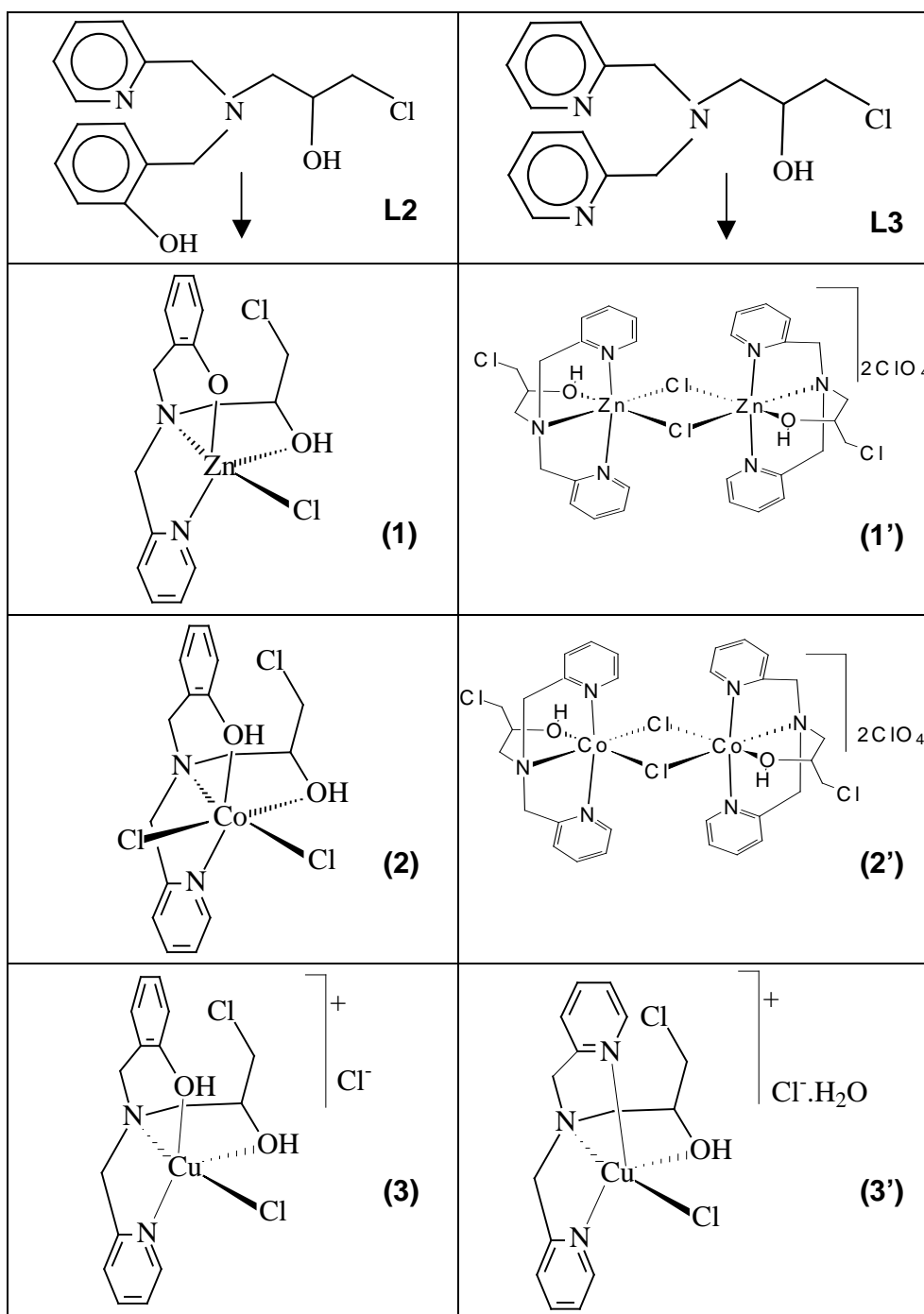
O $[\text{Co}(\text{OH}_2)_6]\text{Cl}_2$ utilizado na síntese do complexo **(2)** apresentou baixa atividade frente a *S. aureus* COL e Smith Diffuse (cerca de 10%). Contudo a atividade deste sal é muito baixa em relação à atividade apresentada pelo complexo **(2)**, para todas as cepas. Do mesmo modo, o sal $[\text{Cu}(\text{OH}_2)_4]\text{Cl}_2$ utilizado na síntese do complexo **(3)** apresentou atividade inibitória moderada a fraca frente a *S. aureus* RN 6390B, COL, Smith Diffuse, Wood 46 e FRI-100, entretanto baixa em relação à atividade apresentada para o complexo **(3)**. O ZnCl_2 apresentou

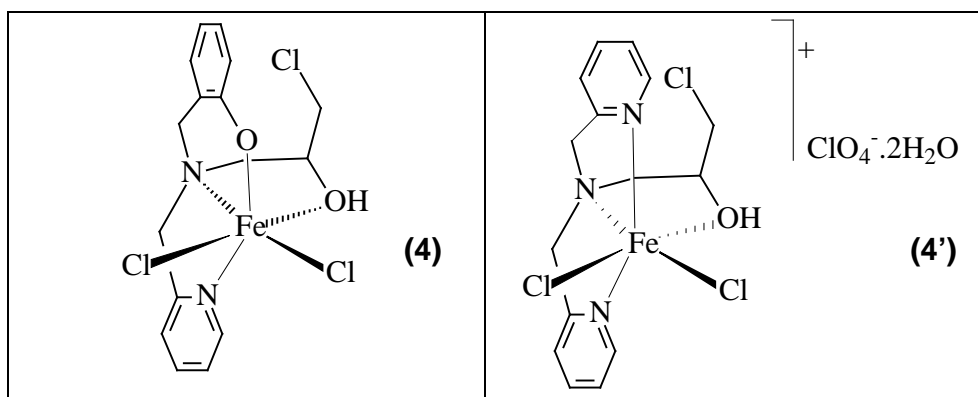
atividade biológica irrelevante quando comparada à atividade inibitória do complexo **(1)**. O $[\text{Fe}(\text{OH}_2)_6]\text{Cl}_3$ apresentou atividade inibitória relevante apenas frente a *S. aureus* RN 6390B, sendo menor que a atividade do complexo **(4)**.

A atividade inibitória do ligante **L2** é irrelevante quando comparada com a atividade dos complexos **(1)**, **(2)**, **(3)** e até mesmo do complexo **(4)**. Isso indica que o ligante **L2** potencializa a ação dos metais contra o crescimento das bactérias estudadas. De acordo com os resultados apresentados na tabela 14 é possível determinar a seqüência de inibição promovida pelos complexos em estudo: **(1)>(2)>(3)>(4)**, logo o centro metálico utilizado interfere na taxa de inibição do complexo, sendo o complexo zinco o de maior eficiência, seguido pelos complexos de cobalto, cobre e ferro, sucessivamente.

Concomitantemente à realização deste estudo, foram realizados estudos de atividade inibitória dos complexos de zinco, cobalto, cobre e ferro sintetizados com o ligante HPCINOL (1-(bis-piridin-2-ilmetil-amino)-3-cloropropan-2-ol) **L3** frente a *S. aureus* LSA 88 (Rocha, 2008). As estruturas dos complexos e do ligante **L3** são apresentadas na Tabela 15. O ligante HPCINOL (**L3**) tem estrutura similar ao ligante $\text{H}_2\text{BPCINOL}$ (**L2**), apresentando dois grupos metil-piridínicos ligados ao nitrogênio amínico, enquanto que o **L2** possui um grupo metil-piridínico e um grupo metil fenol ligados ao nitrogênio amínico.

Tabela 15. Estrutura dos ligantes **L2** e **L3** e seus respectivos complexos de zinco, cobalto, cobre e ferro.





Todos os complexos sintetizados com o ligante **L3** e também o ligante não apresentaram atividade inibitória significativa frente a *S. aureus* LSA 88. A mudança do grupo funcional fenol presente no ligante **L2** por uma piridina (ligante **L3**), provavelmente é a causa da inexistência da atividade inibitória dos complexos sintetizados com o ligante **L3** frente a *S. aureus* LSA88. Isto sugere que **L2** é um ligante que atua potencializando a ação dos metais, sendo mais eficiente que o ligante **L3**.

5.2.3- Concentração Mínima Inibitória (CMI)

Após determinadas as atividade inibitória dos complexos **(1)** e **(2)** frente às nove cepas de *S. aureus* por turbidimetria, foi determinada, para cada complexo, a concentração mínima inibitória (CMI), a qual se refere a menor concentração capaz de inibir o crescimento das cepas em estudo. Para essa etapa foram escolhidas cinco cepas de *S. aureus* pelas suas características: RN 6390B: cepa padrão; COL: resistente a meticilina; LSA 88: produtora de enterotoxinas C e D; ATCC 25923: cepa de origem humana e padrão internacional; Wood 46: baixa produtora de cápsulas.

Na tabela 16 encontram-se os resultados obtidos na determinação da CMI para ambos os complexos, utilizando-se como controle negativo o medicamento comercial Cloranfenicol.

Tabela 16. CMI dos complexos **(1)** e **(2)** frente a *S. aureus*.

complexo	CMI ($\mu\text{g/mL}$)				
	ATCC 25923	RN 6390B	LSA 88	Wood 46	COL
(1)	101,7	101,7	101,7	101,7	101,7
(2)	109,2	109,2	109,2	109,2	109,2
cloranfenicol	1*	-	-	-	-

* (Lv *et al.*, 2006)

Apesar dos complexos **(1)** e **(2)** apresentarem uma alta atividade inibitória, suas CMI são cem vezes maiores que a CMI do cloranfenicol para *S. aureus* ATCC 25923.

6- CONCLUSÃO

O ligante **L2** mostrou-se adequado para a obtenção de novos complexos mononucleares de zinco e de cobalto, os quais foram caracterizados por análise elementar, espectroscopia de infravermelho, espectrometria de massas (ESI-MS/MS), espectroscopia eletrônica e eletroquímica (apenas para o complexo **(2)**) e difração de raios X (apenas para o complexo **(1)**).

Os complexos foram investigados do ponto de vista da atividade inibitória frente a nove cepas de *S. aureus*. Através da metodologia de poços foi possível comprovar que ambos os complexos inibiram o crescimento da bactéria devido a formação de halo de inibição.

Os testes avaliados por turbidimetria indicaram que o ligante **L2** é altamente eficiente em potencializar a ação dos metais na inibição do crescimento das diversas cepas de *S. aureus* estudadas. Os complexos **(1)** e **(2)** apresentaram uma taxa de inibição média de 98% frente às cepas de *S. aureus* estudadas, sendo os mais eficazes em relação aos outros complexos previamente sintetizados com os ligantes **L2** e **L3**.

A alta atividade inibitória apresentada pelos complexos **(1)** e **(2)** indica que o metal tem grande influência na atividade biológica, evidenciando-se neste trabalho a seguinte seqüência em ordem decrescente de atividade: **(1)>(2)>(3)>(4)**.

Os complexos **(1)** e **(2)** apesar de apresentarem uma elevada atividade inibitória apresentaram CMI da ordem de 100 vezes maior que a MCI para o medicamento Cloranfenicol. Entretanto, a disseminação da resistência a medicamentos vem cescendo, logo há a necessidade de novos medicamentos que atuem em conjunto com os agentes antimicrobianos já utilizados, função a qual estes complexos poderiam exercer.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMYES, S. G. B., GEMMELL, C. G. Antibiotic resistance. **J. Med. Microbiol.**, 46:436-470, 1997.
- BALABAN, N., COLLINS, L. V., CULLOR, J. S., HUME, E. B., MEDINA-ACOSTA, E., VIEIRA-DA-MOTTA, O., O'CLLAGHAN, R., ROSSITTO, P. V., SHIRTLIFF, M. E., SILVEIRA, L. S., TARKOWSKI, A., TORRES, J. V. Prevention of diseases by *Staphylococcus aureus* using the peptide RIP. **Peptides**, 21:1301-1311, 2000.
- BULL, E. S. **Síntese, caracterização e avaliação das atividades de nuclease e antitumoral de compostos de coordenação de Cobre**, Dissertação de Mestrado, UENF, 2008.
- GEARY W. J. **Coord. Chem. Rev.**, 7:81-122, 1971.
- GORDON, L. A. *Staphylococcus aureus*: A Well-Armed Pathogen. **Clin. Infect Dis.**, 26:1779-1781, 1998.
- HORN JR, A., NEVES, A., VENCATO, I., DRAGO, V., ZUCCO, C., WERNER, R., HAASE, W. A New Dinucleating N,O donor Ligand (H₂BPCINOL) and the Structural and Magnetic Properties of two Diiron Complexes with the di- μ -Alckoxo Motif. **J. Braz. Chem. Soc.**, 11:7-10, 2000.
- KOOLS, W. E., LAMBRE JR, D. W. *Staphylococcus*. In: Balows, A., Husler Jr, W. J., Herrmann, K. L., et al. Manual of clinical microbiology. 5. ed. Washington, D.C., **Am. Soc. Microb...**, 222-227, 1991.
- LAUTENSCHGER, S., HERZOG, C., ZIMMERLI, W. Course and outcome of bacterimia due to *Staphylococcus aureus*: evaluation of different clinical case definitions. **Clin. Infect Dis.**, 16:567-573, 1993.

LEE, J. D., Química Inorgânica não tão concisa. 5.ed. São Paulo: **Edgard Blücher**, 1999.

LV, J., Liu, T., Cai, S., Wang, X., Liu, L., Wang, Y. **J. Inorg. Biochem**, 1260-1265, 2006.

LEVY, S. B. Antibacterial resistance: bacteria on the defence. **Brit. Med. J.**, 7159:612-613, 1998.

MICUSAN, V. V., THIBODEAU, J. Superantigens of microbial origin. **Semin. Immunol.**, 5:3, 1993.

NEVES, A., BRITO, M., VENCATO, I. Synthesis, Crystal Structure and Properties of a New Binuclear Iron (III) Complex as a Model for the Purple Acid Phosphatase. **Inorg. Chim. Acta.**, 214:5-8, 1993.

PARRILHA, G. L. **Síntese e caracterização de compostos mono e binucleares de Ferro de relevância bioinorgânica**. Dissertação de Mestrado, UENF, 2008.

ROCHA, M.R. **Síntese, caracterização e atividade biológica frente a bactéria *S.aureus* de compostos de coordenação de Cobalto, Cobre, Ferro, Vanádio e Zinco**. Monografia de Conclusão de Curso, UENF, 2008.

SCHWIETERT, C. W., MCCUE, J. P. **Coord. Chem. Rev.**, 184:67, 1999.

SOLOMONS, G., FRYHLE, C. Química Orgânica. 7 ed. Rio de Janeiro: **LTC Editora**, v. 02, 2002.