

UNIVERSIDADE DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM MEDICINA
REGENERATIVA E QUÍMICA MEDICINAL

José Alberto Paris Junior

**Síntese, caracterização e avaliação da atividade antimicrobiana de
complexos de Ag(I) com isoniazida e ácido succínico**

Araraquara, SP

2021

UNIVERSIDADE DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM MEDICINA
REGENERATIVA E QUÍMICA MEDICINAL

José Alberto Paris Junior

Síntese, caracterização e avaliação da atividade antimicrobacteriana de complexos de Ag(I) com isoniazida e ácido succínico

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal da Universidade de Araraquara – UNIARA – como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, Área de Concentração: Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Massabni
Coorientador: Dr. Mauricio Cavicchioli

Araraquara, SP
2021

FICHA CATALOGRÁFICA

P259s Paris Junior, José Alberto

Síntese, caracterização e avaliação da atividade antimicrobacteriana de complexos de Ag (I) com isoniazida e ácido succínico/José Alberto Paris Junior. – Araraquara: Universidade de Araraquara, 2021.

65f.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal- Universidade de Araraquara-UNIARA

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Massabni

Coorientador: Prof. Dr. Maurício Cavicchioli

1. Complexos metálicos. 2. Prata. 3. Isoniazida. 4. Àcido succínico. 5. Antimiobacteriano. 6. Antibacteriana. I. Título.

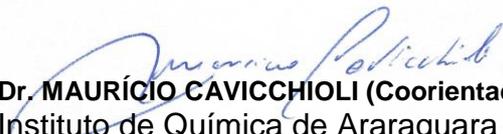
CDU 57.089

JOSÉ ALBERTO PARIS JUNIOR

Dissertação apresentada a Universidade de Araraquara - UNIARA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

Araraquara, 23 de fevereiro de 2021.

BANCA EXAMINADORA



Dr. MAURÍCIO CAVICCHIOLI (Coorientador)
Instituto de Química de Araraquara – UNESP



Profª. Drª. FLÁVIA APARECIDA RESENDE NOGUEIRA
Universidade de Araraquara - UNIARA



Dr. RENAN LIRA DE FARIAS
Instituto de Química de Araraquara – UNE

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao Senhor meu Deus que sempre esteve comigo me guiando em todos os momentos de minha vida e cuidando de mim com seu infinito amor.

Dedico também a minha amada família que sempre esteve comigo me dando forças para que eu continuasse em minha jornada, à qual sempre serei grato por tudo que já fizeram por mim.

Dedico, ainda, aos meus saudosos avós Derovaldo e Isabel Guerra (*In Memoriam*), que mesmo não estando mais entre nós, o amor, carinho e admiração sempre estarão vivos em meu coração.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, ao Senhor Jesus pela vida, amor e cuidado que sempre teve comigo e com minha família e por ter me guiado até aqui, muito obrigado Senhor.

Agradeço a minha família por todo amor e dedicação que tiveram comigo, agradeço a vocês por todas as lutas e esforços que fizeram para que eu chegasse até aqui e para que meu sonho se tornasse realidade. Agradeço a minha mãe Rute S. Guerra, a minha tia Raquel S. Guerra e a minha Irmã Isabela M. Branco por tudo que fizeram e ainda estão fazendo por mim, e, por fim, a minha saudosa avó Isabel L. Guerra (*In Memoriam*).

Agradeço ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal – UNIARA por contribuir com a minha formação e ao Coordenador do Programa Prof. Dr. André Capaldo Amaral e a secretária Sandra Pavanelli.

Agradeço ao grupo do Laboratório de Química Inorgânica Medicinal (QIM), ao Prof. Dr. Antônio Massabni, ao Dr. Mauricio Cavichioli e a todos os alunos de Iniciação Científica.

Agradeço à agência Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (Capes) pela taxa e apoio financeiro.

Por fim, agradeço aos amigos e colegas do Programa de Biotecnologia Bruna, Pietra, Fabio, Paula, Jessica e Ana Julia pela amizade e companheirismo.

“Nada temos que recear quanto ao futuro, a menos que esqueçamos a maneira que o Senhor nos tem guiado.”
Ellen G. White

RESUMO

Este trabalho tem como objetivo principal apresentar a síntese, a caracterização e os estudos da atividade biológica de complexos metálicos de prata (I) com os seguintes ligantes: isoniazida e ácido succínico. A caracterização do complexo $[Ag(inh)NO_3]$ sintetizado indica que a isoniazida está coordenada através de átomos de oxigênio do grupo C=O e de nitrogênio do grupo NH_2 , apresentando em sua estrutura a presença do ânion NO_3^- . Já para o complexo $[Ag_2(succ)]$, o resultado da caracterização indica a coordenação dos íons Ag ao grupo carboxilato do ligante. A avaliação biológica dos complexos contra o *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv indicou que os complexos apresentam atividade biológica, sendo o complexo $[Ag(inh)NO_3]$ o mais ativo (MIC_{90} 0,13 μ g/ml), apresentando um desempenho superior quando comparado aos fármacos de referência como o etambutol (MIC_{90} = 5,62 μ g/ml) e o *p*-aminossalicílico (MIC_{90} = 1,25 μ g/ml). A avaliação de inibição do crescimento bacteriano mostrou que os complexos $[Ag(inh)NO_3]$, $[Ag_2(succ)]$ apresentaram-se ativos contra as bactérias *S. aureus* e *E. coli* quando comparado aos ligantes na forma livre. A partir desses resultados, o centro metálico Ag apresentou um papel importante ao composto, conferindo ao complexo atividade biológica antibacteriana e antimicobacteriana.

Palavras-Chave: Complexos metálicos. Prata. Isoniazida. Ácido succínico. Antimicobacteriano.

ABSTRACT

This thesis has as main objective to present the synthesis, characterization and studies of the biological activity of silver (I) metal complexes with the following ligands: isoniazid and succinic acid. The characterization of the synthesized $[\text{Ag}(\text{inh})\text{NO}_3]$ complex indicates that the isoniazid is coordinated through oxygen atoms of the C = O group and nitrogen atoms of the NH₂ group, presenting in its structure the presence of the NO³⁻ anion. For the $[\text{Ag}_2(\text{succ})]$ complex, the characterization result indicates the coordination of the Ag ions to the carboxylate group of the ligand. The biological evaluation of the complexes against *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv indicated that the complexes have biological activity. The complex $[\text{Ag}(\text{inh})\text{NO}_3]$ being the most active (MIC₉₀ 0.13µg / ml), presenting a superior performance when compared to reference drugs such as ethambutol (MIC₉₀ = 5.62µg / ml) and p-aminosalicylic (MIC₉₀ = 1.25µg / ml). The evaluation of bacterial growth inhibition showed that the $[\text{Ag}(\text{inh})\text{NO}_3]$, $[\text{Ag}_2(\text{succ})]$ complexes were active against the bacteria *S. aureus* and *E. coli* when compared to the ligands in the free form. From these results, the metallic center Ag played an important role in the compound, giving the complex biological antibacterial and antimycobacterial activity.

Keywords: Metal complexes. Silver. Isoniazid. Succinic acid. Antimycobacterial.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Contribuições da química de coordenação para a medicina.....	2
1.1.1. Complexos metálicos utilizados na clínica médica.....	3
1.2. Resistência bacteriana.....	7
1.3. Tuberculose.....	8
1.3.1. Principais fármacos no tratamento da TB.....	10
1.4. Ligantes.....	12
1.4.1. Isoniazida.....	12
1.4.2. Ácido succínico.....	13
1.5. Metais	14
1.5.1. Prata	14
2. OBJETIVOS.....	16
3. EXPERIMENTOS.....	17
3.1. Sínteses dos complexos metálicos	17
3.1.1. Complexo de isoniazida com prata – [Ag(inh)]NO ₃	17
3.1.2. Complexo de ácido succínico com prata – [Ag ₂ (succ)].....	17
3.2. Testes biológicos	17
3.2.1. Teste de inibição de crescimento bacteriano dos complexos de prata	17
3.2.2. Testes microbiológicos (μMIC) para determinação da atividade antimicobacteriana dos complexos de prata	18
3.2.3 - Teste da concentração inibitória mínima (MIC).....	19
3.3. Cálculos teóricos por DFT para determinar a melhor conformação da molécula	20
3.4. Métodos instrumentais.....	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
4.1. Caracterização química dos complexos:.....	22
4.1.1. Complexo de isoniazida com prata	22
4.1.2. Complexo de ácido succínico com prata	31
4.2. Teste de solubilidade	36
4.3 Testes biológicos	38
4.3.1. Ensaio de atividade inibitória de crescimento bacteriano por difusão em discos ..	38
4.3.2. Teste da concentração inibitória mínima (MIC)	39
4.3.4. Atividade antimicobacteriana dos complexos de prata	41
5. CONCLUSÕES	43
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

LISTA DE ABREVIATURAS

AAS	Ácido acetilsalicílico
ACs	Agentes de contrastes
Ag	Prata
AMR	Resistência antibacteriana
AR	Artrite reumatoide
ATCC	Americam type culture collection
BHI	Brain Heart infosion
C	Carbono
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	Clinical and laboratory Standards Institut
DFT	Density functional theory
DMSO	Dimetil-sulfoxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSC	Differential scanning calorimetry
EMB	Etambutol
EUA	Estados Unidos da América
FDA	Food and Drug Administration
FMO	Orbitais moleculares de fronteira
H	hidrogênio
HIV	Vírus da Imunodeficiência
INH	Isoniazida
IRAS	Infecções relacionadas a assistência à saúde
IV	Infravermelho
K	Potássio
OMS	Organização Mundial da Saúde
P₄O₁₀	Pentóxido de fósforo
PZA	pirazinamida
REMA	Resazurim Microtiter Assy

RM	Ressonância magnética
RPM	Rifampicina
RPM	Rotação por minutos
TB	Tuberculose
TCA	Intermediário dos ácidos tricarboxílicos
TG	Análise termogravimétrica

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: COMPLEXOS DE PLATINA APROVADOS NA CLINICA MÉDICA	3
FIGURA 2: MECANISMO DE AÇÃO DA CISPLATINA	4
FIGURA 3: ESTRUTURA MOLECULAR DA SULFADIAZINA DE PRATA.....	5
FIGURA 4: COMPLEXOS METÁLICOS À BASE DE BISMUTO.....	5
FIGURA 5: COMPLEXOS ANTIRREUMÁTICOS	6
FIGURA 6: AGENTE DE CONTRASTE A BASE DE GADOLÍNIO.....	7
FIGURA 7: INCIDÊNCIA DA TB NO ANO DE 2019. FONTE : BRASIL(2020)	9
FIGURA 8: NUMERO DE ÓBITOS PARA CADA 100MIL HABITANTES.	10
FIGURA 9: CRONOLOGIA DOS FÁRMACOS DA TUBERCULOSE.	12
FIGURA 10: ESTRUTURA MOLECULAR DA ISONIAZIDA.	13
FIGURA 11: ESTRUTURA MOLECULAR DO ÁCIDO SUCCÍNICO.....	13
FIGURA 12: MECANISMO DE AÇÃO DA PRATA CONTRA MICRORGANISMOS.....	15
FIGURA 13: CURVA TERMOGRAVIMÉTRICA (TG AND DTG) DO COMPLEXO [AG(INH)NO ₃].	23
FIGURA 14: CURVA DA ANÁLISE DE DSC (CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL) PARA O COMPLEXO [AG(INH)NO ₃].	24
FIGURA 15: ESPECTROS NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO PARA A ISONIAZIDA E O COMPLEXO [AG(INH)NO ₃]. FONTES: OS AUTORES.....	25
FIGURA 16- DFT.....	27
FIGURA 17- DFT.....	29
FIGURA 18: CURVA TERMOGRAVIMÉTRICA (TG AND DTG) DO COMPLEXO [AG ₂ (SUC)]	33
FIGURA 19: CURVA DA ANÁLISE DE DSC (CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL) PARA O COMPLEXO [AG ₂ (SUC)]	33
FIGURA 20: ESPECTROS NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO PARA O ÁCIDO SUCCINATO, SUCCINATO DE POTÁSSIO E DO COMPLEXO [AG ₂ (SUC)].	35
FIGURA 21- DFT- COMPLEXO ACIDO SUCCÍNICO COM PRATA.....	36
FIGURA 23: SATURAÇÃO DOS SOLVENTES- A) COMPLEXOS DE ISONIAZIDA; B) COMPLEXOS DE ÁCIDO SUCCÍNICO ..	37
FIGURA 24: - A) DIAGRAMA DO POSICIONAMENTO DOS LIGANTES PUROS E SEUS COMPLEXOS	39

1. INTRODUÇÃO

A química medicinal é uma ciência multidisciplinar que engloba áreas como química geral, bioinorgânica, farmacologia, bioquímica, química orgânica sintética, química farmacêutica, química computacional, biologia celular, biologia estrutural e biologia molecular (Fundamental et al., 2017); (Lima, 2007). A química medicinal é a ciência que estuda o desenvolvimento e o planejamento de novos compostos bioativos, suas características estruturais e moleculares, e suas interações com o sistema biológico (Do Amaral & Montanari, 2002).

O marco histórico da Química Medicinal ocorreu com a descoberta do ácido acetilsalicílico (AAS) no final do século XIX pelo químico alemão Felix Hoffmann, tendo sido o primeiro fármaco sintetizado pela indústria. Em 1902, o químico Hermann Emil Fischer postulou o modelo dos estudos da interação dos fármacos com os biorreceptores por meio do conceito de “chave-fechadura”, nascendo então o princípio-base da Química Medicinal (BARREIRO, 2011).

A Química Bioinorgânica é uma subárea da química que estuda as funções do metabolismo e as aplicações dos íons metálicos e seus complexos em processos biológicos (QUE JR; BANCI, 2002), tais como os íons metálicos que ocorrem naturalmente em sistemas biológicos ou incorporados em sistemas biológicos mediante aplicação de metalofármacos (MONGE et al., 2000; FARRELL, 2002).

A origem da utilização e da aplicação da química inorgânica medicinal é datada desde 3500 a.C., quando os chineses e os árabes utilizavam ouro na fabricação de medicamentos para tratar algumas doenças (Beraldo, 2005). Por volta de 3000 a.C., no Egito já se usava cobre na esterilização da água (FARIAS, 2009) do zinco para o tratamento de feridas (STOCHEL et al., 1998) e do ouro para tratar tuberculose e processos inflamatórios (BERALDO, 2005).

Sabe-se que os íons metálicos, além de serem essenciais para diversas funções vitais do organismo, podem modificar a ação e a estrutura de compostos orgânicos empregados na medicina, podendo ser ativados ou biotransformados por meio de íons presentes no meio biológico (SADLER; GUO, 1999). A vista disso, o estudo e a pesquisa de complexos metálicos e de metalofármacos que apresentam algum potencial biológico são de grande importância.

Os ligantes dos metalofármacos podem ser orgânicos ou inorgânicos. A coordenação com o íon metálico pode modificar as propriedades físicas e químicas, alterar a toxicidade, modificar a biodistribuição, reduzir os efeitos colaterais e aumentar a atividade biológica (THOMPSON, 2003). Os ligantes são moléculas ou íons que se encontram ligados à espécie central (íon metálico) por ligação coordenada (COELHO, 2015).

1.1. Contribuições da química de coordenação para a medicina

Sabe-se que diversos íons metálicos são primordiais para os seres vivos e desempenham papéis cruciais no sistema biológico nos quais estão presentes inúmeros processos bioquímicos e interações com diversas moléculas como DNA e proteínas. Como por exemplo, o grupo heme da hemoglobina contém o íon ferro Fe^{2+} coordenado, se tornando essencial para o transporte de oxigênio e de elétrons. (Orvig & Abrams, 1999) (Pesantren et al., 2017).

A Química Inorgânica Medicinal atual originou-se no século XX com os trabalhos de Paul Ehrlich, ganhador do prêmio Nobel em Medicina e Fisiologia em 1908 e por Alfred Werner, ganhador do prêmio Nobel de Química em 1913. (Pesantren et al., 2017). Paul Ehrlich foi o pioneiro e criador da quimioterapia e do conceito de índice terapêutico. Já Alfred Werner é visto como o pai da química de coordenação, por criar a teoria que explica as ligações existentes nos compostos de coordenação. (Beraldo, 2005)

Em 1964, Barnett Rosenberg estudava os efeitos do campo elétrico sobre culturas bacterianas de *Escherichia coli* quando observou que as bactérias em questão passavam a crescer na forma de filamentos devido à impossibilidade de se multiplicarem. Ele acabou descobrindo acidentalmente que na região próxima aos eletrodos de platina houve uma inibição à divisão celular bacteriana. Após a análise do material próximo aos eletrodos descobriu que se tratava da cisplatina. (Fontes et al., 2005)

1.1.1. Complexos metálicos utilizados na clínica médica

Antitumorais

Na década de 70 a cisplatina foi aprovada pela FDA (*Food and Drug Administration*) para o tratamento de alguns tipos de câncer, como o câncer de ovário e de testículo (REEDIJK *et al.*, 1987). Atualmente a cisplatina [Pt(NH₃)₂Cl₂], também conhecida como cis-diaminodicloroplatina (II), é também administrada em outros tipos de neoplasias, como câncer de pulmão, de cabeça, de esôfago, de mama e de cérvix. Novos estudos mostram que também é eficaz em casos de sarcomas, linfomas, câncer pulmonar, de esôfago, tiroidemelanoma maligno e neuroblastoma (Fontes *et al.*, 2005).

Após a descoberta da cisplatina vários outros complexos à base de platina(II) foram estudados, porém somente mais dois complexos foram aprovados para a utilização clínica no mundo todo, sendo eles a oxiliplatina e carboplatina (Figura 1). Outros complexos também aprovados à base de platina ficaram restritos a países como a Coreia, Japão e China. (Neves & Vargas, 2011).

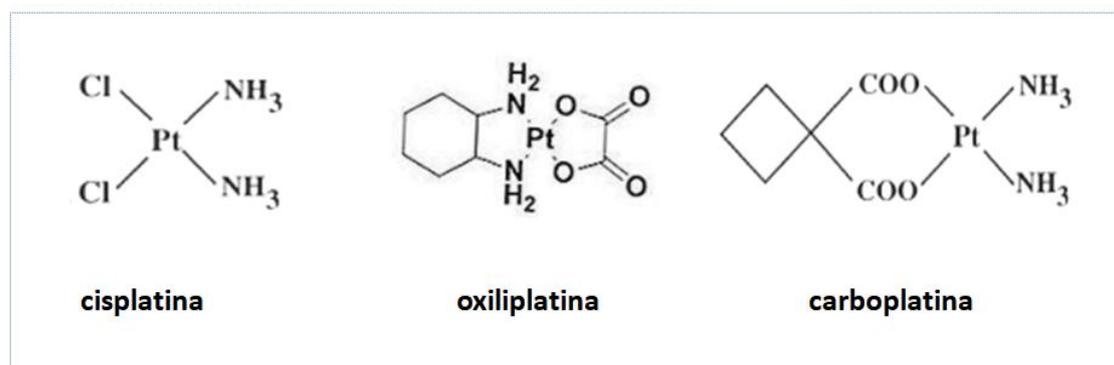


Figura 1: Complexos de platina aprovados na clínica médica

O mecanismo de ação da cisplatina se inicia com a entrada do complexo no interior da célula (Figura 2). No meio intracelular o complexo sofre hidrólise, substituindo um ou dois dos cloridos de sua estrutura por uma ou duas moléculas de água. Esse processo de hidrólise possibilita a ligação da platina ao DNA por meio do nitrogênio 7 da guanina. As ligações entre a platina e o DNA ocasionam distorções na estrutura do material genético, gerando bloqueio do ciclo celular e ao processo de apoptose. (Siddik, 2003)

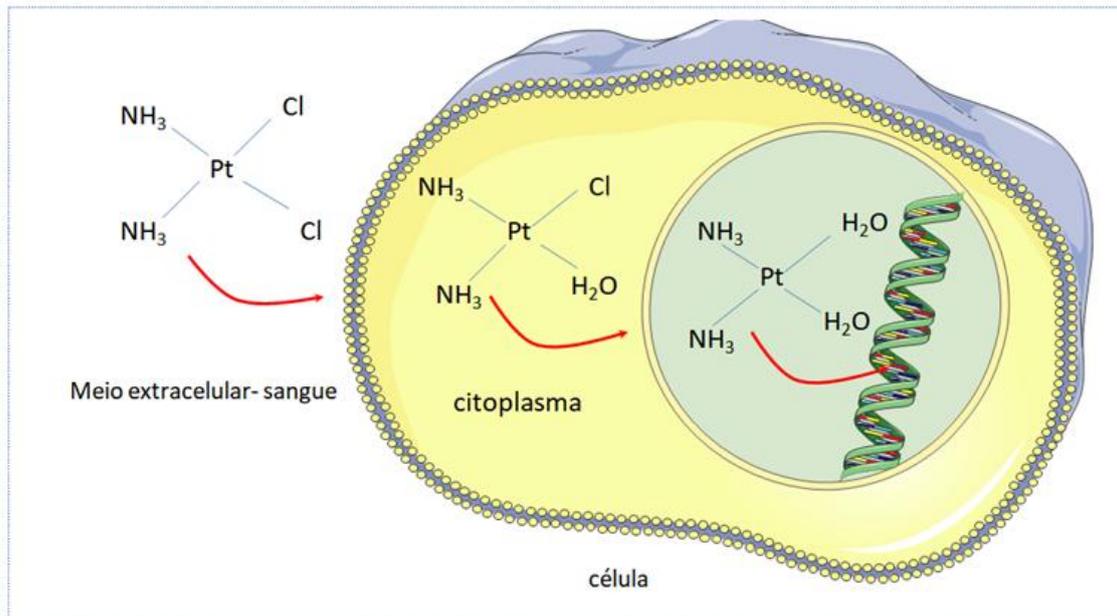


Figura 2: Mecanismo de ação da cisplatina

Antibacterianos

Além do rápido aumento da resistência bacteriana frente aos antibióticos já existentes, tem ocorrido, na mesma velocidade, uma redução drástica do arsenal de fármacos disponíveis para o tratamento de infecções bacterianas resistentes. Conseqüentemente, a busca por novas drogas farmacêuticas torna-se um fator indispensável (Rocha et al., 2011).

O uso da prata como antibacteriano é observado há muito tempo. Existem relatos da idade média que mostram o uso do nitrato de prata para o tratamento de queimaduras e feridas e a utilização de objetos feitos de prata metálica em cirurgias da época (Klasen, 2000).

Em 1968, Charles L. Fox estudava a associação de nitrato de prata com sulfadiazina. Esse estudo acabou resultando no desenvolvimento da sulfadiazina de prata (Figura 3) e foi aprovado em 1973 pelo FDA. Desde então a substância é amplamente usada até hoje no tratamento de queimaduras de segundo e terceiro graus.(Ragonha et al., 2005).

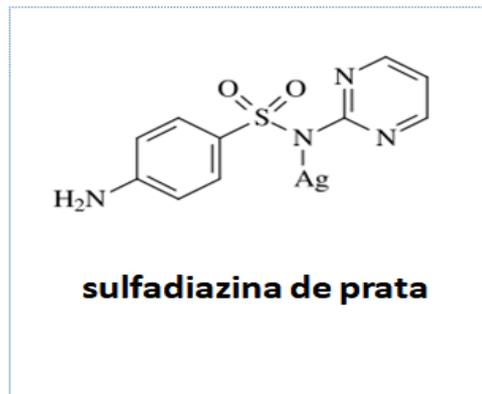


Figura 3: Estrutura molecular da sulfadiazina de prata

A sulfadiazina de prata é um antibacteriano de uso tópico que apresenta uma estrutura polimérica e é encontrado na forma de creme inodoro, de cor branca e hidrossolúvel. Sua prescrição é indicada para o tratamento de infecções em pacientes com quadros de queimaduras, feridas cirúrgicas, escaras de decúbito e úlceras varicosas, com atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Ragonha et al., 2005) (Donaduzzi, 2012).

Já os compostos à base de bismuto são utilizados na clínica médica para tratar doenças do trato gastrointestinal, como a infecção por *Helicobacter pylori*. O tratamento para a erradicação da *H pylori* consiste na utilização de diversos complexos metálicos à base de bismuto, como subsalicilato de bismuto e citrato de bismuto - Figura 4 (Rocha et al., 2011)

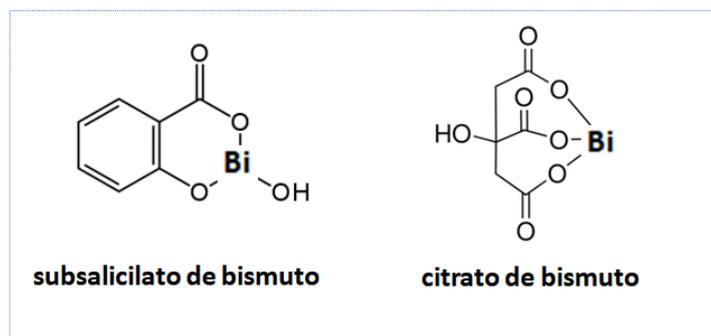


Figura 4: Complexos metálicos à base de bismuto

Antirreumáticos

O ouro também é um metal muito utilizado desde a antiguidade com finalidade terapêutica. Os primeiros relatos sobre a sua utilização na medicina surgiu em 2500 a.C. (Higby, 1982).

Os compostos à base de ouro também se mostraram eficazes na diminuição das dores articulares, levando em 1929 Jacques Foriester a estudar o uso de compostos de ouro no tratamento de artrite reumatoide.(Delgado,et al., 2020)

Atualmente, com o desenvolvimento de novos fármacos para AR, houve uma diminuição da prescrição desses compostos à base de ouro para esse tipo de tratamento, porém, alguns ainda fazem parte da classe de medicamentos antirreumáticos (Figura 5), como o aurotiomolato de sódio, a aurotioglicose e a auranofina.(Delgado, et al,2020)

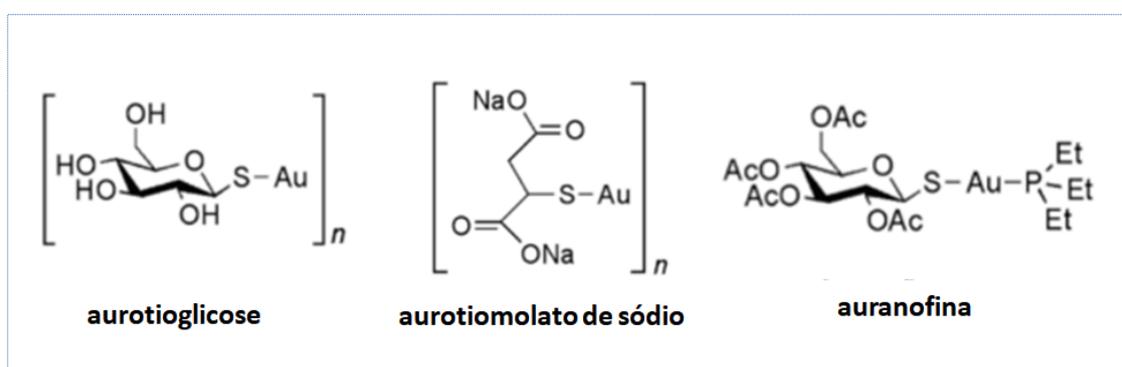


Figura 5: Complexos antirreumáticos

1.1.2. Complexos metálicos como agentes de contraste

A técnica de ressonância magnética (RM) é considerada um método de excelente qualidade no intuito de realizar o processamento de imagens diagnósticas para a área médica, sendo classificada como não invasiva (COURANT et al., 2013), permitindo a obtenção de imagens tridimensionais de alta resolução (BENNETT et al., 2014).

No momento atual, cerca de 35% dos exames realizados por ressonância magnética fazem uso de agentes de contrastes (ACs) que atuam encurtando o tempo de relaxação dos prótons presentes nos tecidos, possibilitando um contraste nos mesmos (AIME et al., 2006; ZHANG et al., 2014). Dentre os compostos metálicos ou ACs utilizados na clínica estão os complexos à base de gadolínio Gd³⁺, complexos de manganês Mn²⁺ e óxidos de Fe²⁺. Os complexos metálicos à base de gadolínio aprovados para a utilização clínica são: Magnevist® (Gadopentato), MultiHance® (gadobenato de dimeglumina), Dotarem® (ácido gadotérico), ProHance® (Gadoteridol), Gadovist® (Gadobutrol), Vasovist® (gadofosveset

trissódico), Eovist® (gadonetato dissódico) e Optimark® (Gadoversetamida) (LAURENT, et al., 2012).

O Gd-DTPA (Gadopentato) (Figura 6) foi o primeiro complexo aprovado para o uso clínico e é o mais utilizado devido a sua estabilidade, especialmente sendo usufruído para exames de lesões intracranianas (Aime, 2002).

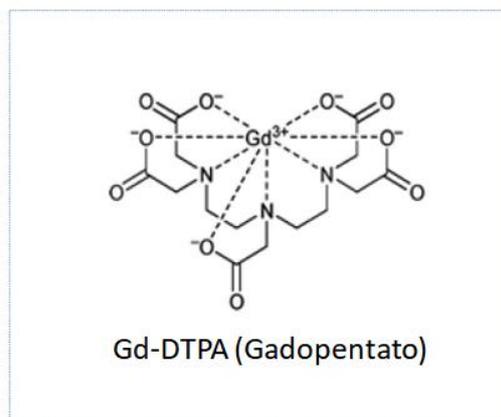


Figura 6: Agente de contraste à base de gadolínio

1.2. Resistência bacteriana

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 25% das mortes ocorridas no mundo são resultantes de infecções correlacionadas a fatores como a dificuldade em se relacionar um microrganismo a determinada patologia, a incerteza no diagnóstico e o diagnóstico tardio. Esses fatores podem induzir a utilização terapêutica incorreta, desnecessária e ineficaz (WANMACHER, 2007) e contribuir para a resistência dos microrganismos aos antibióticos (AMR, *antimicrobial resistance*), aumentando a pressão seletiva e, também, favorecendo a adaptação e a resistência da bactéria exposta aos fármacos e às moléculas bioativas (Santos de Queiroz, 2004).

Segundo a OMS, a resistência antimicrobiana é definida como a capacidade de um microrganismo impedir a ação de um antimicrobiano (OMS, 2014). A AMR é considerada um problema de saúde mundial e um obstáculo para a saúde pública. Calcula-se que em média 700 mil mortes por ano sejam decorrentes da AMR (Estrela, 2018).

De acordo com um estudo de O'Neil (2014), até 2050 a AMR causará a morte de cerca de 10 milhões de pessoas ao ano, superando as mortes por câncer, tornando-se um problema de saúde pública ainda maior, além de causar perda

econômica relacionada à diminuição de produtividade e ocasionando um impacto na economia global de aproximadamente cem trilhões de dólares.

As bactérias resistentes ou multirresistentes são consideradas um dos principais agravantes das infecções hospitalares e são de fácil transmissibilidade através de contato direto (pessoa a pessoa) ou indireto (pessoa – objeto contaminado).

As infecções hospitalares ou nosocomiais são uma das principais causas de mortes no mundo. Segundo o Ministério da Saúde do Brasil, a taxa média nacional de infecção hospitalar é de cerca de 15%, enquanto nos EUA e na Europa é de 10%, ou seja, as infecções hospitalares são um grave problema de saúde pública mundial (MANUAL DE MICROBIOLOGIA CLÍNICA, 2004). As Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) são descritas como condições localizadas ou sistêmicas resultantes da ação de algum agente infeccioso, ocorrendo a partir das primeiras 72 horas após a admissão do paciente ou após a sua alta hospitalar. (Hughes; 2008).

Entre as doenças infecciosas mais letais encontram-se a tuberculose e as infecções causadas pelas bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (Santos et al,2016), tornando as referidas doenças, então, matéria desse estudo.

1.3. Tuberculose

A tuberculose (TB) é uma grave doença do tipo infectocontagiosa e de caráter crônico que afeta a humanidade há mais de 5000 anos. Causada pelo agente etiológico *Mycobacterium tuberculosis*, é um dos patógenos que mais causa mortes no mundo (CAMPOS, 1999).

A infecção da TB ocorre por meio da inalação do *M. tuberculosis* presente nos aerossóis ou nas partículas de poeira presentes no ar. As pessoas contaminadas transmitem o microrganismo expelindo-o no ar, por intermédio da fala, da tosse, de espirros e de perdigotos (MIMS et al., 2004).

A TB é uma doença que afeta cerca de 1/3 (um terço) da população mundial, posto que aproximadamente 10 milhões de pessoas acabam desenvolvendo a doença (WHO, 2018). Estima-se que em 2018 cerca de 10 milhões de pessoas desenvolveram a TB no mundo e que 1,5 milhão de pessoas vieram ao óbito em decorrência da mesma (BRASIL, 2020).

Segundo o ranking da Organização Mundial da Saúde (OMS), o Brasil ocupa a 20ª posição quanto à casos da doença e a 19ª posição referente à coinfeção tuberculose/HIV (REZENDE et al., 2020). No Brasil, a incidência da TB no ano de 2019 foi de 73.864 novos casos, ou seja, uma incidência média de 35 casos para cada 100 mil habitantes conforme Figura 7 (BRASIL, 2020).

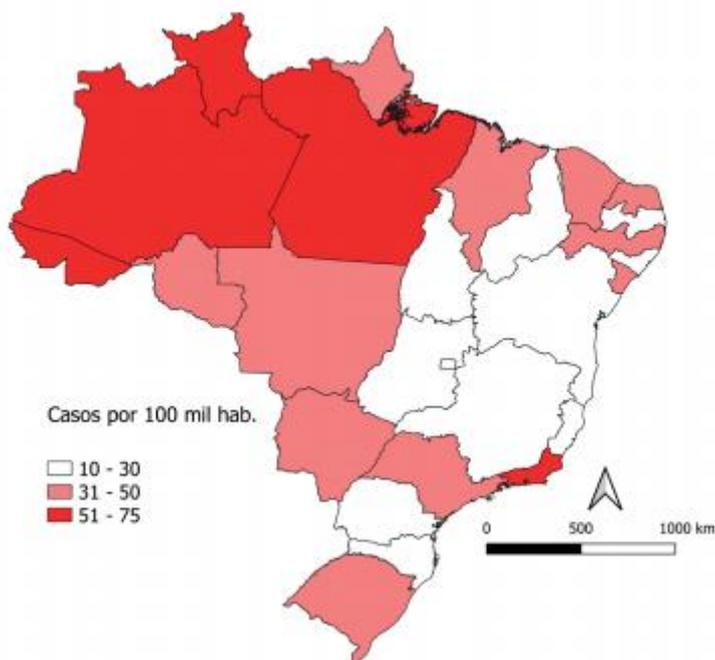


Figura 7: Incidência da TB no ano de 2019. Fonte : Brasil(2020)

Em 2018, o número de óbitos ocorridos no Brasil foi de 4.490 entre homens, mulheres e crianças (REZENDE et al., 2020), correspondendo a uma taxa de mortalidade de aproximadamente 2,2 óbitos para cada 100 mil habitantes, sendo que alguns estados da Federação tiveram um índice maior do que o nacional, conforme Figura 8 (BRASIL, 2020).

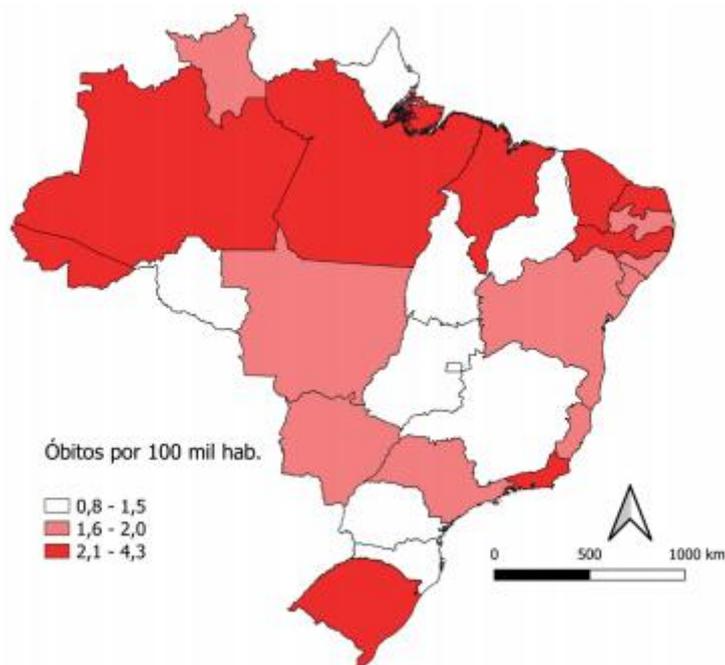


Figura 8: Numero de óbitos para cada 100mil habitantes. Fonte : Brasil(2020)

1.3.1. Principais fármacos no tratamento da TB

O maior marco histórico no tratamento das infecções bacterianas se deu com a descoberta da penicilina pelo médico alemão Alexander Fleming em 1928 (GUIMARÃES et al., 2010). Entretanto, essa grande descoberta no tratamento de doenças bacterianas mostrou-se ineficaz para a TB. Somente em 1944, ou seja, 15 anos após a descoberta da penicilina, é que Waksman descobriu a estreptomicina, substância produzida pela bactéria *Streptomyces griséus*, que foi o primeiro antibiótico eficaz com capacidade de atuar contra o *M. tuberculosis* (SOUZA; VASCONCELOS, 2005).

Em 1945, Ernst Huant relatou uma descoberta feita por acaso ao testar o uso da nicotinamida em pacientes com câncer na tentativa de diminuir os efeitos e proteger as mucosas dos pacientes expostos à radiação ionizante (VILCHÈZE; JACOBS, 2019). Ele observou que os pacientes contaminados com *M. tuberculosis* tiveram as lesões e os infiltrados pulmonares reduzidos (MURRAY, 2003). Tal descoberta levou o médico Frances Vital Chorine a testar a nicotinamida em cobaias infectadas com o bacilo da TB, o que permitiu comprovar sua eficiência na interrupção da progressão da doença (VILCHÈZE; JACOBS, 2019).

Em 1952, Herbert Fox e Hoffmann estudavam compostos semelhantes à niacina que apresentavam atividade contra a TB, resultando na descoberta da isoniazida (INH) (VILCHÈZE; JACOBS, 2019). Após a descoberta da isoniazida, novos fármacos foram descobertos e utilizados com sucesso, como a rifampicina (RPM) em 1965, o etambutol (EMB) sintetizado em 1960 e a pirazinamida (PZA) sintetizada em 1936, porém somente empregada em 1970 (SOUZA; VASCONCELOS, 2005).

A isoniazida é um pró-fármaco que possui a capacidade de adentrar no *M. tuberculosis* (VILCHÈZE, 2020) e também nos macrófagos, sendo, assim, uma droga utilizada tanto contra a TB ativa quanto contra a TB latente (ILTBT) (MASSABNI; BONINI, 2019). Ela atua inibindo a síntese de lipídeos essenciais para a formação da parede celular do microrganismo, além de gerar um estresse oxidativo que acarreta danos às proteínas e ao DNA da célula bacteriana (TIMMINS; DERETIC, 2006).

O etambutol, descoberto em 1961, atua inibindo a síntese de alguns metabólicos do bacilo (SOUZA; VASCONCELOS, 2005). Ele possui ação bacteriostática e seus mecanismos ainda não são totalmente claros, entretanto, parece que atuam na síntese de um ou mais metabólitos, causando danos ao metabolismo celular, interrupção da multiplicação, morte celular (TUBERCULOSTÁTICO, 2006), inibição da transferência do ácido micótico para a parede celular e inibição da síntese da arabinogalactana (VILCHÈZE, 2020).

A rifampicina é um fármaco semissintético derivado da rifamicina B que possui atividade bactericida de amplo espectro sobre a maioria dos microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos (TUBERCULOSTÁTICO, 2006). Ela atua inibindo a transcrição e a síntese de RNA-polimerase-DNA-dependente (DDRP) e da síntese de proteínas do bacilo (ARBEX et al., 2010).

A pirazinamida foi sintetizada pela primeira vez em 1936, porém só foi empregada no tratamento da TB a partir de 1952. Ela é um derivado do ácido nicotínico que apresenta uma estrutura análoga à da isoniazida (ARBEX et al., 2010). É considerada um pró-fármaco, uma vez que se converte em PZA por meio de uma enzima bacteriana dependente de ferro chamada pirazinamidase (PZase) (SILVA LIMA et al., 2011). Seu mecanismo de ação ainda é pouco conhecido, porém parece atuar causando a inativação de enzimas e prejudicando a biossíntese do ácido micótico (ARBEX et al., 2010).

A linha do tempo da descoberta de fármacos contra a TB é apresentada na Figura 9 a seguir.

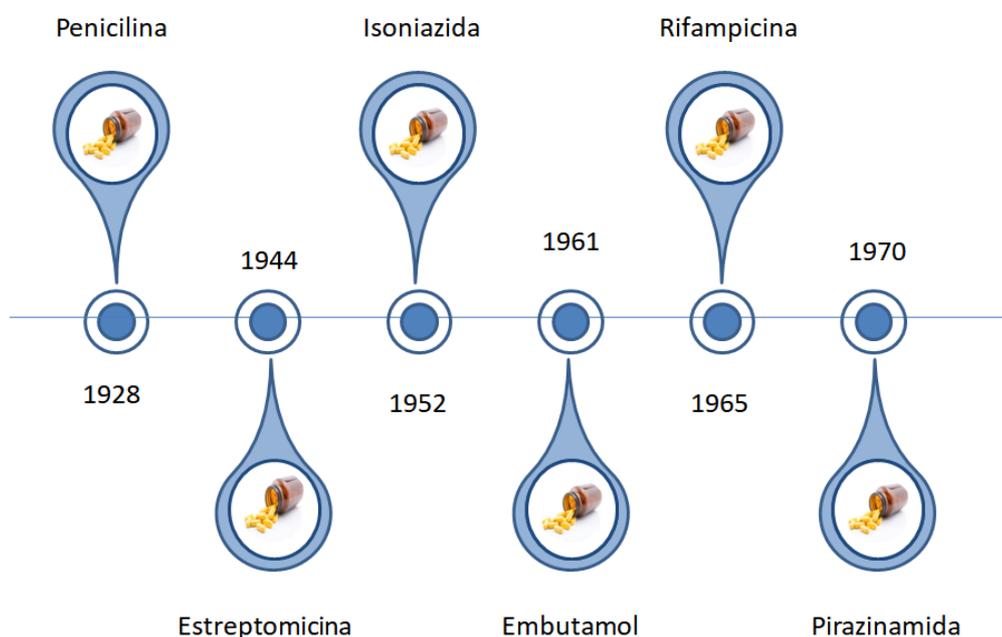


Figura 9: Cronologia dos Fármacos da Tuberculose. Fonte: Próprio autor.

1.4. Ligantes

1.4.1. Isoniazida

A INH possui uma estrutura relativamente simples formada por um grupo hidrazida e por um anel de piridina. É considerada um pró-fármaco que precisa ser ativado mediante uma reação de oxidação pela ação da enzima KatG do *M. tuberculosis*. A oxidação da INH produz um intermediário ativo formando o radical isonicotinal. Esse radical, por sua vez, se liga covalentemente ao cofator NADH formando um metabólico ativo denominado INH-NAD (RAWAT, WHITTY; TONGE, 2003). O processo de oxidação também produz espécies reativas de oxigênio e radicais orgânicos que atuam na inibição da síntese do ácido micótico da parede do bacilo (ANDRADA et al., 2008).

O metabólito ativo INH-NAD atua como um inibidor do tipo competitivo lento e forte da InhA, enzima que codifica a enoil-ACP redutase envolvida na biossíntese de ácidos graxos de cadeia longa, incluindo os ácidos micóticos encontrados na parede

celular de micobactérias (RAWAT et al., 2003). A Figura 10 mostra a estrutura molecular da INH.

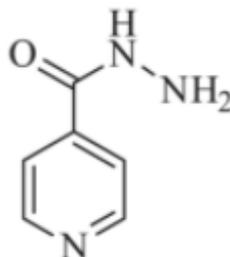


Figura 10: Estrutura molecular da isoniazida.

1.4.2. Ácido succínico

O ácido succínico, também conhecido como ácido butanodioico, ácido 1,2-etanodicarboxílico ou ácido âmbar, pertence à classe dos compostos orgânicos conhecidos como ácidos dicarboxílicos, ou seja, que apresentam dois grupos carboxílicos. É obtido como produto principal da fermentação anaeróbica realizada por alguns tipos de microrganismos ou como um intermediário dos ácidos tricarboxílicos (TCA) (LEE et al., 2000).

O ácido succínico foi encontrado pela primeira vez no século XIX em uma resina de âmbar presente em um fóssil de árvore e seu nome deriva da palavra *succinum*, do latim, que significa âmbar (ZEIKUS et al., 1999). Sua fórmula molecular é C₄H₆O₄, possui massa molecular de 118,02 g mol⁻¹ e sua estrutura química está representada na Figura 11. Apresenta-se, normalmente, como um pó branco e inodoro, possui temperatura de fusão entre 185 e 188 C, ponto de ebulição de 235°C e solubilidade de 83,2 mg mL⁻¹ a 25 °C (PUBCHEM).

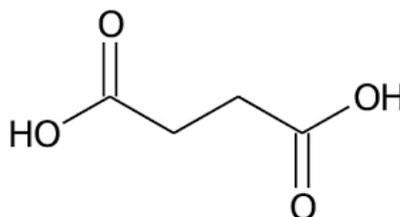


Figura 11: Estrutura molecular do ácido succínico.

O ácido succínico possui diversas aplicações na indústria química, alimentícia e farmacêutica. Na indústria química é utilizado para a produção de solventes

biodegradáveis, detergentes, síntese de biopolímeros e em resinas sintéticas (WILKE et al., 2004). Na indústria farmacêutica é empregado na fabricação de fármacos para o tratamento do câncer, artrite, inflamações, espasmos; na fabricação de pílulas anticoncepcionais, tranquilizantes e antibióticos (ZEIKUS, 1999). Por fim, na indústria alimentícia é utilizado como realçador de sabor em alimentos ou para ajustar o PH dos mesmos, podendo, ainda, substituir o glutamato monossódico (CAROLE et al., 2004).

1.5. Metais

1.5.1. Prata

A atividade antimicrobiana da prata já é conhecida há muito tempo (CLEMENT; JARRETT, 1994). Relatos mostram que Alexandre, o Grande (356-323 d.C.) bebia água exclusivamente em taças de prata. Heródoto descreveu que nenhum rei persa bebia água que não fosse armazenada em jarros de prata (SILVER et al., 2006). Há, ainda, registros dos povos gregos, romanos, fenícios e egípcios que mostram a utilização desse metal para a preservação de água e comida (ALEXANDER; WESLEY, 2009).

Já se sabe que a prata ao penetrar na célula bacteriana pode interagir com várias estruturas celulares (Figura 12) (RUSSELL; HUGO, 1994). Os íons de prata reagem com o peptidoglicano da parede celular bacteriana, podendo formar poros e lesionar a estrutura (SIM et al., 2018), além de proporcionar a inibição das funções relacionadas ao transporte através da parede celular (MCDONNELL, 1999). Os íons de Ag também atuam na interação com os ácidos nucleicos do DNA, interrompendo o ciclo celular (WOO et al., 2008), podendo também interagir com as proteínas microbianas e levar a uma perturbação em nível metabólico da célula (MAILLARD; HARTEMANN, 2013).

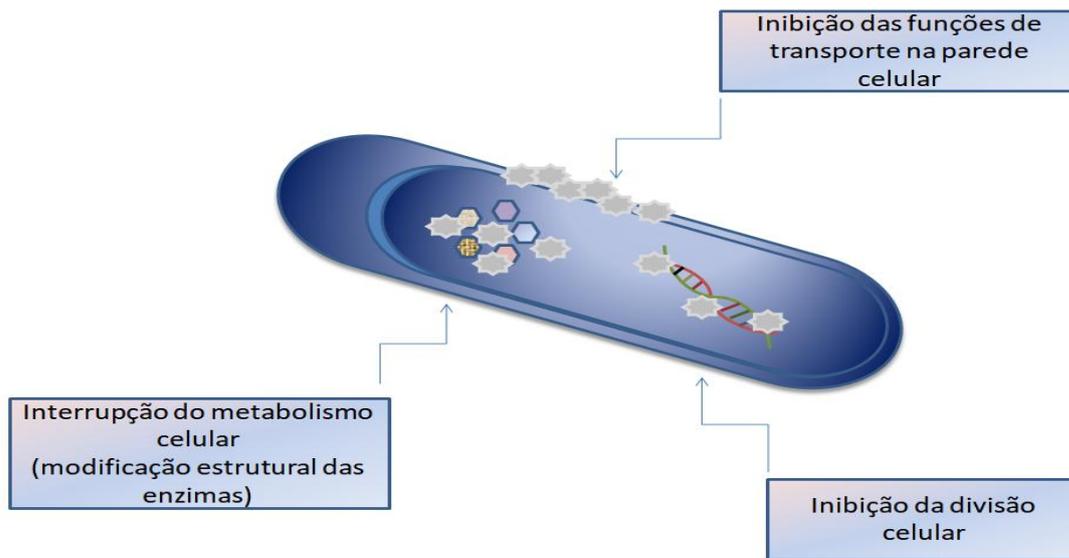


Figura 12: Mecanismo de ação da prata contra microrganismos. Fonte: os autores

2. OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo principal apresentar a síntese e a caracterização de novos complexos metálicos e avaliar a atividade biológica contra bactérias Gram positivas e Gram negativas de complexos metálicos com ácidos alfa-hidroxicarboxílicos e outros ligantes selecionados.

Os objetivos específicos são:

- Síntese de novos complexos metálicos com ácidos alfa-hidroxicarboxílicos e outros ligantes selecionados;
- Caracterização dos complexos metálicos fazendo uso de espectroscopia vibracional na região do infravermelho, análise elementar, técnica termogravimétrica, DFT, espectroscopia por ressonância magnética e outras;
- Estudos da atividade biológica dos complexos contra microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos *in vitro*;
- Estudo da atividade biológica dos complexos contra microrganismos *M. tuberculosis in vitro*.

3. EXPERIMENTOS

3.1. Sínteses dos complexos metálicos

3.1.1. Complexo de isoniazida com prata – $[Ag(inh)]NO_3$

Para a síntese do complexo de Ag com inh foram utilizados 10 mL de uma solução aquosa contendo 0,850g (5,0 mmol) de nitrato de prata que foram adicionados a 10 mL de uma solução aquosa com 0,685g (5,0 mmol) de inh sob agitação constante, a 50°C e na ausência de luz. Inicialmente, ocorreu a precipitação de um sólido branco e depois a formação de um precipitado avermelhado. O sólido foi filtrado e seco em um dessecador com P4O10 em uma sala escura. Os resultados da análise elementar permitiram propor a composição $[Ag(inh)]NO_3$ – fórmula molecular $[Ag(C_6H_7N_3O)] \cdot NO_3$ para o composto formado (calc. C=23,5; H=2,3; N=18,3; exp. C=22,8; H=1,73; N=18,8).

3.1.2. Complexo de ácido succínico com prata – $[Ag_2(succ)]$

Para a síntese do complexo de ácido succínico com prata foi preparada uma solução aquosa com 3,0 mmol de ácido succínico e o pH foi ajustado em 7,0 com KOH. Em seguida, foram adicionados 20 mL de solução aquosa com 6,0 mmol de nitrato de prata. A mistura foi mantida em agitação constante a 50°C na ausência de luz por 5 minutos. Durante o aquecimento ocorreu a formação de um precipitado branco que foi filtrado e seco em dessecador com P₄O₁₀ e guardado em local protegido contra luz. Os resultados de análise elementar permitiram sugerir a composição $[Ag_2(succ)]$ – fórmula molecular $[Ag_2(C_4H_6O_4)]$ para o complexo (calc.: C=14,5; H=1,22; exp. C=14,6; H=1,01; N=0,90).

3.2. Testes biológicos

3.2.1. Teste de inibição de crescimento bacteriano dos complexos de prata

Os ensaios de inibição do crescimento bacteriano por difusão em disco se baseiam na capacidade do composto, inicialmente impregnado nos discos, de se

difundir pelo meio de cultura, sendo possível avaliar a sua atividade ou não atividade contra o microrganismo. Os ensaios de inibição de crescimento bacteriano dos complexos metálicos e dos ligantes livres foram realizados de acordo com o método do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Foram utilizadas as cepas bacterianas do tipo ATCC (*American type culture collection*) devido a sua padronização em relação ao seu fenótipo bioquímico.

As cepas das bactérias Gram-negativas (*E. coli* ATCC 25922) e Gram-positivas (*S. aureus* ATCC 25923) foram inoculadas em tubos contendo 2,0 mL de BHI estéril e incubadas por 18 horas à temperatura de 35-37°C. A partir desses cultivos, as suspensões foram preparadas na escala nefelométrica 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) e semeadas em placas de Petri contendo Ágar Mueller-Hinton.

Discos de papel de filtro estéreis (Whatman 3 – 10 mm de diâmetro) foram impregnados com 1000µg dos complexos metálicos [Ag(inh)]NO₃, [Ag₂(succ)], e com os ligantes bioativos na forma livre. Após secagem em estufa ventilada a 37°C, os discos foram depositados sobre a superfície da placa com ágar contendo os microrganismos já semeados. As placas foram incubadas por 18-24 horas a 37°C em estufa bacteriológica. A atividade antimicrobiana dos compostos foi analisada mediante presença ou ausência de halo de inibição de crescimento (em mm). Os testes foram realizados em triplicata.

3.2.2. Testes microbiológicos (μ MIC) para determinação da atividade antimicobacteriana dos complexos de prata

Para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) dos complexos contra a cepa padrão de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, foi empregado o ensaio *Resazurin Microtiter Assay* (REMA). As soluções estoque dos complexos foram diluídas em caldo Middlebrook 7H9 suplementado com OADC e 0,5% de glicerol. As diluições, com faixas de concentração variando de 0,09 a 25 µg/mL, foram adicionadas a uma microplaca de 96 poços juntamente com o inóculo bacteriano com 105 CFU mL⁻¹. As placas foram incubadas por 7 dias a 37°C, 5,0% de atmosfera de CO₂. No sétimo dia de ensaio foi adicionada em cada poço uma solução de Resazurina na concentração 0,01% e ocorreu a incubação por 24 horas. A leitura da fluorescência foi realizada em 530/590 nm. A concentração inibitória

mínima foi realizada em triplicatas. O MIC90 foi definido como a menor concentração de composto capaz de inibir $\geq 90\%$ do crescimento micobacteriano.

3.2.3 - Teste da concentração inibitória mínima (MIC)

Para a determinação da concentração inibitória mínima (MIC) do complexo Ag-succínico e do seu ligante foram utilizadas cepas bacterianas ATCC de *S. aureus* ATCC 25923 (Gram-positivo), *B. cereus* ATCC 14579 (Gram-positivo), *E. coli* ATCC 25922 (Gram-negativo) e *P. aeruginosa* ATCC 27853 (Gram-negativo), conforme descrito em CLSI 2016 (CLSI, 2016) (Lustri et al., 2017).

Cada isolado ATCC foi inoculado em tubos contendo 10,0mL de BHI (*Brain Heart Infusion* KASVI) e incubada por 18 horas a 35-37° C. Após o crescimento bacteriano, foram realizados inóculos de cada suspensão bacteriana em meio BHI estéril até atingir 1,0 de turbidez na escala nefelométrica de McFarland ($\sim 3,0 \times 10^8$ UFC / mL⁻¹). Ao primeiro poço da microplaca de 96 poços, utilizado como controle de crescimento, foram adicionados 50 μ L de meio BHI estéril, 50 μ L de solução DMSO aquosa 20% e 100 μ L de suspensões bacterianas na escala 1,0 de McFarland.

No segundo poço, foi adicionado um volume de 50 μ L da solução estoque (20 mg / mL) do ligante livre e [Ag₂ (C₄H₄O₄)] suspenso em solução aquosa de DMSO a 20% mais a adição de 50 μ L de meio BHI estéril e em seguida foram realizadas as diluições em série (5,0 mg / mL a 0,078 mg / mL). Após a diluição foram adicionadas em cada poço 100 μ L das suspensões de microrganismos, na escala McFarland 1,0, atingindo turbidez 0,5 McFarland ($\sim 1,5 \times 10^8$ UFC / mL), em um volume final de 200 μ L / poço.

As microplacas foram incubadas a 35-37° C por 18 horas em câmara úmida sob agitação a 150 rpm. Após o período de incubação, 15 μ L de Resazurina 0,02% em solução aquosa estéril foram adicionados a cada poço. Após 3 horas de reincubação a leitura foi realizada. Quando as células bacterianas encontram-se ativas, elas acabam convertendo a Resazurina “azul” em resorufina “rosa”. Para a determinação do MIC foi considerada a menor concentração que resultou na inibição do crescimento bacteriano. Os testes foram realizados em triplicata.

Devido à pandemia do Covid-19 não foi possível a realização do MIC do complexo de isoniazida com prata.

3.3. Cálculos teóricos por DFT para determinar a melhor conformação da molécula

A técnica de DFT (*Density Functional Theory*) foi usada para estudar a melhor conformação espacial para o ligante e o complexo de prata. Os estudos foram realizados pelo Prof. Douglas Henrique Pereira, da Universidade Federal do Tocantins, incluindo-se as discussões relacionadas às estruturas.

As estruturas possíveis de isoniazida e do complexo Ag-inh [Ag (C₆H₇N₃O)]NO₃ foram otimizadas para o mínimo de energia utilizando-se o híbrido funcional B3LYP (Becke, 1993) (Ditchfield et al., 1971). Os conjuntos de bases 6-31 + G (d, p) (Hariharan & Pople, 1973) foram usados para átomos C, H, N e O. Para o átomo de Ag o conjunto de base potencial de núcleo efetivo LANL2DZ32 foi usado. As frequências vibracionais foram calculadas, e nenhuma frequência imaginária foi encontrada, mostrando que as estruturas estavam em sua energia mínima. Todos os cálculos foram realizados no *software* Gaussian 0933. As análises topológicas dos complexos foram realizadas utilizando a teoria quântica de átomos em moléculas (QTAIM) (Bader, 1994) (Ribeiro, 2019) no nível B3LYP / 6-31 + G (d, p) / LANL2DZ. O QTAIM permite caracterizar a ligação química do metal com o ligante e também entender a natureza da ligação. As análises QTAIM foram realizadas usando o pacote AIMALL(Keith, 2017)

3.4. Métodos instrumentais

As análises elementares de carbono, hidrogênio e nitrogênio foram realizadas usando um analisador CHNS-O 2400 série II (Perkin Elmer). Os espectros de infravermelho (IR) foram registrados em um espectrofotômetro FT-IR Cary 630 Agilent, equipado com aparelho de amostragem de refletância total atenuada (ATR). A resolução foi fixada em 4 cm⁻¹. A análise térmica foi realizada em um Thermoanalyzer TG / DTA SDT Q-600 TA Instrumentos simultâneos sob as seguintes condições: cadinho de α -alumina, ar sintético (100 mL / min), taxa de aquecimento de 10° C por min, de 30 a 1000° C. Espectros de ressonância magnética nuclear (NMR) de estado de solução de ¹H e ¹³C para inh livre e seu complexo de prata foram registrados em espectrômetros Bruker AVANCE III 400 e

500 MHz. Os espectros de NMR foram adquiridos em soluções de sulfóxido de dimetil deuterado (DMSO-d₆) e os desvios químicos foram dados em relação ao tetrametilsilano (TMS).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização química dos complexos:

4.1.1. Complexo de isoniazida com prata

4.1.1.a. Análise elementar

As análises elementares para a determinação das porcentagens de carbono, hidrogênio e nitrogênio, em conjunto com os dados da porcentagem de resíduo da curva termogravimétrica, foram de fundamental importância para a determinação da estequiometria dos complexos metálicos. As análises dos resultados permitem obter a proporção entre metal e ligante (Tabela 1).

Tabela 1- Valores das porcentagens de c, H e N obtidos para o complexo de isoniazida com prata

Complexo	%C		%H		%N		% resíduo Ag Pela curva TG	
	Calc.	Exp.	Calc.	Exp.	Calc.	Exp.	Calc.	Exp.
Nome: [Ag(inh)]-NO ₃ Fórmula molecular: [Ag(C ₈ H ₇ N ₃ O)]-NO ₃	22,8	23,5	1,73	2,30	18,8	18,3	35	38

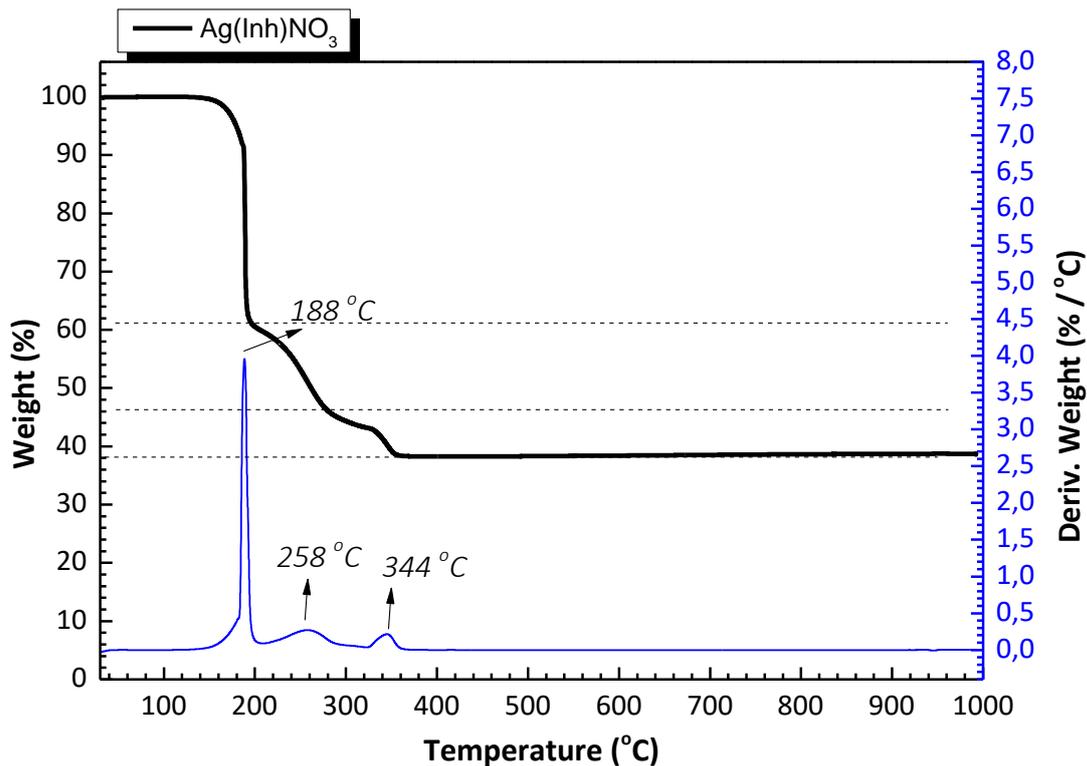
Fonte: os autores

4.1.1.b. Análise termogravimétrica

A curva termogravimétrica do [Ag(inh)]NO₃ mostra três perdas de massa bem definidas com platôs ao longo da curva. A primeira perda de cerca de 38% ocorre na faixa de 140-200°C. As outras duas perdas de massa ocorrem nas faixas de 200-280 e de 320-360°C, que correspondem à decomposição do ligante e do ânion NO₃⁻. A curva mostra uma perda de massa de cerca de 62%, com um resíduo final de 38%, condizente com a formação final de Ag⁰. Em trabalhos já realizados no grupo de pesquisa, (Cavicchioli et al., 2010) (Cavicchioli et al., 2007) foram feitas análises térmicas de dois outros complexos de prata(I) utilizando ar sintético nos quais os resíduos da decomposição foram analisados por difratometria de raios-X.

Em ambos os casos o resíduo final foi Ag^0 .

A análise por calorimetria de varredura diferencial (DSC, do inglês *differential scanning calorimetry*) do complexo Ag-inh indica eventos exotérmicos com seus picos máximos em 190, 275 e 348 °C, que correspondem à decomposição do ligante e formação de resíduo de prata metálica (Ag^0). (Figura 13 e Figura 14).



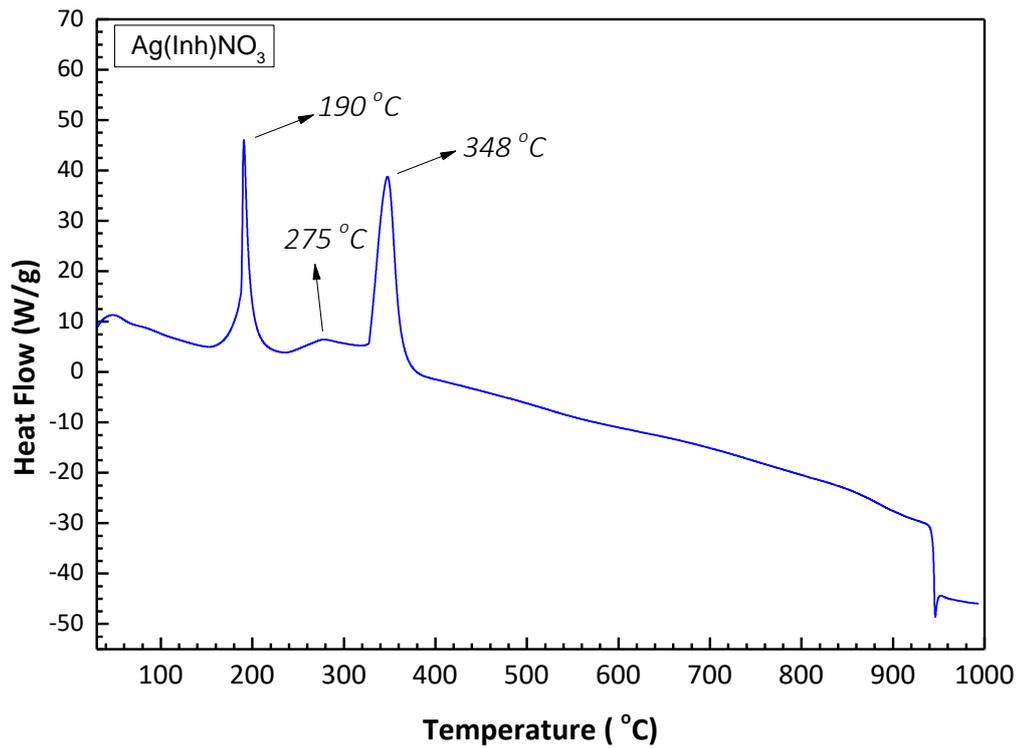


Figura 14: Curva da análise de DSC (Calorimetria Exploratória Diferencial) para o complexo $[\text{Ag(inh)NO}_3]$.
Fonte: os autores

4.1.1.c. Espectroscopia no infravermelho

Os espectros de infravermelho (IV) da isoniazida e do seu complexo de prata são apresentados na Figura 15 e as principais frequências de IV na região $3500\text{-}600\text{ cm}^{-1}$ são mostradas na Tabela 2.

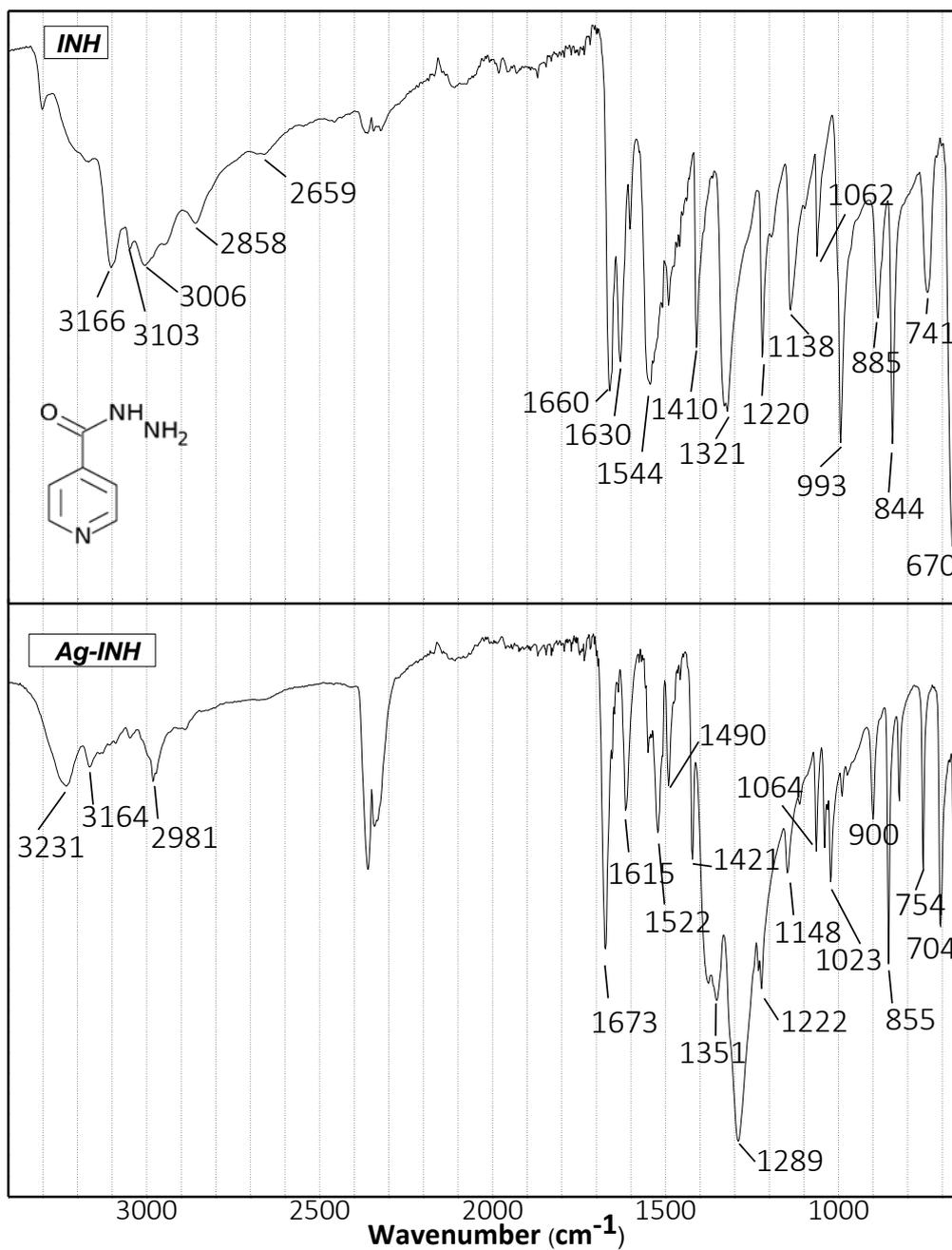


Figura 15: Espectros na região do infravermelho para a isoniazida e o complexo [Ag(inh)NO₃]. Fontes: os autores

Tabela 2 - Valores dos comprimidos de onda e respectivas atribuições das bandas dos espectros IV da isoniazida e Ag-isoniazida

Isoniazida (inh)	Ag-isoniazida (Ag-Inh)NO ₃	Segmentos vibracionais
670	704	τ (C-C-C)+ τ (C-N-C-C)
741	754	γ (C-C-C)+ γ (C-C-H)
844	855	γ (C-C-H)
885	900	γ (C-N-C) _{py}
993	1023	γ (C-C-H)
1062	1064	β (C-N-C) + β (C-C-H)
1138	1148	β (C-C-H)
	1289	ν NO ₂
1321,3	1351.1	β (O=C-N)+ β (C-C-H)
1410	1421.9	β (C-N-H)
1490	1490	ν (C-C)
1544.9	1522.6	ν (C=O)
1630	1615	S (NH ₂)
1660	1673	ν (C=O)
3000-3100	3000-3100	ν (C-H)
3166	3164	ν (NH)
3303	3223	ν (NH ₂)

Fonte: os autores.

Mudanças significativas nas bandas do complexo em comparação com o ligante indicam que houve coordenação. A banda relacionada ao NH₂ em 1630 cm⁻¹ foi deslocada para 1615 cm⁻¹ no complexo e a banda relacionada a C=O em 1544 cm⁻¹ foi deslocada para 1522 cm⁻¹ no complexo. Essas mudanças indicam uma possível coordenação do metal ao ligante por meio do oxigênio do grupo C=O e do nitrogênio do grupo NH₂. Uma banda em 1289 cm⁻¹ atribuída ao grupo NO₃⁻ apareceu no espectro do complexo, confirmando sua presença na composição.

Com relação às bandas ν (C-N) amida e ν (N-N), foi observado um comportamento semelhante ao complexo de cobre com isoniazida descrito por Poggi et al. (2004), dado que a coordenação provoca um deslocamento das bandas da amida. Uma possível explicação para esse comportamento seria que a coordenação pelo grupo C=O enfraquecer a ligação C-O e, conseqüentemente, reforçar a ligação N-H, deslocando a banda da amida (C-N) para uma frequência maior.

Mudanças significativas nas bandas do complexo com relação ao ligante indicam coordenação da isoniazida ao metal. Além disso, a presença de bandas intensas de NO₃⁻ confirma a presença desse ânion na composição do complexo.

4.1.1.d. DFT – Teoria fundamental da densidade

Devido à ausência de cristais do complexo Ag-inh para realizar um estudo cristalográfico detalhado de raios-X e considerando os possíveis sítios de coordenação de inh a Ag sugeridos por medidas espectroscópicas de IR e NMR, estudos DFT foram realizados para avaliar algumas possibilidades de complexação. Tais possibilidades avaliadas foram calculadas de acordo com a Figura 16

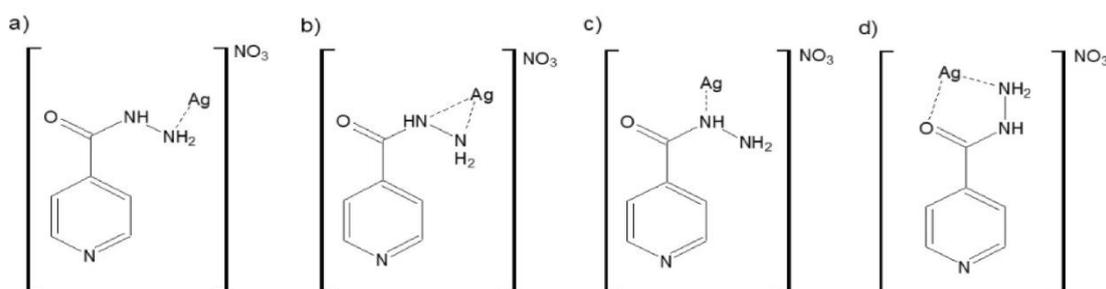


Figura 16- DFT- complexo Isoniazida com prata

Analisando os resultados teóricos de quatro possíveis sítios de complexação é possível inferir que a estrutura mais estável é aquela na qual a coordenação do ligante ao átomo de Ag ocorre pelo átomo N do grupo NH_2 e o átomo de oxigênio do grupo $\text{C}=\text{O}$ (Figura 16d). A coordenação do ligante ao átomo de Ag apenas pelo nitrogênio do grupo NH_2 (Figura 16a), é a segunda estrutura mais estável. A diferença na estabilidade entre os complexos metálicos (Figura 16d e 16a) é pequena e da ordem de $1,3 \text{ kcal mol}^{-1}$. Por outro lado, a estrutura proposta na Figura 16b, onde a coordenação foi sugerida para ocorrer pelos grupos NH e NH_2 , mostra que após a otimização da geometria a estrutura converge para a primeira hipótese (Figura 16a). Por fim, analisando a complexação pelo grupo NH (Fig. 16c), é possível identificar que a interação ocorre, mas esta é menos estável porque existe um impedimento estérico para a coordenação do ligante à prata pelo grupo NH . A diferença de estabilidade do complexo (Figura 16c) em relação ao complexo mais estável é de $11,16 \text{ kcal mol}^{-1}$ e em relação ao complexo representado na Figura 16a a diferença é de $9,86 \text{ kcal mol}^{-1}$.

Após determinar a estrutura mais estável, é possível analisar as propriedades do complexo como os comprimentos de ligação ideais N-Ag e O-Ag que foram $2,60$ e $2,30 \text{ \AA}$, respectivamente. O modo de coordenação de inh a Ag (I) é

o mesmo observado para o complexo Cu (II) com este ligante relatado anteriormente (Hanson et al., 1981)

Outra propriedade estrutural que pode ser analisada para ligações de coordenação são as frequências vibracionais. Os valores das frequências vibracionais ν_{NH_2} e $\nu(\text{C}=\text{O})$ determinadas teoricamente para o ligante foram 1707 e 1740 cm^{-1} , respectivamente. As frequências vibracionais das ligações diminuem com a coordenação e os valores encontrados foram 1679 cm^{-1} para ν_{NH_2} e 1722 cm^{-1} para $\nu(\text{C}=\text{O})$. É importante ressaltar que nenhum fator de escala foi utilizado para corrigir o erro associado ao método de cálculo, o que justifica a diferença em relação aos dados experimentais.

O QTAIM foi usado para entender melhor os efeitos eletrônicos do complexo Ag-inh. Na análise QTAIM, a natureza da ligação ou interação pode ser descrita por alguns parâmetros, tais como densidade eletrônica ($\rho(r)$), Laplaciano de densidade eletrônica ($\nabla^2\rho(r)$) e energia eletrônica total ($H(r)$) ($H(r) = G(r) + V(r)$). De acordo com QTAIM, os valores de $\nabla^2\rho(r) < 0$ indicam ligações covalentes e $\nabla^2\rho(r) > 0$ indicam ligações não covalentes. Quando os valores de $\nabla^2\rho(r)$ e $H(r)$ são positivos a natureza da interação ou ligação é eletrostática, para $\nabla^2\rho(r)$ positivo e $H(r)$ negativo a ligação é considerada parcialmente covalente 34,35.

Os resultados da análise QTAIM para as ligações Ag-N e Ag-O são mostrados na Figura 17, juntamente com o gráfico molecular do complexo. Os valores de $\nabla^2\rho(r)$ são positivos e $H(r)$ é negativo para a ligação Ag-O, mostrando que a ligação tem caráter parcialmente covalente. Para o Ag-N os valores de $\nabla^2\rho(r)$ e $H(r)$ são positivos, mostrando que a ligação tem caráter eletrostático.

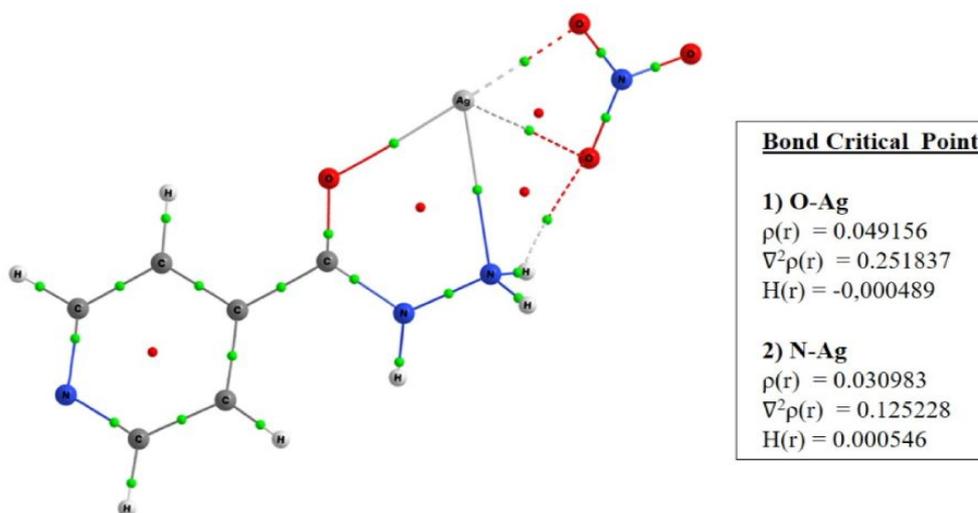


Figura 17: DFT

4.1.1.e. RMN – Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do complexo de prata foram avaliados em comparação com os espectros do ligante isoniazida na forma livre para confirmar os locais de coordenação do ligante ao metal, conforme sugerido pelos dados de IR.

Os espectros de ^1H NMR de inh e seu complexo de Ag estão apresentados na

Figura 18, juntamente com a estrutura de ligante numerada. A mudança mais notável no espectro do complexo metálico quando comparado ao espectro do ligante é o sinal dos átomos de hidrogênio do grupo NH_2 (numerados como H7). O espectro do ligante mostra um sinal agudo a 4,64 ppm para os átomos H do grupo NH_2 . Após a coordenação, os mesmos átomos de H são detectados como um sinal amplo desviado para baixo, com seu máximo em 5,59 ppm ($\Delta\delta$ 0,95). Além disso, o átomo de H do grupo N-H (H6) ligado ao NH_2 também é desviado para baixo em 0,31 ppm, o que reforça a coordenação do grupo NH_2 de inh a Ag (I).

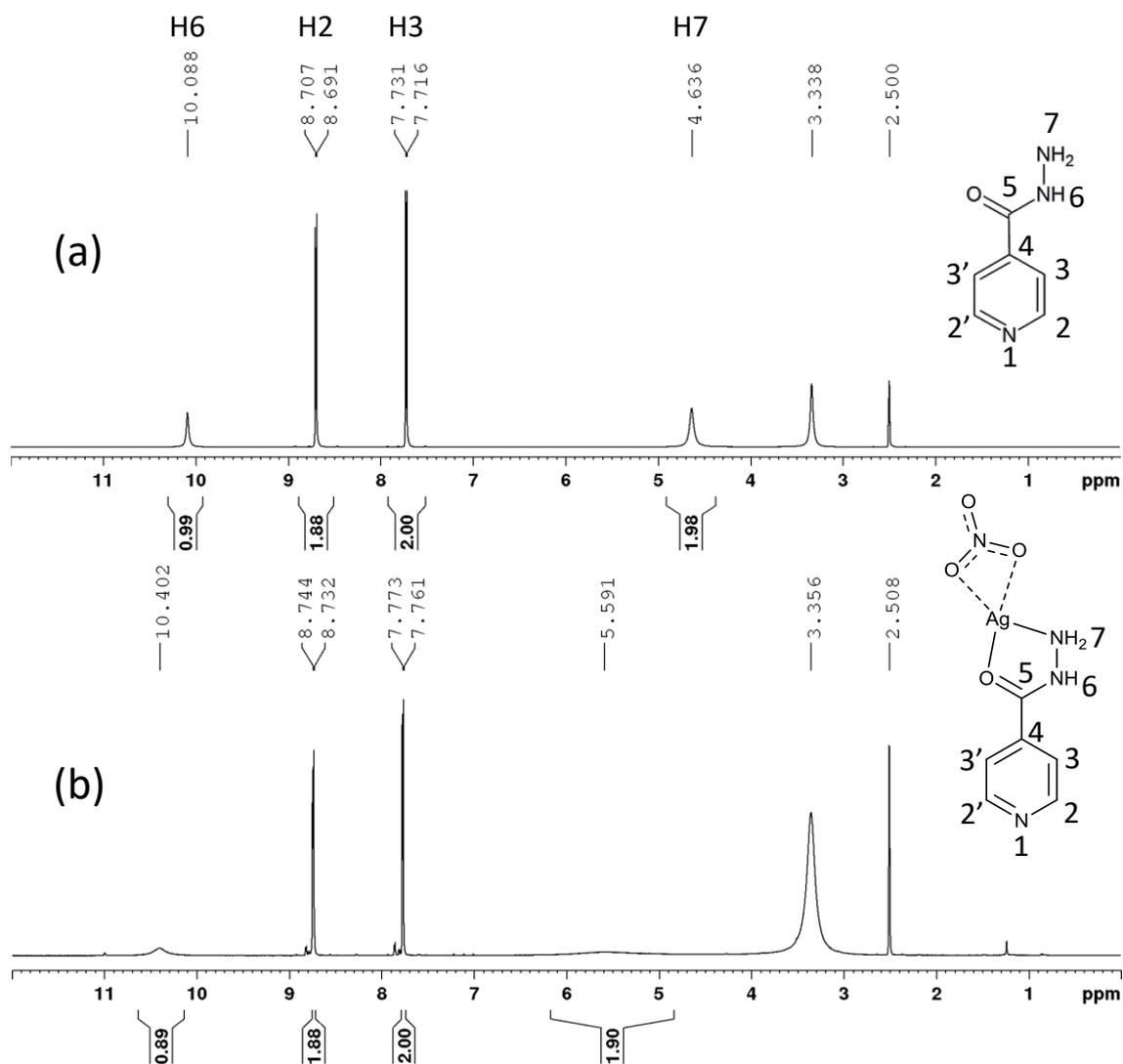


Figura 18: Espectro de ^1H NMR de (a) isoniazida e (b) complexo de prata.

A análise dos espectros de ^{13}C NMR de inh e seu complexo de prata (Figura 19) não nos permitiu confirmar a coordenação do ligante à prata pelo átomo O do grupo carbonila, conforme sugerido pela primeira vez pelos dados de IR. Não foram detectados desvios isoméricos significativos ao comparar o sinal do átomo C do grupo carbonila no ligante a 163,88 ppm com o mesmo átomo C do complexo que foi observado a 164,05 ppm. Além disso, a ausência de mudanças significativas nos sinais dos átomos de carbono C2,2', C3,3' ou C4 (

Figura 19) nos levou a descartar a coordenação N do anel piridina de inh para Ag.

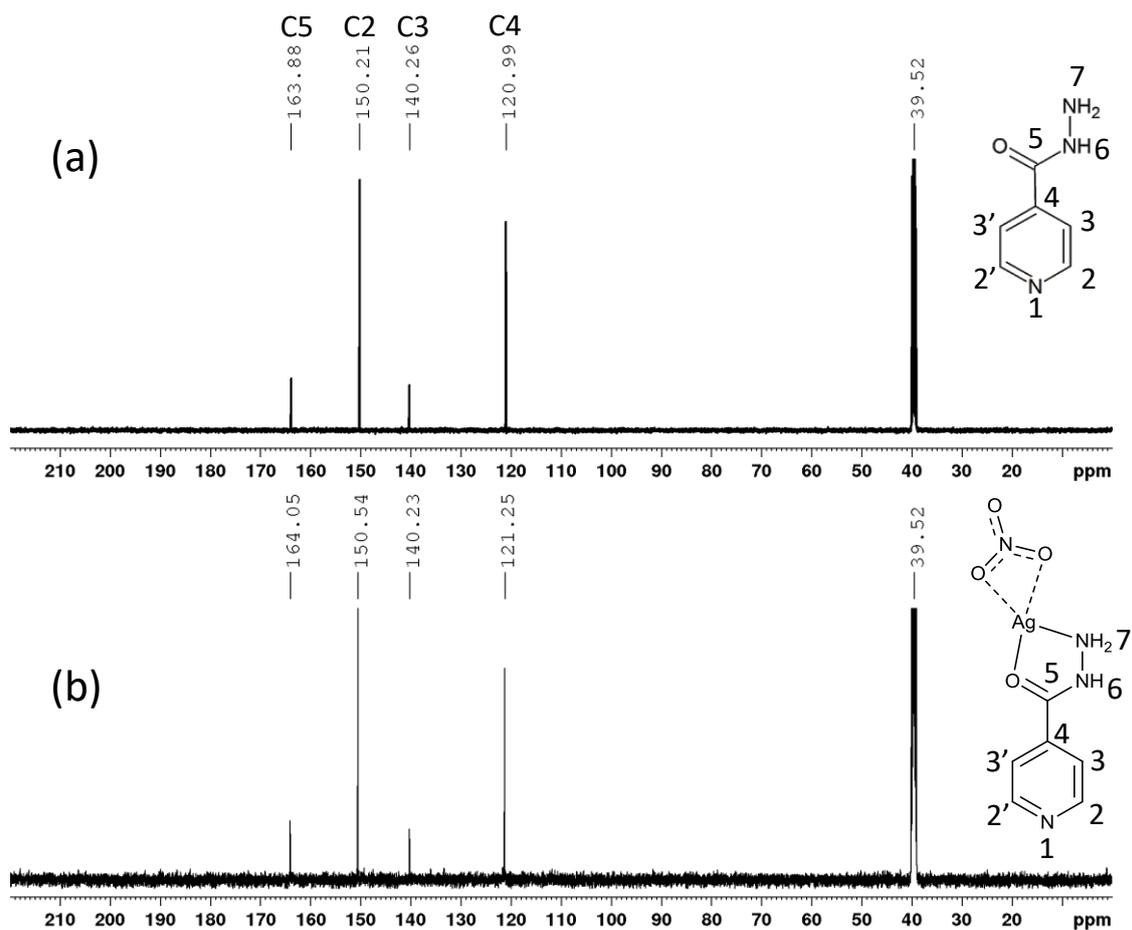


Figura 19: Espectro de ^{13}C NMR de (a) isoniazida e (b) complexo de prata.

No entanto, considerando que os dados espectroscópicos de infravermelho sugeriram nitrogênio do grupo NH_2 e também coordenação de oxigênio do grupo $\text{C}=\text{O}$ à prata e que este modo de coordenação já foi observado para um complexo Cu (II) com inh, novos estudos baseados em DFT (veja a próxima seção) foram aplicados para avaliar se esse modo de coordenação bidentado de fato existiria e se seria o mais estável.

4.1.2. Complexo de ácido succínico com prata

4.1.2.a. Análise elementar

As análises elementares para a determinação das porcentagens de carbono, hidrogênio e nitrogênio, em conjunto com os dados da porcentagem de resíduo da curva termogravimétrica foram de fundamental importância para a determinação da estequiometria dos complexos metálicos. As análises dos resultados permitem obter a proporção entre metal e ligante (*Tabela 3*)

Tabela 3 - Valores das porcentagens de C,H e N obtidos para o complexo de ácido succínico com prata

Complexo	%C		%H		%N		% resíduo Ag Pela curva TG	
	Calc.	Exp.	Calc.	Exp.	Calc.	Exp.	Calc.	Exp.
Nome: [Ag₂(suc)]								
Fórmula molecular: [Ag₂(C₄H₆O₄)]	14,59	14,48	1,01	1,22	0,99	0	35	38

Fonte: os autores

4.1.2.b. Análise termogravimétrica

A curva termogravimétrica de [Ag₂(suc)] mostra uma perda de massa bem definida com platôs ao longo da curva. A perda de cerca de 34% ocorre em 290°C e também corresponde a uma perda de massa. A curva mostra uma perda de massa com um resíduo final de 64,6% condizente com a formação final de Ag⁰.

A análise de DSC do complexo Ag₂(suc) indica um do evento exotérmico em 304°C que corresponde à decomposição do ligante (Figura 20 e Figura 21).

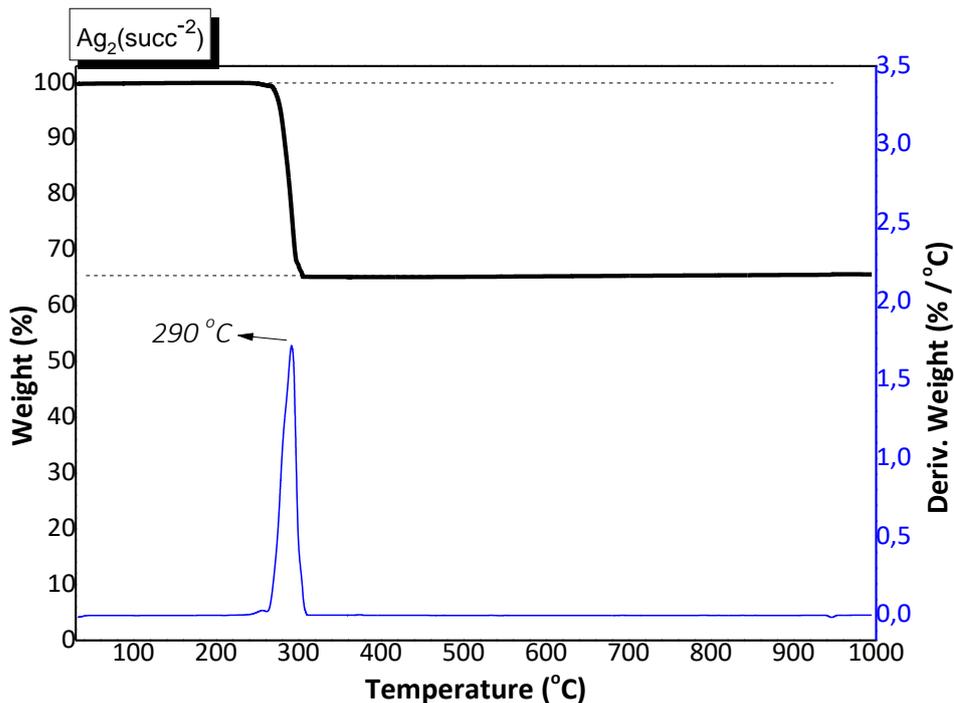


Figura 20: Curva termogravimétrica (TG and DTG) do complexo $[Ag_2(suc)]$, nas seguintes condições: ar sintético 100ml/min, taxa de aquecimento de 10°C/min, de 30 a 1000°C. Fonte: os autores

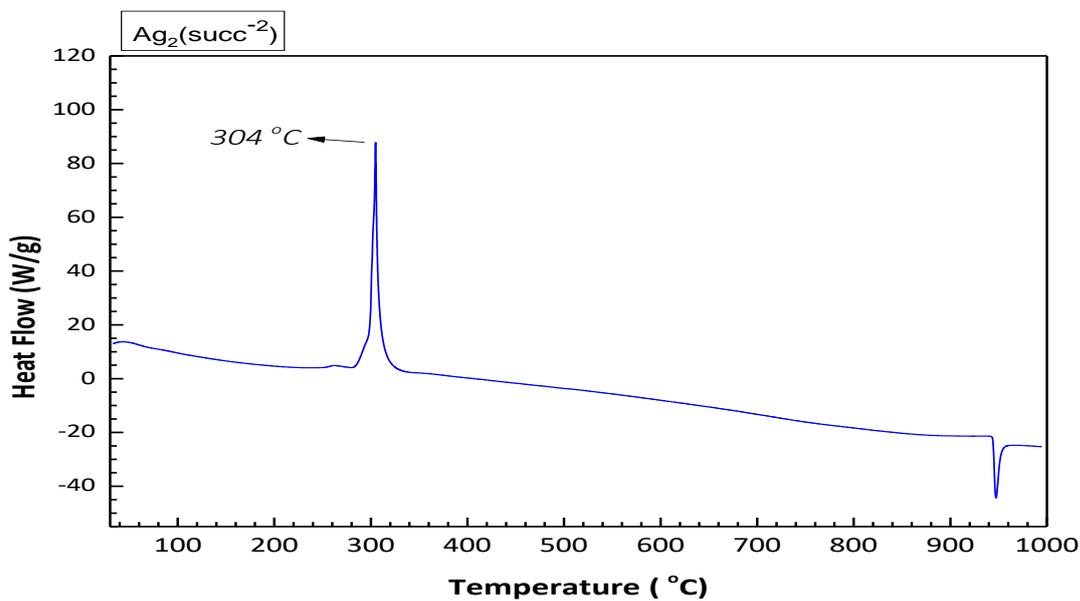


Figura 21: Curva da análise de DSC (Calorimetria Exploratória Diferencial) para o complexo $[Ag_2(suc)]$

4.1.2.c. Espectroscopia Infravermelho

Mudanças significativas nas bandas do complexo em comparação com o ligante e o sal de potássio do ligante indicam a coordenação do metal ao ácido succínico através do grupo carboxilato. Os espectros do ácido succínico mostram

uma banda O–H na faixa de 3300-2500 cm^{-1} . O ácido carboxílico mostra um padrão de absorção com sobreposições na região de 3300-2500 cm^{-1} , com a banda larga O–H e bandas de alongamento C–H acentuadas. A razão pela qual a banda de estiramento O–H dos ácidos carboxílicos é tão ampla é porque os ácidos carboxílicos geralmente existem como dímeros ligados por hidrogênio. Essa banda desaparece quando o sal de potássio ou o complexo de prata é formado. Além disso, o ácido succínico tem o C=O em 1675 cm^{-1} , a curva O–H em 1408 e 890 cm^{-1} e o trecho C–O em 1304 cm^{-1} .

Para o succinato de K^+ , os íons COO^- geram fortes vibrações de alongamento assimétrico (νCO_{as}) em 1559 cm^{-1} e uma fraca vibração de alongamento simétrico (νCO_{sym}) em 1392 cm^{-1} . Essas bandas estão localizadas em 1507 cm^{-1} (νCO_{as}) e em 1385 cm^{-1} (νCO_{sym}) no complexo de succinato de prata. A diferença entre νCO_{as} e νCO_{sym} ($\Delta\nu$) depende do tipo de coordenação entre o metal e o carboxilato. O grupo carboxilato mantém a simetria C_2 ao coordenar como um grupo em ponte ou bidentado. O átomo do metal está igualmente associado aos dois átomos de oxigênio no sal de succinato. A diferença $\Delta\nu$ entre as frequências de alongamento assimétrico e simétrico COO^- no sal de carboxilato e no complexo é 167 e 122 cm^{-1} , respectivamente, sugerindo uma coordenação bidentada de cada grupo carboxilato para os dois íons Ag (Figura 22).

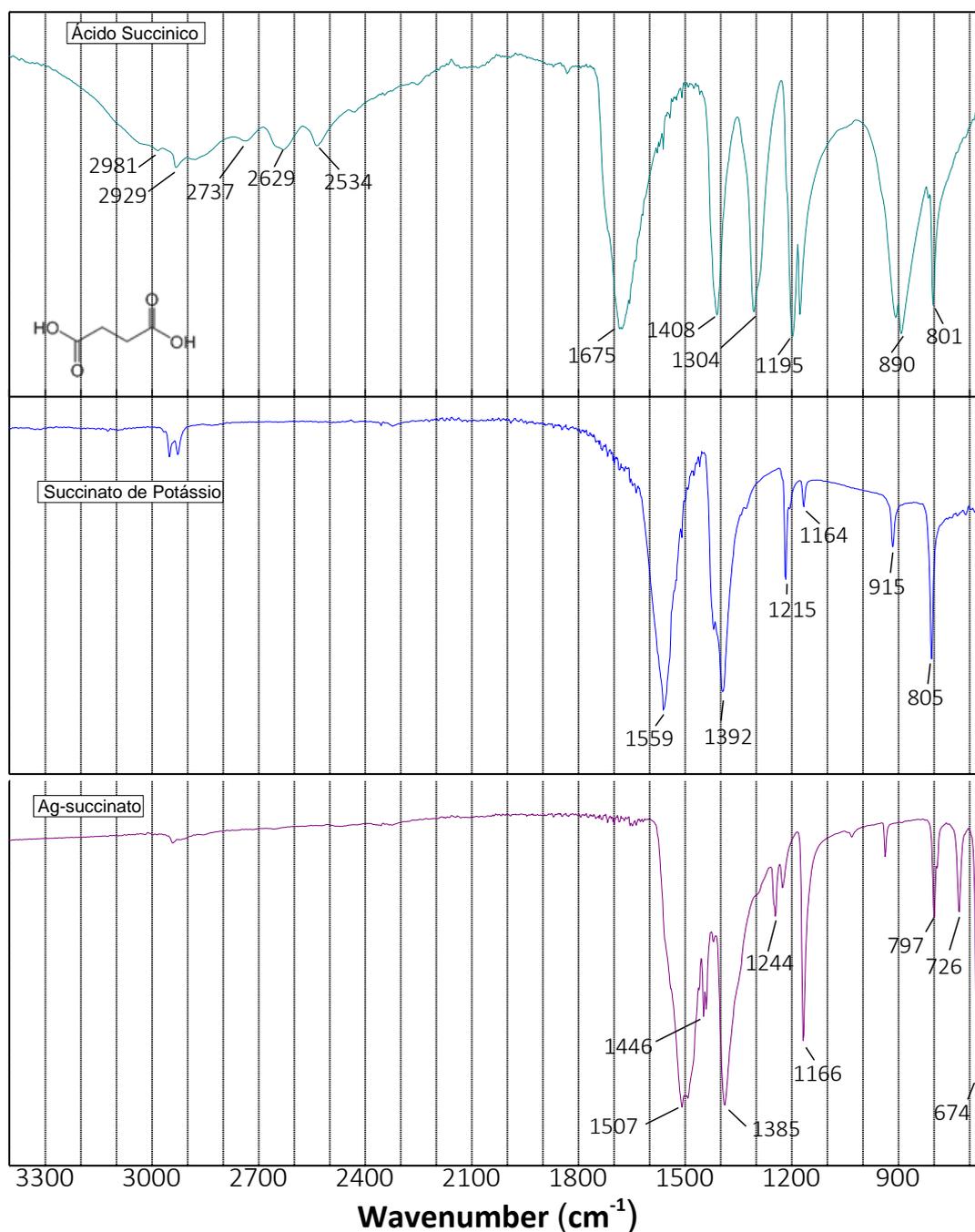


Figura 22: Espectros na região do infravermelho para o ácido succinato, succinato de potássio e do complexo [Ag₂(succ)]. Fonte: os autores.

4.1.2.d. DFT – Teoria

O ácido succínico e o [Ag₂(succ)] foram teoricamente estudados e seus parâmetros estruturais após complexação e seus orbitais moleculares de fronteira (FMO) foram determinados. Os parâmetros estruturais calculados foram os

comprimentos de ligação para o metal e o oxigênio (O- Ag) conforme se verifica na figura 23.

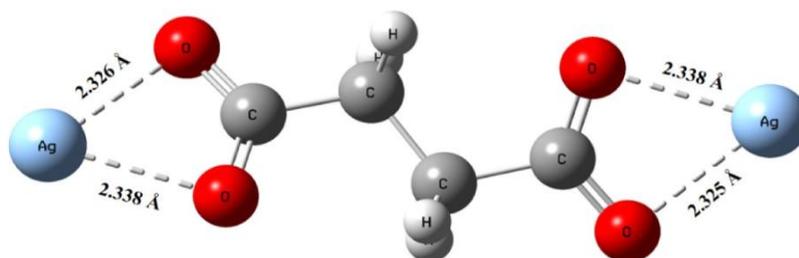


Figura 23: DFT- complexo ácido succínico com prata

Ao analisar os resultados é possível observar que cada grupo carboxilato do succinato coordena um átomo de prata pelos dois oxigênios em modo bidentado e os comprimentos de ligação O-Ag teoricamente determinados estavam na faixa de 2,325 Å a 2,338 Å. É importante notar que para a otimização o átomo de Ag foi colocado próximo ao oxigênio e nenhuma frequência imaginária foi identificada após a otimização, mostrando que a estrutura determinada na Figura 5 estava com energia mínima. Os valores teoricamente determinados para a ligação O-Ag são semelhantes aos dados de cristal encontrados na literatura para um complexo de prata com ligantes misto 2-aminobenzonitrila e ácido 4-metilbenzóico, onde o grupo carboxilato é coordenado com prata em um modo quelato bidentado. (Sun et al.,2012)

4.2. Teste de solubilidade

As solubilidades dos complexos foram testadas com água, etanol e dimetilsulfoxido. Em tubos de ensaios foram adicionados 5ml de cada respectivo solvente e em seguida foi adicionada uma quantidade de massa dos respectivos complexos testados até ao ponto no qual todas as soluções atingiram o ponto de saturação indicado na Figura 24. A cada vez que era adicionado mais uma porção de massa o tubo de ensaio era agitado no vortex por 3 minutos. Em seguida, os tubos foram levados para a centrifugação a 5000rpm por 15 minutos. Após a centrifugação foram coletados os sobrenadantes de cada tubo e os mesmos foram colocados em béqueres previamente pesados. Os béqueres foram postos para secagem (evaporação do sobrenadante) na estufa por 9 dias a uma temperatura de

70° C. A seguir, os béqueres foram novamente pesados para a realização dos cálculos das solubilidades de cada complexo. A solubilidade dos complexos encontra-se na (Erro! Fonte de referência não encontrada.).

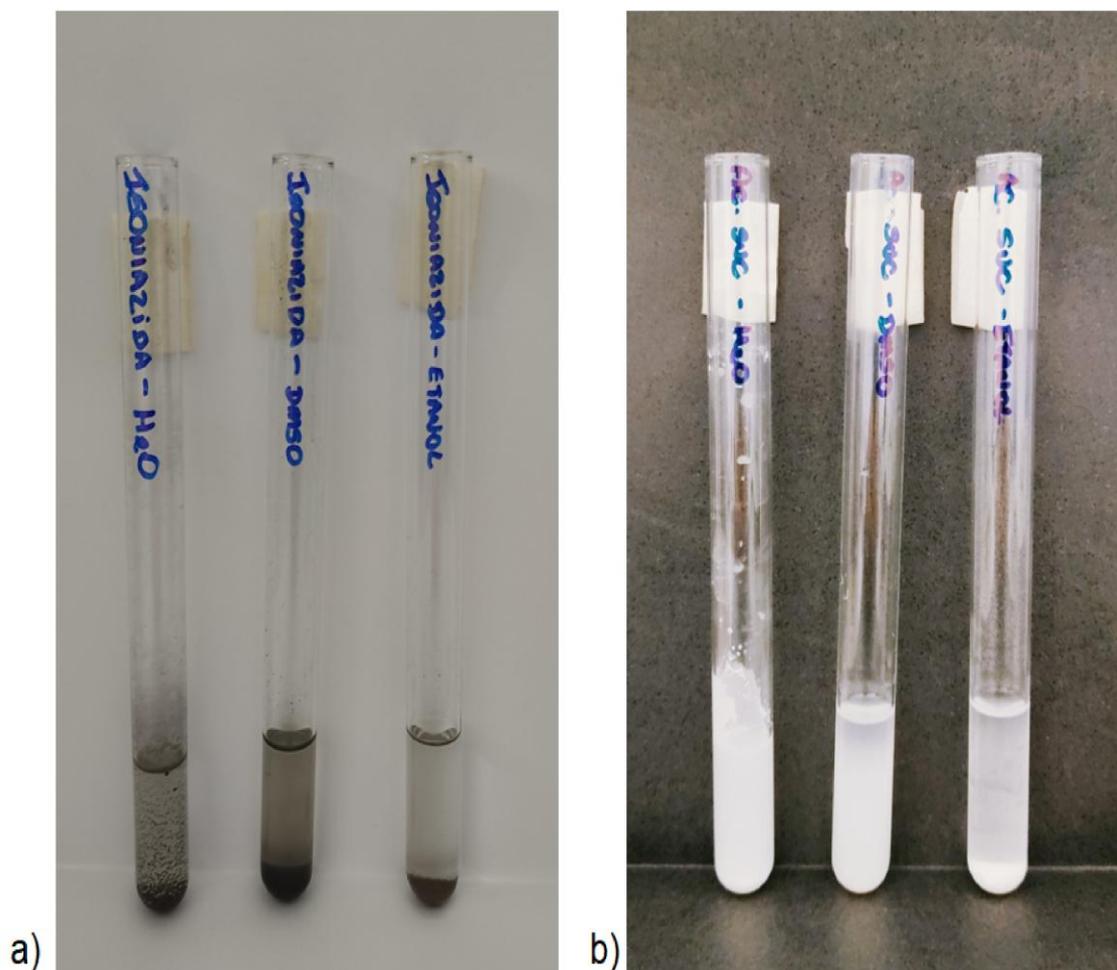


Figura 24: Saturação dos solventes- a) complexos de izonizada; b) complexos de ácido succínico. Fonte; os autores.

Tabela 4 - Resultados do teste de solubilidade

	H ₂ O	DMSO	Etanol
[Ag(inh)NO ₃]	1,6 mg/ml	16 mg/ml	0,4 mg/ml
{Ag ₂ (succ)}	0,07 mg/ml	1,4 mg/ml	0,07 mg/ml

Fonte: os autores.

4.3 Testes biológicos

4.3.1. Ensaio de atividade inibitória de crescimento bacteriano por difusão em discos

Os complexos de prata foram submetidos a testes de inibição do crescimento de bacteriano. A Tabela 5 apresenta os perfis de sensibilidade dos microrganismos testados contra os complexos metálicos e ligantes bioativos.

Tabela 5 - Valores dos halos de inibição do teste de inibição do crescimento bacteriano para os complexos de prata.

Amostra	Complexos	Halos de inibição em mm (+ 0.1 mm)	
		<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 25922
1	Inh	R	R
2	[Ag(inh)NO ₃]	1,4	1,1
3	[Ag ₂ (succ)]	1,4	1,2
4	SCC	R	R

R = Resistente.

Fonte: os autores.

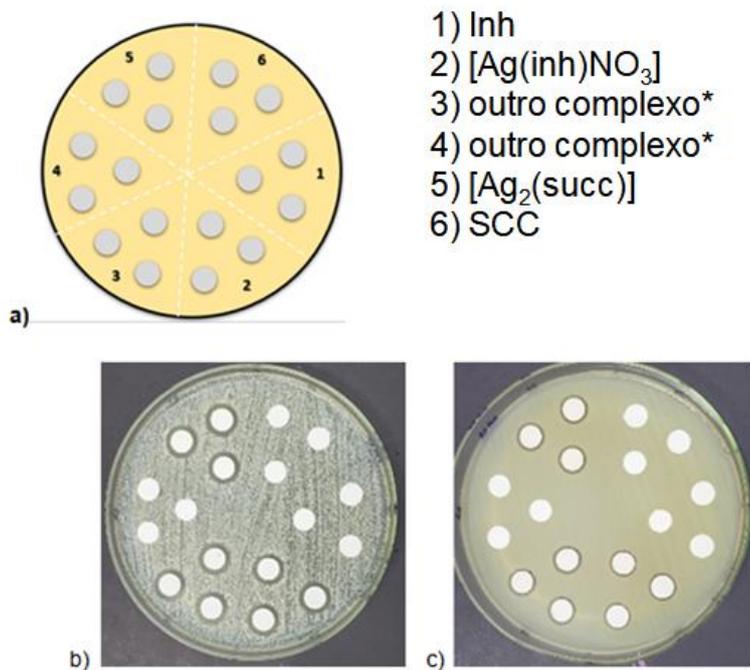


Figura 25: - a) Diagrama do posicionamento dos ligantes puros e seus complexos distribuídos na placa; b) Halos de inibição da bactéria *S.auros*(ATCC 25923) para os ligantes e complexos; c) Halos de inibição da bactéria *E.Coli* (ATCC 25922) para os ligantes e complexo; * São complexos metálicos testados que compartilharam a mesma placa de petri, entretanto não estão incluídos nessa dissertação. Fonte: os autores

Esses resultados mostram que os complexos apresentaram atividade de inibição do crescimento bacteriano quando comparados com os ligantes livres.

4.3.2. Teste da concentração inibitória mínima (MIC)

O complexo [Ag₂(succ)] apresentou atividade inibitória contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas usadas no ensaio. O ligante livre succ e a solução aquosa de DMSO não apresentaram atividades antibacterianas nas mesmas condições experimentais. Os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 6.

Tabela 6 - Valores de concentração inibitória mínima (MIC) de AgNO₃, ácido succínico e [Ag₂(succ)]

	<i>S. aureus</i>		<i>B. cereus</i>		<i>E. coli</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
	ATCC 25923		ATCC 14579		ATCC 25922		ATCC 27853	
	MIC	MIC	MIC	MIC	MIC	MIC	MIC	MIC
	$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$
	1	1	1	1	1	1	1	1
[Ag ₂ (succ)]	$\leq 78,12$	$\leq 0,23$						
Succinic Acid	R		R		R		R	
AgNO ₃	$\leq 78,12$	$\leq 0,45$						

R = resistente. O teste t de Student foi usado para determinar a significância estatística para réplicas de *S. aureus*, *B. cereus*, *E. coli* and *P. aeruginosa* Os resultados foram expressos como a média (***) $p < 0,005$).

Os resultados do teste MIC sugerem que a atividade antibacteriana do [Ag₂(succ)] está relacionada com a liberação de íons Ag⁺ semelhante à forma que foi descrita para o complexo sulfadiazina+Ag e para os demais complexos de prata. A inibição (em $\text{mmol}\ \mu\text{L}^{-1}$) fornecida pelo [Ag₂(succ)] foi maior do que a observada pelo sal inicial AgNO₃. Assim, conforme já está descrito na literatura, os íons de prata podem se ligar à membrana celular e, conseqüentemente, inibir as divisões celulares, podendo também se ligar ao DNA e RNA bacteriano e inibir a replicação da célula bacteriana. (Castellano et al, 2007).

O uso de complexos à base de prata promovem uma liberação mais lenta dos íons Ag⁺ quando comparados ao nitrato de prata. Essa característica causa o aumento do efeito antibacteriano do composto. Por exemplo: o mecanismo de ação da sulfadiazina de prata para infecções de feridas por queimadura já é conhecido (Fox & Modak, 1974) e acredita-se que a eficácia da sulfadiazina de prata resulte de suas reações lentas e constantes com o soro e outros fluidos corporais contendo cloreto de sódio, possibilitando assim a liberação de forma lenta e sustentada de íons de prata na região da queimadura.

Os resultados do teste da concentração inibitória mínima demonstram que o complexo [Ag₂(succ)] apresentou uma significativa atividade inibidora do crescimento bacteriano quando comparado a outros estudos que relatam a atividade inibitória do crescimento bacteriano por complexos Ag (I) com diversos ligantes como Ag (I) com furosemida (Ag- FSE - MIC foram 0,39 $\text{mmol}\ \text{L}^{-1}$ para cepas de bactérias Gram-

positivas), sulfatiazol (Ag-SFT - MIC foram 3,45 mmol L⁻¹ para bactérias Gram-negativas e 6,90 mmol L⁻¹ para bactérias Gram-positivas) e sulfametoxazol (Ag-SFM - MIC foram 1,74 mmol L⁻¹, para bactérias Gram-negativas e 13,9 mmol L⁻¹, para bactérias Gram-positivas) (Bormio Nunes et al., 2015). Os resultados do MIC demonstram o potencial do complexo [Ag₂(succ)] como um possível medicamento antibacteriano no futuro.

4.3.4. Atividade antimicobacteriana dos complexos de prata

Os complexos de prata foram submetidos ao teste para determinação da concentração inibitória mínima com *Mycobacterium tuberculosis*. A Tabela 7 apresenta os respectivos valores de concentração inibitória mínima (MIC₉₀) de cada complexo.

Tabela 7 - Valores de concentração inibitória mínima dos complexos obtidos.

Complexo	MIC ₉₀ (µg/ml)
Rifampicina	0,08
Isoniazida	0,13
Ag-isoniazida	0,78
Ácido succínico	> 25,00
Ag-succinato	23,94

Fonte: os autores.

O complexo Ag-inh foi ativo contra *M. tuberculosis* com MIC₉₀ de 0,78 + 0,5 µg mL⁻¹ (2,55 µmol L⁻¹). Embora o complexo de prata apresente um valor MIC₉₀ maior que a rifampicina (0,08 + 0,02 µg mL⁻¹ ou 0,097 µmol L⁻¹) e a própria isoniazida (0,13+ 0,06 µg.mL⁻¹ ou 0,948 µmol.L⁻¹), ele é menor que outros agentes antimicobacterianos usados em tratamentos clínicos de TB como o etambutol (MIC₉₀ = 5,62 µg mL⁻¹ ou 27,5 µmol.L⁻¹) e o ácido *p*-aminosalicílico (MIC₉₀ = 1,25 µg mL⁻¹ ou 8,16 µmol.L⁻¹). Está bem estabelecido que a isoniazida livre é um pró-fármaco potente e seletivo que inibe a biossíntese da parede celular das micobactérias, interrompendo a síntese de ácidos micólicos. É chamado de pró-fármaco pois só se

torna ativo após uma transformação por pela enzima catalase-peroxidase, dando origem ao ácido isonicotínico.

A rigidez e a estabilidade conferidas ao complexo pelo átomo de prata poderiam impedir a biotransformação da isoniazida em ácido isonicotínico e assim inibir sua atividade. Entretanto foi provado que o complexo $[Ag(inh)]NO_3$ é ativo contra *M. tuberculosis* e apresentou MIC_{90} diferente do da isoniazida. Esse fato pode indicar que o mecanismo de ação do complexo pode ser diferente do da própria isoniazida. Resultados similares foram publicados na literatura com complexos de cobalto e de cobre com complexos de isoniazida, que se mostraram ativos sobre o *M. tuberculosis* com valores MIC_{90} de 0,41 e 2,2 $\mu mol.L^{-1}$, respectivamente. Além disso, o MIC_{90} estava abaixo do limite máximo de 25 $\mu g.mL^{-1}$, que é o valor descrito na literatura que justifica estudos adicionais de compostos ativos contra *M. tuberculosis*.

Montelongo-Peralta et al. Realizaram recentemente um estudo que relatou que uma mistura de isoniazida e nitrato de prata, sem isolamento do complexo, tem um potente efeito bactericida sobre cepas do *M. tuberculosis* resistentes a isoniazida, resultando em valores de MIC mais baixos do que aqueles dos componentes isolados. Entretanto, o MIC resultante de $AgNO_3$ na mistura foi maior (cerca de 10,0 $mmol.L^{-1}$) que o de nosso complexo isolado de $Ag-inh$ (2,55 $mmol.L^{-1}$).

Os valores de MIC_{90} do complexo $[Ag_2(succ)]$, ácido succínico e da rifampicina (a droga de primeira linha mais eficaz, usada como controle) foram obtidos por meio de REMA (referência). A rifampicina, droga de primeira linha mais eficiente, apresentou MIC_{90} de 0,08 $\mu g.mL^{-1}$ (0,09 $\mu mol L^{-1}$). O complexo de prata com succinato mostrou-se ativo com MIC_{90} de 23,94 $\mu g.mL^{-1}$ (74,7 $\mu mol L^{-1}$) enquanto o próprio ácido succínico apresentou valor superior a 25,00 $\mu g.mL^{-1}$ (208,1 $\mu mol L^{-1}$) O complexo $[Ag_2(succ)]$ possui um valor de MIC superior ao de outros agentes antimicobacterianos utilizados no tratamento clínico da TB, como o etambutol ($MIC_{90} = 5,62 \mu g.mL^{-1}$ ou 27,5 $\mu mol.L^{-1}$) e o *p*-aminossalicílico ($MIC_{90} = 1,25\mu g.mL^{-1}$ ou 8,16 $\mu mol.L^{-1}$).

5. CONCLUSÕES

Nesse trabalho foram sintetizados e caracterizados dois novos complexos de prata na forma sólida. A caracterização do complexo [Ag(inh)NO₃] sintetizado indica que a isoniazida está coordenada através átomos de oxigênio do grupo C=O e de nitrogênio do grupo NH₂, apresentando em sua estrutura a presença do ânion NO₃. Já para o complexo os resultados da caracterização indicam a coordenação dos íons Ag ao grupo carboxilato do ligante.

A avaliação biológica dos complexos contra o *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv indicou que os complexos apresentam atividade biológica, sendo o complexo [Ag(inh)NO₃] o mais ativo, com um desempenho superior quando comparado aos fármacos de referência como o etambutol e o p-aminossalicílico. A avaliação de inibição do crescimento bacteriano mostrou que os complexos [Ag(inh)NO₃], [Ag₂(succ)] apresentaram resultados positivos contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas quando comparado aos ligantes na forma livre.

A partir desses resultados, o centro metálico Ag apresentou um papel importante ao composto, conferindo atividade biológica antibacteriana e antimicobacteriana ao complexo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDER, Wesley, J. (2009). **History of the medical use of silver**. *Surgical Infections*, 10(3), 289–294.

AMARAL, A. T., & MONTANARI, C. A. (2002). **25 Years of medicinal chemistry in Brazil**. *Química Nova*, 25(SUPPL. 1), 39–44. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422002000800008>.

ARBEX, M. A., VARELLA, M. de C. L., de Siqueira, H. R., & de Mello, F. A. F. (2010). **Drogas antituberculose: Interações medicamentosas, efeitos adversos e utilização em situações especiais. parte 1: Fármacos de primeira linha**. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, 36(5), 626–640. <https://doi.org/10.1590/s1806-37132010000500017>.

BADER, R.F.W.; *Atoms in molecules: a quantum theory*, 1st ed., Clarendon Press: Wotton-under-Edge, 1994.

BARBERIS, I., BRAGAZZI, N. L., GALLUZZO, L., & MARTINI, M. (2017). **The history of tuberculosis: From the first historical records to the isolation of Koch's bacillus**. *Journal of Preventive Medicine and Hygiene*, 58(1), E9–E12. <https://doi.org/10.15167/2421-4248/jpmh2017.58.1.728>.

BARILLO, D. J., & MARX, D. E. (2014). **Silver in medicine: A brief history BC 335 to present**. *Burns*, 40(S1), S3–S8. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2014.09.009>.

BECKE, A. D. (1993). **Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange**. *The Journal of Chemical Physics*, 98(7), 5648–5652. <https://doi.org/10.1063/1.464913>

BERALDO, H. (2005). **Contribuições da química inorgânica para a química medicinal**. *Química Nova Na Escola*, 6, 4–6.

BERINGER, P. (Ed.) **Remington: the science and practice of pharmacy**. 19th ed. Easton: Mack, 1995. p. 880.

Brasil. (2020). **Boletim Epidemiológico de Tuberculose. Ministério Da Saúde. Secretaria de Vigilância Em Saúde. Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis.**, 1, 40.

CAMPOS, H. S. (1999). **Mycobacterium tuberculosis resistente: de onde vem a resistência?**. Boletim de Pneumologia Sanitária, 7(1). <https://doi.org/10.5123/s0103-460x1999000100006>

CAMPOS, R., & PIANTA, C. (2001). **Tuberculose: histórico, epidemiologia e imunologia, de 1990 a 1999, e co-infecção TB/HIV, de 1998 a 1999**, Rio Grande do Sul - Brasil. Boletim Da Saúde, 61–71.

CAROLE, M. T., PELLEGRINO, J. e PASTER, M. D, 2004. **Opportunities in the Industrial Biobase Products Industry**. Appl. Biochemistry and Biotechnology, v. 11-116.

CAVACCHIOLI, M., LEITE, C. Q. F., SATO, D. N., & MASSABNI, A. C. (2007). **Synthesis, characterization and antimycobacterial activity of Ag(I)-aspartame, Ag(I)-saccharin and Ag(I)-cyclamate complexes**. Archiv Der Pharmazie, 340(10), 538–542.

CAVICCHIOLI, M., MASSABNI, A. C., HEINRICH, T. A., COSTA-NETO, C. M., ABRÃO, E. P., FONSECA, B. A. L., CASTELLANO, E. E., CORBI, P. P., LUSTRI, W. R., & LEITE, C. Q. F. (2010). **Pt(II) and Ag(I) complexes with acesulfame: Crystal structure and a study of their antitumoral, antimicrobial and antiviral activities**. Journal of Inorganic Biochemistry, 104(5), 533–540.

CHEN, X. B. **Determination of allantoin in biological, cosmetic and pharmaceuticals samples**. Journal of AOAC International, v. 79, n. 3, p. 625-635, 1996.

CHOWDHURY, S.; GHOSH, S.; RASHID, K.; SIL, P. C. **Deciphering the role of ferulic acid against streptozotocin-induced cellular stress in the cardiac tissue of diabetic rats**. Food Chem Toxicol. v. 97, p. 187–198, 2016.

CLARK, T.P.; CHIEFFO, C.; HUHN, J.C.; NIMZ, E.L.; WANG, C.; BOY, M.G. **The steady-state pharmacokinetics and bioequivalence of carprofen administered orally and subcutaneously in dogs**. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, Oxford, v.26, n.3, p.183-192, 2003

CLEMENT, J. L., & JARRET, P. S. (1994). **Antibacterial Silver. Metal-Based Drugs**, 1(5–6), 467–482. <https://doi.org/10.1155/mbd.1994.467>

CLIVATTI, J., SAKATA, R. K., & ISSY, A. M. (2009). **Review of the use of gabapentin in the control of postoperative pain.** *Revista Brasileira de Anestesiologia*, 59(1), 87–98. <https://doi.org/10.1590/S0034-70942009000100012>

D. Sun, F.-J. Liu, H.-J. Hao, Y.-H. Li, R.-B. Huang, L.-S. Zheng, **Six low-dimensional silver(I) coordination complexes derived from 2-aminobenzonitrile and carboxylates**, *Inorganica Chimica Acta*. 387 (2012) 271–276. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2012.01.027>.

LIMA, C. H. da Silva, ÇÃ, M. D. L.F.B., & De Souza, M. V. N. (2011). **Pyrazinamide: An essential drug in the tuberculosis treatment.** *Revista Virtual de Quimica*, 3(3), 159–180. <https://doi.org/10.5935/1984-6835.20110021>

DITCHFIELD, R., MILLER, D. P., & POPLER, J. A. (1971). **Self-consistent molecular orbital methods. xi. molecular orbital theory of NMR chemical shifts.** *The Journal of Chemical Physics*, 54(10), 4186–4193. <https://doi.org/10.1063/1.1674657>

ESTRELA, T. S. (2018). **Resistência antimicrobiana: enfoque multilateral e resposta brasileira. Saúde e Política Externa : Os 20 Anos Da Assessoria de Assuntos Internacionais de Saúde (1998-2018).** Brasil. Ministério Da Saúde. Assessoria de Assuntos Internacionais de Saúde, 307–327. http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/saude_politica_externa_20_anos_aisa.pdf

FARIAS, R. F. **Química de coordenação: fundamentos e atualidades.** 2. ed. São Paulo: Átomo, 2009

FU, Y.-C., FERNG, L.-H.A., HUANG, P.-Y. **Quantitative analysis of allantoin and allantoic acid in yam tuber, mucilage, skin and bubil of Dioscorea species.** *Food Chemistry*, 94: 541-549, 2006.

Fundamental, D. D. Q., Química, I. De, Paulo, U. D. S., Prof, A., Prestes, L., Física, I. De, Carlos, D. S., Paulo, U. D. S., Dagnone, A. J., & Angelina, J. S. (2017). *Quim. Nova*,. 40(6), 694–700.

Genérico, M. (2020). **Medicamento Genérico**, Lei no 9.787, de 1999. 13–14.

GORDON, S. V., Bottai, D., SIMONE, R., STINEAR, T. P., & BROSCH, R. (2009). **Pathogenicity in the tubercle bacillus: Molecular and evolutionary determinants**. *BioEssays*, 31(4), 378–388. <https://doi.org/10.1002/bies.200800191>

GUIMARÃES, D. O., DA SILVA MOMESSO, L., & PUPO, M. T. (2010). **Antibióticos: Importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes**. *Química Nova*, 33(3), 667–679. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000300035>

HARIHARAN, P. C., & POPLE, J. A. (1973). **The influence of polarization functions on molecular orbital hydrogenation energies**. *Theoretica Chimica Acta*, 28(3), 213–222. <https://doi.org/10.1007/BF00533485>

Higby, G.J. Gold in medicine. *Gold Bull* 15, 130–140 (1982).

HUGHES, Ronda. **Patient Safety and Quality: An Evidence-Based Handbook for Nurses**. Rockville, MD: Agency for Healthcare Research and Quality, 2008

KAY-MUGFORD, P.; BENN, S.J.; LaMARRE, J.; CONLON, P. **In vitro effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on ciclooxigenase activity in dogs**. *American Journal of Veterinary Research*, Chicago, v.61, n.7, p.802-810, 2000

KEITH, T.A.; **AIMA11. (Version 17.11.14)**; Overland Park, USA, 2017.

LEE, P.C., LEE, S.Y., HONG, S.H., CHANG, H.N., LEE, W.G., KWON, S, 2000. **Batch and continuous cultivation of Anaerobiospirillum succiniciproducens for the production of succinic acid from whey**. *Appl Environ Microbiol*;54:23-7.

LEHNINGER, A.L. **Princípios de bioquímica**. 4a.ed., Sao Paulo: Sarvier, 2006. 1232p

LIMA, L. M. (2007). **Química Medicinal Moderna: desafios e contribuição brasileira**. *Química Nova*, 30(6), 1456–1468. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422007000600015>

LUBOWE I. I. and MECCA S. B. (1959). **Allantoin and aluminum derivatives in dermatological applications**. Drug Cosmet. Ind. 84, 36-37, 117-118. Beraldo, H. (2005). Contribuições da química inorgânica para a química medicinal. Química Nova Na Escola, 6, 4–6.

LUSTRI, W. R., LAZARINI, S. C., LUSTRI, B. C., CORBI, P. P., SILVA, M. A. C., RESENDE NOGUEIRA, F. A., AMARAL, A. C., TREU FILHO, O., & MASSABNI, A. C. (2017). **Spectroscopic characterization and biological studies in vitro of a new silver complex with furosemide: Prospective of application as an antimicrobial agent**. Journal of Molecular Structure, 1134(2017), 386–394. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2016.12.056>.

MACIEL, M. D. S., SIQUEIRA-BATISTA, R., MENDES, P. D., & GOMES, A. P. (2012). **A história da tuberculose no Brasil: os muitos tons (de cinza) da miséria ***. Revista Brasileira de Clínica Médica, 10(3), 226–230.

MAILLARD, J. Y., & HARTEMANN, P. (2013). **Silver as an antimicrobial: facts and gaps in knowledge**. Critical Reviews in Microbiology, 39(4), 373–383. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2012.713323>

MASSABNI, A. C., & BONINI, E. H. (2019). **Tuberculose: história e evolução dos tratamentos da doença**. Revista Brasileira Multidisciplinar, 22(2), 6–34. <https://doi.org/10.25061/2527-2675/rebram/2019.v22i2.678>

MONGE, A.; CHORGHADÉ, M.; ERHARDT, P.W.; GANELLIN, C.R.; KOGA, N.; LINDBERG, P.; PERUN, T.J.; TOPLISS, J.G.; TRIVEDI, B.K.; WERMUTH, C.G. **Medicinal Chemistry in the development of societies**. Eur. J. Med. Chem. v.35, p.1121-1125, 2000

MURATSUBAKI, H., SATAKE, K., ENOMOTO, K. **Enzymatic assay of allantoin in serum using allantoinase and allantoate amidohydrolase**. Anal. Biochem. 359: 161–166, 2006

MURRAY, M. F. (2003). **Nicotinamide: An oral antimicrobial agent with activity against both Mycobacterium tuberculosis and human immunodeficiency virus**. Clinical Infectious Diseases, 36(4), 453–460. <https://doi.org/10.1086/367544>

NGHIEM, N. P., KLEFF, S., & SCHWEGMANN, S. (2017). **Succinic acid: Technology development and commercialization**. *Fermentation*, 3(2), 1–14. <https://doi.org/10.3390/fermentation3020026>

O'NEIL, J. (2014). **Review on Antibiotic resistance. Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations**. Health and Wealth Nations, December, 1–16. https://amr-review.org/sites/default/files/AMR_Review_Paper_-_Tackling_a_crisis_for_the_health_and_wealth_of_nations_1.pdf

OUIMET, M. A.; GRIFFIN, J.; CARBONE-HOWELL, A. L.; WU, W. H.; STEBBIND, N. D.; DI, R.; UHRICH, K. E. **Biodegradable ferulic acid-containing poly(anhydride-ester): degradation products with controlled release and sustained antioxidant activity**. *Biomacromolecules*. v. 14, p. 854–861, 2013

QUE JR, L.; BANCI, L. **Bioinorganic Chemistry**. *Curr. Opinion in Chemical Biology*. v.6, p.169-170, 2002

RAWAT, R., WHITTY, A., & TONGE, P. J. (2003). **The isoniazid-NAD adduct is a slow, tight-binding inhibitor of InhA, the Mycobacterium tuberculosis enoyl reductase: Adduct affinity and drug resistance**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(SUPPL. 2), 13881–13886. <https://doi.org/10.1073/pnas.2235848100>

REZENDE, S., CRISTINA, A., CARVALHO, C., & Tuberculose, P. A. De. (2020). **Determinantes sociais da saúde e custos catastróficos associados ao diagnóstico e tratamento da tuberculose**. 46(5), 1–5.

RIBEIRO, I.; REIS, D.; PEREIRA, D.; **J. Mol. Model.** 2019, 25, 267.

ROSEMBERG, J. (1999). **Tuberculose - Aspectos históricos, realidades, seu romantismo e transculturação**. *Boletim de Pneumologia Sanitária*, 7(2). <https://doi.org/10.5123/s0103-460x1999000200002>

SANTOS DE QUEIROZ, N. (2004). **A Resistência Bacteriana no Contexto da Infecção Hospitalar**. *Texto & Contexto Enfermagem*, 13, 64–70. <http://www.scielo.br/pdf/tce/v13nspe/v13nspea07.pdf>

SILVER, S., PHUNG, L. T., & SILVER, G. (2006). **Silver as biocides in burn and wound dressings and bacterial resistance to silver compounds.** Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 33(7), 627–634. <https://doi.org/10.1007/s10295-006-0139-7>

SIM, W., BARNARD, R. T., BLASKOVICH, M. A. T., & ZIORA, Z. M. (2018). **Antimicrobial silver in medicinal and consumer applications: A patent review of the past decade (2007–2017).** Antibiotics, 7(4), 1–15. <https://doi.org/10.3390/antibiotics7040093>

SOUZA, M. V. N., & VASCONCELOS, T. R. A. (2005). **Drugs against tuberculose: Past, present and future.** Quimica Nova, 28(4), 678–682. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422005000400022>

Tuberculostático, E. (2006). Nome Genérico: 2004–2006.

VILCHÈZE, C. (2020). **Mycobacterial cell wall: A source of successful targets for old and new drugs.** Applied Sciences (Switzerland), 10(7). <https://doi.org/10.3390/app10072278>

VILCHÈZE, C., & JACOBS, W. R. (2019). **The Isoniazid Paradigm of Killing, Resistance, and Persistence in Mycobacterium tuberculosis.** Journal of Molecular Biology, 431(18), 3450–3461. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.02.016>

WANMACHER L. **Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: uma guerra perdida?**

WHITE, E. G., **Life Sketches of Ellen G. White.** Literary Licensing, LLC, p. 196, 2014.

WILLKE, Th.; VORLOP, K-D. **Industrial bioconversion of renewable resources as an alternative to conventional chemistry.** App. Microbiol. Biotechnol, 66, p. 131 - 142, 2004.

WOO, K. J., HYE, C. K., Ki, W. K., SHIN, S., SO, H. K., & YONG, H. P. (2008). ***Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in Staphylococcus aureus and Escherichia coli. Applied and Environmental Microbiology***, 74(7), 2171–2178. <https://doi.org/10.1128/AEM.02001-07>

World Health Organization. “**Antimicrobial resistance: global report on surveillance**”. 2014.

ZEIKUS, J.G, JAIN, M.K., ELANKOVAN P, 1999. ***Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products***. Appl Microbiol Biotechnol 51(5):545–552.