



ENEPEX

ENCONTRO DE ENSINO,
PESQUISA E EXTENSÃO

8° ENEPE UFGD • 5° EPEX UEMS

AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANAS EM COMPLEXOS METÁLICOS

Bento P. Cabral Júnior¹; Ademir dos Anjos²; Lis R. V. Favarin³; Antonio F. dos Santos⁴; Gleison A. Casagrande⁵

GBBTEC/UEMS, Rua Emilio Mascoli, 79950000, Naviraí/MS. E-mail: junior_cabral18@hotmail.com ¹Bolsista de Iniciação Científica da UEMS; ²Orientador, Professor UEMS/Naviraí, Pesquisador PPG Recursos Naturais/UEMS; ³Doutoranda no PPG Química/UFMS; ⁴Mestrando no PPG Recursos Naturais/UEMS; ⁵Professor e Pesquisador Química/UFMS.

RESUMO

O estudo da ação antimicrobiana frente aos complexos metálicos tem como importância avaliar novos compostos para a inibição de micro-organismos patogênicos resistentes aos antibióticos atuais. Nos últimos anos as pirazolininas suscitam cada vez mais atenção por suas propriedades biológicas. Seus sistemas heterocíclicos exibem uma variedade de bioatividades, incluindo antitumoral, antifúngica, antibacteriana, entre outras. Complexos de cobre(I) com núcleos pirazolínicos são de grande interesse em química bioinorgânica, química inorgânica medicinal, bem como pelas suas possíveis atividades luminescentes e catalíticas. Desta forma, neste trabalho, avaliou-se a atividade antimicrobiana em complexos de cobre(I) com ligantes pirazolínicos, bem como nos ligantes livres (não coordenados), utilizando-se bactérias padronizadas Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*) e Gram-negativas (*Pseudomonas fluorescens*). Os resultados demonstraram alta sensibilidade das cepas bacterianas aos compostos testados (ligantes livres e complexos de cobre), o que indica um amplo espectro de atividade e abre perspectivas de que os mesmos possam ser utilizados como futuros fármacos.

Palavras-Chave: Complexos cuprosos, bactericida, núcleos pirazolínicos.

INTRODUÇÃO

A introdução de novos princípios ativos no arsenal farmacêutico é absolutamente importante no contexto atual, sendo que tal necessidade torna-se mais evidente ao considerar-se o aparecimento de formas bacterianas resistentes, decorrentes principalmente do uso indiscriminado e mal orientado destes tipos de produto (Calixto, 2000). Paralelamente, a utilização de fármacos quimioterapêuticos tradicionais na maioria das vezes é limitada devido aos efeitos colaterais. O desenvolvimento de novas substâncias que permitem a ativação seletiva de drogas no local alvo é crucial para tratamentos terapêuticos bem sucedidos (Lazarou, 2010).

Os compostos heterocíclicos constituem uma das maiores divisões da química orgânica clássica. A atividade farmacológica, por sua vez, é a principal área de aplicação desses compostos, uma vez que grandes partes dos fármacos utilizados na clínica contêm em suas estruturas anéis heterocíclicos (Rosa, 2008; Katritzky, 1984). Os núcleos pirazolínicos contêm sistemas heterocíclicos que exibem uma variedade de bioatividades, incluindo ação antitumoral, antifúngica, antimicrobiana, antibacteriana, antiinflamatória, entre outras (Casarin, 2008; Trofimenko, 1986). Complexos metálicos com estes ligantes tem sido objeto de vastas investigações não somente pelas suas diversidades estruturais, mas também por suas propriedades químicas e biológicas (Favarin, 2014).

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo a avaliação do comportamento dos ligantes pirazolínicos livres e coordenados com íons cobre(I) frente a bactérias padronizadas gram-positivas (*Staphylococcus aureus*) e gram-negativas (*Pseudomonas fluorescens*).

MATERIAIS E METODOS

Foram sintetizados três novos complexos seguindo a rota sintética demonstrada na Figura 1. Os três novos complexos pirazolínicos foram obtidos através da reação direta entre o precursor $[\text{Cu}(\text{PPh}_3)\text{Cl}]$ e os respectivos ligantes, em uma proporção equivalente de diclorometano e metanol. A uma solução de 1,1 mmol do ligante, L(1), L(2) ou L(3), em 5,0 mL de diclorometano, sob agitação e aquecimento (75°C), acrescentou-se uma solução de 1,0 mmol do complexo precursor previamente dissolvido em 10 mL de uma mistura de solventes na proporção de 1:1 (metanol e diclorometano). A mistura reacional de coloração amarela foi mantida em refluxo por 4 horas. Os monocristais de coloração amarela apropriados para a

realização dos bioensaios foram obtidos por lenta evaporação do solvente (Favarin, 2014). Foram realizados ensaios de ponto de fusão para verificar a formação dos complexos.

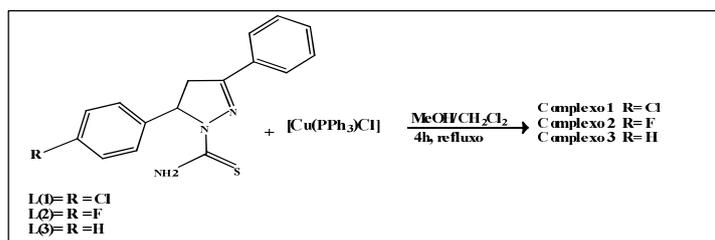


Figura 1 – Esquema reacional de síntese dos complexos.

Utilizando metodologias descritas por Santos et al.(2014), determinou-se a concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM). Foi utilizado como solvente uma solução aquosa de DMSO a 5%. Foram inicialmente ajustadas seis concentrações por diluição em série 2:1 (1000,500,250,125,62,5 e 31,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$), sendo que após as diluições, foram produzidos inóculos a partir das colônias bacterianas com tempo de incubação não superior a 24 horas. Utilizando um suabe estéril, retirou-se 4 colônias de bactérias e diluiu-se em um tubo de ensaio contendo 4,0 mL de água salina (08% de NaCl diluído em água destilada), utilizando uma solução padrão de 0,5 McFarland, que corresponde ao padrão de turvação da bactéria *Escherichia colia* a uma concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL (unidades formadoras de colônias por mililitro), sendo que esta solução foi diluída em caldo para obter a concentração de 5×10^5 UFC/mL. Para a determinação da concentração inibitória mínima foi distribuído em cada tubo de ensaio (que contem 1,0 mL da solução nas concentrações especificadas) 1,0 mL da suspensão bacteriana ajustada com o padrão de turvação, exceto no controle negativo. Os tubos contendo os inóculos foram incubados a 37° por 24 horas, sendo que logo após avaliou-se a turvação bacteriana utilizando o controle negativo (menor concentração do composto com caldo Luria-Bertani sem inóculo) e controle positivo (caldo Luria-Bertani e suspensão bacteriana ajustada). Os testes foram realizados em duplicatas com três repetições para cada bactéria.

Para determinar a concentração bactericida mínima (CBM) foram utilizado o método de semeadura em placa de petri. Em conjunto aos procedimentos para determinação da CIM, foram iniciados os procedimentos para determinação da CBM. Após a incubação para a verificação da CIM, foram retirados 0,1 mL de cada tubo de ensaio, inclusive do controle positivo (caldo LB e suspensão bacteriana) e controle negativo (caldo LB sem inóculo), os quais foram projetados sobre o meio de cultura em placa de pétri, sendo distribuídos sobre toda superfície com o auxílio de uma alça de Drigalski (todo o procedimento foi realizado

próximo a chama de um bico de Bunsen). As placas com os inóculos foram incubadas a uma temperatura de 37° por 20 horas, sendo que após este período foi observado a presença das colônias bacterianas em todas elas. A placa com menor concentração do composto que impediu o crescimento bacteriano em meio de cultura pode ser determinada como sendo a concentração bactericida mínima (CBM).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os três novos complexos de cobre(I) com ligantes tiocarbomil pirazolínicos, são formados através da coordenação dos respectivos ligantes ao íon metálico de maneira monodentada pelo átomo de enxofre; essa coordenação Cu(I)-S já era esperada, devido a maior afinidade do átomo de cobre(I) pelo átomo de enxofre, uma base mais macia do que o nitrogênio. A análise elementar de CHN apresenta resultados concordantes com as fórmulas moleculares $C_{35}H_{33}CuN_3Cl_2POS$, $C_{52}H_{44}CuClFN_3P_2S$ e $C_{52}H_{45}CuClN_3P_2S$, em que todos os complexos são neutros (Favarin, 2014).

Os complexos pirazolínicos foram testados contra a bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC SP 25923) e contra a bactéria gram-negativa *Pseudomona fluorescens* (ATCC SP 13525).

Ambas as cepas bacterianas investigadas apresentaram sensibilidade frente a todos os compostos investigados, entretanto, nota-se claramente que os complexos metálicos são muito mais eficientes na inibição quando comparado aos ligantes não coordenados (Tabela 1). Isto está de acordo com o que é estipulado na literatura quanto à maior eficiência em atividades biológicas de compostos de coordenação frente aos seus ligantes livres.

Verifica-se uma semelhança no comportamento das duas bactérias, embora ambas apresentem morfologias diferentes em suas paredes celulares, mas essa diferença das bactérias não originou diferenças na permeabilidade dos complexos testados.

A CIM foi considerada como moderada para os complexos **(1)** e **(2)**, e como boa para o complexo **(3)**; já para todos os ligantes livres pode ser descrita como fraca ou inativa, levando em consideração a classificação empregada para avaliar a atividade antimicrobiana em extratos de vegetais como: BOA - CIM inferior a 100 µg/mL; MODERADA - CIM entre 100 e 500 µg/mL; FRACA - CIM entre 500 e 1000 µg/mL; e INATIVA quando a CIM for superior a 1000 µg/mL (Holetzet *al.*, 2002; Dalmarco, 2010). A classificação do efeito inibitório pode ser caracterizada como **bactericida**, pois quando a proporção entre CBM/CIM

$\leq 4,0$ o agente será bactericida, e quando $> 4,0$ o agente será bacteriostático (Abou *et al.*, 2013; konaté *et al.*, 2012).

Tabela 1 -Resultados da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) para os ligantes livres e os complexos (valores expressos em $\mu\text{g mL}^{-1}$).

<i>Complexos/cepas</i>	<i>S. aureus</i>		<i>P. Fluorescens</i>	
	CIM	CBM	CIM	CBM
L1	>500	$>10^3$	>500	$>10^3$
(1)	125	250	125	250
L2	>500	$>10^3$	>500	$>10^3$
(2)	125	250	125	250
L3	>500	$>10^3$	> 500	$>10^3$
(3)	62,5	125	62,5	125

CONCLUSÕES

Os compostos avaliados inibiram o crescimento das bactérias gram-positivas e gram-negativas, o que indica um amplo espectro de atividade e abre perspectivas de que os mesmos possam ser utilizados como futuros fármacos. E quando se compara os dados dos complexos com aqueles obtidos para os ligantes livres, nota-se claramente um aumento das atividades antimicrobianas, comprovando a importância do processo de coordenação dos íons cobre(I).

AGRADECIMENTOS

Ao PIBIC/UEMS pela bolsa e ao FUNDECT pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

ABOU, O.; KARAMOKO, O.; ADAMA, C.; AUGUSTIN, A. A. **Phytochemical screening and evaluation of the antibacterial activity of bark extracts of *Pericopsis* (*Afrormosia*) *laxiflora* (Benth.) of *scherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* ESBL.** Journal of Chemical and Pharmaceutical Research. v. 5. n. 1p. 86-90, 2013.

CALIXTO, J.B. **Bioterapia: A diversidade biológica na vida da indústria farmacêutica.** Ciênc. Hoje. v. 28, n. 167, p. 36-43, 2000

CASARIN, M.; FORRER, D.; GARAU, F.; PANDOLFO, L.; PETTINARI, C.; VITTADINI, A.J. *Phys. Chem. A*. **2008** (112) 6723-6731.

DALMARCO, J. B. et al. **Isolation and identification of bioactive compounds responsible for the anti-bacterial efficacy of *Lotus comiculatus*: var. São Gabriel**. *International Journal Green Pharmacy*. v. 4. n. 2, p. 108-114, 2010.

FAVARIN, L. R. V. **Cristaloquímica de Compostos de Cu(I) Baseados em Pirazolinas 1,3,5-TriSubstituídas: Síntese, Caracterização Estrutural e Propriedades Ópticas. (Dsseretação)**. Programa de Pós-Graduação em Química. Universidade Federal da Grande Dourados. P. 26 – 27. 2014.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; FILHO, B. P. D. **Screening of Some Plants Used in the Brazilian Folk Medicine for the Treatment of Infectious Diseases**. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. Rio de Janeiro. v. 97. n.7. p. 1027-1031, 2002.

KATRITZKY, A. R., REES, C. W; **Comprehensive Heterocyclic Chemistry**; Pergamon Press: New Yprk, **1984**; Vol. 6, pp 235_332.

KONATÉ, K.; MAVOUNGOU, J. F.; LEPENGUÉ, A. N.; AWORET-SAMSENY, R. R. R. HILOU, A; SOUZA, A.; DICKO, M. H.; M'BATCHI, B. **Antibacterial activity against β -lactamase producing Methicillin and Ampicillin-resistants *Staphylococcus aureus*: fractional Inhibitory Concentration Index (FICI) determination**. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. p. 11-18, 2012.

LAZAROU, K.; BEDNARZ, B.; KUBICKI, M. *Inorg. Chim. Acta* .**2010** (363) 763–772.

ROSA, F. A.; **Acilenaminonas: Síntese e aplicação na obtenção de pirazóis, pirazolo[3,4-d]piridazinonas e pirazolo[1,5-a]pirimidinas**. (Tese). Programa de pós graduação em química núcleo de química de heterociclos Universidade federal de santa Maria. 2008

SANTO A.F.; BROTTTO D. F.; FAVARIN L.R.V.; CABEZA N.A.; ANDRADE G.R.;BATISTOTE M.; CAVALHEIRO A.A.; NEVES A.; RODRIGUES D.G.M.; ANJOS A.; **Study of the antimicrobial activity of metal complexes and their ligands through bioassays applied to plant extracts**. *Rev. Bras. Farmacogn.* V. 24. p.309-3015. 2014

TROFIMENKO, S. *Prog. Inorg. Chem.* 1986 (34) 115-210.