

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E BIOCÊNCIAS  
APLICADAS À FARMÁCIA**

**ATIVIDADE ANTI - *Mycobacterium tuberculosis* INTRA E EXTRA CELULAR E  
CITOTOXICIDADE DOS COMPLEXOS DE COORDENAÇÃO DE METAIS**

**PAULA CAROLINA DE SOUZA**

**ARARAQUARA – SP**

**2013**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E BIOCÊNCIAS  
APLICADAS À FARMÁCIA**

**ATIVIDADE ANTI - *Mycobacterium tuberculosis* INTRA E EXTRA CELULAR E  
CITOTOXICIDADE DOS COMPLEXOS DE COORDENAÇÃO DE METAIS**

**PAULA CAROLINA DE SOUZA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia, área de concentração: Microbiologia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, para obtenção do Título de Mestre em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia.

**Prof<sup>o</sup>. Dr. FERNANDO ROGÉRIO PAVAN**  
ORIENTADOR

**ARARAQUARA – SP**  
**2013**

## **Ficha Catalográfica**

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
UNESP – Campus de Araraquara

S829a Souza, Paula Carolina de  
Atividade anti - *Mycobacterium tuberculosis* intra e extra celular e citotoxicidade dos complexos de coordenação de metais / Paula Carolina de Souza . – Araraquara, 2013  
48 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia  
Orientador: Fernando Rogério Pavan

1. Tuberculose. 2. Química Inorgânica Medicinal. 3. Citotoxicidade. 4. Atividade intracelular. I. Pavan, Fernando Rogério, orient.. II. Título.

**CAPES: 40300005**

## **DEDICO ESTE TRABALHO...**

*Aos meus avós, Angelina e Paulino (“in memoriam”), que amorosamente muito me incentivaram nesta caminhada e me ensinaram o que de mais valioso há no mundo: os valores morais de um “homem de bem”. Eu os amo inexoravelmente.*

*Aos meus pais, Inês e Evanildo, por estarem sempre ao meu lado e me apoiarem de forma incondicional, entendendo toda minha ausência física. Vocês me ensinam a cada dia o verdadeiro AMOR: a compreensão.*

*Ao meu irmão, André, por todo amor que a cada dia a mim concede. Apesar de mais novo és um grande exemplo para mim: eu te amo!*

*Ao meu namorado, amigo, incentivador, companheiro: Bruno. A cada dia me surpreendendo e me ensinando que o grande objetivo de estarmos aqui é para evoluirmos espiritualmente.*

*A técnica de laboratório Marisa por ter sido a primeira pessoa a me estender a mão nesta caminhada; jamais esquecerei o valor desta oportunidade!*

*A prof<sup>a</sup> Clarice Queico que na minha pequena opinião é uma pessoa extraordinária! A senhora tem um olhar todo especial que lhe permite muito além de ver e enxergar... permite sentir o outro. Esta sua percepção me toca profundamente e sou muito grata por ter me aceitado em seu grupo de pesquisa. A senhora também foi, junto a técnica Marisa, a primeira pessoa a estender a mão a mim nesta caminhada. Meu eterno MUITO OBRIGADA!*

## AGRADECIMENTOS...

*À “inteligência suprema e causa primária de todas as coisas” por ter me permitido ser depositária e não proprietária de todas as coisas que usufruo nesta vida.*

*Aos amigos “de longe” e “aos de perto” que a cada dia me surpreendem com mensagens carinhosas de total apoio às minhas decisões pessoais e profissionais... vocês são meus cúmplices com toda docilidade que esta palavra possa expressar. Sou extremamente abençoada por vocês terem me escolhido como amiga!*

*Ao amigo Adolfo... sem palavras para agradecê-lo. Títulos passam, conquistas materiais são tão efêmeras; você é um exemplo para mim! Um dia eu gostaria de ser 10% da pessoa que você é!*

*Ao amigo “de frente” Leonardo por toda sua simplicidade de alma. Divido contigo “altos papos” e a cada dia me orgulho de trabalhar com alguém tão humano quanto você!*

*Aos colegas de laboratório e colaboradores deste trabalho. Por dividir o trabalho, as angústias, a ansiedade, e as pequenas conquistas... Vocês são maravilhosos! Por doarem tanto de suas competências.*

*Ao querido orientador Fernando Rogério Pavan pela paciência, dedicação e competência dedicadas a este trabalho.*

*À querida e doce Patrícia Bento por tudo que fez por mim. Sua dedicação é algo que muito me emociona! Muito obrigada por cada contribuição a este trabalho.*

*Ao amigo Ederlan, pela ajuda nos gráficos e idéias para este trabalho.*

*Às funcionárias da Seção de Pós-graduação: Cláudia, Daniela e Joyce pelo atendimento de sempre.*

*Aos professores da Graduação que me incentivaram e doaram do seu conhecimento, além de despertarem em mim a vontade da carreira acadêmica que aos poucos se torna realidade... Meu muito obrigada!*

*A CNPQ por ter me concedido a bolsa e todo apoio necessário para que este projeto se concretizasse.*

*“Tu te tornas eternamente responsável por tudo aquilo que cativas”  
(Antoine de Saint-Exúpery)*

## RESUMO

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa que tem como principal patógeno o *Mycobacterium tuberculosis* e continua sendo um importante problema de saúde pública mundial, exigindo o desenvolvimento de estratégias para o seu controle. Em 2011 foram notificados 8,7 milhões de casos da doença no mundo. Ao longo dos anos o cenário da doença não tem se mostrado otimista, devido ao aumento de número de casos de TB multi resistente a fármacos (TB-MDR) e o surgimento de cepas de resistência estendida (TB-XDR). A pesquisa de novos fármacos, em um contexto geral, apresenta-se como um enorme desafio científico para a era moderna. Neste sentido, a Química Inorgânica Medicinal tem se mostrado uma ferramenta bastante promissora. Este trabalho objetivou a caracterização da atividade anti- *M. tuberculosis* intra e extracelular e a citotoxicidade de 158 compostos de coordenação com metais. A citotoxicidade usando linhagens celulares de macrófago (J774A.1) e células epiteliais (VERO) também foi investigada. Diante Os resultados demonstraram que 16 compostos apresentaram uma alta seletividade, ou seja, alta atividade contra o bacilo da tuberculose e baixa citotoxicidade frente às linhagens testadas. Quatro desses 16 compostos selecionados foram analisados quanto a atividade intracelular; dos quais 2 compostos de coordenação de Co (cobalto) mostraram-se promissores quanto a esta atividade. Com base nos resultados encontrados mais estudos serão realizados a fim de garantir a eficácia e segurança desses novos compostos de coordenação candidatos à fármacos para tratamento da tuberculose.

**Palavras-chaves:** tuberculose, Química Inorgânica Medicinal, citotoxicidade, atividade intracelular.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b>	Contaminação e resposta imunológica do organismo frente ao <i>M. tuberculosis</i>	14
<b>Figura 2</b>	Porcentagem de novos casos de TB-MDR no mundo .....	15
<b>Figura 3</b>	Países que até o final de 2011 notificaram ao menos um caso de TB-XDR .....	16
<b>Figura 4</b>	Fármacos de primeira escolha do tratamento da tuberculose .....	17
<b>Figura 5</b>	Fármacos de segunda escolha do tratamento da tuberculose .....	17
<b>Figura 6</b>	Abordagens para pesquisa de novos fármacos anti-TB .....	19
<b>Figura 7</b>	Reação de óxido-redução resazurina frente ao metabolismo celular .....	23
<b>Figura 8</b>	Representação esquemática do preparo da microplaca da técnica Resazurin Microtiter Assay (REMA) .....	25
<b>Figura 9</b>	Representação esquemática do preparo da microplaca para a determinação da citotoxicidade (IC <sub>50</sub> ) .....	27
<b>Figura 10</b>	Representação esquemática do preparo da microplaca para a determinação da atividade intracelular .....	30
<b>Figura 11</b>	Compostos contendo tiossemicarbazona complexados a manganês (Mn) e cobalto (Co).....	37
<b>Gráfico 1</b>	Resultados da concentração inibitória mínima (CIM) dos 158 compostos analisados (136 complexos e 22 ligantes).....	32
<b>Gráfico 2</b>	Resultados de citotoxicidade (IC <sub>50</sub> ) frente a células VERO para os 29 compostos de coordenação de metais e 2 ligantes analisados .....	33
<b>Gráfico 3</b>	Resultados de IS frente a células VERO para os 29 compostos de coordenação de metais e 2 ligantes analisados.....	34
<b>Gráfico 4</b>	Resultados de citotoxicidade (IC <sub>50</sub> ) frente a linhagem de macrófagos J774A.1 para os 21 compostos de coordenação de metais e 2 ligantes analisados .....	35
<b>Gráfico 5</b>	Resultados de IS frente a linhagem de macrófagos J774A.1 para os 21 compostos de coordenação de metais e 2 ligantes analisados .....	36

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Resultados de CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ), $\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ ) e IS frente a células VERO e J774A.1.....	38
<b>Tabela 2</b>	Resultados de citotoxicidade ( $\mu\text{g/mL}$ ) e CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) dos compostos de coordenação de metais frente a linhagem celular J774A.1 em 72 horas .....	38
<b>Tabela 3</b>	Resultados do valor inibitório de atividade intracelular (%) dos compostos de coordenação de metais frente às células de macrófago J774A.1 infectados com <i>M. tuberculosis</i> Erdmann .....	39
<b>Tabela 4</b>	Resultados de CIM frente ao <i>M. tuberculosis</i> H <sub>37</sub> Rv em diferentes condições ambientais (pH 6,0; 2% de albumina; 10% de SFB) .....	40

## LISTA DE ABREVIATURAS

TB – Tuberculose

TB-MDR – Tuberculose multi-droga resistente

TB-XDR – Tuberculose de resistência estendida

INH – Isoniazida

RFP – Rifampicina

SM – Estreptomicina

EMB – Etambutol

PZA – Pirazinamida

REA – Relação Estrutura-Atividade

DMSO – Dimetilsulfóxido

OADC – ácido oleico, albumina, dextrose, catalase

rpm – Rotações por minuto

CIM – Concentração inibitória mínima

UFC – Unidades formadoras de colônia

REMA – *Resazurin Microtiter Assay*

IC<sub>50</sub> – Índice de citotoxicidade

IS – Índice de seletividade

URL – Unidade relativa de luz

## SUMÁRIO

### Capítulo 1

1.1 Tuberculose (TB) .....	13
1.2 Epidemiologia, Tuberculose multi-droga resistente (TB MDR) e Tuberculose de resistência estendida (TB XDR) .....	15
1.3 Histórico e Evolução do Tratamento.....	16
1.4 Pesquisa de Novos Fármacos contra TB .....	18
1.5 Química Inorgânica Medicinal.....	19

### 2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral .....	21
2.2 Objetivos Específicos .....	21

### 3. Material e Métodos

#### 3.1 Amostras

3.1.1 Compostos de coordenação a metais .....	22
3.1.2 Fármacos Referência .....	22
3.2 Solução reveladora .....	22
3.3 Cepas Bacterianas .....	23
3.4 Linhagens celulares .....	23
3.4.1 Macrófagos J774.A1 (ATCC TIB-67) e VERO ATCC CCL81 .....	23

#### 3.5 Metodologias

3.5.1 Preparação das suspensões bacilares de <i>M. tuberculosis</i> H <sub>37</sub> Rv – ATCC 27294 e <i>M. tuberculosis</i> Erdmann ATCC 35801 recombinante .....	23
3.5.2 Determinação da atividade anti- <i>M. tuberculosis in vitro</i> dos compostos de coordenação de metais e seus ligantes utilizando a resazurina como revelador da reação .....	24
3.5.3 Cultivos celulares .....	26
3.5.3a Macrófagos J774A.1 (ATCC TIB-67) .....	26
3.5.3b VERO (ATCC CCL81) .....	26
3.5.4 Determinação da Citotoxicidade (IC <sub>50</sub> ) dos compostos de coordenação de metais .....	26

3.5.5 Determinação do Índice de Seletividade (IS).....	28
3.5.6 Determinação da Citotoxicidade (IC <sub>50</sub> ) dos compostos de coordenação de metais em 72 horas frente a linhagem de macrófagos J774A.1 (ATCC TIB-67).....	28
3.5.7 Determinação da atividade intracelular em modelo de infecção <i>in vitro</i> de macrófagos J774A.1 infectados com <i>M. tuberculosis</i> Erdmann ATCC35801 recombinante .....	28
3.5.8 Determinação da CIM frente ao <i>M. tuberculosis</i> H <sub>37</sub> Rv (ATCC 27294) em diferentes condições ambientais (pH 6,0; 2% de albumina e 10% de SFB).....	30
<b>4. Resultados e Discussão</b>	
4.1 Determinação da atividade anti- <i>M. tuberculosis in vitro</i> dos compostos de coordenação de metais e seus ligantes .....	32
4.2 Determinação da Citotoxicidade (IC <sub>50</sub> ) e do IS dos compostos de coordenação de metais.....	33
4.3 Compostos contendo tiossemicarbazona complexados a manganês (Mn) e cobalto (Co) .....	36
4.4 Determinação da Citotoxicidade (IC <sub>50</sub> ) dos compostos de coordenação de metais em 72 horas.....	38
4.5 Determinação da atividade intracelular em modelo de infecção <i>in vitro</i> de macrófagos J774A.1 infectados com <i>M. tuberculosis</i> Erdmann ATCC35801 recombinante .....	40
4.6 Determinação da CIM frente ao <i>M. tuberculosis</i> H <sub>37</sub> Rv (ATCC 27294) em diferentes condições ambientais (pH 6,0; 2% de albumina e 10% de SFB) ...	41
<b>5. Conclusão .....</b>	<b>43</b>
<b>6. Referências Bibliográficas .....</b>	<b>44</b>
<b>Capítulo 2</b>	
<b>Produção Bibliográfica .....</b>	<b>49</b>

## 1. INTRODUÇÃO

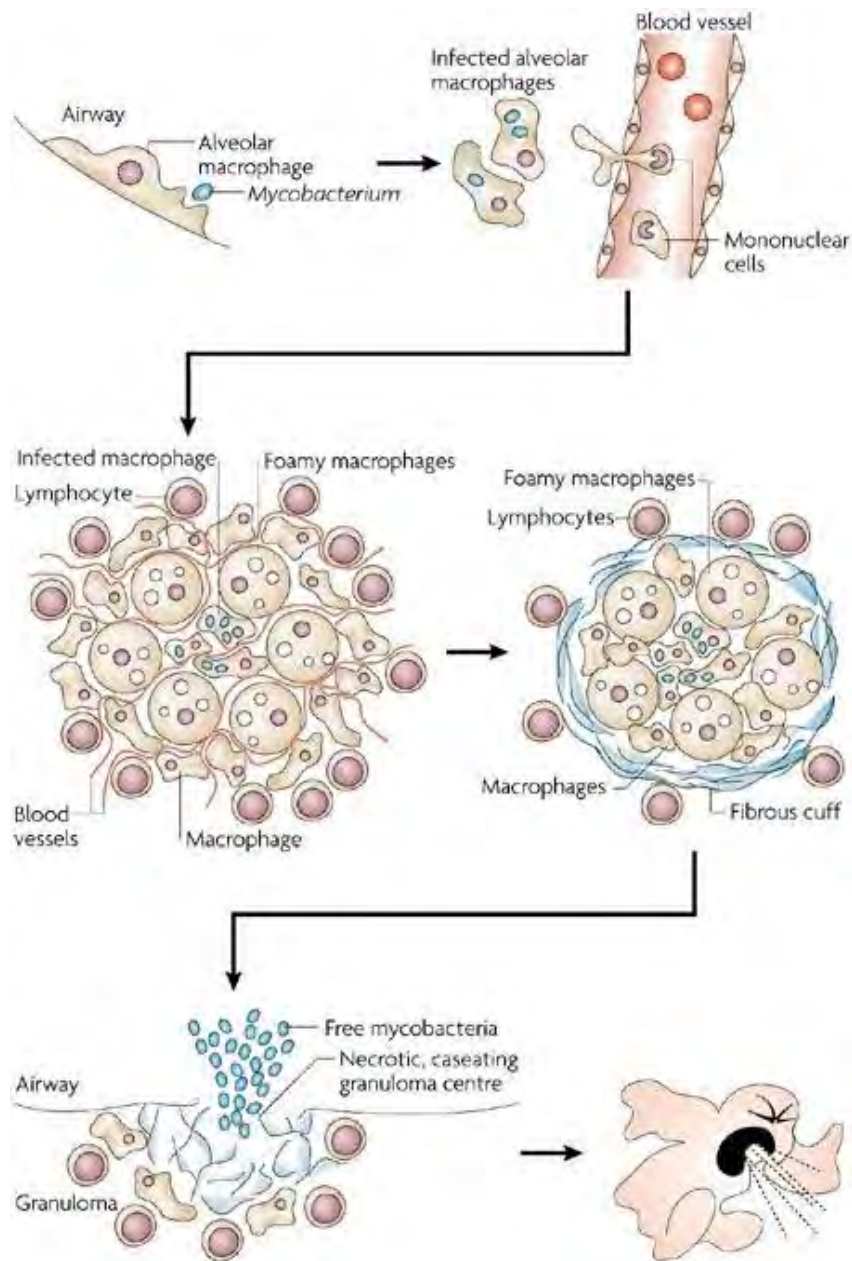
### 1.1 Tuberculose (TB)

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa que tem como principal patógeno o *Mycobacterium tuberculosis*. Esta bactéria identificada em 1882 por Robert Koch afeta comumente os pulmões; entretanto, outros órgãos podem ser afetados levando à forma não pulmonar. A doença continua sendo um importante problema de saúde pública mundial, exigindo o desenvolvimento de estratégias para o seu controle considerando aspectos humanitários, econômicos e de saúde pública (RAVIGLIONE et al. 2012).

Em geral, a bactéria é transmitida por aerossóis de pessoas que são contaminadas após a inalação do bacilo em núcleos de gotículas. Cerca de 10 a 30% das pessoas expostas adoecem e outras 60-90% desenvolverão resposta imune celular eficaz para conter a infecção com sucesso na qual o *M. tuberculosis* pode assumir o estado de latência (WARD, 2008; MANABE e BISHAI, 2000). Nesta fase de latência o bacilo não se encontra ativo, mas a infecção pode sofrer reativação anos mais tarde resultando em doença ativa (MOUTINHO, 2011).

A fase de latência é definida quando nos pulmões a bactéria é fagocitada por macrófagos alveolares induzindo uma resposta pró-inflamatória iniciando o processo de recrutamento de células mononucleares de vasos sanguíneos vizinhos. Os bacilos rodeados por células T, monócitos e macrófagos não podem se reproduzir e adquirem o referido estado. Nesta fase os bacilos não são infecciosos, podendo permanecer neste estado por muitos anos ou ocorrer o processo de reativação - forma mais comum de manifestação da tuberculose em adultos (**Figura 1**). Esta é frequentemente associada a condições de comprometimento do sistema imunológico, tais como: co-infecção com HIV, deficiência nutricional, idade avançada e estresse (RUSSELL, 2007).

Figura 1- Contaminação e resposta imunológica do organismo frente ao *M. tuberculosis*.



Fonte: Russel, 2007.

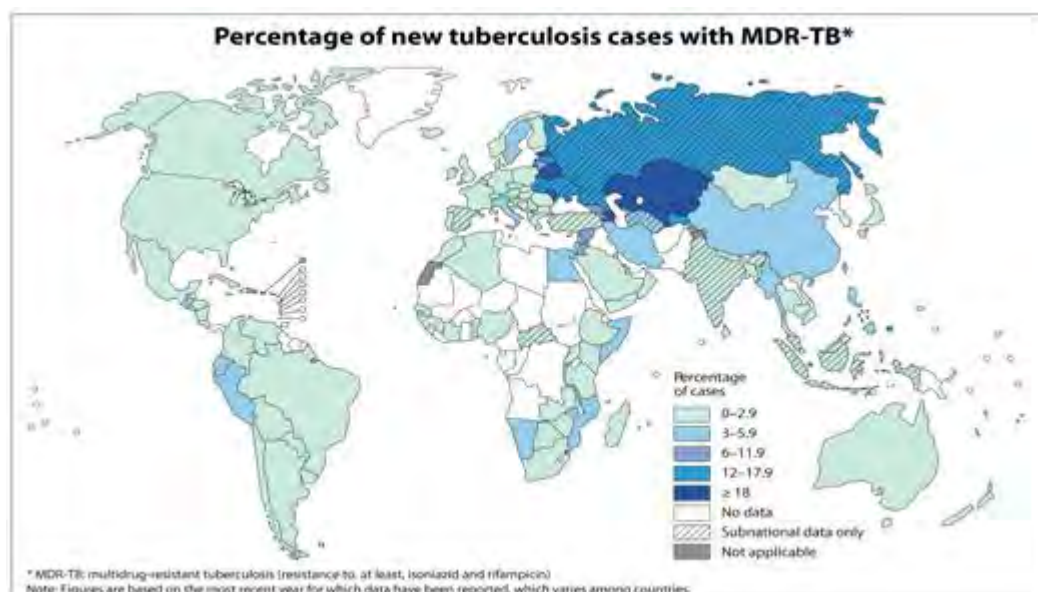
## 1.2 Epidemiologia, tuberculose multi resistente a fármacos (TB-MDR) e tuberculose de resistência estendida (TB-XDR)

Em 2011 foram notificados 8,7 milhões de casos da doença no mundo. Dos quais 1,1 milhão representam os casos de pacientes HIV positivos. No mesmo ano 1,4 milhão de pessoas morreram com TB, das quais 430.000 pessoas eram co-infectadas com HIV. A taxa de mortalidade da TB caiu 41% entre 1990 e 2011; e o mundo estaria a caminho de atingir a meta global de redução de 50% até 2015 (WHO, 2013).

Ao longo dos anos apesar da diminuição em números totais de casos da doença o cenário da TB supostamente otimista não se apresenta tão real assim. Isto se comprova pelo aumento de casos de TB multi resistente a fármaco (TB-MDR) e o aparecimento de cepas de resistência estendida (TB-XDR); como demonstrado nas **figuras 2 e 3** (WHO, 2013).

A TB-MDR é definida como a resistência a pelo menos os fármacos isoniazida (INH) e rifampicina (RFP) que são de primeira escolha na terapia. Já a forma TB-XDR caracteriza-se além da resistência a INH e RFP a também a qualquer das fluoroquinolonas além de um dos três fármacos injetáveis de segunda-linha (capreomicina, canamicina, e amicacina).

Figura 2 - Porcentagem de novos casos de TB-MDR no mundo.



Fonte: WHO, 2012.



Figura 3 - Países que até o final de 2011 notificaram ao menos um caso de TB-XDR.



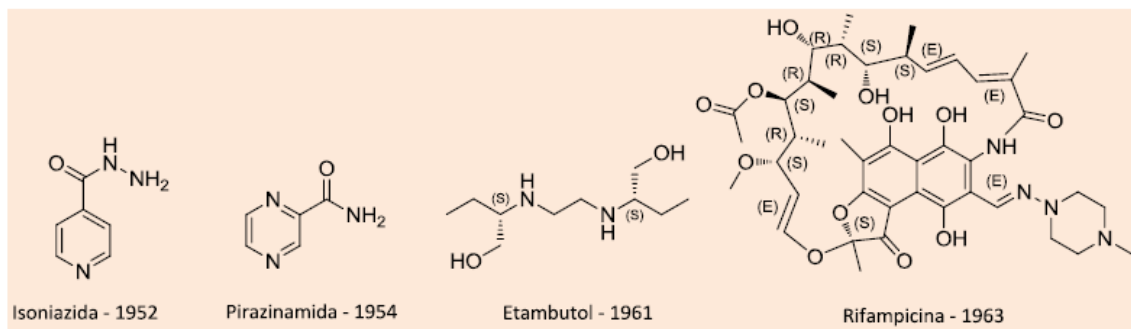
Fonte: WHO, 2012.

### 1.3 Histórico e evolução do tratamento

A estreptomicina (SM) produzida pela bactéria *Streptomyces griseus* e descoberta por Selman Waksman, em 1944, foi o primeiro fármaco efetivo para a TB. Oito anos decorreram (1952) para que a INH fosse descoberta, e posteriormente a RFP (1965). O etambutol (EMB) sintetizado em 1960, só passou a integrar a terapia da TB em 1968; assim como a pirazinamida (PZA) que apesar de sintetizada em 1936, somente em 1970 passa a compor a poliquimioterapia da doença (SOUZA e VASCONCELOS, 2005).

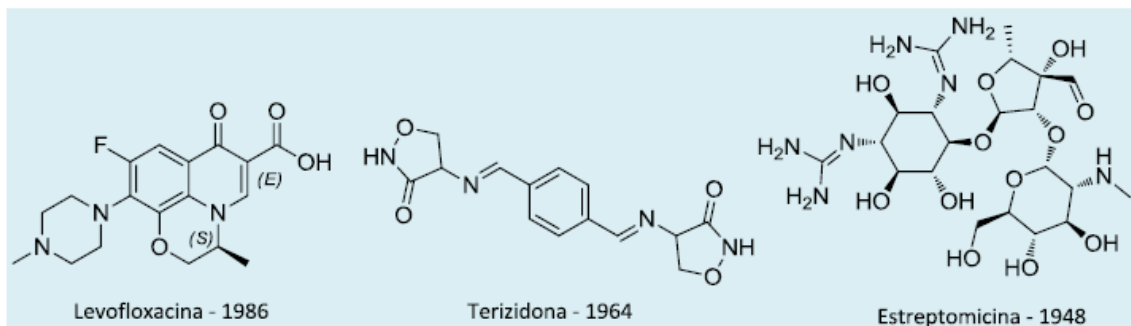
Os fármacos de primeira linha ou também chamados de primeira escolha do tratamento atual são: INH, RFP, PZA, EMB (**Figura 4**). Para os casos de falência do tratamento, devido a desistência ou mesmo às infecções resistentes, são utilizados além dos fármacos PZA e EMB, os fármacos ditos de segunda linha ou segunda escolha (**Figura 5**): SM, levofloxacina e terizidona (BRANCO et al 2012). Estes fármacos citados como segunda linha de tratamento compõem a terapia vigente, no entanto, há outros fármacos ditos também de segunda linha a exemplo dos injetáveis citados anteriormente no item 1.2..

Figura 4 - Fármacos de primeira escolha do tratamento de tuberculose



Fonte: Branco et al. 2012

Figura 5 - Fármacos de segunda escolha do tratamento de tuberculose.



Fonte: Branco et al. 2012

Para o tratamento básico a RFP, descoberta há mais de 50 anos, ainda representa o último modelo de fármaco introduzido no tratamento da TB. Juntamente com INH, EMB e PZA, a RFP faz parte de um regime de tratamento de 6 meses sendo ineficaz contra TB-MDR e TB-XDR, apresentando ainda antagonismo com muitos antiretrovirais em casos de co-infecção TB/HIV (GANDHI et al. 2010). A interação medicamentosa entre a terapia da TB e a do HIV dá-se ao fato da mesma enzima do citocromo P450 ser responsável pela metabolização destes fármacos (DOOLEY et al. 2012).

Tendo em vista a necessidade de um novo fármaco eficaz contra as cepas MDR, no dia 28 de dezembro de 2012 o FDA (*Food and Drug Administration*) aprovou o medicamento SIRTURO com a indicação de uso apenas a casos de TB-MDR (FDA, 2012).

#### 1.4 Pesquisas de novos fármacos contra TB

A pesquisa de novos fármacos, em um contexto geral, apresenta-se como um enorme desafio científico para a era moderna mesmo com toda tecnologia disponível. O uso irracional dos antimicrobianos por várias gerações têm selecionado cepas cada vez mais resistentes aos fármacos encontrados no mercado ou até mesmo às substâncias inéditas que nunca foram apresentadas ao micro-organismo. O *M. tuberculosis* torna esse desafio ainda mais difícil devido às suas características morfológicas (espessa parede lipídica com ácidos graxos de alto peso molecular) (LEDERER, 1977), e suas características fisiológicas (a bactéria pode ser encontrada em estado ativo ou em estado de latência) (RUSSEL, 2007).

Em vista desses fatores, espera-se que o novo fármaco contra a TB possa, principalmente: (i) reduzir a duração do tratamento; (ii) ser ativo contra cepas resistentes; (iii) não interferir com os retro-virais e (iv) ser ativo contra bacilos em estado de latência (MA et al. 2010).

Para o desenvolvimento de novos agentes anti-TB, duas principais abordagens têm sido empregadas (SIRIAM et al. 2006). Uma delas é baseada na síntese de análogos de fármacos existentes com o objetivo de reduzir o tempo de tratamento da TB bem como melhorá-lo. A outra envolve a busca de novas estruturas com as quais a micobactéria nunca tenha sido apresentada antes (TARALLO et al. 2010) (**Figura 6**). Neste trabalho foram investigadas as duas abordagens de síntese: metais coordenados a ligantes (novas estruturas) e metais complexados com derivados de fármacos do tratamento (análogos). Mais especificamente, novos compostos de coordenação, visando obter compostos anti-TB novos e mais eficazes para implementar a terapêutica atual.

Figura 6 - Abordagens para pesquisa de novos fármacos anti-TB



Para a investigação da atividade biológica dessas moléculas, duas principais abordagens têm sido utilizadas: triagem baseada em alvo ou seleção fenotípica. A triagem baseada em alvo compreende a aplicação de conhecimentos moleculares para se investigar hipóteses específicas, possibilitando a triagem de moléculas pequenas através de programas computacionais. A desvantagem é que nem sempre os fatores relevantes nesta análise computacional correspondem aos relevantes para o patógeno como um todo (SWINNEY e ANTHONY, 2011).

Em contrapartida, a triagem fenotípica não exige um conhecimento prévio. A substância em estudo é colocada à frente do patógeno para análise. Os ensaios podem ser traduzidos de forma mais eficaz. Uma desvantagem dessa abordagem é o desafio de otimizar as propriedades moleculares do candidato a fármaco, devido a ausência de prévio conhecimento quanto ao seu mecanismo de ação (SWINNEY e ANTHONY, 2011).

Frente às duas possíveis abordagens, a triagem fenotípica tem se revelado mais eficaz na busca de novas moléculas e conseqüente aprovação de novos fármacos (SWINNEY e ANTHONY, 2011).

O desenvolvimento dessa dissertação compreendeu a busca de novas moléculas utilizando abordagens fenotípicas.

### 1.5 Química Inorgânica Medicinal

A química inorgânica medicinal tem mostrado ser uma ferramenta em potencial para superar os problemas do tratamento da TB. É sabido que muitos

elementos metálicos desempenham papel crucial em sistemas vivos (OLIVEIRA et al. 2006).

Há uma vasta literatura acerca de compostos inorgânicos e atividade anti-tuberculose.

Sandbhor e colaboradores (2002) demonstraram que a complexação do cobre ao ligante carboxamidrazona mostrou-se vantajosa. Devido à coordenação houve um aumento da lipossolubilidade contribuindo para uma maior permeabilidade do composto através da parede da micobactéria - essencialmente composta por ácidos graxos de alto peso molecular.

Tarallo e colaboradores (2010) pesquisaram dois novos complexos de ferro com a ação bacteriostática e bactericida contra *M. tuberculosis*. Os dois complexos apresentaram atividade comparada aos fármacos de segunda linha de tratamento da TB (estreptomicina: CIM= 1,00 µg/mL) além da baixa toxicidade para células eucarióticas. Sugerindo uma especificidade de ação dos compostos.

Pavan e colaboradores (2010) demonstraram que compostos de coordenação de rutênio com ligante picolinato possuem atividade contra *M. tuberculosis*. A ação bacteriostática do ligante picolinato já é descrita na literatura para outras micobactérias. A complexação na forma espacial *cis*- mostrou-se vantajosa por aumentar esta atividade em 64 vezes do complexo em relação ao seu ligante.

Considerando que os íons metálicos são deficientes de elétrons, e que a maioria das moléculas biológicas, tais como proteínas e DNA são ricos em elétrons, a atração destas cargas opostas leva a uma tendência geral dos íons metálicos em se ligar e interagir com essas moléculas biológicas. Além disso, a relação estrutura-atividade (REA) não apenas evidencia que a complexação com o metal pode aumentar a atividade antimicobacteriana do ligante - principalmente se este já for um fármaco - mas também indica que o metal desempenha um papel relevante por si só (BERNHARDT et al. 2008).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Determinar a atividade anti-*M. tuberculosis* de diferentes grupos de compostos de coordenação e selecionar a partir dos menos tóxicos, os mais promissores para ensaios específicos envolvendo atividade intracelular e extracelular em diferentes condições ambientais (pH 6,0; 2% de albumina e 10% de soro fetal bovino).

### 2.2 Objetivos específicos

- Determinar a CIM frente ao *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv (ATCC 27294) em condições ambientais normais (pH 6,6).
- Determinar a citotoxicidade frente às células VERO (ATCC CCL81) e macrófagos J774A.1 (ATCC TIB-67).
- Determinar a atividade intracelular em modelo de infecção *in vitro* de macrófagos J774A.1 infectados com *M. tuberculosis* Erdmann ATCC 35801 recombinante, contendo o gene *luxA* (plasmídeo pSMT1) proveniente do *Vibrio harveyi*
- Determinar a CIM frente ao *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv (ATCC 27294) em diferentes condições ambientais (pH 6,0; 2% de albumina e 10% de soro fetal bovino).

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Amostras**

##### **3.1.1 Compostos de coordenação de metais**

Os compostos analisados foram sintetizados por diferentes grupos de pesquisa que trabalham com diferentes ligantes complexados aos metais: Au, Mn, Fe, Co, V, Cu, Zn, Ni, Ru, Ag e Pd.

As soluções estoque de 10.000 µg/mL foram solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO).

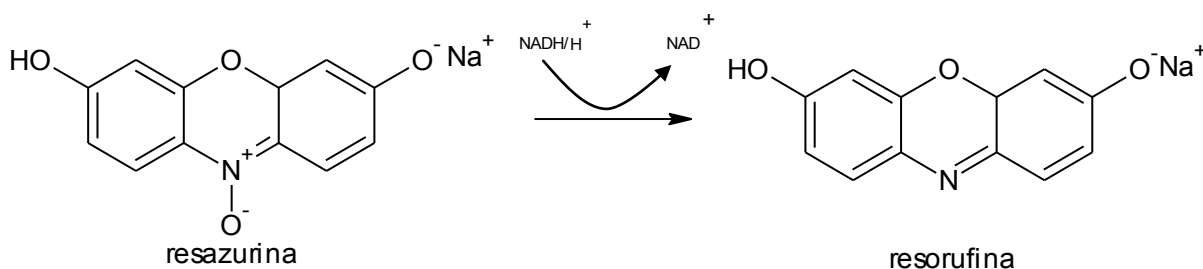
##### **3.1.2 Fármacos de referência**

Foram utilizadas soluções estoque de isoniazida (Sigma<sup>®</sup>) de concentração 10.000 µg/mL em água destilada e de rifampicina (Sigma<sup>®</sup>) de concentração 10.000 µg/mL em DMSO como fármacos de referência para a padronização das metodologias.

#### **3.2 Solução reveladora**

A solução reveladora dos ensaios de atividade e citotoxicidade foi a resazurina a uma concentração de 0,01% em água estéril. Esta apresenta um potencial redox (Óxido-Redução), com mudança colorimétrica e propriedade fluorescente em resposta ao metabolismo celular (**Figura 7**).

Figura 7- Reação de óxido-redução da resazurina frente ao metabolismo celular.



### 3.3 Cepas Bacterianas

Foi utilizada a cepa MTB H<sub>37</sub>Rv – ATCC 27294 e MTB Erdman ATCC 35801. Os criotubos contendo a suspensão bacilar em água destilada estéril foram mantidos em freezer -80°C até o momento de uso.

### 3.4 Linhagens Celulares

#### 3.4.1 Macrófagos J774A.1 (ATCC TIB-67) e VERO (ATCC CCL81)

Foram utilizadas as linhagens celulares VERO (células epiteliais de primata) (ATCC CCL81) e macrófagos (de murino) J774A.1 (ATCC TIB-67) - mantidas congeladas (-80°C) até o momento do uso. As células foram congeladas com o respectivo meio de cultura com 5% de DMSO.

### 3.5 Metodologias

#### 3.5.1 Preparo das suspensões bacilares de *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv – ATCC 27294 e *M. tuberculosis* Erdmann ATCC 35801 recombinante.

A partir de uma alíquota de 800 µL da cepa de *M. tuberculosis* congelada a -80°C foi realizada a suspensão bacilar em 200 mL de meio Middlebrook 7H9 (BD®) enriquecido com OADC (ácido oleico, albumina, dextrose e catalase) (BD/BBL®) na proporção de 10:1, respectivamente, de maneira a se obter uma grande quantidade de massa bacilar. Para o *M. tuberculosis* Erdmann ATCC



35801 recombinante foi acrescentado 200µL do fármaco higromicina para preservação do plasmídeo no interior bacteriano.

Após aproximadamente 10 dias de incubação à 37°C, a suspensão de micobactérias obtida foi centrifugada a 3000 rpm por 10 minutos e lavada por 2 vezes com água destilada estéril. O sedimento obtido foi ressuspensão em 10 mL de água destilada estéril. Este foi aliquoteado em criotubos (800 µL em cada) que foram congelados a -20°C por duas horas e após este período armazenados a -80°C até o momento de uso.

A avaliação da população bacilar viável para a cepa *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv – ATCC 27294 foi realizada pelo plaqueamento de uma alíquota da suspensão em meio de Middlebrook 7H11 (BD<sup>®</sup>) enriquecido com OADC nas seguintes diluições: 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup> e 10<sup>-5</sup>.

Para o *M. tuberculosis* Erdmann ATCC 35801 recombinante, a avaliação da população bacilar viável foi realizada por leitura de absorbância e comparada a Escala de Mac Farland. No momento do ensaio, a concentração foi ajustada para a Escala 1 de Mac Farland a fim de atingir a concentração necessária de bactérias. Esta diluição foi realizada com meio de cultura RPMI (Vitrocell<sup>®</sup>).

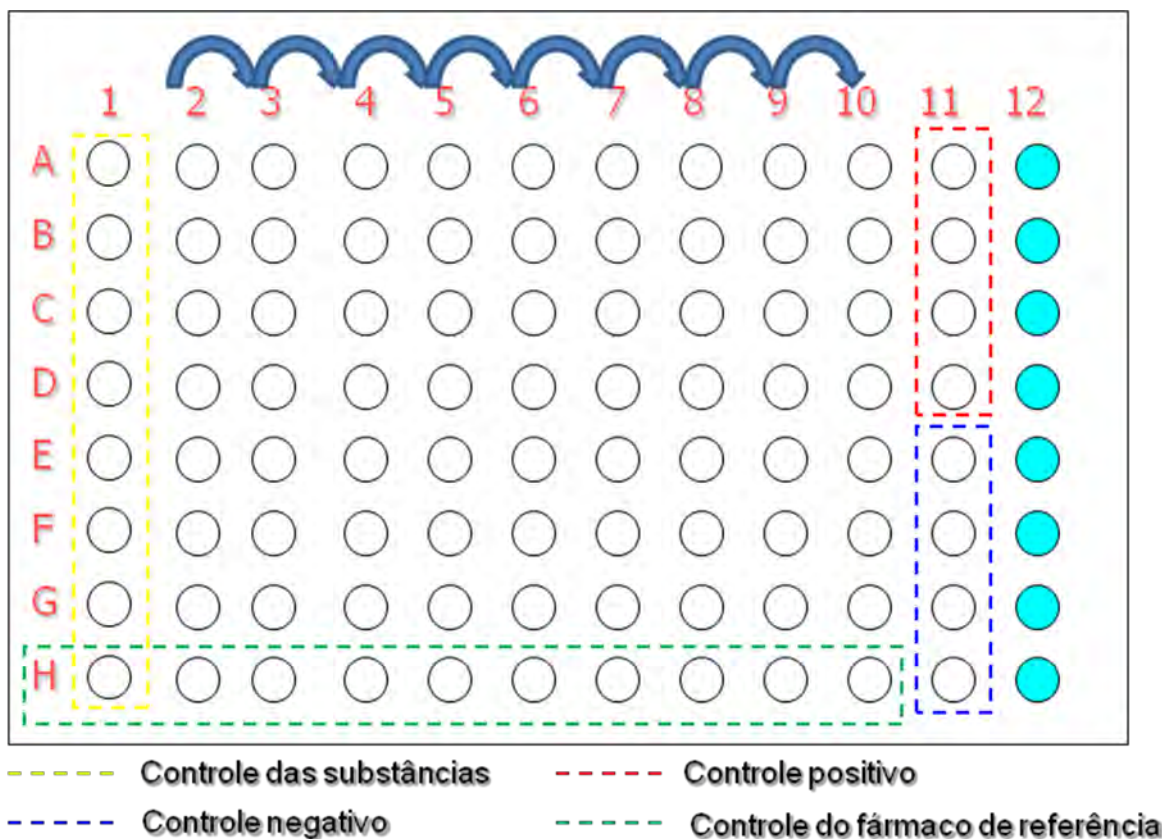
### **3.5.2 Determinação da atividade anti – *M. tuberculosis in vitro* dos compostos de coordenação de metais e seus ligantes utilizando a resazurina como revelador da reação**

A CIM (Concentração Inibitória Mínima) foi determinada empregando a metodologia padronizada por Palomino (PALOMINO *et al.* 2002). Em uma microplaca estéril de 96 orifícios (**figura 8**) foram depositados os seguintes volumes de meio Middlebrook 7H9 enriquecido com OADC: 150µL nos controles dos compostos analisados (coluna 1); 200µL na coluna de hidratação (coluna 12); 100µL nos controles positivos (poços A, B, C e D da coluna 11); 200µL nos controles negativos (poços E, F, G e H da coluna 11) e 100µL demais orifícios da placa (colunas 2 à 10). Em seguida foi realizada diluição seriada de maneira a se obter concentrações variáveis de isoniazida (de 0,01 a 1,00 µg/mL) e dos compostos (de 0,09 a 25,00 µg/mL) – na própria placa. Na coluna 1 foram depositados 50 µL dos compostos para controle de esterilidade. A cepa de *M.*

*tuberculosis* H<sub>37</sub>R<sub>V</sub> – ATCC 27294 congelada foi diluída até atingir a concentração de 10<sup>5</sup> UFC/mL. A seguir, 100 µL da suspensão foi inoculada em cada um dos orifícios contendo as soluções de isoniazida, dos compostos e no controle positivo. A microplaca foi selada com parafilme e papel alumínio; sendo incubada à 37°C.

Após sete dias de incubação foi adicionado o volume de 30 µL da resazurina diluída em água estéril (0,01%) por toda placa, sendo esta reincubada à 37°C por 24 horas.

Figura 8 - Representação esquemática do preparo da microplaca da técnica *Resazurin Microtiter Assay* (REMA).



Após este período, foi realizada a leitura visual e a interpretação da fluorescência no SpectraFluor Plus (TECAN®; filtros: 530nm de excitação e 590nm

de emissão). A análise da leitura da placa foi realizada com auxílio de uma planilha do Excel para a determinação da CIM.

O revelador age como indicador da multiplicação celular e/ou viabilidade; que para a resazurina a cor azul representa a ausência de multiplicação/viabilidade celular e a rosa multiplicação ou presença de viabilidade (PALOMINO *et al.* 2002). A CIM é, então, definida como a menor concentração do composto capaz de inibir a multiplicação de 90% da cepa de *M. tuberculosis*, ou seja, a menor concentração do composto capaz de impedir a mudança da cor azul para rosa.

Compostos que apresentaram  $CIM \leq 12,5 \mu\text{g/mL}$  foram considerados promissores, e selecionados para a próxima etapa: determinação da citotoxicidade.

### **3.5.3 Cultivos Celulares**

#### **3.5.3a Macrófagos J774A.1 (ATCC TIB-67)**

A linhagem celular J774A.1 corresponde a macrófagos de murino. As amostras foram descongeladas e cultivadas em garrafas com superfície em torno de  $12,50 \text{ cm}^2$  contendo 10 mL de meio RPMI (Vitrocell<sup>®</sup>) enriquecido com 10% de soro fetal bovino, sulfato de gentamicina (50 mg/L) e anfotericina B (2 mg/L). As garrafas foram incubadas à 35°C com 5% de CO<sub>2</sub> até atingir a confluência celular. A partir deste estágio as células foram retiradas para o ensaio.

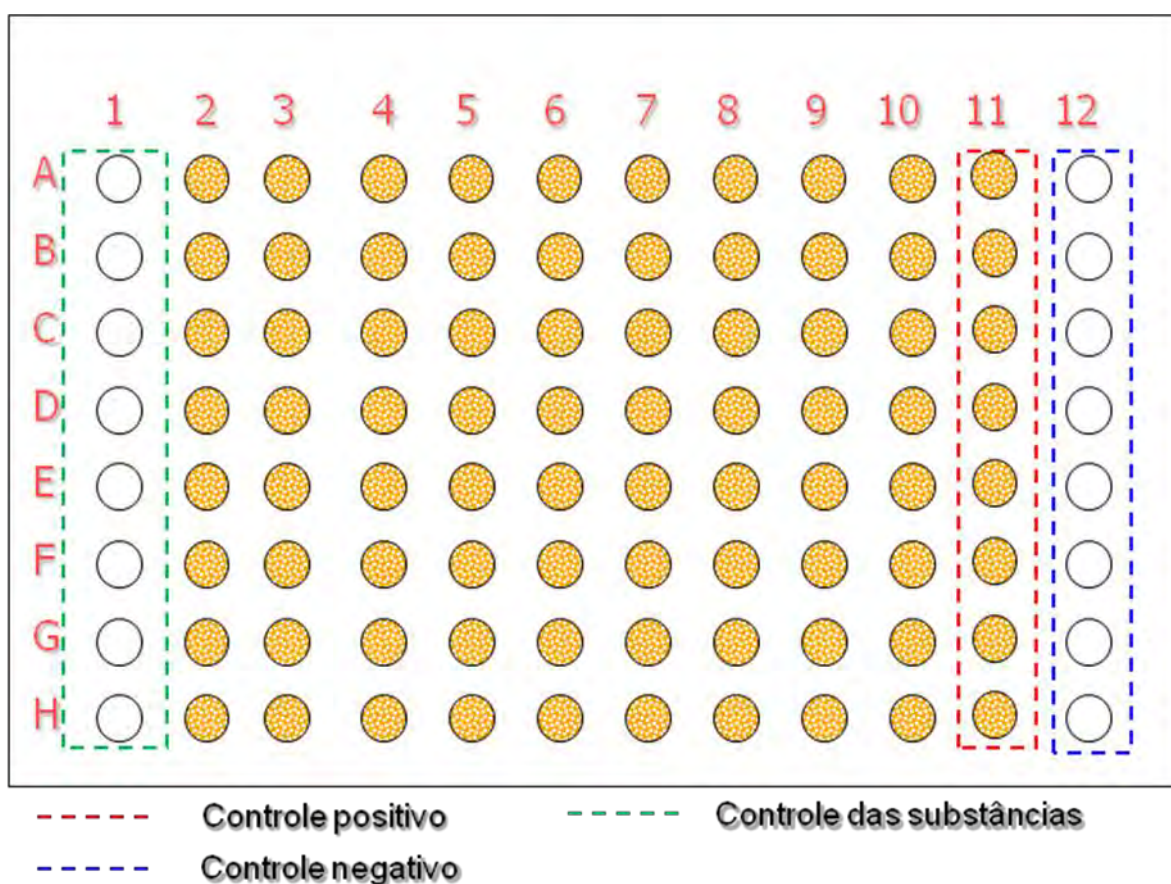
#### **3.5.3b VERO (ATCC CCL81)**

A linhagem celular VERO ATCC CCL81 trata-se de células epiteliais de primata. As amostras foram descongeladas e cultivadas em garrafas com superfície em torno de  $12,50 \text{ cm}^2$  contendo 10 mL de meio DMEM (Vitrocell<sup>®</sup>) enriquecido com 10% de soro fetal bovino, sulfato de gentamicina (50 mg/L) e anfotericina B (2 mg/L). As garrafas foram incubadas à 35°C com 5% de CO<sub>2</sub> até atingir a confluência celular.

### **3.5.4 Determinação da citotoxicidade (IC<sub>50</sub>) dos compostos de coordenação com metais.**

Após a confluência celular as células J774A.1 foram retiradas por raspagem utilizando *scraper* e as células VERO utilizando solução de tripsina/EDTA (Vitrocell®). Ambas células foram contadas em Câmara de Neubauer a fim de ajustar a concentração. Para cada ensaio de IC<sub>50</sub>, 1 x 10<sup>5</sup> cels/mL (J774A.1) e 3,4 x 10<sup>5</sup> cels/mL (VERO), foram semeadas em microplaca de 96 orifícios (**Figura 9**) permitindo um volume final de 200 µL e incubadas por 24 h à 37°C com 5% CO<sub>2</sub> para permitir a adesão celular antes da análise com os complexos.

Figura 9 – Representação esquemática do preparo da microplaca para a determinação da citotoxicidade (IC<sub>50</sub>).



Após o período de incubação, em outra placa de 96 orifícios, as soluções dos compostos em concentrações de 10000µg/mL foram preparadas em DMSO à 5% e submetidas à diluição seriada em meio DMEM ou RPMI (de acordo com a linhagem celular utilizada) com intervalo de 2,00 à 500,00 µg/mL. Estas soluções foram

transferidas à placa de células, a fim destas serem expostas aos compostos nas diferentes concentrações por 24 h.

Após esta segunda incubação foram aplicados 30 µL de resazurina em cada orifício na concentração de 0,01% e incubadas por 6 h; para após este período ser realizada a leitura final.

A leitura final foi baseada na interpretação da fluorescência no SpectraFluor Plus (TECAN®). O valor de IC<sub>50</sub> é definido como a maior concentração do composto em que 50% das células permanecem viáveis.

Como controle, o IC<sub>50</sub> do DMSO foi determinado em cada ensaio (PAVAN et al. 2010).

### **3.5.5 Determinação do índice de seletividade (IS)**

A critério de seleção dos compostos de coordenação de metais foi utilizado o cálculo do índice de seletividade (ORME et al. 2001) dado pela razão entre o IC<sub>50</sub> e a CIM (IS = IC<sub>50</sub>/CIM). Foram considerados promissores os complexos cujo IS se igualou ou foi superior a 10. Ou seja, a concentração na qual o composto é citotóxico dista em pelo menos 10 vezes da qual ele é ativo contra o bacilo da tuberculose.

### **3.5.6 Determinação da citotoxicidade (IC<sub>50</sub>) dos compostos de coordenação de metais em 72 horas frente a linhagem de macrófagos J774A.1 (ATCC TIB-67).**

O ensaio foi realizado segundo a metodologia descrita no item 3.5.4 sendo alterado o período de incubação das células expostas aos compostos para 72 horas.

### **3.5.7 Determinação da atividade intracelular em modelo de infecção *in vitro* de macrófagos J774A.1 infectados com *M. tuberculosis* Erdmann ATCC 35801 recombinante.**

A determinação da atividade intracelular empregando-se o *M. tuberculosis* Erdman ATCC 35801, contendo o plasmídeo pSMT1, foi realizada segundo a técnica proposta por Snewin (SNEWIN et al.1999) e padronizada nos moldes segundo Sato (SATO 2003).

A monocamada de macrófagos J774 foi coletada por raspagem (utilizando *scraper*), centrifugada (1500 rpm por 10 minutos) e o número de células

quantificada em câmara de Newbauer e ajustada para  $5 \times 10^5$  cel/mL em meio RPMI 1640. Inicialmente em uma microplaca transparente estéril de 24 orifícios (TPP®), foram depositados, em cada orifício, 1000  $\mu$ L desta suspensão, permanecendo com a concentração celular de  $5 \times 10^5$  cel/orifício. A placa foi incubada a 35°C com 5% de CO<sub>2</sub>, por 24-horas para aderência celular à placa. A seguir, o meio de cultura RPMI foi retirado e o tapete de células lavado com solução tamponada de Hank's (Sigma® pH 7,0). Foi adicionado então em todos os orifícios, 1000  $\mu$ L da suspensão de micobactérias preparada em meio RPMI 1640, de maneira a se obter de 1 a 5 micobactérias/célula, e incubadas à 35°C com 5% de CO<sub>2</sub> por 2 horas para posterior fagocitose (**Figura 10**).

Após este tempo, a suspensão de micobactérias foi retirada e o tapete de células foi lavado com solução tamponada de Hank's para eliminar as micobactérias extracelulares.

O número de micobactérias que infectaram as células foi chamado T0 e determinado pela lise de dois orifícios contendo o tapete de células, com 1000  $\mu$ L da solução aquosa de Triton 0,1% (Sigma®). Em uma microplaca branca de 96 orifícios foi adicionado 180  $\mu$ L desta suspensão proveniente da lise das células e adicionado 20  $\mu$ L de n-decil-aldeído a 1% em etanol e realizada leitura da luminescência no aparelho SPECTRAfluor Plus (TECAN®), com parâmetros de *Luminescence Integration Time* de 100 e *Gain* de 200 sendo os resultados expressos em URL (Unidade Relativa de Luz).

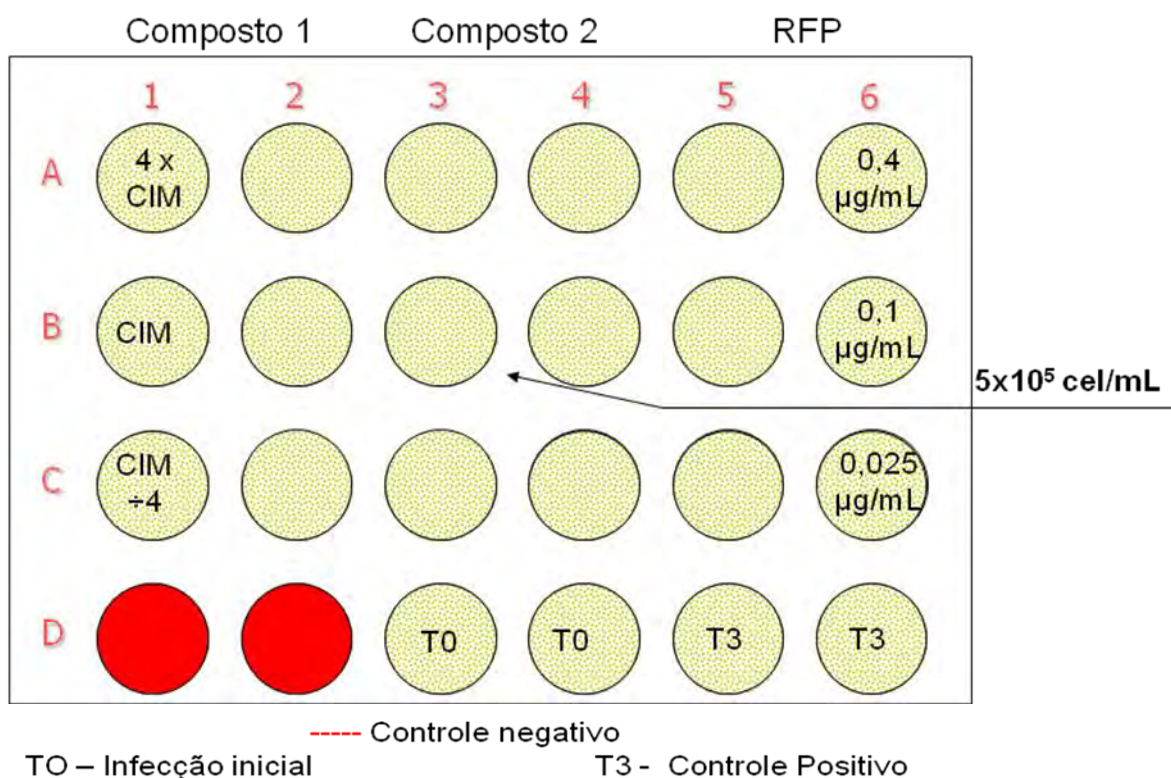
Confirmada a infecção, após visualização de luz no tempo T0, foram adicionados 1000  $\mu$ L de cada diluição das substâncias em análise nas concentrações do valor de CIM, 4x superior e 4x inferior ao CIM, em duplicata, em três orifícios da microplaca. Como controle do ensaio foi utilizada a rifampicina em concentrações de 0,40; 0,10 e 0,03  $\mu$ g/mL.

As microplacas foram incubadas a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> por 3 dias. Após este período, foi realizado novamente a lavagem do tapete de células com solução tamponada de Hank's, e as células infectadas submetidas à lise. Células de todos os orifícios foram lisadas com 1000  $\mu$ L da solução aquosa de Triton a 0,1% e a luminescência avaliada. A porcentagem de inibição de multiplicação bacteriana intracelular foi determinada aplicando-se a fórmula a seguir, considerando a igual à

média da leitura em URL dos orifícios controle-positivos T3 (orifícios com células e bactérias interiorizadas) e **b** o resultado em URL de cada orifício com a respectiva diluição do composto em análise.

$$100 \times [1 - b/a] = \% \text{ de inibição da multiplicação bacteriana intracelular}$$

Figura 10- Representação esquemática do preparo da microplaca para a determinação da atividade intracelular.



### 3.5.8 Determinação da CIM frente ao *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv (ATCC 27294) em diferentes condições ambientais (pH 6,0; 2% de albumina e 10% de soro fetal bovino).

O estudo do item 3.5.2., foi estendido empregando as três condições ambientais distintas, consistindo em: ajuste do meio de cultura para o pH 6,0;

incorporação de 2% de albumina no meio de cultura; e 10% de SFB (FRANZBLAU et al. 2012). Como controle, a CIM da RFP foi determinada em cada ensaio. Cada ensaio foi realizado em triplicata.

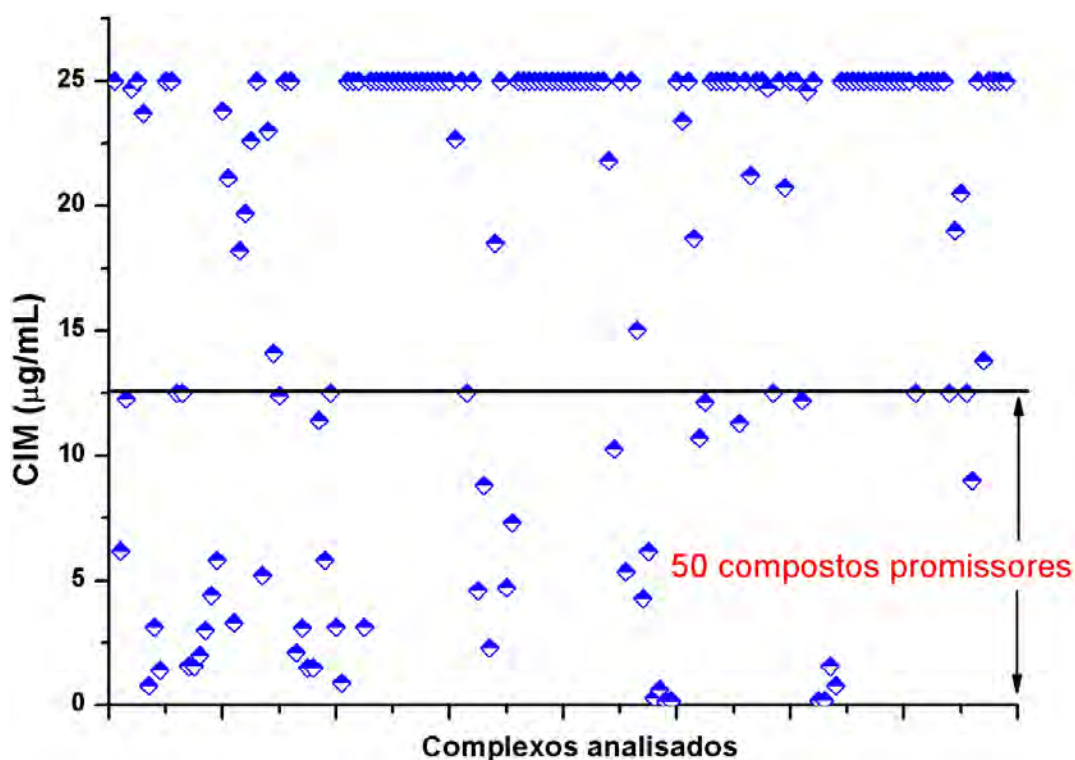


## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Determinação da atividade anti – *M. tuberculosis in vitro* dos compostos de coordenação de metais e seus ligantes.

O **Gráfico 1** representa os resultados da CIM encontrados a partir da metodologia do REMA para os 136 compostos de coordenação de metais e 22 ligantes analisados.

Gráfico 1- Resultados da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos 158 compostos analisados (136 complexos e 22 ligantes).



Foram considerados promissores os compostos de coordenação de metais cuja CIM se igualou ou foi inferior a 12,50 µg/mL (ORME et al. 2001). Dentre os compostos analisados, 50 apresentaram valores de CIM dentro do intervalo

considerado promissor (excluiu-se os ligantes com atividade promissora). Estes prosseguiram para a determinação da citotoxicidade ( $IC_{50}$ ) frente às células VERO.

#### 4.2. Determinação da citotoxicidade ( $IC_{50}$ ) e do IS dos compostos de coordenação de metais.

O **gráfico 2** apresenta os resultados de Citotoxicidade ( $IC_{50}$ ) e o gráfico 3 o IS frente a células VERO para os 29 compostos de coordenação de metais e 2 ligantes analisados.

Gráfico 2- Resultados de Citotoxicidade ( $IC_{50}$ ) frente a células VERO para os 29 compostos de coordenação de metais e 2 ligantes analisados.

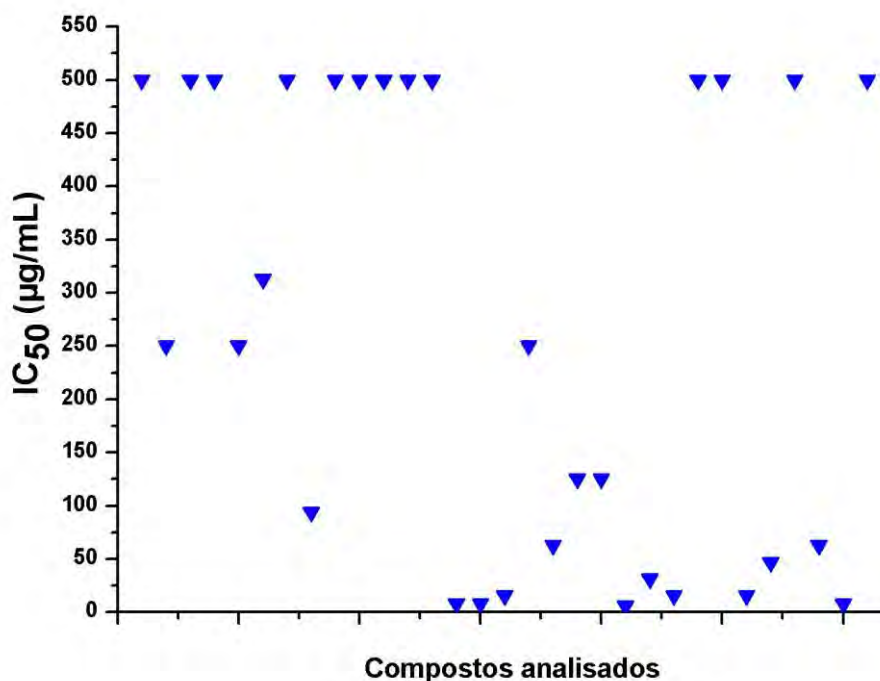
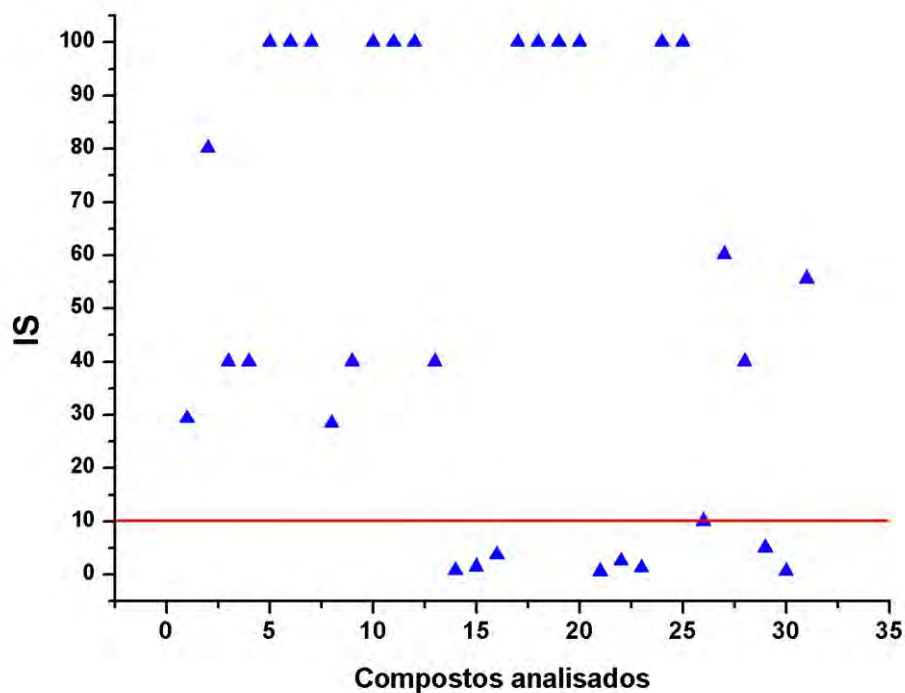


Gráfico 3- Resultados de IS frente a células VERO para os 29 compostos de coordenação de metais e 2 ligantes analisados.



Dentre os compostos analisados, 21 apresentaram perfil promissor (excluí-se os ligantes com atividade promissora), com IS superior a 10, ou seja, a concentração em que são ativos distancia em pelo menos 10 vezes da concentração em que são tóxicos.

Os 21 compostos e os 2 ligantes com resultados promissores foram submetidos ao ensaio de citotoxicidade frente a linhagem celular de macrófagos J774A.1

O **gráfico 4** apresenta os resultados de Citotoxicidade ( $IC_{50}$ ) e o gráfico 5 o IS frente a linhagem de macrófagos J774A.1 para os 21 compostos e 2 ligantes analisados.

Gráfico 4- Resultados de Citotoxicidade ( $IC_{50}$ ) frente a linhagem de macrófagos J774A.1 para os 21 compostos de coordenação de metais e 2 ligantes analisados.

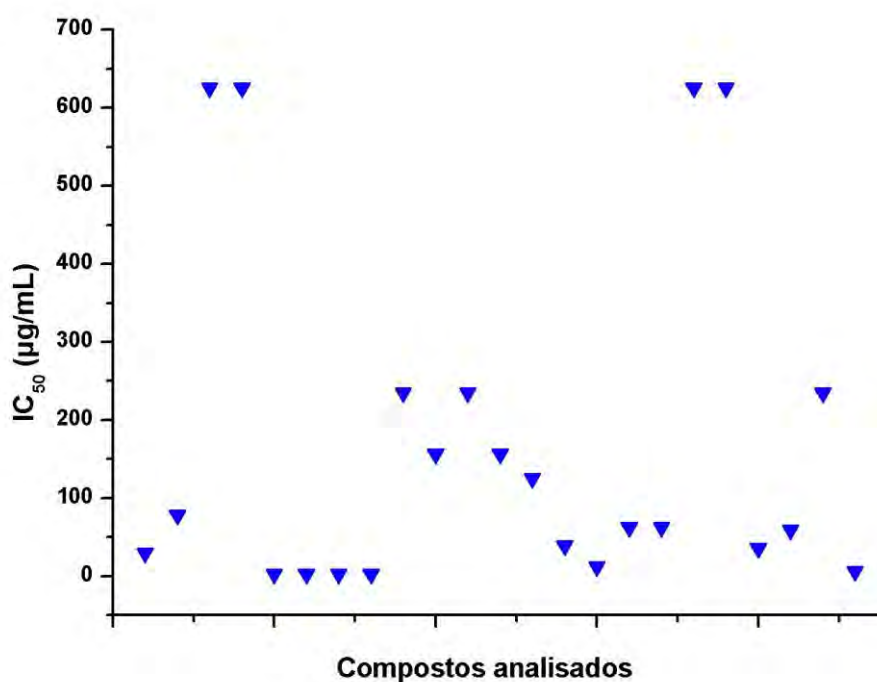
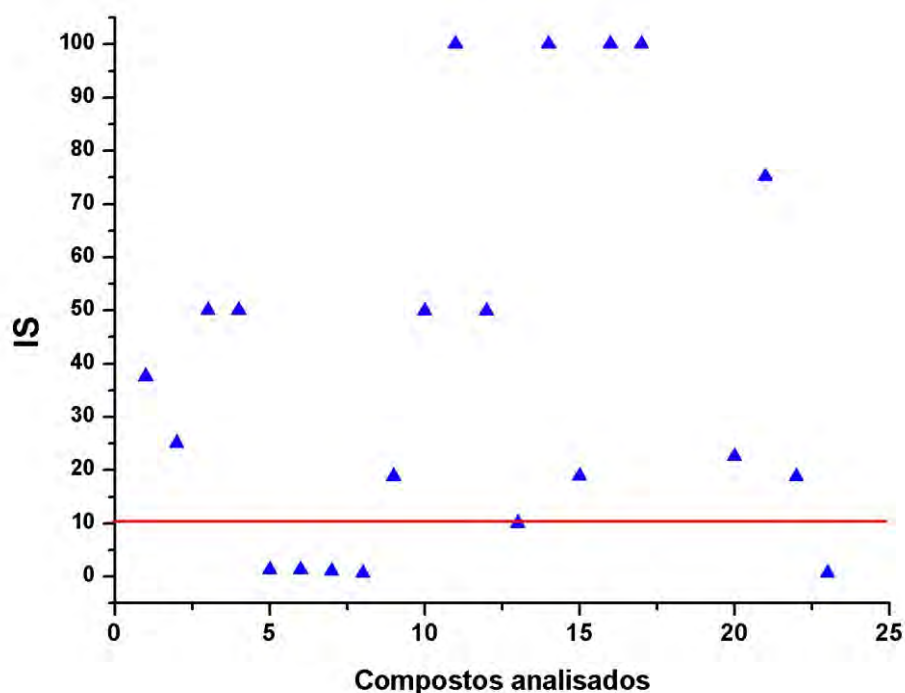


Gráfico 5- Resultados de IS frente a linhagem de macrófagos J774A.1 para os 21 compostos de coordenação de metais e 2 ligantes analisados.



Foram considerados promissores os compostos de coordenação de metais cujo IS se igualou ou foi superior a 10. Dentre os 21 compostos analisados (excluí-se os ligantes) 16 apresentaram perfil promissor.

#### 4.3 Compostos contendo tiossemicarbazona complexados a manganês (Mn) e cobalto (Co).

Dentre os 16 compostos de coordenação de metais promissores, quatro (**Figura 11**) foram selecionados para os próximos ensaios. Estes quatro compostos foram sintetizados pela aluna Carolina Gonçalves Oliveira orientada pelo prof. Prof. Dr. Victor Marcelo Deflon do Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo (OLIVEIRA, 2013).

Segue abaixo as estruturas e os resultados obtidos (**Tabela1**) nos ensaios já descritos.

**Figura 11 -** Compostos contendo tiossemicarbazona complexados a manganês (Mn) e cobalto (Co).

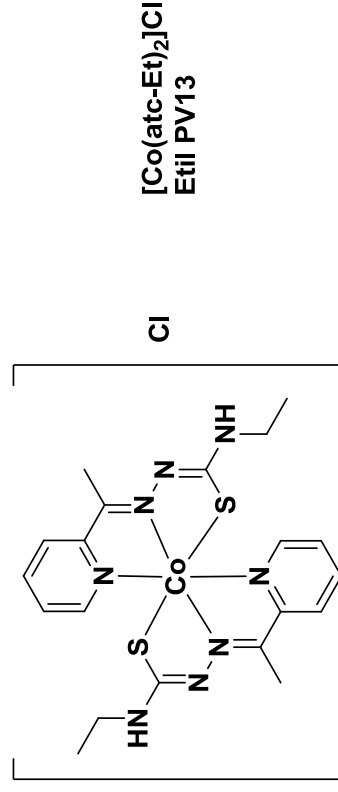
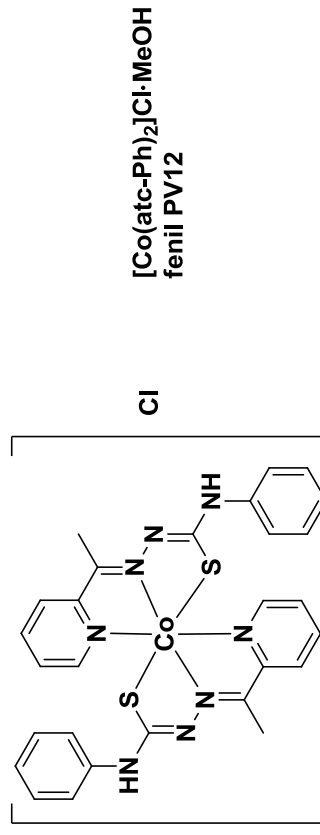
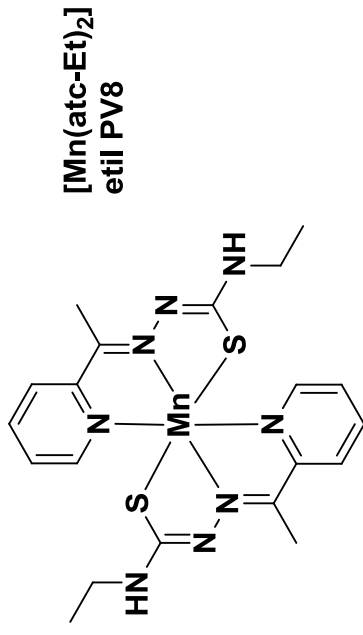
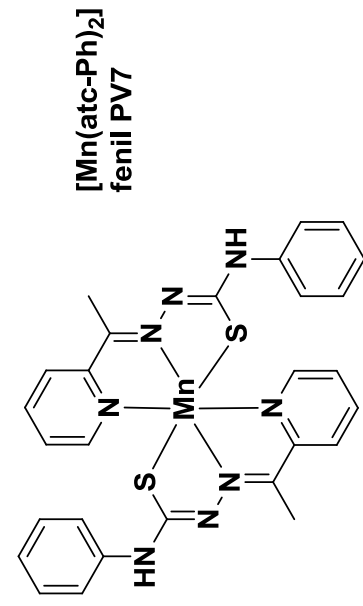


Tabela 1- Resultados de CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ), IC<sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ ) e IS frente a células VERO e J774A.1.

Compostos de coordenação de metais	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )	CIM ( $\mu\text{M}$ )	IC <sub>50</sub>		IS		IC <sub>50</sub>		IS	
			VERO ( $\mu\text{g/mL}$ )	VERO ( $\mu\text{M}$ )	VERO	VERO	Macrof. Macrof. ( $\mu\text{g/mL}$ )	Macrof. Macrof. ( $\mu\text{M}$ )		
[Mn(atc-Ph) <sub>2</sub> ]	0,78	1,31	>500,00	>822	>641,03	>627	19,5	32,8	25,0	50,2
[Mn(atc-Et) <sub>2</sub> ]	3,12	6,64	250,00	532,5	80,13	80,2	78,10	166	25,03	25
[Co(atcPh) <sub>2</sub> ]Cl.MeOH	12,50	18,8	>500,00	>751	>40,00	>40	625,00	940	50,00	50
[Co(atc-Et) <sub>2</sub> ]Cl	12,50	23,3	>500,00	>931	>40,00	>40	625,00	1163	50,00	50

#### 4.4 Determinação da citotoxicidade (IC<sub>99</sub>) dos compostos de coordenação com metais em 72 horas.

Como pré-requisito para o ensaio de infecção intracelular, foi determinado o IC<sub>99</sub> (Tabela 2) com período de incubação de 72 horas, frente a linhagem de macrófagos.

Tabela 2 – Resultados de citotoxicidade ( $\mu\text{g/mL}$ ) e CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) dos compostos de coordenação com metais frente à linhagem celular J774A.1, em 72 horas.

<b>Compostos de coordenação de metais</b>	<b>CIM (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>IC<sub>99</sub> (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>
[Mn(atc-Ph) <sub>2</sub> ]	0,78	<2,00
[Mn(atc-Et) <sub>2</sub> ]	3,12	<2,00
[Co(atc-Ph) <sub>2</sub> ]Cl.MeOH	12,50	31,30
[Co(atc-Et) <sub>2</sub> ]Cl	12,50	31,30

Diante os resultados tabelados, observa-se que ambos compostos de manganês ([Mn(atc-Ph)<sub>2</sub>] e [Mn(atc-Et)<sub>2</sub>]) apresentaram alta toxicidade (IC<sub>99</sub> < 2,00  $\mu\text{g/mL}$ ) frente à linhagem celular J774.A1 no período de 72 horas, apesar deste resultado não ter sido observado no mesmo ensaio de 24 horas. Logo, excluiu-se estes compostos de coordenação de metais para o ensaio de atividade intracelular. Os compostos [Co(atc-Ph)<sub>2</sub>]Cl.MeOH e [Co(atc-Et)<sub>2</sub>]Cl apresentaram baixa



citotoxicidade ( $IC_{99} = 31,30\mu\text{g/mL}$ ). Provavelmente, a mudança do metal Mn para Co colaborou para esta variação no valor de  $IC_{99}$ .

Diante desses resultados, apenas os compostos de coordenação de metais  $[\text{Co}(\text{atc-Ph})_2]\text{Cl}\cdot\text{MeOH}$  e  $[\text{Co}(\text{atc-Et})_2]\text{Cl}$  prosseguiram para o ensaio de atividade intracelular.

#### 4.5 Determinação da atividade intracelular em modelo de infecção *in vitro* de macrófagos J774A.1 infectados com *M. tuberculosis* Erdmann ATCC 35801 recombinante.

Tabela 3 – Resultados de valor inibitório de atividade intracelular (%) dos compostos de coordenação de metais frente às células de macrófago J774A.1 infectados com *M. tuberculosis* Erdmann.

Compostos de coordenação de metais	Concentrações ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentrações ( $\mu\text{M}$ )	Valor inibitório Intracelular (%)
$[\text{Co}(\text{atc-Ph})_2]\text{Cl}\cdot\text{MeOH}$	12,50	18,80	53,31
	3,12	4,69	23,38
$[\text{Co}(\text{atc-Et})_2]\text{Cl}$	12,50	23,30	57,58
	3,12	5,81	6,03
RFP	0,10	0,12	44,52
	0,03	0,04	16,75

Como descrito no item 3.5.7, neste ensaio a determinação da atividade intracelular é realizada em três diferentes concentrações do composto (4x superior a CIM, CIM, 4x inferior a CIM). Porém eliminou-se a mais alta concentração devido ao fato de ambos os compostos serem citotóxicos a concentração 4x superior a CIM.

Ambos os compostos na CIM (12,50  $\mu\text{g/mL}$ ) apresentaram valores de atividade inibitória intracelular bastante próximos. No entanto, na concentração 4x inferior da CIM (3,12  $\mu\text{g/mL}$ ), o composto  $[\text{Co}(\text{atc-Et})_2]\text{Cl}$  perdeu significativamente sua atividade.

Pavan, (2010), nas concentrações 0,03 e 0,1µg/mL obteve valores inibitórios para a RFP intracelular de 24 e 51,50% respectivamente; corroborando com os encontrados no presente ensaio.

#### 4.6 Determinação da CIM frente ao *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv em diferentes condições ambientais (pH 6,0; 2% de albumina; 10% de SFB)

Tabela 4 – Resultados de CIM frente ao *M. tuberculosis* H37Rv em diferentes condições ambientais (pH 6,0; 2% de albumina; 10% de SFB)

Compostos	REMA (µg/mL)						
	NORMAL	pH 6,0			2%		10%
		CIM	CIM	RAZÃO*	ALBUMINA		SFB
	CIM				RAZÃO*	CIM	RAZÃO*
[Co(atc-Ph) <sub>2</sub> ]Cl.MeOH	12,50	22,02	1,76	13,88	1,11	17,91	1,43
[Co(atc-Et) <sub>2</sub> ]Cl	12,50	23,27	1,86	21,82	1,75	17,16	1,37

\*Razão entre a CIM em condições normais e a CIM em diferentes condições.

O estudo da atividade anti-TB em pH ácido é bastante relevante, uma vez que este é o pH encontrado no interior do macrófago (ZANG et al. 2003). Os resultados foram expressos pela razão da CIM<sub>pH6,0</sub> e a CIM em condições normais variando entre 1,76 e 1,86. Esta variação é aceitável do ponto de vista microbiológico uma vez que o valor de CIM de um composto pode variar em até duas diluições (FRANZBLAU et al. 2012)

Os compostos também foram expostos a outras duas condições diferentes, uma contendo 2% de albumina (proteína encontrada em maior concentração no plasma sanguíneo) e a outra com 10% de SFB (composição: proteínas totais, α, β e γ globulinas, glicose, uréia, creatinina e hemoglobulina). A utilização dessas altas concentrações funciona como uma seleção negativa, ou seja, caso o composto apresente uma perda significativa na atividade, pode-se sugerir que esse composto interagiu irreversivelmente com algum componente do plasma estudado e que esta ligação irreversível provavelmente ocorrerá *in vivo*. Caso ocorra o inverso, apenas pode-se sugerir que provavelmente isso não ocorrerá *in vivo*.

Diante do exposto, embora não significativamente, observa-se uma redução na atividade do composto  $[\text{Co}(\text{atc-Et})_2]\text{Cl}$ , o que praticamente não é perceptível para o composto  $[\text{Co}(\text{atc-Ph})_2]\text{Cl.MeOH}$ .

Na presença de SFB, ambos os compostos apresentaram uma CIM bastante próxima às condições normais resultando em uma razão de 1,37 ( $[\text{Co}(\text{atc-Et})_2]\text{Cl}$ ) e 1,43 ( $[\text{Co}(\text{atc-Ph})_2]\text{Cl.MeOH}$ ). Estes resultados sugerem uma baixa afinidade dos compostos em relação aos componentes presentes no SFB ou possuem uma interação reversível.

## 5. Conclusão

Neste trabalho de um universo de 158 compostos analisados, 16 apresentaram uma alta seletividade, ou seja, alta atividade contra o bacilo da tuberculose e baixa citotoxicidade frente às linhagens testadas - macrófago (J774A.1) e células epiteliais (VERO). Destes, dos 4 compostos selecionados dois coordenados de Co destacaram-se pela seletividade além da eficácia intracelular; tornando, assim, os compostos  $[\text{Co}(\text{atc-Et})_2]\text{Cl}$  e  $[\text{Co}(\text{atc-Ph})_2]\text{Cl.MeOH}$  promissores.

Com base nos resultados encontrados mais estudos serão realizados a fim de garantir a eficácia e segurança desses novos compostos de coordenação candidatos à fármacos para tratamento da tuberculose.

## 6. Referências Bibliográficas

BERNHARDT, P. V.; WILSON, G. J.; SHARPE, P. C.; KALINOWSKI, D. S.; RICHARDSON, D. R. Tuning the antiproliferative activity of biologically active iron chelators: characterization of the coordination chemistry and biological efficacy of 2-acetylpyridine and 2-benzoylpyridine hydrazone ligands. **Journal of Biological Inorganic Chemistry** v. 13(1), p. 107-119, 2008.

BRANCO, F. S. C.; PINTO, A. C.; BOECHAT, N. A. Química medicinal de novas moléculas em fase clínica para o tratamento da tuberculose. **Revista Virtual de Química** v. 4(3), p. 287-328, 2012.

DOOLEY, K. E.; KIM, P. S.; WILLIAM, S.D.; HAFNER, H. TB and HIV therapeutics: pharmacology research priorities . **Hindawi Publishing Corporation AIDS Research and Treatment** p.1-9, 2012.

Food and Drugs Administration (FDA). FDA News Release [dezembro de 2012]. Disponível em: <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm333695.htm> e [http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2012/204384s000lbl.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2012/204384s000lbl.pdf)

FRANZBLAU, S.G.; DEGROOTE, M.A.; CHO, S.H.; ANDRIES, K.; NUERMBERGER, E.; ORME, I.M.; MDLULI, K.; ANGULO-BARTUREN, I.A.; DICK T.; DARTOIS, V.; LENAERTS, A.J. Comprehensive analysis of methods used for the evaluation of compounds against *Mycobacterium tuberculosis*. **Elsevier** v.92, p. 453-488, 2012.

GANDHI, N.R.; NUNN P.; DHEDA K.; SCHAAF, H.S.; ZIGNOL M.; SOOLINGEN D.; JENSEN P.; BAYONA J. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant

tuberculosis: a threat to global control of tuberculosis. **Lancet** v.375, p.1830-1843, 2010.

LEDERER, E. The mycobacterial cell wall. **Pure and Applied Chemistry** v. 25(1), p.135–165, 1971.

MA, Z.; LIENHARDT, C.; MCLLERON, H.; NUNN, A. J.; WANG, X. Global tuberculosis drug development pipeline: the need and the reality. **Lancet** v. 375(9731), p. 2100-2109, 2010.

MANABE, Y.C.; BISHAI, W.R. Latent *Mycobacterium tuberculosis* - persistence, patience, and winning by waiting. **Nature Medicine** v. 6 (12), p. 1327-1329, 2000.

MOUTINHO, I.L.M. Tuberculose: aspectos imunológicos na infecção e na doença. **Revista Médica de Minas Gerais** v. 21(1), p. 42-48, 2011.

OLIVEIRA, CAROLINA GONÇALVES. **Síntese e Caracterização de Complexos de Metais da Primeira Série do Bloco d com Tiossemicarbazonas para Investigar seu Potencial contra *Mycobacterium tuberculosis*** [Dissertação] 2013.

OLIVEIRA, J.; SOUSA, E. H.; SOUSA, O. N.; MOREIRA, I. S.; SANTOS, D. S.; BASSO, L. A. Slow-onset inhibition of 2-trans-enoyl-ACP (CoA) reductase from *Mycobacterium tuberculosis* by an inorganic complex. **Current Pharmaceutical Design** v. 12, p. 2409-2424, 2006.

ORME, I. Search for new drugs for treatment of tuberculosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 47(7), p. 1943-1946, 2001.

PALOMINO, J.C.; MARTIN, A.; CAMACHO, C.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin Microtiter Assay plate: Simple and inexpensive method for

detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial agents and Chemotherapy** v. 46 (8), p. 2720–2722, 2002.

PAVAN, F. R.; MAIA, P. I. S.; LEITE, S.R.A.; DEFLON, V. M.; BATISTA, A. A.; SATO, D. N.; FRANZBLAU, S. G.; LEITE, C. Q. F. Thiosemicarbazones, semicarbazones, dithiocarbazates and hydrazide/ hydrazones: Anti – *Mycobacterium tuberculosis* activity and cytotoxicity. **European Journal of Medicinal Chemistry** v. 45, p. 1898–1905, 2010.

PAVAN, F. R.; POELHSIT, G. V.; NASCIMENTO, F. B.; LEITE, S. R. A.; BATISTA, A. A.; DEFLON, V. M.; SATO, D. N.; FRANZBLAU, S. G.; LEITE, C. Q. F. Ruthenium (II) phosphine/picolinate complexes as antimycobacterial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry** v. 45, p. 598–601, 2010.

RAVIGLIONE, M.; MARAIS, B.; FLOYD, K.; LONNROTH, K.; GETAHUN, H.; MIGLIORI, G. B.; HARRIES, A. D.; NUNN, P.; LIENHARDT, C.; GRAHAM, S.; CHAKAYA, J.; WEYER, K.; COLE, S.; KAUFMANN, S. H. E.; ZUMLA, A. Scaling up interventions to achieve global tuberculosis control: progress and new developments. **Lancet** v. 379, p. 1902–13, 2012.

RUSSEL, D. G. Who puts the tubercle in tuberculosis? **Nature** v. 5, p. 39-47, 2007.

SANDBHOR, U.; PADHYE, S.; BILLINGTON, D.; RATHBONE, D.; FRANZBLAU, S.; ANSON, C. E.; POWELL, A. K. Metal complexes of carboxamidrazone analogs as antitubercular agents. Synthesis, X-ray crystal-structures, spectroscopic properties and antimycobacterial activity against *Mycobacterium tuberculosis* HRv 37. **Journal of Inorganic Biochemistry** v. 90, p. 127–136, 2002.

SATO, D.N. **Avaliação rápida do perfil de sensibilidade do agente a tuberculose às drogas sintéticas ou extratos vegetais empregando *Mycobacterium tuberculosis* contendo o gene da luciferase**. 2003. Tese de Doutorado em Biotecnologia. Instituto de Química – UNESP, Araraquara, 2003.

SNEWIN V.A.; GARES M.; GAORA P.O.; HASAN Z.; BROWN I.N.; YOUNG D.B. Assessment of immunity to microbial infection with luciferase reporter constructs. **Infection and Immunity** v. 67(9), p. 4586-4593, 1999.

SOUZA, M. V. N.; VASCONCELOS, T. R. A. Fármacos no combate à tuberculose: passado, presente e futuro. **Química Nova** v. 28(04), p. 678-682, 2005.

SIRIRAM, D.; YOGESHWARI, P.; DEVAKARAM, R. V. Synthesis, in vitro and in vivo antimycobacterial activities of diclofenac acid hydrazones and amides. **Bioorganic & Medicinal Chemistry** v. 14, p. 3113–3118, 2006.

SWINNEY, D. C.; ANTHONY, J. How were new medicines discovered? **Nature Drug discovery** v.10, p. 507-519, 2011.

TARALLO, M. B.; URQUIOLA, C.; MONG, A.; COSTA, B. P.; RIBEIRO, R. R.; COSTA-FILHO, A. J.; MERCADER, R. C.; PAVAN, F. R.; LEITE, C. Q. F.; TORRE, M. H.; GAMBINO, D. Design of novel iron compounds as potential therapeutic agents against tuberculosis. **Journal of Inorganic Biochemistry** v. 104, p. 1164–1170, 2010.

WARD, S. K.; HOYE, E. A.; TALAAT, A. M. The global responses of *Mycobacterium tuberculosis* to physiological levels of copper. **Journal of Bacteriology** v. 190(8), p. 2939–2946, 2008.

World Health Organization, 2012 (WHO). Porcentagem de novos casos de TB MDR [consulta realizada em 27/04/2013]. Disponível em: [http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global\\_new\\_cases\\_mdr\\_tb\\_2011.png](http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_new_cases_mdr_tb_2011.png)



World Health Organization, 2012 (WHO). Países que até o final de 2011 notificaram ao menos um caso de TB-XDR [consulta realizada em 27/04/2013]. Disponível em: [http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global\\_TB\\_xdr\\_2011.png](http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_TB_xdr_2011.png)

World Health Organization (WHO). Situação da Tuberculose no Mundo [consulta realizada em 05/02/2013]. Disponível em: <http://www.who.int/gho/tb/en/>

Dear Dr. Pavan,

We are pleased to inform you that the following paper has been accepted for publication:

Manuscript ID: HT-SBJ-CCP-0003

Type of manuscript: Article

Title: Vanadium Complexes with Hydrazone or Thiosemicarbazone Ligands as Potential Anti-*Mycobacterium tuberculosis* Agents

Authors: Paula C. de Souza, Pedro I. S. Maia, Heloisa B. de Barrosa, Clarice Q. F. Leite, Victor M. Deflonand Fernando R. Pavan

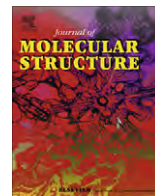
Received: January 22th, 2013

Submit to section: The Challenges of tuberculosis treatment: from drug discovery to therapy management

We will now edit and finalize your paper which will then be returned to you for your approval. We are waiting submission by other authors in order to complete this special issue.

Kind regards,

Jean Leandro dos Santos  
Guest Editor  
Current Clinical Pharmacology



## Study of a series of cobalt(II) sulfonamide complexes: Synthesis, spectroscopic characterization, and microbiological evaluation against *M. tuberculosis*. Crystal structure of $[\text{Co}(\text{sulfamethoxazole})_2(\text{H}_2\text{O})_2]\cdot\text{H}_2\text{O}$

Melina Mondelli<sup>a</sup>, Fernando Pavan<sup>b</sup>, Paula C. de Souza<sup>b</sup>, Clarice Q. Leite<sup>b</sup>, Javier Ellena<sup>c</sup>, Otaciro R. Nascimento<sup>d</sup>, Gianella Facchin<sup>a</sup>, María H. Torre<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Química Inorgánica (DEC), Facultad de Química, UDELAR, Gral. Flores 2124, Montevideo, Uruguay

<sup>b</sup> Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Unesp, C.P. 582, 14801-902 Araquara (SP), Brazil

<sup>c</sup> Laboratório de Cristalografia, Instituto de Física de São Carlos, USP, C.P. 369, 13560 São Carlos (SP), Brazil

<sup>d</sup> Grupo de Biofísica Sérgio Mascarenhas, Instituto de Física de São Carlos, USP, C.P. 369, 13560 São Carlos (SP), Brazil

### HIGHLIGHTS

- We synthesized Co(II) complexes with general formulae  $[\text{Co}(\text{sulfonamide})_2]\cdot n\text{H}_2\text{O}$ .
- IR, UV–Vis and EPR spectra showed different coordination depending on the ligand.
- X-ray crystal structure of  $[\text{Co}(\text{sulfamethoxazole})_2(\text{H}_2\text{O})_2]\cdot\text{H}_2\text{O}$  was obtained.
- The activity against *M. tuberculosis* was evaluated.
- The cytotoxicity on macrophage cells was studied.

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 22 July 2012

Received in revised form 22 September 2012

Accepted 24 September 2012

Available online 2 October 2012

#### Keywords:

Cobalt complexes

Sulfonamides

Antimycobacteria activity

X-ray structure

IR spectra

EPR

### ABSTRACT

Nowadays, the research for new and better antimicrobial compounds is an important field due to the increase of immunocompromised patients, the use of invasive medical procedures and extensive surgeries, among others, that can affect the incidence of infections. Another big problem associated is the occurrence of drug-resistant microbial strains that impels a ceaseless search for new antimicrobial agents.

In this context, a series of heterocyclic-sulfonamide complexes with Co(II) was synthesized and characterized with the aim of obtaining new antimicrobial compounds. The structural characterization was performed using different spectroscopic methods (UV–Vis, IR, and EPR). In spite of the fact that the general stoichiometry for all the complexes was  $\text{Co}(\text{sulfonamide})_2\cdot n\text{H}_2\text{O}$ , the coordination atoms were different depending on the coordinated sulfonamide. The crystal structure of  $[\text{Co}(\text{sulfamethoxazole})_2(\text{H}_2\text{O})_2]\cdot\text{H}_2\text{O}$  was obtained by X-ray diffraction showing that Co(II) is in a slightly tetragonal distorted octahedron where sulfamethoxazole molecules act as a head-to-tail bridges between two cobalt atoms, forming polymeric chains.

Besides, the activity against *Mycobacterium tuberculosis*, one of the responsible for tuberculosis, and the cytotoxicity on J774A.1 macrophage cells were evaluated.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Nowadays, the demand for new and better antimicrobial compounds makes relevant the research on this field. There is an increase of immunocompromised patients with HIV or receiving organ transplant-associated immunosuppressive therapy that have high probability to suffer infections. Besides, invasive medical

procedures, extensive surgery and the use of prosthetic devices, among others, can also affect the incidence of infections. Another big problem associated is the occurrence of drug-resistant microbial strains that impels a ceaseless search for new antimicrobial agents [1].

In this context, sulfonamides still retain an important place in the chemotherapy of infections. They are the drugs of choice for the treatment of chancroid, nocardiosis and acute urinary tract infections caused by several microorganisms like *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, among others. They can be used combined with other drugs in the treatment of otitis, meningitis, toxoplasmosis,

\* Corresponding author. Tel.: +55 598 2 9249739; fax: +55 598 2 9241906.

E-mail address: [mtorre@fq.edu.uy](mailto:mtorre@fq.edu.uy) (M.H. Torre).

recurrent and chronic urinary tract infections and in diarrhea, among other diseases [2,3]. Apart from the antibacterial activity, sulfonamides were developed for antitumor, anti-viral, anti-fungal, anti-carbonic anhydrase, diuretic, hypoglycemic, antithyroid or protease inhibitor activity, among others [4–8].

One strategy in the research of better pharmacological compounds was the sulfonamide complexation with metals [9]. In particular, silver sulfonamide compounds have proved to be effective topical antimicrobial agents, especially Ag-sulfadiazine used in burn therapy [10]. On the other hand, several series of homoleptic and heteroleptic Cu(II) compounds were studied showing the importance of the coordination sites for the antibacterial activity [11,12]. Besides the above, reports of Zn(II), Cu(II), Ni(II), Ce(III), Bi(III), Cd(II), Hg(II), Sm(III) and  $UO_2^{2+}$  sulfonamide complexes can be found in the literature showing the versatility of sulfonamides as ligands and the importance of their complexes in coordination chemistry and medicinal chemistry [13–18]. Most of these compounds were tested against Gram+ and Gram– bacteria and fungi but only a little is known about the activity against mycobacteria, especially *Mycobacterium tuberculosis* one of the pathogen responsible for tuberculosis. The interest in finding new anti-*M. tuberculosis* compounds is due to the fact that this microorganism uses diverse strategies to evade immune surveillance and consequently the emergence of multi-drug-resistant strains are appearing. For this reason the study of new drugs against *M. tuberculosis* is actually a priority.

As a part of our work on the research of new antimicrobial compounds, series of heterocyclic sulfonamide complexes have been synthesized and characterized [11,17,19]. In spite of the fact that the general stoichiometry found in these compounds often is similar, the coordinating atoms can be different. Consequently, the

microbiological activity can change with the sulfonamide coordination modes and with the metal. Particularly, from the studied series of copper complexes, the most active compounds were those coordinated only through the heterocyclic N from five-membered heterocyclic rings [11]. On the other hand, similar isostructural complexes like  $[M(\text{sulfisoxazole})_2(\text{H}_2\text{O})_4]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (with  $M = \text{Cu(II)}$  or  $\text{Ni(II)}$ ) presented different microbiological behavior showing the role of the metal ion [19].

With these antecedents, our aim in this work was to synthesize a series of heterocyclic-sulfonamide complexes but in this case with Co(II) and to obtain structural information through different spectroscopic methods. Besides, the activity against *M. tuberculosis*, and the cytotoxicity on J774A.1 macrophage cells were evaluated [20,21].

Fig. 1 shows the general structure of sulfonamides used in this work. These ligands can coordinate several cations through the  $^4\text{N}$  aryl amine,  $^1\text{N}$  and O of the sulfonamide group and the heteroatom, especially  $\text{N}_h$  from the heterocycles of different residues (R).

In the literature, some Co(II) complexes with these ligands are reported but unlike our compounds they contain mixed ligands that can change the coordination behavior and/or the metal ions are coordinated differently or the study was performed in only one structural aspect [22–25].

Besides, none of them were evaluated against *M. tuberculosis*.

## 2. Experimental

### 2.1. Synthesis

The complexes were synthesized according to the procedure described by Bult et al. [26], mixing 0.8 mmol of sulfonamide (SIGMA) in water and adding NaOH 1 M until total dissolution was achieved (pH = 9–10). To the resulting solution, 0.4 mmol of  $\text{CoSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Baker) dissolved in 20 mL of water were added dropwise.

A pink precipitate with all the sulfonamide ligands was obtained. It was washed three times with 5 mL of water, dried at room temperature and protected from light. The elemental analysis was performed with a Carlo Erba EA1108 elemental analyzer.

The obtained results were:

For  $[\text{Co}(\text{sulfapyridine})_2]\cdot \text{H}_2\text{O}$  ( $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{N}_6\text{O}_5\text{S}_2\text{Co}$ ) (code Co-L1): calc. (%) / found (%) C 46.7, N 14.7, H 3.4 / C 46.2, N 14.5, H 3.6. Yield 16%.

For  $[\text{Co}(\text{sulfadimethoxine})_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ( $\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{N}_8\text{O}_{10}\text{S}_2\text{Co}$ ) (code Co-L2): calc. (%) / found (%) C 40.9, N 15.7, H 4.0 / C 41.7, N 16.1, H 4.0. Yield 65%.

For  $[\text{Co}(\text{sulfamerazine})_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ( $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{N}_8\text{O}_6\text{S}_2\text{Co}$ ) (code Co-L3): calc. (%) / found (%) C 42.5, N 18.0, H 4.3 / C 43.1, N 18.1, H 4.1. Yield 89%.

For  $[\text{Co}(\text{sulfamethazine})_2]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$  ( $\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{N}_8\text{O}_7\text{S}_2\text{Co}$ ) (code Co-L4): calc. (%) / found (%) C 43.4, N 16.8, H 4.3 / C 43.4, N 16.8, H 4.9. Yield 85%.

For  $[\text{Co}(\text{sulfamethoxazole})_2]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$  ( $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{N}_6\text{O}_6\text{S}_2\text{Co}$ ) (code Co-L5): calc. (%) / found (%) C 39.0, N 13.7, H 4.1 / C 38.8, N 13.5, H 4.4. Yield 42%.

For  $[\text{Co}(\text{sulfamethizole})_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ( $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_8\text{O}_6\text{S}_2\text{Co}$ ) (code Co-L6): calc. (%) / found (%) C 34.1, N 17.5, H 3.6 / C 34.1, N 17.7, H 3.5. Yield 24%.

The charge neutrality in the complexes was achieved by deprotonation of the amide group of the ligands.

### 2.2. Crystal structure of Co-L5

Room temperature X-ray diffraction data collection for Co-L5 was performed on an Enraf-Nonius Kappa-CCD diffractometer,

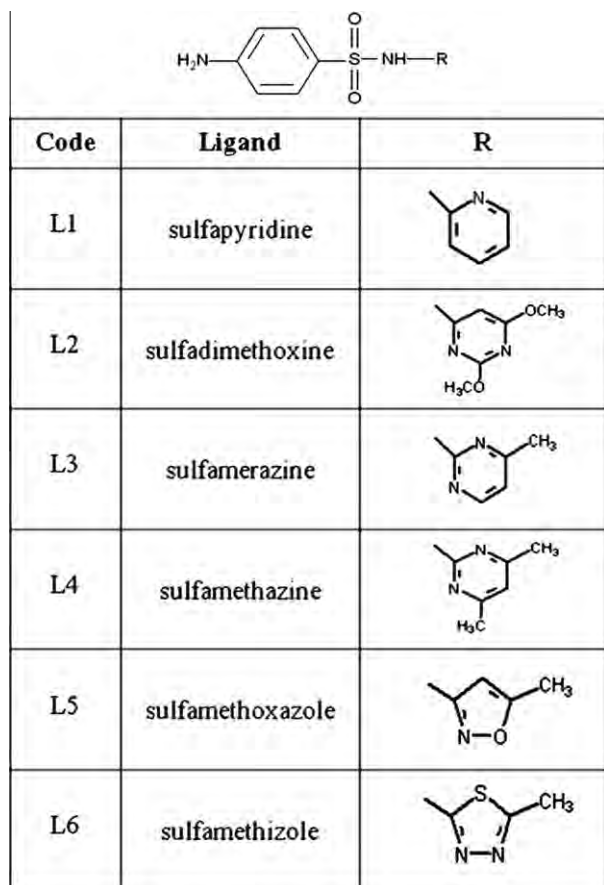


Fig. 1. Sulfonamides used as ligands.

using graphite-monochromated Mo K $\alpha$  radiation (0.71073 Å). The final unit cell parameters were based on all reflections. Data collections were made using the COLLECT program [27]. Integration and scaling of the reflections were performed with the HKL Denzo–Scalepack system of programs [28]. Gaussian absorption correction was applied [29]. The structure was solved by direct methods with SHELXS-97 [30]. The model was refined by full-matrix least squares on  $F^2$  with SHELXL-97 [30]. All the hydrogen atoms were stereochemically positioned and refined with the riding model [30]. Data collections and experimental details for the complexes are summarized in Table 1. Programs SHELXL-97, and ORTEP-3 [31] were used within WinGX [32] to prepare materials for publication.

### 2.3. Spectroscopic measurements and conductivity

IR spectra, in the range between 4000 and 200 cm<sup>-1</sup>, were recorded on a BOMEM M 102 FTIR spectrophotometer using the KBr pellet technique. Electronic spectra of complexes were registered on a UV-1603 Shimadzu spectrophotometer, using 0.001 M solutions in DMSO. The experimental spectra were deconvoluted as a sum of Gaussian curves. EPR measurements were carried out on polycrystalline samples using an X-band Varian E109 spectrometer and rectangular cavity with 100 kHz field modulation. The measurements were performed at 4.3 K and a Cr(III) ( $g = 1.9797$ ) in MgO sample was used for field calibration.

Conductimetric measurements of 10<sup>-3</sup> M DMSO solutions of complexes were performed at 25 °C in a JENWAY 4310 conductimeter.

### 2.4. Lipophilicity test and solubility

Lipophilicity tests were performed determining the partition coefficient between *n*-octanol and the physiological solution of

**Table 1**  
Crystal data and structure refinement.

Empirical formula	C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> N <sub>6</sub> O <sub>9</sub> S <sub>2</sub> Co
Formula weight	617.52
Temperature	293(2) K
Wavelength	0.71073 Å
Crystal system	Monoclinic
Space group	$P2_1/c$
Unit cell dimensions	$a = 17.9921(3)$ Å $b = 8.7401(1)$ Å $\beta = 101.507(1)^\circ$ $c = 16.8952(3)$ Å
Volume	2603.42(7) Å <sup>3</sup>
Z	4
Density (calculated)	1.575 Mg/m <sup>3</sup>
Absorption coefficient	0.880 mm <sup>-1</sup>
$F(000)$	1276
Crystal size	0.38 × 0.31 × 0.28 mm <sup>3</sup>
Theta range for data collection	2.92–27.5°
Index ranges	$-23 \leq h \leq 23$ , $-11 \leq k \leq 11$ , $-21 \leq l \leq 21$
Reflections collected	20,873
Independent reflections	5947 [ $R(\text{int}) = 0.0309$ ]
Completeness to $\theta = 27.5^\circ$	99.5%
Absorption correction	Gaussian
Max. and min. transmission	0.817 and 0.664
Refinement method	Full-matrix least-squares on $F^2$
Computing <sup>a</sup>	COLLECT, HKL Denzo and Scalepack SHELXS-97, SHELXL-97
Data/restraints/parameters	5947/0/348
Goodness-of-fit on $F^2$	1.036
Final R indices [ $I > 2\sigma(I)$ ]	$R_1 = 0.0407$ , $wR_2 = 0.1039$
R indices (all data)	$R_1 = 0.0510$ , $wR_2 = 0.1106$
Largest diff. peak and hole	1.146 and $-0.935$ e Å <sup>-3</sup>

<sup>a</sup> Data collection, data processing, structure solution and structure refinement respectively.

the ligand and the complexes [33]. The concentration of the compounds in the original physiological solution and after the contact with *n*-octanol was determined by AAS.

The solubility at 37 °C in saline and DMSO was estimated. The results are informed according to [34].

### 2.5. Anti-*M. tuberculosis* activity assay

The anti-*M. tuberculosis* activity of the ligands and the complexes was determined by the Resazurin Microtiter Assay (REMA) [35]. Stock solutions of the test compounds were prepared in DMSO and diluted in Middlebrook 7H9 broth (Difco), supplemented with oleic acid, albumin, dextrose and catalase (OADC enrichment BBL/Becton Dickinson, Sparks, MD, USA), to obtain final drug concentration ranges from 0.15 to 250 µg/mL. The serial dilutions were realized in Precision XS Microplate Sample Processor (Biotek™).

The isoniazid was dissolved in distilled water, according to the manufacturers' recommendations (Difco laboratories, Detroit, MI, USA), and used as a standard drug. *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 was grown for 7–10 days in Middlebrook 7H9 broth supplemented with OADC, plus 0.05% Tween 80 to avoid clumps.

Suspensions were prepared and their turbidities matched to the optical density of the McFarland no. 1 standard. After a further dilution of 1:25 in Middlebrook 7H9 broth supplemented with OADC, 100 µL of the culture were transferred to each well of a 96-well microtiter plate (NUNC), together with the test compounds. Each test was set up in triplicate. Microplates were incubated for 7 days at 37 °C, after which resazurin was added for the reading. Wells that turned from blue to pink, with the development of fluorescence, indicated growth of bacterial cells while maintenance of the blue color indicated bacterial inhibition [35,36]. The fluorescence was read (530 nm excitation filter and 590 nm emission filter) in a SPECTRAfluor Plus (Tecan) microfluorimeter.

As a standard test, the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of isoniazid was determined on each microplate. The acceptable range of isoniazid MIC is from 0.015 to 0.05 µg/mL [35,36].

### 2.6. Cytotoxicity assay

*In vitro* cytotoxicity assays (IC<sub>50</sub>) were performed on the J774A.1 (ATCC TIB-67) mouse cell line, as recommended by Pavan et al. [21]. The cells were routinely maintained in complete medium (RPMI-1640 supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) plus 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin), at 37 °C, in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. After reaching confluence, the cells were detached and counted. For the cytotoxicity assay, 1 × 10<sup>5</sup> cells/mL were seeded in 200 µL of complete medium in 96-well plates (NUNC™). The plates were incubated at 37 °C under a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere for 24 h, to allow cell adhesion prior to drug testing. The compounds were dissolved in DMSO (5%) and subjected to two-fold serial dilution from 1250 to 3.9 µg/mL. Cells were exposed to the compounds at various concentrations for 24 h. Resazurin solution was then added to the cell cultures and incubated for 6 h. Cell respiration, as an indicator of cell viability, was detected by reduction of resazurin to resorufin, whose pink color and fluorescence indicates cell viability. A persistent blue colour of resazurin is a sign of cell death. The fluorescence measurements (530 nm excitation filter and 590 nm emission filter) were performed in a SPECTRAfluor Plus (Tecan) microfluorimeter. The IC<sub>50</sub> value was defined as the highest drug concentration at which 50% of the cells are viable relative to the control. Each test was set up in triplicate.

## 2.7. Selectivity index

The selectivity index (SI) was calculated by dividing IC<sub>50</sub> for the mouse cells by the MIC for the pathogen; if the SI is  $\geq 10$ , the compound is then investigated further.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Crystal structure determination of Co-L5

An ORTEP type view of Co-L5 is shown in Fig. 2. Selected bond distances and angles around the Co(II) are presented in Table 2. The asymmetric unit of complex is formed by two ligand molecules, two Co(II) atoms and three water molecules, two of them coordinated to the metal ion and one of hydration.

The Co(II) ions are located on an inversion center. Their coordination sphere is formed by two heterocyclic N and two 4N atoms from four different sulfonamide molecules. Co(II) ions are coplanar with the least square plane through the four N atoms. The slightly tetragonal distorted octahedron is completed with two water molecules (O1w and O2w for Co1 and Co2 ions respectively). The Co–N<sub>heterocycle</sub> (2.081 Å) and the Co–O (W) (2.048 and 2.070 Å) bond distances are very similar to those obtained for [Ni(sulfamethoxazole)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O [19].

Sulfamethoxazole molecules acting as a head-to-tail bridges between two cobalt atoms, form a polymeric chain along (1, –1, 0) (see Fig. 3a).

These polymeric chains are linked by N–H...O(S), O–H...O(S) hydrogen bonds giving rise to the formation of a three dimensional network. Both Co(II) atoms presented bond distances slightly different (see Table 2) possibly due to the formation of an intramolecular H-bond between the sulfonamidic N and the H atom from one water molecule.

The same behavior is observed in the angles for Co1 (N<sub>4</sub>–Co–N<sub>het</sub> = 94.79°, N<sub>4</sub>–Co–OH<sub>2</sub> = 89.62° and N<sub>het</sub>–Co–OH<sub>2</sub> = 90.12°) and those for Co2 (N<sub>4</sub>–Co–N<sub>het</sub> = 93.98°, N<sub>4</sub>–Co–OH<sub>2</sub> = 86.6°, N<sub>het</sub>–Co–OH<sub>2</sub> = 87.31°).

The angles C17–N12–S1 (119.35°) and C27–N22–S2 (120.48) suggests the sp<sup>2</sup> hybridization in accordance with the deprotonation of the sulfonamidic N atom.

An interesting feature of the crystal packing is that ligands gives rise to a hydrophobic region where the aromatic rings lie, alternated with hydrophilic regions occupied by the cobalt ions and the heteroatoms from heterocycles (see Fig. 3b).

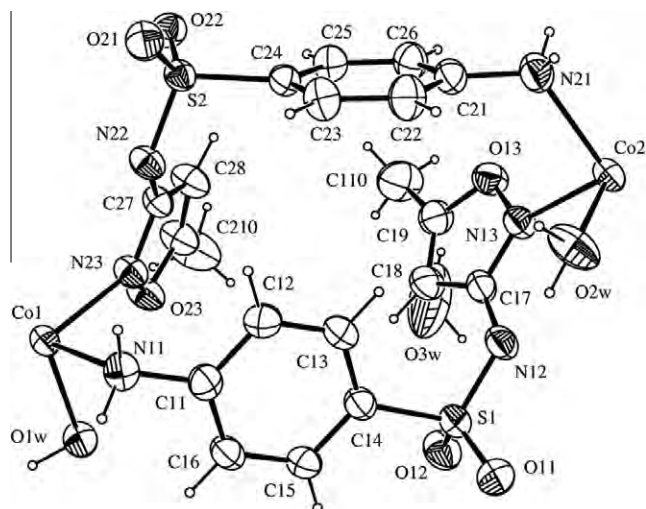


Fig. 2. ORTEP view of the complex Co-L5, showing atoms labeling and the 50% probability ellipsoids.

Table 2

Selected bond lengths (Å) and angles (°) for Co-L5.

Bond lengths (Å)	Bond angles (°)
Co(1)–N(23) 2.1125(18)	O(1W)–Co(1)–O(1W) 180.00(9)
Co(1)–O(1W) 2.1252(15)	O(1W)–Co(1)–N(11) 86.59(7)
Co(1)–N(11) 2.2250(19)	N(11)–Co(1)–N(11) <sup>i</sup> 180.00(12)
Co(2)–N(13) 2.0810(18)	O(2W)–Co(2)–N(21) 90.37(8)
Co(2)–O(2W) 2.1193(18)	N(13)–Co(2)–N(21) 94.80(7)
Co(2)–N(21) 2.220(2)	N(13)–Co(2)–O(2W) 89.88(7)
Bond angles (°)	N(13)–Co(2)–N(13) <sup>ii</sup> 180.00(10)
N(23)–Co(1)–O(1W) 92.69(7)	N(13) <sup>ii</sup> –Co(2)–O(2W) 90.12(7)
N(23)–Co(1)–O(1W) 87.31(7)	N(13) <sup>ii</sup> –Co(2)–O(21) <sup>ii</sup> 85.20(7)
N(23)–Co(1)–N(11) 93.98(7)	O(2W)–Co(2)–N(21) <sup>ii</sup> 89.63(8)
N(23) <sup>i</sup> –Co(1)–N(11) 86.02(7)	N(21) <sup>ii</sup> –Co(2)–O(21) 180.00(12)
O(1W)–Co(1)–N(11) 93.41(7)	

Symmetry transformations used to generate equivalent atoms:

i:  $-x + 1, -y + 1, -z$ , ii:  $-x, -y + 2, -z$ .

### 3.2. Spectroscopic measurements

#### 3.2.1. IR spectra

Table 3 shows the assignment of the main bands in the IR spectra of free ligands and complexes, based on some general references and previous studies on complexes with sulfonamides [37–46]. In spite of the fact that the general stoichiometry for all the complexes was [Co(sulfonamide)<sub>2</sub>·nH<sub>2</sub>O], according to the IR bands, different coordination modes were observed showing the versatility of sulfonamides.

As Table 3 shows, the IR spectra of the complexes Co-L1, Co-L2 and Co-L5 presented the same general features as well as the other group formed by Co-L3, Co-L4 and Co-L6 as discussed below.

With regard to the IR spectrum of complex Co-L5 included in the first group, the bands at 3467 and 3378 cm<sup>-1</sup> in the free ligand assigned to  $\nu_{as}$  (NH<sub>2</sub>) and  $\nu_s$  (NH<sub>2</sub>) respectively, shift to 3391 and 3336 cm<sup>-1</sup> upon complexation, showing the coordination through the <sup>4</sup>N aryl amine group according to the crystallographic structure. The disappearance of the  $\nu$  (<sup>1</sup>NH) band shows the deprotonation of L5, according to the charge in the stoichiometric formulae. Although the SO<sub>2</sub> group did not participate in the coordination, the  $\nu_{as}$  (SO<sub>2</sub>) shifted from 1313 cm<sup>-1</sup> in the free ligand to 1277 cm<sup>-1</sup> in the complex, probably due to the different spatial orientation of the S=O group in the complex, while the  $\nu_s$  (SO<sub>2</sub>) remained almost unchanged. This behavior is observed in other similar compounds [11,19]. On the other hand, it is known that the heteroaromatic ring bands cannot be interpreted as simple vibrational modes as most of them are of complex origin and involve different vibrational types. Some ring bands can shift upon complexation to metal ions through the heterocyclic nitrogen atom to lower frequencies, others to higher frequencies and in some cases no change was observed. In the case of Co-L5 some bands shifted to higher frequencies and others to lower frequencies when the N<sub>h</sub> group took part in the coordination, as shown in Table 3. This behavior agrees with data in the literature [41,45].

In the case of Co-L5 and as well as in the other complexes the spectra showed a broad band or a shoulder in a 3475–3642 cm<sup>-1</sup> range, according to the presence of water molecules in the complexes. Other bands corresponding to water molecule modes could not be assigned, due to the overlapping with some other signals.

On the other hand, the IR spectrum of Co-L1 was very similar to that of the [Ni(sulfapyridine)<sub>2</sub>] previously reported [19]. Fig. 4 shows both spectra.

According to this result and the crystallographic structure of [Ni(sulfapyridine)<sub>2</sub>] [19] we can propose that Co(II) coordinated in Co-L1 with two different sulfapyridine ligands, two of them through the <sup>4</sup>N atom, and the remaining two as bidentate ligands through N<sub>h</sub> and <sup>1</sup>N.

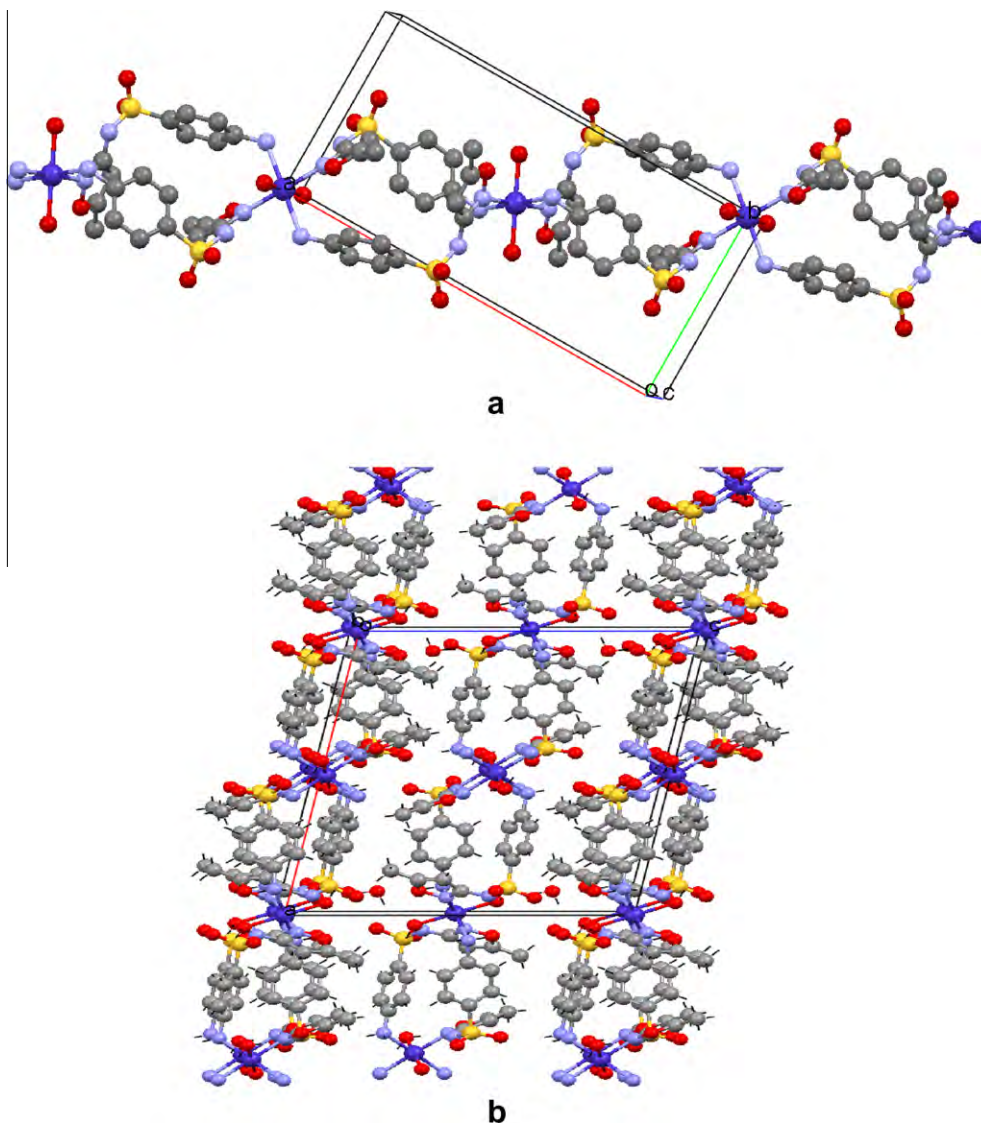
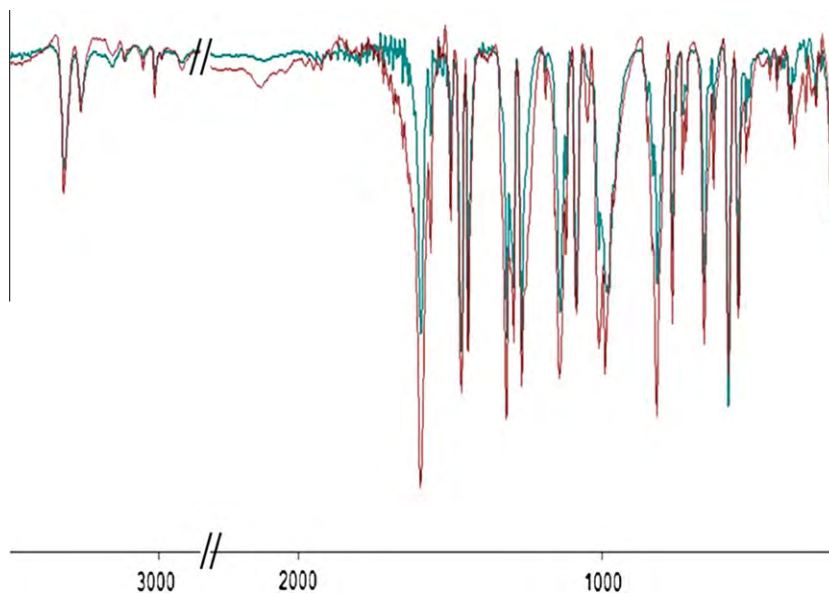


Fig. 3. (a) Polymeric chain along the (1, -1, 0) direction and (b) view of the molecular packing.

**Table 3**  
IR main bands (in  $\text{cm}^{-1}$ ) of free ligands and their Co(II) complexes.

Ligand/complex	$\nu(\text{OH})$	$\nu_{\text{as}}(\text{NH})/\nu_{\text{s}}(\text{NH})$	$\nu(\text{NH})$	$\nu_{\text{as}}(\text{SO}_2)/\nu_{\text{s}}(\text{SO}_2)$	Some heterocyclic bands
L1	–	3416 (m)/3309 (w)	3243 (m)	1323 (s)/1124 (m)	1584 (s), 1451 (m), 946 (s), 615 (s)
Co-L1	3475 (v.w.)	3310 (m)/3255 (w)	–	1312 (s)/1116 (m)	1560 (w), 1463 (s), 977 (s), 583 (v.s.)
L2	–	3482 (w)/3376 (m)	3227 (w)	1353 (s)/1139 (m)	1483 (m), 1430 (m), 983 (m), 722 (m)
Co-L2	3642 (m)	3364 (w)/3276 (w)	–	1364 (s)/1137 (s)	1460 (m), 1427 (s), 976 (s), 732 (m)
L3	–	3497 (s)/3380 (s)	3231 (w)	1328 (s)/1160 (v.s.)	1570 (s), 1446 (s), 965 (s), 715 (w)
Co-L3	3553 (m)	3496 (m)/3380 (m)	–	1324 (s)/1142 (s)	1561 (s), 1434 (s), 979 (m), 720 (m)
L4	–	3451 (w)/3369 (m)	3246 (w)	1298 (s)/1144 (s)	2923 (v.w.), 1576 (s), 1420 (v.s.), 997 (s)
Co-L4	3553 (m)	3446 (m)/3364 (m)	Overlapped	1257 (s)/1141 (s)	2918 (v.w.), 1586 (s), 1436 (s), 979 (m)
L5	–	3467 (m)/3378 (m)	3240 (w), 3300 (m)	1313 (s)/1157 (v.s.)	3144 (m), 1472 (s), 885 (s)
Co-L5	3580 (m)	3391 (w)/3336 (w)	–	1277 (s)/1159 (m)	3158 (w), 1467 (s), 870 (m)
L6	–	3446 (m)/3359 (m)	3253 (w)	1328 (m)/1148 (s)	1648 (s), 1528 (w.b, m) 1080 (s), 696 (s)
Co-L6	3570 (w)	3450 (m)/3353 (m)	–	1302 (s)/1140 (s)	1629 (m), 1528 (m), 1087 (s), 693 (s)

vs = very strong, s = strong, m = medium, w = weak, vw = very weak.



**Fig. 4.** IR spectra of Co-L1 (thin, red line) and [Ni(sulfapyridine)<sub>2</sub>] (wide, green line). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Besides, the Co-L2 spectrum was similar to that of [Cu(sulfadimethoxine)<sub>2</sub>].H<sub>2</sub>O [46]. Taking into account this data, the coordination of Co(II) can be postulated that of the Cu(II), where the sulfadimethoxine molecules coordinated through the <sup>4</sup>N, <sup>1</sup>N and as bidentate ligand through <sup>1</sup>N and N<sub>h</sub> atoms.

In the case of Co-L3, Co-L4 and Co-L6, the IR spectra did not show the coordination through the aryl–amine group due to the fact that no shift in  $\nu_{as}(\text{NH}_2)$  and  $\nu_s(\text{NH}_2)$  was observed upon complexation. Changes in the heterocyclic bands agree with the coordination through the N<sub>h</sub>. Due to the fact that there are important differences between the IR spectra of cobalt complexes and that of the similar copper ones like [Cu(sulfamerazine)<sub>2</sub>].H<sub>2</sub>O and [Cu(sulfamethizole)<sub>2</sub>].H<sub>2</sub>O whose structures were previously reported [11], no further information can be obtained. For this reason to establish the structure of these complexes it is necessary to obtain single crystals, attempt has been performed but without success yet.

### 3.2.2. Electronic spectra

The visible electronic spectra of Co(II) complexes in DMSO are typical octahedral complexes [47] showing one broad d–d band in the range 18,868–18,215 cm<sup>-1</sup> and shoulders at higher or lower wavenumber (see Table 4).

Due to the fact that the visible bands are coupled, a deconvolution was performed with the spectra of Co-L5 and Co-L4. As an example, Fig. 5 shows the spectra of Co-L5 and the deconvoluted bands which the  $\nu'_{max}$  were 16,234, 17,566, 18,487, 20,793 and 23,494 cm<sup>-1</sup>. In the case of Co-L4 the deconvoluted bands were 14,963, 18,390, 20,451 and 23,450 cm<sup>-1</sup>.

**Table 4**  
 $\nu'_{max}$  (cm<sup>-1</sup>) and  $a_M$  (M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) of DMSO solutions of Co(II) complexes.

Compound	$\nu'_{max}$ (cm <sup>-1</sup> )/ $a_M$ (M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )
CoSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	17,800/44
Co-L1	20,576 (sh), 18,691/94
Co-L2	20,161 (sh), 18,215/52
Co-L3	20,747 (sh), 18,868/71
Co-L4	20,600 (sh), 18,444/36, 14,700 (sh)
Co-L5	20,746 (sh), 18,584/39, 16,207 (sh)
Co-L6	20,500 (sh), 18,637/35

sh: Shoulder.

According to Lever [48] the analysis of six coordinate Co(II) complexes is rather difficult.

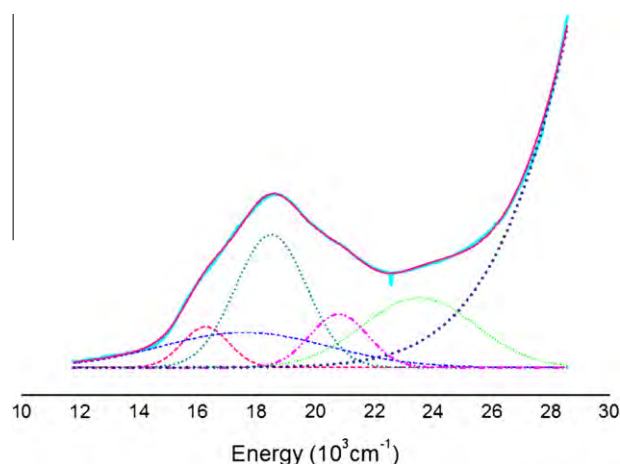
There is a multiple structured band assigned to <sup>4</sup>T<sub>1g</sub>(F) → <sup>4</sup>T<sub>1g</sub>(P) in the visible region due to different causes, especially to admixture of spin forbidden transitions to doublet states. The transition to <sup>4</sup>A<sub>2g</sub> is very weak and appears as a shoulder.

In the studied cobalt complexes a main band observed in the region 18,868–18,215 cm<sup>-1</sup> can be assigned to <sup>4</sup>T<sub>1g</sub>(F) → <sup>4</sup>T<sub>1g</sub>(P), in accordance with cobalt complexes reported in Lever and the shoulder in the region 20,161–20,747 cm<sup>-1</sup> can be assigned to <sup>4</sup>T<sub>1g</sub>(F) → <sup>4</sup>A<sub>2g</sub>(F). This last assignment is in accordance with the result reported for Co(II) complexes with chromophore Co(II)N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> [48]. Usually, with other coordinating atoms the band assigned as <sup>4</sup>T<sub>1g</sub>(F) → <sup>4</sup>A<sub>2g</sub>(F) appears at lower energy.

### 3.2.3. EPR spectra

The EPR spectra were performed for Co-L4 and Co-L5 on polycrystalline samples at 4 K (see Fig. 6).

Both complexes presented wide bands as usually found in the literature and as expected for Co(II) complexes in a high spin state



**Fig. 5.** Experimental and simulated spectra in DMSO of Co-L5 (straight line) and the deconvoluted bands (dashed lines).



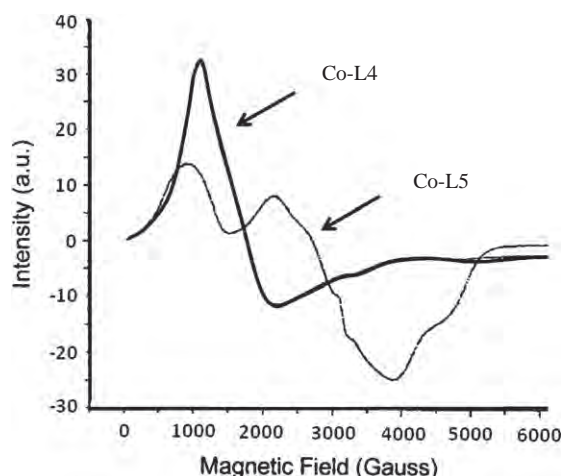


Fig. 6. EPR of Co-L4 and Co-L5 in polycrystalline samples at 4 K.

( $S = 3/2$ ) with distorted octahedral symmetry (see Figs. 2 and 3). This behavior is possibly due to the spin-orbit coupling that produces a decrease in the relaxation time and consequently the band broadening is observed. Additionally, the Jahn-Teller effect introduces anisotropy in the systems increasing the number of signals and it makes the interpretation of these spectra more difficult [49].

In particular, Co-L5 shows a typical octahedral complex spectrum where both Co ions are coupled through the sulfonamide bridges as shows Fig. 2. In the case of Co-L4 no structural conclusions have been drawn. The  $g$  values for Co-L4 were 1.40, 3.85 and 6.18.

### 3.2.4. Conductivity

Conductimetric measurements in DMSO solution of complexes showed no significant changes in comparison with that of the pure solvent. This behavior is in agreement with the neutrality of the complexes, according to the assigned formulae.

In addition, the conductivity was measured after one week and no major changes were observed. These results showed that the ligands remained bonded to metal ion, demonstrating the stability of the complexes in DMSO solution.

### 3.3. Lipophilicity and solubility

With the aim to determine the lipophilic character of the cobalt complexes that can be correlated with biological properties like the passage through lipophilic barriers, partition coefficients ( $K$ ) between  $n$ -octanol and physiological solution and estimated solubility in physiological solution were studied. These results are presented in Table 5. On the other hand all the complexes were soluble in DMSO (from 10 to 30 parts of solvent for 1 part of solute).

As Table 5 shows, the values obtained for  $P$  are similar to those previously obtained for similar Cu-sulfonamide complexes [11] and they are lower than the values considered the optimal partition coefficient for trespassing lipophilic membranes [3].

Besides, the solubility tendency is not inversely correlated with the partition coefficient as expected. Only Co-L6 presented the higher lipophilicity and one of the lowest solubility in physiological solution and Co-L5 was the less lipophilic complex and the most soluble.

### 3.4. Anti-*M. tuberculosis* activity assay

The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) values of Co(II) complexes and free ligands against *M. tuberculosis* were higher

Table 5

Partition coefficients ( $P$ ) between  $n$ -octanol and physiological solution and estimated solubility ( $S$ ) of cobalt complexes.

Complex	$P/\log P$	$S$ (mg/100 mL of physiological solution)
Co-L1	0.24/−0.62	67
Co-L2	0.08/−1.10	35
Co-L3	0.51/−0.29	103
Co-L4	0.29/−0.54	85
Co-L5	0.009/−2.0	279
Co-L6	0.94/−0.03	38

Table 6

Anti-*M. tuberculosis* activity (MIC), cytotoxicity ( $IC_{50}$ ), and selectivity index (SI) of the complexes and their free ligands.

Compound	MIC ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	S.I.
CoSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	>25	78.1	n.d.
Co-L1	>25	78.1	n.d.
Co-L2	>25	156.3	n.d.
Co-L3	>25	156.3	n.d.
Co-L4	>25	156.3	n.d.
Co-L5	>25	156.3	n.d.
Co-L6	>25	156.3	n.d.
L1	>25	19.5	n.d.
L2	>25	156.3	n.d.
L3	>25	312.5	n.d.
L4	>25	156.3	n.d.
L5	>25	312.5	n.d.
L6	12.5	312.5	25

n.d. Not determined.

than 25  $\mu\text{g/mL}$  in all the free ligands and Co(II) complexes with the exception of L6 that was 12  $\mu\text{g/mL}$  (see Table 6). None of the cobalt sulfate dilutions, used as control, inhibited the growth of mycobacterium.

It is known that mycobacteria have a very wide lipid-rich hydrophobic cell wall. Probably, the low activity of the complexes against *M. tuberculosis* is due to the fact that the lipophilicity of these compounds was low and the penetration into the cell would be difficult. Similar results were found with several Ni-sulfonamide complexes [19].

### 3.5. Cytotoxicity assay

To better understand the biological activities of complexes and ligands, the behavior in eukaryotic cells was studied. The model chosen was the J774.A1 macrophage, due to the fact that these macrophages are the first cells that respond against mycobacterial invasion and after phagocytize it, these mycobacteria have the ability to survive inside the macrophage. In addition, the pipeline described by the group of Dr. Leite [50] shows that the next step to search for a new drug against tuberculosis is to determine the activity of the compound through a model of intracellular infection.

The cytotoxicity results (see Table 6), expressed as the  $IC_{50}$  for the J774.A1 cell line, show that all the tested compounds exhibited low cytotoxicity ( $IC_{50}$  ranging from 19.5 to 312.5  $\mu\text{g/mL}$ ).

As shown in Table 6, no regular behavior was observed in the  $IC_{50}$ . The complex Co-L1 was less toxic than the free ligand. Probably, in this case, the metal center is preventing the interaction with the eukaryotic cell. In the other cases the complexes were equal or more toxic than the corresponding ligands. Further biochemical data is necessary to explain this behavior.

To sum up, the only compound that presented a good activity against *M. tuberculosis*, low cytotoxicity and good selectivity index (25) was L6, being a promissory new anti-tuberculosis drug candidate for further studies [38].

#### 4. Conclusions

Through the study of a series of new cobalt complexes with sulfonamides, different coordination modes were observed, showing the versatility of sulfonamides as ligands. Some sulfonamides coordinated only through the  $^4\text{N}$  and  $\text{N}_\text{h}$  atoms. The crystallographic data of  $[\text{Co}(\text{sulfamethoxazole})_2(\text{H}_2\text{O})_2]\cdot\text{H}_2\text{O}$  confirms this behavior and was similar to copper and nickel complexes previously reported. Tacking into account the previously resolved crystalline structure of similar  $\text{Cu}(\text{II})$  complexes, structural information of  $\text{Co}(\text{II})$ -sulfonamide complexes was obtained for the other complexes. They presented several sulfonamide ligands coordinating with the same  $\text{Co}(\text{II})$  center through different groups ( $^1\text{N}$  and  $\text{N}_\text{h}$  as monodentate,  $^1\text{N}$  and  $\text{N}_\text{h}$  as bidentate). An exhaustive spectroscopic analysis supported the different coordination modes and the electronic configuration (high spin). Besides, the conductivity measurements showed the stability of the complexes in solution.

On the other hand, the microbiological assays against *M. tuberculosis* showed that these complexes cannot penetrate across the mycobacteria cell wall in an active quantity. This result is in accordance with the lipophilicity values. All the tested compounds exhibited low cytotoxicity being the free L6 ligand the compound with best performance as anti-mycobacterium and a good candidate for further studies.

#### Acknowledgements

The authors thank PEDECIBA Química (Uruguayan organization) and FAPESP, processo 2009/06499-1 e 2011/11593-7 (Brazilian organization) for the financial support and CYTED network RIIDFCM 209RT0380.

#### References

- [1] M.E. Wolff (Ed.), *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*, vol. 2, John Wiley & Sons, Laguna Beach, 1996.
- [2] S.C. Sweetman, Martindale, *Guía completa de consulta farmacoterapéutica*, Pharma Editores, Barcelona, 2008.
- [3] A.R. Gennaro, Remington Farmacia, Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, 2003.
- [4] Z.H. Chohan, K. Mahmood-Ul-Hassan, M. Khan, C.T. Supuran, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 20 (2) (2005) 183.
- [5] S. Bellú, E. Hure, M. Trapé, C. Trossero, G. Molina, C. Drogo, P.A.M. Williams, A.M. Atria, J.C. Muñoz Acevedo, S. Zacchino, M. Sortino, D. Campagnoli, M. Rizzotto, *Polyhedron* 24 (2005) 501.
- [6] Z. Huang, Z. Lin, J. Huang, *Eur. J. Med. Chem.* 36 (2001) 863.
- [7] M.A. Ilies, C.T. Supuran, A. Scozzafava, *Metal-based Drugs* 7 (2000) 2.
- [8] T. Tokumaru, Y. Shimizu, C.L. Fox Jr., *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 8 (1) (1974) 151.
- [9] D. Pessoa Rocha, G. Ferreira Pinto, R. Ruggiero, C.A. De Oliveira, W. Guerra, A.P. Soares Fontes, T.T. Tavares, I.M. Marzano, E.C. Pereira-Maia, *Química Nova* 34 (1) (2011) 111.
- [10] J.C. Ballin, *JAMA* 230 (8) (1974) 1184.
- [11] E. Kremer, G. Facchin, E. Estévez, P. Alborés, E.J. Baran, J. Ellena, M.H. Torre, *J. Inorg. Biochem.* 100 (2006) 1167.
- [12] A.M. Ramadan, *J. Inorg. Biochem.* 65 (1997) 183.
- [13] Z.H. Chohan, H. Pervez, A. Rauf, K.M. Khalid, C.T. Supuran, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 21 (2) (2006) 193.
- [14] J. Joseph, K. Nagashri, G. Boomadevi Janaki, *Eur. J. Med. Chem.* 49 (2012) 151.
- [15] R. Yuan, R. Xiong, Z. Chen, P. Zhang, H. Ju, Z. Dai, Z. Guo, H. Fun, X. You, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* (2001) 774.
- [16] L. Yang, X. Yang, J. Liu, Y. Li, Q. Lou, Q. Liu, *J. Coord. Chem.* 56 (13) (2003) 1131.
- [17] M.H. Torre, S. Calvo, H. Pardo, A. Mombrú, *J. Coord. Chem.* 58 (6) (2005) 513.
- [18] B. Macías, M.V. Villa, I. García, A. Castiñeiras, J. Borrás, R. Cejudo-Marin, *Inorg. Chim. Acta* 342 (2003) 241.
- [19] M. Mondelli, V. Bruné, G. Borthagaray, J. Ellena, O.R. Nacimiento, C.Q. Leite, A.A. Batista, M.H. Torre, *J. Inorg. Biochem.* 102 (2008) 285.
- [20] M.B. Tarallo, C. Urquiola, A. Monge, B. Parajón Costa, R.R. Ribeiro, A.J. Costa-Filho, R.C. Mercader, F.R. Pavan, C.Q.F. Leite, M.H. Torre, D. Gambino, *J. Inorg. Biochem.* 104 (11) (2010) 1164.
- [21] F.R. Pavan, P.I.S. Maia, S.R.A. Leite, V.M. Deflon, A.A. Batista, D.N. Sato, S.G. Franzblau, C.Q.F. Leite, *Eur. J. Med. Chem.* 45 (2010) 1898.
- [22] E. Borrás, G. Alzuet, J. Borrás, J. Server-Carrió, A. Castiñeiras, M. Liu-González, F. Sanz-Ruiz, *Polyhedron* 19 (2000) 1859.
- [23] G.N. Mukherjee, S. Basu, *J. Indian Chem. Soc.* 76 (6) (1999) 288.
- [24] B. Kesimli, A. Topaçli, *Spectrochim. Acta Part A* (2001) 1031.
- [25] H.S. Randhawa, B.S. Sekhon, H.K. Sahai, R. Lakhani, *J. Therm. Anal. Calorim.* 57 (2) (1999) 551.
- [26] A. Bult, in: H. Siegel (Ed.), *Metal Ions in Biological Systems*, M. Dekker, New York, 1983 (Chapter 16).
- [27] Enraf-Nonius, COLLECT, Nonius BV, Delft, The Netherlands, 1997–2000.
- [28] Z. Otwinowski, W. Minor, in: H.K.L. Denzo Scalepack, C.W. Carter Jr., R.M. Sweet (Eds.), *Methods in Enzymology*, vol. 276, Academic Press, New York, 1997, p. 307.
- [29] P. Coppens, L. Leiserowitz, D. Rabinovich, *Acta Crystallogr.* (1965) 1035.
- [30] G.M. Sheldrick, *Acta Crystallogr. A* 64 (2008) 112.
- [31] L.J. Farrugia, ORTEP3 for Windows, *J. Appl. Crystallogr.* 30 (1997) 565.
- [32] L.J. Farrugia, *J. Appl. Crystallogr.* 32 (1999) 837.
- [33] A. Leo, C. Hansch, D. Elkins, *J. Chem. Soc.* 71 (1971) 525.
- [34] R.C. Rowe, P.J. Sheskey, S. Cowen (Eds.), *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, fifth ed., Pharmaceutical Press, London, 2006, p. 641.
- [35] J.C. Palomino, A. Martin, M. Camacho, H. Guerra, J. Swings, F. Portaeta, *Antimicrob. Agents Chemother.* 46 (2002) 2720.
- [36] L.A. Collins, S.G. Franzblau, *Antimicrob. Agents Chemother.* 41 (1997) 1004.
- [37] D. Lin-Vien, N.B. Colthup, W.G. Fateley, J.G. Grasselli, *The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules*, Academic Press Inc., Boston, 1991.
- [38] I. Orme, J. Secrist, S. Anathan, C. Kwong, J. Maddry, R. Reynolds, A. Poffenberger, M. Michael, L. Miller, J. Krahenbuh, L. Adams, A. Biswas, S. Franzblau, D. Rouse, D. Winfield, J. Brooks, *Antimicrob. Agents Chemother.* 45 (2001) 1943.
- [39] K. Nakamoto, *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*, vol. 5, John Wiley and Sons, New York, 1997.
- [40] K. Nakanishi, *IR-Absorption Spectroscopy – Practica*, Holden-Day Inc., San Francisco, 1962.
- [41] W.L. Driessen, P.H.V. der Voort, *Inorg. Chim. Acta* 21 (1977) 217.
- [42] B. Macías, I. García, M.V. Villa, J. Borrás, A. Castiñeiras, F. Sanz, *Polyhedron* 21 (2002) 1229.
- [43] B.C. Rudy, B.Z. Senkowski, K. Florey, *Analytical Profiles of Drug Substances*, vol. 2, Academic Press, New York, 1973.
- [44] E.E. Chufán, J.C. Pedregosa, J. Borrás, *Vib. Spectrosc.* 15 (1997) 191.
- [45] C. Preti, G. Tosi, M. Massacesi, G. Ponticelli, *Spectrochim. Acta* 32A (1976) 1779.
- [46] M.H. Torre, G. Facchin, E. Kremer, E.E. Castellano, O.E. Piro, E.J. Baran, *J. Inorg. Biochem.* 94 (2003) 200.
- [47] F.A. Cotton, Geoffrey Wilkinson, Carlos A. Murillo, Manfred Bochmann, *Advanced Inorganic Chemistry*, sixth ed., Wiley-Interscience, New York, 1999.
- [48] A.B.P. Lever, *Inorganic Electronic Spectroscopy*, Elsevier, New York, 1984.
- [49] J. Ribas-Gispert, *Química de Coordinación*, Omega, Barcelona, 2000.
- [50] F.R. Pavan, D.N. Sato, C.Q.F. Leite, *Understanding Tuberculosis – New Approaches to Fighting Against Drug Resistance*, An Approach to the Search for New Drugs Against Tuberculosis, ISBN: 978-953-307-948-6, doi: 10.5772/31618, 2010.