

---

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA  
APLICADAS À FARMÁCIA

**ATIVIDADE ANTI - *Mycobacterium tuberculosis* INTRA E  
EXTRACELULAR E CITOXICIDADE DOS COMPLEXOS  
DE RUTÊNIO E VANÁDIO E SEUS LIGANTES**

**FERNANDO ROGÉRIO PAVAN**

**ARARAQUARA - SP**

**2009**

---

---

---

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA  
APLICADAS À FARMÁCIA

**ATIVIDADE ANTI - *Mycobacterium tuberculosis* INTRA E  
EXTRACELULAR E CITOXICIDADE DOS COMPLEXOS  
DE RUTÊNIO E VANÁDIO E SEUS LIGANTES**

**FERNANDO ROGÉRIO PAVAN**

Dissertação de Mestrado apresentada a Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista-UNESP, Campus de Araraquara, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia.

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. CLARICE QUEICO FUJIMURA LEITE**

**ORIENTADOR(A)**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. DAISY NAKAMURA SATO**

**CO-ORIENTADOR(A)**

**ARARAQUARA - SP**

**2009**

---

---

*DEDICO ESTE TRABALHO...*

*Principalmente a meus pais, Nelson Pavan e Nadir de Antonio Pavan, por tudo que eles representam em minha vida, pelo apoio, dedicação, carinho, amor e ensinamentos. Se aqui cheguei e estou devo tudo a vocês.*

*A meus irmãos, Paulo e Aline, por todas nossas conversas e preocupações um com o outro. Pelo amor e carinho existente dentro dessa família.*

## AGRADECIMENTOS

---

### *MUITO OBRIGADO...*

*À Professora, amiga e segunda mãe, Clarice Queico Fujimura Leite, por todo ensinamento, dedicação, preocupação, carinho e acima de tudo pelo ensinamento de vida que me proporcionou. A convivência ao seu lado fez repensar todos os aspectos sobre a vida;*

*À Pesquisadora, amiga e segunda mãe, Daisy Nakamura Sato, por todo apoio, confiança, dedicação, preocupação e carinho. Toda maturidade e confiança que tenho em me dedicar a esse trabalho e a outros são exclusividade de seus incentivos e confiança em meu trabalho;*

*À minha namorada Miriane, pelo companheirismo, carinho e atenção durante toda esta etapa de minha vida;*

*À minha cunhada Mônica pelas conversas e incentivos que tivemos juntamente com o presente de me conceder um lindo sobrinho, Gabriel;*

*Ao meu grande amigo Adolfo C. Barreto, por estar sempre presente ao meu lado desde minha chegada nessa cidade, e por toda amizade e ajuda dispensada;*

*Aos meus amigos que dividem o mesmo espaço comigo, Ederlan, Caio e Júlio, por nossas conversas intelectuais ou não;*

*A todos meus amigos distantes de Jaú e Ribeirão Preto, mas sempre presentes em minha vida;*

*A todos meus amigos e companheiros de laboratório, Ana Carolina, Carol-Paçoca, André, Cleso, Haichu, José Rodrigo, Karina, Marcelo, Lívia, Márcio, Natália e Paulinho;*

---

## **AGRADECIMENTOS**

---

*À aluna de Pós-graduação Patrícia Bento Silva, por toda amizade, paciência e incentivo no decorrer dessa dissertação;*

*Ao Prof. Dr. Victor M. Defflon, pelo trabalho em colaboração, e pelas sugestões que viabilizaram todo esse trabalho;*

*Ao Prof. Dr. Alzir A. Batista, pelo trabalho em colaboração, sugestões e auxílios durante a escrita desse trabalho;*

*Ao Prof. Dr. Gustavo V. Poelhsitz, pelo trabalho em colaboração, sugestões e auxílio no desenvolvimento de artigos;*

*Ao aluno de Pós-graduação Pedro Ivo S. Maia, por toda a ajuda durante o desenvolvimento desse trabalho e de artigos;*

*À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Rosemeire Pietro, por toda sua ajuda na padronização e auxílio durante todos os ensaios de citotoxicidade;*

*Às funcionárias da Seção de Pós-graduação, Cláudia, Laura e Sônia, pelo acolhimento, atenção e colaboração nos momentos que necessitei;*

*A CNPq e a FAPESP pelas bolsas concedidas;*

*A Deus, por me conceder a vida...*

---

---

---

**"Sê humilde para evitar o orgulho, mas voa alto para alcançar a sabedoria." (Santo Agostinho)**

**"A verdadeira sabedoria consiste em saber como aumentar o bem-estar do mundo." (Benjamin Franklin)**

---

---

### RESUMO

O *Mycobacterium tuberculosis*, principal agente da tuberculose (TB), é responsável pela morte anual de dois a três milhões de pessoas no mundo e por prejuízos econômicos globais de aproximadamente 12 bilhões de dólares ao ano. Estima-se que 1/3 da população mundial esteja infectada com o bacilo na forma latente. Apesar disso, nenhuma nova droga específica contra o *M. tuberculosis* foi desenvolvida desde 1960. O presente trabalho objetivou a investigação do potencial anti-*M. tuberculosis* intra e extracelular juntamente com a citotoxicidade de 66 compostos envolvendo diferentes classes de ligantes como tiossemicarbazonas, semicarbazonas, hidrazonas, diiminas, fosfinas e bases de Schiff, juntamente com dois diferentes metais (vanádio e rutênio) formando diferentes e inéditos complexos. Para as diferentes análises biológicas *in vitro*, 3 técnicas já padronizadas foram utilizadas para a detecção da Concentração Inibitória Mínima (CIM), da Citotoxicidade (IC<sub>50</sub>) e da Atividade Intracelular. Dos 66 compostos analisados neste trabalho, 7 complexos contendo o rutênio, *cis*-[RuCl<sub>2</sub>(NO)(BPA)] (**G1**), *cis*-[Ru(pic)(dppe)<sub>2</sub>]PF<sub>6</sub> (**G6**), [Ru(pic)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub> (**G7**), [Ru(pic)(dppb)(Me-bipy)]PF<sub>6</sub> (**G8**), [Ru(pic)(dppb)(Cl-bipy)]PF<sub>6</sub> (**G9**), [Ru(pic)(dppb)(fen)] (**G12**), *cis*-[RuCl<sub>2</sub>(dppb)(bipy)] (**G14**), foram qualificados como potenciais agentes anti-TB, porque apresentaram atividade inibitória melhor do que algumas drogas comumente utilizadas no tratamento da tuberculose, baixa citotoxicidade e alta atividade inibitória intracelular.

**Palavras-chave:** Complexos de vanádio; complexos de rutênio; atividade anti-*M. tuberculosis*; citotoxicidade; atividade intracelular.

---

**ABSTRACT**

The *Mycobacterium tuberculosis*, the major agent of tuberculosis (TB), is responsible for approximately 2-3 million deaths annually, with a global economic injury of approximately \$12 billion per year. It is estimated that 1/3 of the worldwide population are infected with the latent form bacilli. Although, no new specific drug against *M. tuberculosis* was developed since 1960. The objective of this study was the investigation of intra and extracellular anti-*M. tuberculosis* activity and cytotoxicity of 66 compounds involving different class of ligands as thiosemicarbazones, semicarbazones, hydrazones, diimines, phosphines and Schiff bases with two different metals (vanadium and ruthenium) resulting different and unknown complexes. For the different biologicals *in vitro* analyses, three standardized techniques had been used for the detection of the Minimal Inhibitory Concentration (MIC), Cytotoxicity (IC<sub>50</sub>) and Intracellular Activity. Of 66 compounds analyzed in this study, 7 complexes containing the ruthenium, *cis*-[RuCl<sub>2</sub>(NO)(BPA)] (G1), *cis*-[Ru(pic)(dppe)<sub>2</sub>]PF<sub>6</sub> (G6), [Ru(pic)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub> (G7), [Ru(pic)(dppb)(Me-bipy)]PF<sub>6</sub> (G8), [Ru(pic)(dppb)(Cl-bipy)]PF<sub>6</sub> (G9), [Ru(pic)(dppb)(fen)] (G12), *cis*-[RuCl<sub>2</sub>(dppb)(bipy)] (G14), were qualified as potential anti-TB agents, because they presented inhibitory activity better than some drugs commonly used in the TB treatment, low cytotoxicity and high intracellular inhibitory activity.

**Keywords:** Vanadium complexes; ruthenium complexes; anti-*M. tuberculosis* activity; cytotoxicity; intracellular activity.

---



**LISTA DE FIGURAS**

- Figura 1.** Fórmula geral de hidrazonas (a), semicarbazonas (b) e tiossemicarbazonas (c)..... **22**
- Figura 2.** Representação esquemática do preparo da microplaca e exemplo de um resultado de CIM através da técnica do *Rezasurin Microtiter Assay* (REMA)..... **46**
- Figura 3.** Representação esquemática do preparo da microplaca e exemplo de um resultado de IC<sub>50</sub> utilizando resazurina como revelador..... **48**
- Figura 4.** Representação esquemática do preparo da microplaca para a determinação da atividade inibitória mínima intracelular, utilizando a rifampicina como droga de referência e controle da técnica..... **52**
- Figura 5.** Cinética da multiplicação do *M. tuberculosis* Erdmann extracelular, no período de incubação de 7 dias correlacionando as UFC/mL com a Unidade Relativa de Luz/mL (URL/mL)..... **54**
-

LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Siglas, fórmulas e estruturas dos Complexos de Vanádio.....	<b>29</b>
<b>Tabela 2.</b>	Siglas, fórmulas e estruturas dos ligantes complexados com Vanádio.....	<b>32</b>
<b>Tabela 3.</b>	Siglas, fórmulas e estruturas dos Complexos de Rutênio.....	<b>34</b>
<b>Tabela 4.</b>	Siglas, fórmulas e estruturas dos ligantes complexados com Rutênio.....	<b>37</b>
<b>Tabela 5.</b>	Atividade intracelular da rifampicina em diferentes concentrações empregado o <i>M. tuberculosis</i> Erdmann ATCC 35801 contendo o plasmídeo pSMT1.....	<b>55</b>
<b>Tabela 6.</b>	Resultados das avaliações biológicas (CIM e IC <sub>50</sub> ) e determinação do IS dos compostos contendo Tiosemicarbazonas.....	<b>57</b>
<b>Tabela 7.</b>	Resultados das avaliações biológicas (CIM e IC <sub>50</sub> ) e determinação do IS dos compostos contendo Semicarbazonas.....	<b>60</b>
<b>Tabela 8.</b>	Resultados das avaliações biológicas (CIM e IC <sub>50</sub> ) e determinação do IS dos compostos contendo Hidrazonas.....	<b>62</b>
<b>Tabela 9.</b>	Resultados das avaliações biológicas (CIM e IC <sub>50</sub> ) e determinação do IS dos compostos contendo Tiocarbonoilhidrazonas.....	<b>64</b>

---

## LISTA DE TABELAS

---

<b>Tabela 10.</b>	Resultados das avaliações biológicas (CIM e IC <sub>50</sub> ) e determinação do IS dos compostos contendo fosfinas.....	<b>65</b>
<b>Tabela 11.</b>	Resultados das avaliações biológicas (CIM e IC <sub>50</sub> ) e determinação do IS dos compostos contendo fosfinas e diiminas.....	<b>67</b>
<b>Tabela 12.</b>	Resultados das avaliações biológicas (CIM e IC <sub>50</sub> ) e determinação do IS dos compostos contendo fosfinas e picolinato.....	<b>69</b>
<b>Tabela 13.</b>	Resultados das avaliações biológicas (CIM e IC <sub>50</sub> ) e determinação do IS dos compostos contendo fosfinas, diiminas e picolinato.....	<b>71</b>
<b>Tabela 14.</b>	Resultados das avaliações biológicas (CIM e IC <sub>50</sub> ) e determinação do IS dos compostos contendo fosfinas, diiminas e ligantes contendo o íon tiolato.....	<b>73</b>
<b>Tabela 15.</b>	Resultados das avaliações biológicas (CIM e IC <sub>50</sub> ) e determinação do IS dos nitrosilo complexos.....	<b>74</b>
<b>Tabela 16.</b>	Resultados da atividade intracelular dos compostos selecionados em diferentes concentrações.....	<b>76</b>

---

**SUMÁRIO**

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
1.1.	Tuberculose.....	15
1.2.	Tuberculose e pobreza.....	15
1.3.	Co-infecção TB/HIV.....	16
1.4.	Tratamento.....	16
1.5.	Tuberculose Multi Droga Resistente (TBMDR).....	17
1.6.	Alvos e mecanismos de ação dos medicamentos do esquema terapêutico vigente.....	18
1.7.	Epidemiologia.....	19
1.8.	Pesquisa de novas drogas contra TB.....	20
1.9.	Química Inorgânica nos medicamentos.....	21
1.10.	Hidrazonas, semicarbazonas e tiossemicarbazonas.....	21
1.11.	O metal Vanádio.....	23
1.12.	Complexação de ligantes de hidrazonas, semicarbazonas e tiossemicarbazonas com vanádio.....	23
1.13.	O metal Rutênio.....	25
1.14.	Complexação de ligantes de diiminas, fosfinas, bases de Schiff e tiossemicarbazonas com rutênio.....	25
1.15.	Perfil de compostos candidatos a agentes anti-TB.....	27
1.15.1.	Ensaio <i>in vitro</i> .....	27
1.15.2.	Ensaio <i>in vivo</i> .....	28
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>39</b>
2.1.	Objetivo Geral.....	39
2.2.	Objetivo Específico.....	39

---

---

## SUMÁRIO

---

3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	40
3.1.	AMOSTRAS.....	40
3.1.1.	Complexos de hidrazonas, semicarbazonas e tiossemicarbazonas contendo vanádio.....	40
3.1.2.	Complexos de diiminas, fosfinas, bases de Schiff, tiossemicarbazonas contendo rutênio.....	40
3.2.	DROGAS DE REFERÊNCIA.....	41
3.3.	SOLUÇÕES REVELADORAS.....	41
3.4.	CEPAS DE <i>M. tuberculosis</i> .....	41
3.4.1.	<i>M. tuberculosis</i> H <sub>37</sub> Rv ATCC 27294.....	41
3.4.2.	<i>M. tuberculosis</i> Erdman ATCC 35801 recombinante.....	41
3.5.	LINHAGEM CELULAR.....	42
3.6.	METODOLOGIAS.....	42
3.6.1.	Preparação das Suspensões Bacilares.....	42
3.6.2.	Determinação da atividade anti- <i>M. tuberculosis</i> extra celular <i>in vitro</i> dos complexos de vanádio e rutênio e seus ligantes livres...	44
3.6.3.	Determinação da Citotoxicidade (IC <sub>50</sub> ) dos complexos de vanádio e rutênio e seus ligantes livres.....	46
3.6.4.	Determinação do Índice de Seletividade (IS).....	48
3.6.5.	Atividade anti- <i>M. tuberculosis</i> intracelular dos complexos vanádio e rutênio e seus ligantes livres.....	48
3.6.5.1.	Ensaio preliminares da atividade intracelular.....	49
3.6.5.2.	Determinação da atividade anti- <i>M. tuberculosis</i> intracelular dos complexos de vanádio e rutênio e seus ligantes livres.....	51
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
4.1.	Ensaio Preliminares.....	53
4.1.1.	Avaliação da população bacilar viável nas suspensões bacilares congeladas.....	53
4.1.2.	Padronização da luciferase intracelular e determinação da atividade intracelular utilizando a rifampicina como modelo.....	54
4.2.	ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS COMPOSTOS.....	55

---

## SUMÁRIO

---

4.2.1.	Propriedades biológicas <i>in vitro</i> dos ligantes livres e dos complexos de vanádio.....	56
4.2.1.1.	Compostos contendo tiossemicarbazonas.....	56
4.2.1.2.	Compostos contendo semicarbazonas.....	60
4.2.1.3.	Compostos contendo hidrazonas.....	62
4.2.1.4.	Compostos das classes das tiocarbonoilhidrazona.....	64
4.2.2.	Propriedades biológicas <i>in vitro</i> dos ligantes livres e dos complexos de rutênio.....	65
4.2.2.1.	Compostos contendo fosfinas.....	65
4.2.2.2.	Compostos contendo fosfinas e diiminas.....	67
4.2.2.3.	Compostos contendo fosfinas e picolinato.....	69
4.2.2.4.	Compostos contendo fosfinas, diiminas e picolinato.....	71
4.2.2.5.	Compostos contendo fosfinas, diiminas e ligantes contendo o íon tiolato.....	73
4.2.2.6.	Compostos contendo nitrosilo (nitrosilo-complexos).....	74
4.2.3.	Determinação da atividade anti <i>M. tuberculosis</i> intracelular dos complexos de vanádio e rutênio e seus ligantes livres.....	75
4.3.	Avaliação geral dos complexos de vanádio e rutênio analisados	80
5.	CONCLUSÃO.....	83
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84
7.	PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA.....	93
7.1.	Artigos completos publicados em periódicos.....	93
7.2.	Capítulos de livros publicados.....	109

---

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Tuberculose

Os principais membros do complexo *Mycobacterium tuberculosis* são as espécies *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* e *M. microti* (MENEZES e SILVA et al., 2006). *M. tuberculosis* é a espécie mais importante em termos clínicos e foi a primeira a ser descrita, em 1886. É o agente etiológico da tuberculose pulmonar (TB), que no adulto se caracteriza por uma inflamação crônica intensa, necrose e caseificação do tecido pulmonar. As cavidades que se formam nos pulmões podem se romper nos brônquios, permitindo a difusão de bacilos por aerolização através da tosse, havendo, dessa maneira, a possibilidade de contaminação de outros indivíduos. A TB em pacientes com AIDS progride mais rapidamente e algumas vezes sem a formação de granulomas típicos. Mas o *M. tuberculosis* pode também se disseminar, sendo responsável pelo comprometimento de meninges, rins, gânglios e pele (MENEZES e SILVA et al., 2006).

### 1.2. Tuberculose e Pobreza

São abundantes as evidências de que a pobreza aumenta a vulnerabilidade à TB. A desnutrição, superpopulação, má circulação de ar e instalações sanitárias pouco higiênicas, que comumente caracterizam os grupos carentes, aumentam a probabilidade de infecção pela TB. As pessoas que vivem em comunidades de baixa renda também são mais atingidas pela precariedade do diagnóstico e tratamento da doença e, em consequência, têm

menos possibilidades de acesso aos serviços de TB. A prevalência da tuberculose e as taxas de mortalidade por TB, no Brasil, refletem padrões sócio-econômicos mais amplos, com os pobres e as comunidades desfavorecidas sofrendo o maior impacto. (PUBLIC HEALTH WATCH, 2006a)

### **1.3. Co-infecção TB/HIV**

Estima-se que 10% das pessoas que vivem com TB sejam HIV - positivas e que cerca de 20% das pessoas com AIDS sofram de TB pulmonar. As pessoas portadoras de HIV ou que manifestam a doença (AIDS) têm um risco significativamente maior de morte, quando co-infectadas com TB. Por exemplo, enquanto a taxa de mortalidade dos pacientes com TB e AIDS que se submetem a tratamento anti-retroviral é de 5% ou menor, as pessoas co-infectadas, que são diagnosticadas com TB em um estágio avançado da infecção (frequentemente em hospitais), tendem a morrer 30 dias após o diagnóstico, se não receberem o tratamento. (PUBLIC HEALTH WATCH, 2006b).

### **1.4. Tratamento**

A atual terapêutica recomendada pelo Ministério da Saúde contra TB pulmonar ativa, padroniza 3 esquemas de tratamentos, I, IR e III, com fármacos chamados de “primeira-linha”. O esquema I utiliza-se de 3 drogas, isoniazida, rifampicina e pirazinamida, pelo período de 6 meses e mais 2 meses com 2 drogas (isoniazida e rifampicina). O esquema I é utilizado para o tratamento do paciente que nunca apresentou a doença. Em caso de falha no esquema I, ou



abandono de tratamento, será aplicado ao paciente o esquema IR que consiste de 2 meses com isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol, e mais 4 meses com rifampicina, isoniazida e etambutol. No caso de falha nesse esquema e/ou diagnóstico de TB multi-droga resistente (TBMDR), será aplicado o esquema III, que consiste de 3 meses de estreptomicina, etionamida, etambutol e pirazinamida e 9 meses de etionamida e etambutol (CASTELO FILHO et al., 2004)

### **1.5. Tuberculose Multi Droga Resistente (TBMDR)**

A TB devido às cepas MDR (multi-droga resistente), emerge como sério problema, tanto em países desenvolvidos como naqueles em desenvolvimento. A falta de adesão ou tratamento irregular implica em conseqüências sérias, principalmente relacionadas à manutenção de longos períodos de infectividade e ao desenvolvimento de resistência aos medicamentos. Esses dois fatores têm profundas implicações econômicas e de saúde pública. A resistência natural aos fármacos pelo *M. tuberculosis* é atribuída ao seu envelope celular rico em lipídeos e a um sistema de efluxo multidroga ativo (De ROSSI et al., 2006). Recentes estudos sobre os mecanismos que neutralizam a toxicidade dos antibióticos revelaram a existência de outros sistemas que funcionam em sinergismo com a barreira à permeabilidade e o sistema de efluxo propiciando a resistência natural. Fármacos que inibam estes sistemas potencializaram atividade de muitos antibióticos, fornecendo novas estratégias no combate ao *M. tuberculosis* (LOMOVSKAYA e BOSTIAN, 2006). Ao contrário de outras espécies

bacterianas, que adquirem resistência por meio de plasmídeos e transposons, a resistência do *M. tuberculosis* é devido a ocorrência de mutações nos genes cromossomais (HEYM et al., 1994).

Para o *M. tuberculosis*, a resistência aos fármacos de “primeira linha”, isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol, resulta na eliminação prolongada de microrganismos infectantes pelo indivíduo, no maior custo de tratamento, no tratamento mais prolongado e na evolução clínica insatisfatória (SOUZA et al., 2005); (GLOBE et al., 1993).

A TBMDR é definida no Brasil como a resistência *in vitro* a rifampicina e isoniazida e pelo menos a mais um ou mais medicamentos dos esquemas I, IR e III. Pode ainda ser considerada TBMDR, a resistência simultânea à rifampicina e isoniazida e falência operacional ao esquema IIII (CASTELO FILHO et al., 2004).

### **1.6. Alvos e mecanismos de ação dos medicamentos do esquema terapêutico vigente**

A quimioterapia atual para TB utiliza drogas que inibem o metabolismo bacteriano com ênfase maior em inibidores da síntese de parede celular (ZHANG, 2005). De acordo com sua modalidade de ação, drogas anti-TB de “primeira” e “segunda” linha podem ser agrupadas como inibidores de parede celular (isoniazida, etambutol, etionamida, cicloserina), inibidores da síntese de ácidos nucleicos (rifampicina, quinolonas), inibidores da síntese protéica (estreptomicina, kanamicina) e inibidores do metabolismo energético de membrana (pirazinamida) (ZHANG, 2005). As drogas anti-TB existentes

atingem as micobactérias na fase de multiplicação com inibição dos processos celulares como a replicação do DNA e a síntese da parede celular. Isto implica que os quimioterápicos atuais são caracterizados por sua atividade bactericida eficiente, entretanto com atividade esterilizante extremamente baixa. A atividade esterilizante é definida como a habilidade de matar as bactérias que crescem lentamente ou que possuem metabolismo lento e que persistem após a morte das bactérias de multiplicação exponencial (MEDICINS SAN FRONTIÈRE, 2006). Atividade esterilizante, também compreende a habilidade para eliminar bactérias latentes que sobrevivem no estado de dormência dentro dos macrófagos do hospedeiro. As drogas anti-TB tradicionais eram identificadas por sua habilidade de suprimir ou matar culturas bacterianas *in vitro*. A baixa propriedade esterilizante das drogas vigentes para o tratamento da TB é uma das principais inconveniências da quimioterapia atual. Apesar da rifampicina e da pirazinamida serem drogas parcialmente esterilizantes e desempenharem um papel importante na redução do tempo da terapia de 12-18 meses para 6 meses, podem ainda sobreviver uma pequena população de bactérias persistentes que não morrem sob a ação dessas drogas. (MEDICINS SAN FRONTIÈRE, 2006).

### 1.7. Epidemiologia

O *M. tuberculosis*, agente da TB, é responsável pela morte anual de dois a três milhões de pessoas no mundo e por prejuízos econômicos globais de aproximadamente 12 bilhões de dólares ao ano (GLOBAL ALLIANCE, 2006). Estatísticas indicam que 3 milhões de pessoas morrem em todo o

mundo anualmente, devido a complicações da TB. Estima-se que anualmente 8 milhões de pessoas adoecem de TB e que 95% destes casos ocorrem em países em desenvolvimento. Estima-se ainda que cerca de 1,7 bilhões de indivíduos no planeta estejam infectados pelo *M. tuberculosis*, o que corresponde a 30% da população mundial, sendo que em países pobres, a estimativa é de que 70% da população esteja infectada com o *M.tuberculosis* (WHO, 2007). O Brasil ocupa o 13º lugar no ranking dos 22 países que concentram 80% dos casos de TB do mundo. De acordo com os dados oficiais do Ministério da Saúde, existem no Brasil atualmente cerca de 50 milhões de pessoas infectadas com o bacilo de Koch, mas que não desenvolveram a doença, e que a cada ano ocorra contaminação de mais de 1 milhão de pessoas devido ao contato com os pacientes. A incidência da tuberculose está crescendo e em velocidade alarmante, coincidentemente com o crescimento dos casos de AIDS (SOUZA et al., 2005); (COCCO et al., 2002).

### **1.8. Pesquisa de Novas Drogas contra TB**

Enquanto a solução com uma vacina melhor consiste em uma perspectiva a longo prazo, nas décadas subseqüentes tratamento com quimioterápicos continuará sendo a solução. Entretanto, tem havido poucas adições às drogas existentes de "primeira-linha" há um considerável tempo. Existem alguns novos compostos de amplo espectro, tais como as rifamicinas, fluoroquinolonas, oxazolidinonas, e nitroimidazopirano, porém, ainda são apenas candidatos a agentes anti-TB (MEDICINS SAN FRONTIÈRE, 2006).

Encontrar novas drogas representa um grande desafio. Espera-se que os novos agentes possam reduzir a duração total do tratamento (ORME et al., 2001), serem compatíveis com os fármacos já existentes, apresentar uma ação sinérgica e quando possível não interferir com outros medicamentos (ZHANG & ANZEL, 2002). Em adição a uma atividade bactericida em potencial, as novas drogas devem ser ativas contra cepas dormentes, evitando assim, reativação em pessoas com TB infecção (TOMIOKA, 2008). Espera-se que as novas drogas possam: (i) reduzir a duração do tempo de tratamento; (ii) ser ativas contra cepas resistentes; e (iii) ser ativas contra bacilos dormentes (TOMIOKA, 2008).

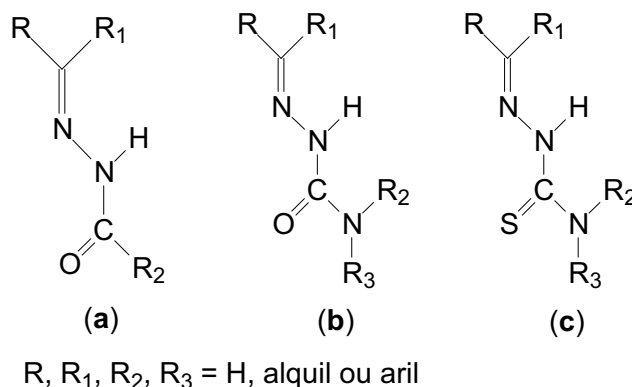
### **1.9. Química Inorgânica nos Medicamentos**

O estudo da associação da Química Inorgânica aos fármacos é uma área em contínua expansão, demonstrando cada vez mais a sua importância (FARRELL et al., 2002). A Química Inorgânica oferece um grande potencial para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos. Além disso, é evidente que muitas drogas orgânicas não têm um modo puramente orgânico de ação; algumas são ativadas ou biomodificadas por íons metálicos, incluindo metaloenzimas, enquanto outras têm um efeito direto ou indireto sobre o metabolismo do íon metálico (GUO et al., 2000).

### **1.10. Hidrazonas, semicarbazonas e tiossemicarbazonas**

Hidrazonas, semicarbazonas e tiossemicarbazonas (**Figura 1**) são compostos do tipo base de Schiff e podem formar derivados diversos pela

simples modificação dos grupos R das moléculas, sendo preparados a partir de hidrazidas, semicarbazidas e tiossemicarbazidas, respectivamente, através de simples reações de condensação.



**Figura 1.** Fórmula geral de hidrazonas (a), semicarbazonas (b) e tiossemicarbazonas (c).

Hidrazonas, semicarbazonas e tiossemicarbazonas apresentam um amplo perfil farmacológico, constituindo uma classe importante de compostos, cujas propriedades têm sido extensivamente estudadas (BERALDO et al., 2004).

Dentre as propriedades biológicas de tiossemicarbazonas e semicarbazonas, bem como dos seus complexos metálicos correspondentes, podem-se destacar as seguintes atividades: antiviral (GENOVA et al., 2004), antibacteriana (COCCO et al., 2002) antimalárico (SCOVILL et al., 1984), antifúngica (NOMYIA et al., 2004), anticonvulsivante (DIMMOCK et al., 1995) e antitumoral (HU et al., 2006). Para as hidrazonas, além das atividades apresentadas acima, ainda são acrescentadas atividades como antiartrite, anticoagulante, antireumática, além de seu uso no tratamento de arritmia cardíaca (RAHMAN et al, 2005).

### 1.11. O Metal Vanádio

Vanádio, elemento químico simbolizado pela letra V, com número atômico 23, massa atômica 50,9415 e estados de oxidação naturalmente encontrados de III à V, possui uma ampla variedade de funções bioquímicas e fisiológicas (SAKURAI et al., 2002). Em humanos, a ingestão alimentar de vanádio no organismo está estimada entre 0,20 e 1,40  $\mu\text{mol}$ . A função fisiológica do vanádio em humanos ainda não é conhecida, embora sua presença pareça ser necessária para um desenvolvimento normal (CRANS et al., 2004).

### 1.12. Complexação de ligantes de hidrazonas, semicarbazonas e tiossemicarbazonas com vanádio

Nas últimas décadas o vanádio passou a ser foco de atenção quanto ao seu potencial farmacológico. O uso deste metal tem sido amplamente estudado, no tratamento da *Diabetes mellitus* e como agente antitumoral (COLLINS et al., 1982).

Os complexos de vanádio têm mostrado ser altamente promissores, uma vez que foi observado que complexos de oxovanádio (IV) com semicarbazonas e tiossemicarbazonas se mostraram ativos contra alguns tipos de bactérias (MAURYA et al., 2006). Certos compostos contendo vanadato ou vanadila mostram atividade antibacteriana potente e específica contra cepas de *Streptococcus pneumoniae* resistentes a penicilina. Os valores de CIM dos compostos de vanádio contra esta bactéria estão entre 4–32  $\mu\text{g/mL}$ , enquanto

que os valores mais elevados de CIM foram encontrados para outras bactérias testadas (*S. aureus*, *Enterococcus faecalis*, *E. coli* e *P. aeruginosa*).

Em outro trabalho observou-se que a coordenação de saliciledeno-S-benzilditiocarbazatos ao  $VO_2^+$  mostrou um aumento significativo da atividade antiamebíca destes compostos orgânicos frente à *Entamoeba histolytica* (MAURYA et al., 2003).

Entretanto a aplicação dos complexos de vanádio na terapia da tuberculose é ainda uma área incipiente, fato que motivou o desenvolvimento desta pesquisa.

Em relação as suas propriedades biológicas, tiosemicarbazonas tem sido estudadas desde 1946, quando Domagk relatou sua atividade contra *M. tuberculosis* (BERALDO et al., 2004)

Segundo Collins et al., (1982), o tratamento da tuberculose com tiosemicarbazonas livres induz a casos de *Diabetes mellitus*. Portanto, a coordenação com o vanádio pode ser considerada vantajosa tanto para melhorar a atividade antituberculose como para prevenir a *Diabetes mellitus*.

Em relação as semicarbazonas, é descrito na literatura que estes ligantes aril-substituídas também apresentaram atividade antituberculose contra *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv (ATCC 27294) (SRIRAM et al., 2004).

A atividade antitubercular de hidrazonas também é conhecida há bastante tempo (RAHMAN et al., 2005). Um quelato complexo lipossolúvel de cobre facilitador da internalização de células foi desenvolvido com a isoniazida formando este composto de primeira linha mais efetivo (PATOLE et al., 2003).



A **tabela 1** apresenta os complexos de vanádio e a **tabela 2** os ligantes utilizados neste trabalho.

### 1.13. O Metal Rutênio

Rutênio, elemento químico simbolizado por Ru, com número atômico 44 (44 prótons e 44 elétrons) e de massa atômica igual a 101. À temperatura ambiente, o rutênio encontra-se no estado sólido. É um elemento do grupo do ferro na classificação periódica dos elementos. É um metal de transição, pouco abundante, encontrado normalmente em minas de platina. É empregado como catalisador e em ligas metálicas de alta resistência com platina ou paládio (wikipédia).

### 1.14. Complexação de ligantes de diiminas, fosfinas, bases de Schiff e tiossemicarbazonas com rutênio

Complexos de rutênio, contendo ligantes como diiminas (MAZUMDER et al., 2004a), fosfinas (NARESH et al., 2006), bases de Schiff (KANNAN et al., 2006) e tiossemicarbazonas (MAZUMDER et al., 2004b), vem sendo testados contra uma série de bactérias (ALLARDYCE et al., 2003). Há relatos na literatura que complexos de rutênio contendo como ligantes fármacos orgânicos podem superar a resistência desenvolvida por bactérias (ou microorganismos) em relação ao ligante livre (SHAIENDRA, et al., 2001). Estudos mostraram que complexo de rutênio (II) contendo cloroquina é duas vezes mais ativo do que o ligante livre (cloroquina) frente a parasitas *Plasmodium* resistentes (SANCHEZ, et al., 1996). Resultados similares foram

obtidos quando compostos orgânicos, utilizados contra a doença de Chagas, tais como tiossemicarbazonas, foram complexados ao rutênio (SHAIENDRA, et al., 2001).

Nascimento et al., (2008) desenvolveram compostos contendo o rutênio, de fórmula  $[Ru(SpymMe)_2(dppb)(N-N)]PF_6$  (SpymMe = 4,6-dimetil-2-mercaptopirimidina; dppb = 1,4-bis(difenilfosfina)butano e N-N = 2,2'-bipiridina e Me-bipy = 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina, os quais apresentaram excelentes resultados, com alta atividade frente o *M. tuberculosis*, indicando que fármacos inorgânicos são promissores contra o bacilo da tuberculose. Os autores verificaram que os complexos foram bem mais ativos que os ligantes livres. Estes compostos foram projetados por terem como ligantes derivado da mercaptopirimida, uma molécula de interesse biológico e uma bifosfina, pois este tipo de ligante é relatado na literatura como possuidor de atividade anticancerígena. (BERNERS-PRICE et al., 1999)

Neste trabalho foram analisados complexos de rutênio contendo as seguintes classes de ligantes: fosfinas, diiminas, contendo o íon tiolato e o picolinato para verificar a estabilidade e os efeitos de substituição de ligante na atividade anti-*M. tuberculosis* intra e extracelular e sua citotoxicidade.

Complexos de rutênio encontram também aplicações como fármacos contra o câncer, imunossuppressores, diminuidores do óxido nítrico no organismo e outras aplicações médicas vem sendo exploradas (ALLARDYCE et al., 2003).

A **tabela 3** apresenta os complexos de rutênio e a **tabela 4** os ligantes utilizados neste trabalho.

### 1.15. Perfil de compostos candidatos a agentes anti-TB

Como parte de um programa de pesquisa de novas drogas contra TB, o National Institutes of Health dos E.U.A., estabeleceu um programa de seleção, utilizando modelos *in vitro* e *in vivo* para encontrar compostos promissores a novos agentes anti-TB (ORME et al., 2001).

Para o programa, o candidato a nova droga anti-TB deve ser avaliado por 2 modelos de pesquisa:

#### 1.15.1. Ensaio *in vitro*

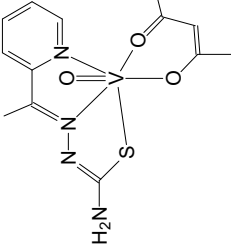
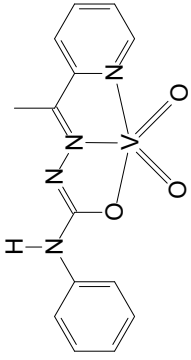
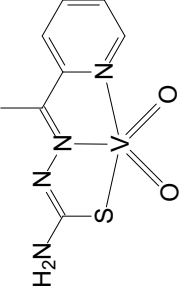
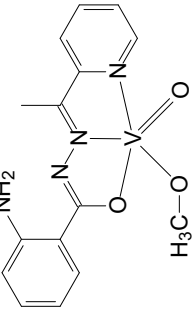
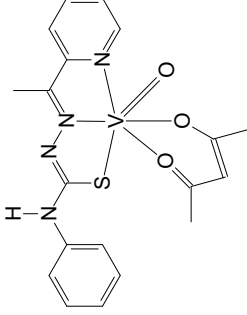
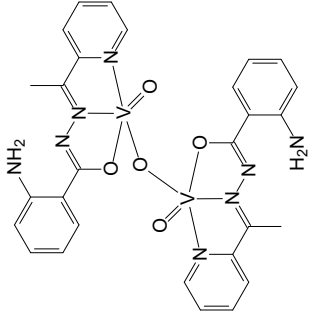
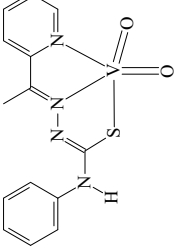
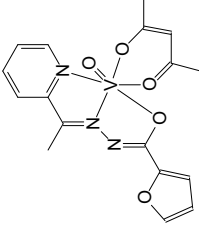
Inicialmente é determinada a concentração inibitória mínima (CIM) de cada composto, frente ao *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv ATCC 27294 utilizando a técnica de *Rezasurin Microtiter Assay* (REMA) (PALOMINO et al., 2002). Compostos com atividade biológica igual ou inferior a 7,80 µg/mL, passam para a próxima etapa, que consiste em avaliar a citotoxicidade (IC<sub>50</sub>), onde é determinada a maior concentração do composto capaz de permitir a viabilidade de 50% das células frente a culturas de macrófagos da linhagem J774 (AHMED et al, 1994). Na sequência um Índice de Seletividade (IS) é determinado pela razão entre o IC<sub>50</sub> e o CIM. Um IS igual ou superior a 10 indica que o composto em análise pode ser aplicado na concentração 10 ou mais vezes acima do valor de CIM sem apresentar citotoxicidade (ORME et al., 2001). Nos compostos com valores de IS ≥10 a próxima etapa consiste na avaliação da capacidade do composto em exercer atividade sobre *M. tuberculosis* internalizado em macrófagos (SNEWIN et al.,1999). *M. tuberculosis* é um patógeno intracelular facultativo persistente no interior dos macrófagos

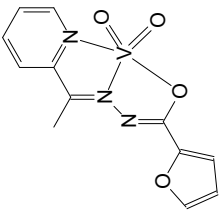
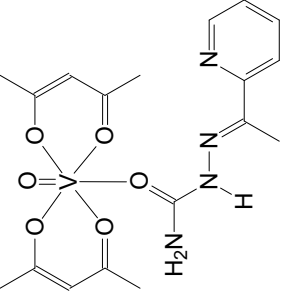
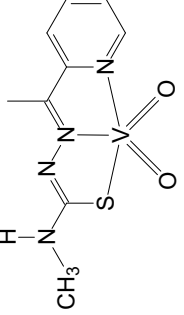
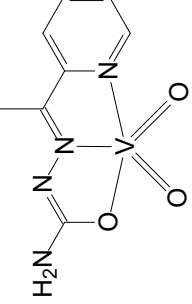
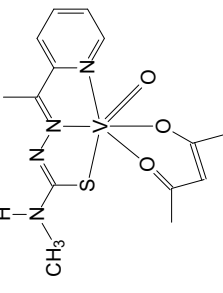
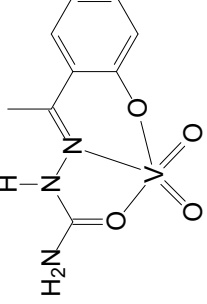
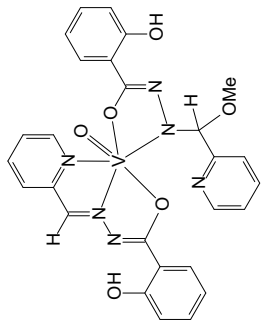
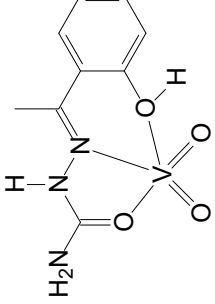
humanos, células estas que são envolvidas na disseminação da infecção. Os bacilos intracelulares são geralmente mais difíceis de serem mortos, devido ao acesso limitado das drogas às bactérias no interior dos macrófagos, necessitando assim, de um tratamento com elevadas doses terapêuticas para o controle e tratamento eficaz da doença (SCHWARTZ et al., 2006).

#### **1.15.2. Ensaios *in vivo***

Para confirmar a investigação em modelos animais, primeiramente, é determinada a dose simples de tolerância máxima do composto em ratos como modelo experimental (PRIMM e FRANZBLAU, 2007). Na sequência é verificada a capacidade do novo candidato a droga anti-TB de reduzir a carga bacteriana dos pulmões dos ratos infectados (ORME et al., 2001).

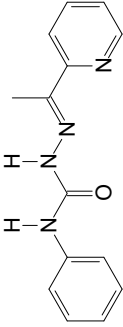
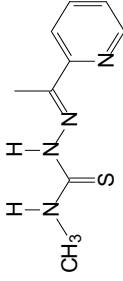
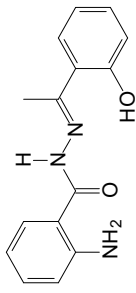
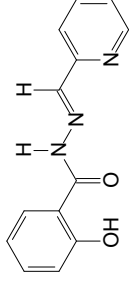
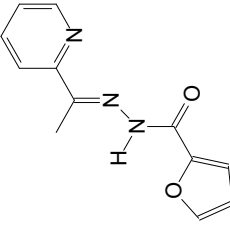
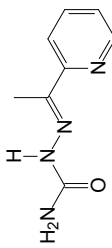
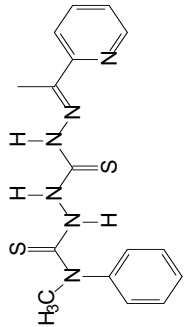
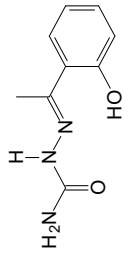
Tabela 1. Siglas, fórmulas e estruturas dos Complexos de Vanádio

Sigla	Fórmula	Estrutura	Sigla	Fórmula	Estrutura
V1	[VO(acac)(apptsc)]		Vb1	[VO <sub>2</sub> (apps)]	
V2	[VO <sub>2</sub> (aptscl)]		Vb2	[VO(haah)(OMe)]	
V4	[VO(acac)(apptsc)]		Vb3	[V <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (haah) <sub>2</sub> (μ-O)]	
V5	[VO <sub>2</sub> (apptsc)]		Vb4	[VO(acac)(apfh)]	

Sigla	Fórmula	Estrutura	Sigla	Fórmula	Estrutura
<b>Vb5</b>	$[\text{VO}_2(\text{apfh})]$		<b>Vb9</b>	$[\text{VO}(\text{acac})_2(\text{Hapsc})]$	
<b>Vb6</b>	$[\text{VO}_2(\text{apmtsc})]$		<b>Vb10</b>	$[\text{VO}_2(\text{apsc})]$	
<b>Vb7</b>	$[\text{VO}(\text{acac})(\text{apmtsc})]$		<b>Vb11</b>	$[\text{VO}_2(\text{Hhasc})]$	
<b>Vb8</b>	$[\text{VO}(\text{fphh})(\text{fphh.OMe})] \cdot 0.5 \text{H}_2\text{O}$		<b>Vb12</b>	$[\text{VO}_2(\text{H}_2\text{hasc})]$	

Sigla	Fórmula	Estrutura	Sigla	Fórmula	Estrutura
<b>Vb13</b>	[VO(acac)(Hhasc)]		<b>Vb17</b>	$[\text{V}_2\text{O}_2(\text{SASHZ})_2(\mu\text{-O})(\mu\text{-H}_2\text{O})] \cdot 2\text{MeCN}$	
<b>Vb14</b>	[VO <sub>2</sub> (apbh)]		<b>Vb18</b>	[VO <sub>2</sub> (apmot)]	
<b>Vb15</b>	[VO(acac)(apbh)]		<b>Vb19</b>	[VO <sub>2</sub> (apmpt)]	
<b>Vb16</b>	[VO <sub>2</sub> (apah)]				

Tabela 2. Siglas, fórmulas e estruturas dos ligantes complexados com Vanádio

Sigla	Fórmula	Estrutura	Sigla	Fórmula	Estrutura
<b>Lig1</b>	Happs		<b>Lig5</b>	Hapmtsc	
<b>Lig2</b>	H <sub>2</sub> haah		<b>Lig6</b>	Hfphh	
<b>Lig3</b>	Hapfh		<b>Lig7</b>	Hapsc	
<b>Lig4</b>	Hapmpt		<b>Lig8</b>	H <sub>2</sub> hasc	



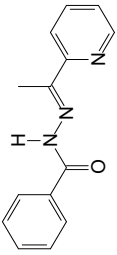
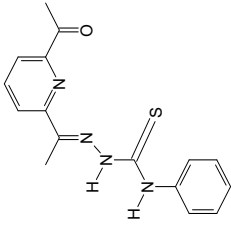
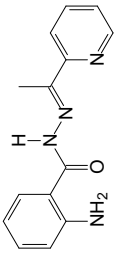
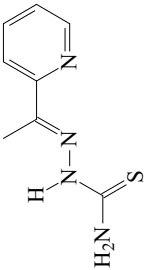
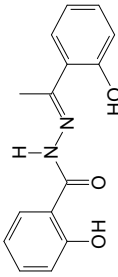
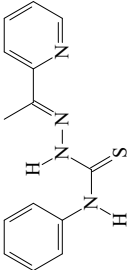
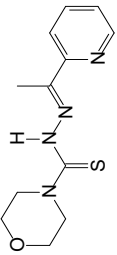
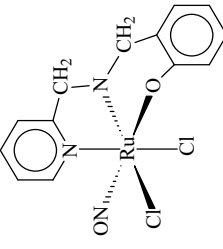
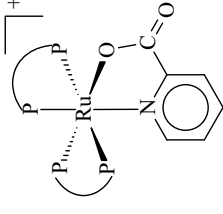
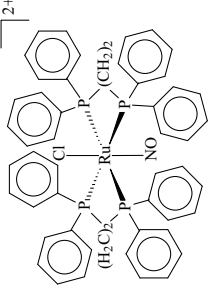
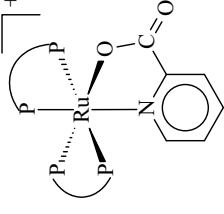
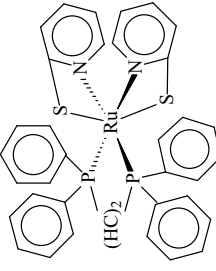
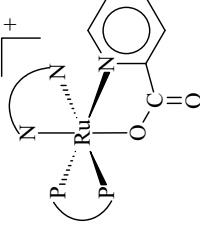
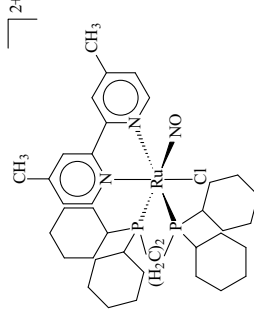
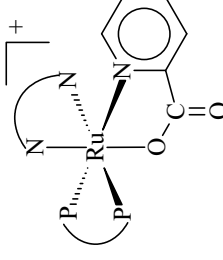
Sigla	Fórmula	Estrutura	Sigla	Fórmula	Estrutura
Lig9	Hapbh		Lig13	m-Dapptc	
Lig10	Hapah		Lig14	Haptscc	
Lig11	Hsashz		Lig15	Happtsc	
Lig12	Hapmot				

Tabela 3. Siglas, fórmulas e estruturas dos Complexos de Rutênio

Sigla	Fórmula	Estrutura	Sigla	Fórmula	Estrutura
G1	<i>cis</i> -[RuCl <sub>2</sub> (NO)(BPA)]		G5	<i>cis</i> -[Ru(pic)(dppm) <sub>2</sub> ][PF <sub>6</sub> ]	
G2	<i>trans</i> -[RuCl(NO)(dppe) <sub>2</sub> ](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>		G6	<i>cis</i> -[Ru(pic)(dppe) <sub>2</sub> ][PF <sub>6</sub> ]	
G3	[Ru(pyS) <sub>2</sub> (c-dppen)]		G7	[Ru(pic)(dppb)(bipy)][PF <sub>6</sub> ]	
G4	[RuCl(NO)(dcpe)(Me-bipy)](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>		G8	[Ru(pic)(dppb)(Me-bipy)][PF <sub>6</sub> ]	

Sigla	Fórmula	Estrutura	Sigla	Fórmula	Estrutura
<b>G9</b>	$[\text{Ru}(\text{pic})(\text{dppb})(\text{Cl-bipy})]\text{PF}_6$		<b>G13</b>	$[\text{Ru}(\text{pic})_2(\text{PPh}_3)_2]$	
<b>G10</b>	$[\text{Ru}(\text{dppb})(\text{bipy})(\text{SpymMe}_2)]\text{PF}_6$		<b>G14</b>	<i>cis</i> - $[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(\text{bipy})]$	
<b>G11</b>	$[\text{Ru}(\text{dppb})(\text{Me-bipy})(\text{SpymMe}_2)]\text{PF}_6$		<b>G15</b>	<i>cis</i> - $[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(\text{Me-bipy})]$	
<b>G12</b>	$[\text{Ru}(\text{pic})(\text{dppb})(\text{fen})]$		<b>G16</b>	<i>cis</i> - $[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(\text{Cl-bipy})]$	

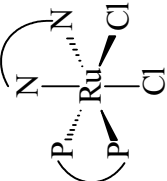
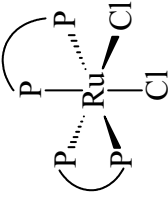
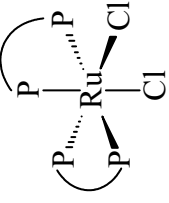
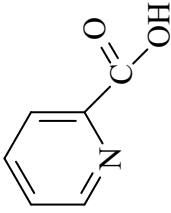
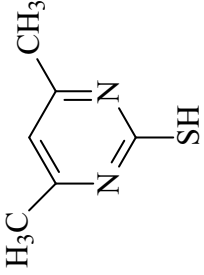
Sigla	Fórmula	Estrutura
G17	$cis\text{-}[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(\text{fen})]$	 <p>The structure shows a central Ruthenium (Ru) atom coordinated to two Chlorine (Cl) atoms in a cis configuration. It is also coordinated to a 1,2-bis(diphenylphosphino)benzene (dppb) ligand, which consists of two phosphorus (P) atoms bridged by a benzene ring. The third coordination site is occupied by a ferrocene (fen) ligand, represented by two nitrogen (N) atoms bridged by a ferrocene backbone.</p>
G18	$cis\text{-}[\text{RuCl}_2(\text{dppm})_2]$	 <p>The structure shows a central Ruthenium (Ru) atom coordinated to two Chlorine (Cl) atoms in a cis configuration. It is also coordinated to two 1,1'-bis(diphenylphosphino)ethane (dppm) ligands, each consisting of two phosphorus (P) atoms bridged by an ethane backbone.</p>
G19	$cis\text{-}[\text{RuCl}_2(\text{dppe})_2]$	 <p>The structure shows a central Ruthenium (Ru) atom coordinated to two Chlorine (Cl) atoms in a cis configuration. It is also coordinated to two 1,2-bis(diphenylphosphino)ethane (dppe) ligands, each consisting of two phosphorus (P) atoms bridged by an ethane backbone.</p>

Tabela 4. Siglas, fórmulas e estruturas dos ligantes complexados com Rutênio

Sigla	Fórmula	Estrutura	Sigla	Fórmula	Estrutura
<b>GL1</b>	Dppm		<b>GL5</b>	PPh <sub>3</sub>	
<b>GL2</b>	Dppe		<b>GL6</b>	Bipy	
<b>GL3</b>	Dppb		<b>GL7</b>	Me-Bipy	
<b>GL4</b>	Dcpe		<b>GL8</b>	Phen	

Sigla	Fórmula	Estrutura
GL9	Hpic	
GL10	HspymMe2	

## 2 . OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

Determinar a atividade anti-*M. tuberculosis* intra e extracelular e a citotoxicidade dos complexos de vanádio e rutênio e seus ligantes livres.

### 2.2. Objetivos Específicos

Determinar a atividade extracelular *in vitro* de um grupo de complexos envolvendo vanádio e seus ligantes livres derivados de hidrazonas, semicarbazonas e tiossemicarbazonas frente ao *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv ATCC 27294.

Avaliar a atividade extracelular *in vitro* de outro grupo de complexos envolvendo rutênio e seus ligantes livres derivados de diiminas, fosfinas, bases de schiff e tiossemicarbazonas frente ao *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv ATCC 27294.

Determinar a citotoxicidade dos compostos que apresentarem CIM  $\leq 7,80$   $\mu\text{g/mL}$  utilizando cultura celular de macrófagos de linhagem J774.

Determinar a atividade intracelular *in vitro* dos compostos que apresentarem Índice de Seletividade  $\geq 10$  utilizando cultura celular de macrófagos linhagem J774 infectadas pelo *M. tuberculosis* Erdman ATCC 35801 contendo o gene da luciferase (plasmídio pSMT1) proveniente do *Vibrio harveyi*.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. AMOSTRAS

Os complexos contendo rutênio foram sintetizados e caracterizados pelo aluno de pós-graduação Gustavo Von Poelhsitz sob a orientação do Prof. Dr. Alzir Azevedo Batista, do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar. Os complexos contendo vanádio foram sintetizados e caracterizados pelo aluno de pós-graduação Pedro I. da S. Maia sob a orientação do Prof. Dr. Victor M. Deflon, do Departamento de Química da Universidade de São Paulo – USP/São Carlos.

##### 3.1.1. Complexos de hidrazonas, semicarbazonas e tiossemicarbazonas contendo vanádio

Foram analisados 37 compostos, sendo 14 ligantes livres derivados de hidrazonas, semicarbazonas e tiossemicarbazonas e 23 complexos desses ligantes contendo vanádio.

Os compostos foram solubilizados em Dimetilsulfóxido (DMSO-Sigma) atingindo uma concentração estoque de 10 mg/mL.

##### 3.1.2. Complexos de diiminas, fosfinas, bases de Schiff, tiossemicarbazonas contendo rutênio

Foram analisados 29 compostos, sendo 10 ligantes livres derivados de diiminas, fosfinas, bases de Schiff, tiossemicarbazonas e 19 complexos desses ligantes contendo rutênio.



Os compostos foram solubilizados em Dimetilsulfóxido (DMSO-Sigma) atingindo uma concentração estoque de 10 mg/mL.

### 3.2. DROGAS DE REFERÊNCIA

Foram utilizadas soluções estoque de isoniazida (Sigma) na concentração de 10 mg/mL em água destilada e de rifampicina (Sigma) na concentração de 10 mg/mL, em metanol.

### 3.3. SOLUÇÕES REVELADORAS

Para os ensaios do REMA e de Citotoxicidade ( $IC_{50}$ ), foi utilizado como substância reveladora a Resazurina na concentração de 0,01% em água destilada estéril, que possui potencial REDOX (Óxido-Redução), com mudança colorimétrica e um indicador de fluorescência em resposta ao metabolismo celular.

### 3.4. CEPAS de *M. tuberculosis*

#### 3.4.1. *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv ATCC 27294

A cepa padrão de *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv - ATCC 27294 foi utilizada na técnica do REMA, para determinar CIM de todas as amostras analisadas. A cultura bacilar foi mantida congelada a -80° C até o momento do uso.

#### 3.4.2. *M. tuberculosis* Erdman ATCC 35801 recombinante

A cepa padrão de *M. tuberculosis* Erdman ATCC 35801 recombinante (gentilmente cedida pelo Dr. Scott Franzblau do Institute for Tuberculosis

Research, University of Illinois at Chicago, USA), contendo o plasmídio pSMT1 (gentilmente cedido pelo Dr. Stefan Hoyle do Imperial College School of Science, Technology and Medicine, London, UK) foi utilizada na determinação da atividade biológica intracelular das amostras promissoras (IS>10). Para tal, as células de macrófagos da linhagem J774 foram infectadas com esta micobactéria. A cultura bacilar foi mantida congelada a -80° C até o momento do uso.

### 3.5. LINHAGEM CELULAR

A linhagem J774 (macrófagos de murino) foi utilizada na determinação da citotoxicidade (IC<sub>50</sub>) e na avaliação da atividade anti - *M. tuberculosis* intracelular dos compostos que apresentaram resultados promissores. As células J774 foram mantidas incubadas a 35°C, com 5% de CO<sub>2</sub>, em garrafas com superfície em torno de 12,50 cm<sup>2</sup>, contendo 10mL de meio de cultura RPMI 1640 (Sigma), suplementado com 10% de soro fetal bovino e antibióticos penicilina e anfotericina B.

### 3.6. METODOLOGIAS

#### 3.6.1. Preparação das Suspensões Bacilares

Para a técnica do REMA, um raspado da cultura de *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv ATCC 27294 correspondente a aproximadamente 5 mg de peso seco, foi semeado em 2 mL de meio de cultura Middlebrook 7H9 enriquecido com Ácido Oléico, Albumina Bovina fração V, Dextrose e Catalase (OADC-BD/BBL) e

incubado por 10 dias a 37°C até obtenção de uma suspensão comparável com a escala nº 1 de McFarland. Desta suspensão foram semeados 100 µL em 20 mL de meio Middlebrook 7H9 enriquecido com OADC contendo 0.05% de Tween 80 e 0.02% de glicerol, de maneira a se obter uma grande quantidade de massa bacilar. Após aproximadamente 10 dias de incubação a 37°C a suspensão de micobactérias obtida foi centrifugada a 3000 rpm por 30 minutos e o sedimento foi lavado por 2 vezes com solução salina tamponada com fosfato (tampão PBS - pH = 7,0), acrescido de Tween 80 a 0,05%. O sedimento obtido foi resuspenso em 50 mL de tampão PBS. Essa suspensão foi dividida em alíquotas de aproximadamente 500 µL em *Eppendorfs* e congelada a -80°C. Após congelamento de no mínimo 2 dias foi realizada a semeadura desta suspensão em placas de Petri divididas em 4 quadrantes contendo meio Middlebrook 7H10 acrescido de OADC, de maneira a se semear 100 µL da suspensão pura e das diluições: 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-7</sup> e 10<sup>-8</sup>. As placas foram incubadas em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> por 28 dias para se realizar a contagem das unidades formadoras de colônias/mL (UFC/mL).

Para a avaliação da atividade intracelular, foi preparada uma suspensão de *M. tuberculosis* Erdman ATCC 35801 contendo o plasmídeo pSMT1. As suspensões foram preparadas de forma semelhante a do *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv ATCC 27294, somente acrescentando-se aos meios Middlebrook 7H9 e 7H10 o antibiótico higromicina na concentração de 50 µg/mL para preservar o plasmídeo na bactéria.

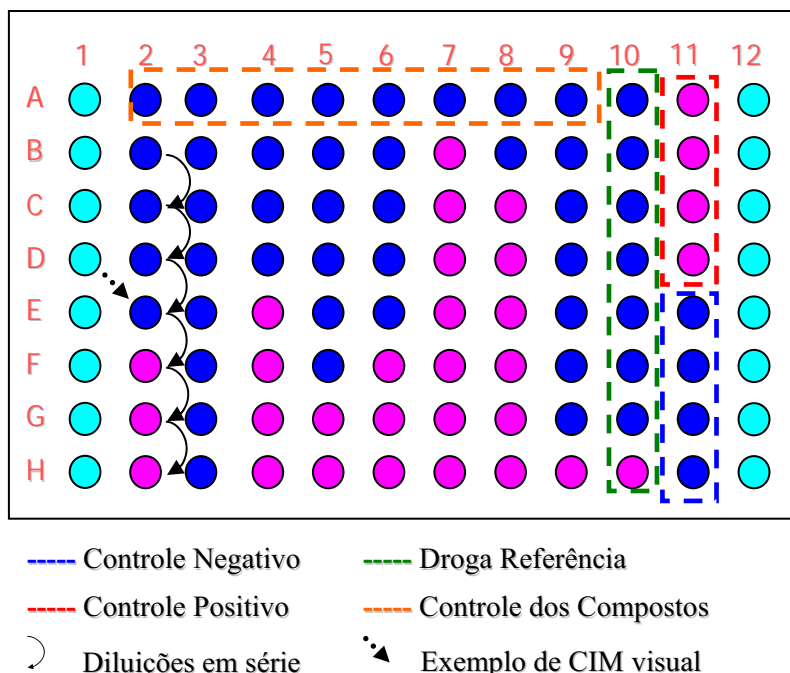
### 3.6.2. Determinação da atividade anti-*M. tuberculosis* extracelular *in vitro* dos complexos de vanádio e rutênio e seus ligantes livres

A CIM (Concentração Inibitória Mínima) foi determinada empregando a metodologia padronizada por COLLINS & FRANZBLAU (1997) denominada MABA e modificada por Palomino et al., (2002) denominada REMA, substituindo o revelador de crescimento bacteriano Alamar Blue pela resazurina. Nas colunas 1 e 12 de uma microplaca estéril de 96 orifícios foram depositados 200 µL de água destilada estéril, para evitar a desidratação do meio de cultura no ensaio durante a incubação na estufa. Os complexos de metais e seus ligantes livres foram diluídos em DMSO, obtendo solução estoque de 10 mg/mL. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas destas soluções na própria microplaca, de maneira a se obter concentrações variáveis de isoniazida (de 1 a 0,03 µg/mL) e dos demais compostos (de 250 µg/mL a 0,10 µg/mL). O primeiro orifício da microplaca contendo cada composto a ser analisado foi utilizado para controle de contaminação do composto. Neste orifício foi adicionado apenas o meio de cultura e a amostra na diluição de 1/4, onde espera-se não haver crescimento de nenhuma espécie bacteriana. A cepa de *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>R<sub>V</sub> ATCC 27294 congelada foi utilizada no início do ensaio na concentração de 10<sup>5</sup> UFC/mL para que no final do experimento fosse obtido população de 10<sup>7</sup> UFC/mL. 100 µL da diluição de 10<sup>5</sup> UFC/mL foi inoculada em cada um dos orifícios contendo os compostos em análise e a Isoniazida. A microplaca foi selada com parafilme e incubada a 37°C. Após seis dias de incubação foi adicionado no orifício de controle de cepa micobacteriana e no orifício de controle de meio, o volume de 30 µL da resazurina 0.01%

diluída em água estéril. A microplaca foi reincubada a 37°C por 24 horas, após foi realizada a leitura visual. Obtendo-se o desenvolvimento de cor rósea no orifício controle de cepa micobacteriana, foram adicionados 30 µL da solução de resazurina nos demais orifícios, sendo as microplacas reincubadas a 37°C por 24 horas (**figura 2**). Em caso de não haver mudança para a cor rósea, a placa era incubada por mais 24 hs. Após este período, foi realizada a leitura final, baseada na interpretação da fluorescência no leitor de microplacas SpectraFluor Plus (TECAN®), onde utilizou-se filtros de excitação e emissão nos comprimentos de ondas de 530 e 590 nm respectivamente.

A CIM foi definida como a menor concentração do composto capaz de inibir a multiplicação de 90% das células de *M. tuberculosis*. A porcentagem de inibição da multiplicação bacteriana foi determinada aplicando-se a fórmula a seguir, considerando **a** igual à média da leitura dos orifícios controle-positivos (orifícios apenas com bactéria e meio de cultura) e **b** o resultado de cada orifício com a respectiva diluição do composto analisado. Cada composto foi analisado em triplicata em dias alternados.

$$100 \times \left( 1 - \frac{b}{a} \right) = \% \text{ de Inibição da Multiplicação Bacteriana}$$



**Figura 2** - Representação esquemática do preparo da microplaca e exemplo de um resultado de CIM através da técnica do *Rezasurin Microtiter Assay* (REMA)

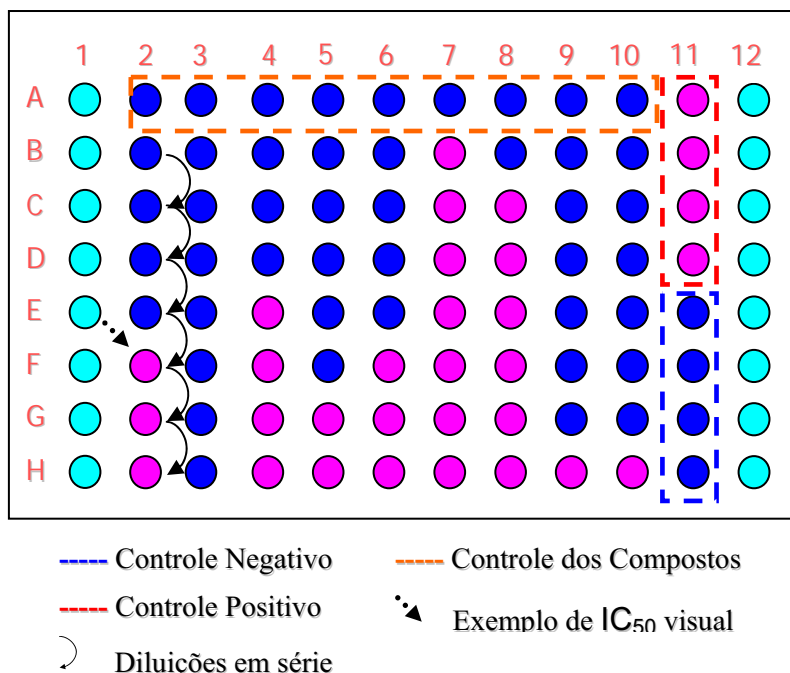
### 3.6.3. Determinação da Citotoxicidade ( $IC_{50}$ ) dos complexos de vanádio e rutênio e seus ligantes livres

Os complexos desses metais e seus respectivos ligantes livres com valores de CIM  $\leq 7,80 \mu\text{g/mL}$  foram analisados frente a macrófagos da linhagem J774 para determinação do Índice de Citotoxicidade ( $IC_{50}$ ) ou Viabilidade celular de acordo com Ahmed et al., (1994). A linhagem J774 foi mantida incubada a  $35^{\circ}\text{C}$ , com 5% de  $\text{CO}_2$ , em garrafas com superfície em torno de  $12,50 \text{ cm}^2$ , contendo 10 mL de meio de cultura RPMI 1640 (Sigma), suplementado com 10% de soro fetal bovino e antibióticos penicilina e anfotericina B. A técnica consistiu em coletar linhagens celulares por raspagem (utilizando *scraper*), centrifugação (1500 rpm por 10 min) e contagem do número de células em câmara de Newbauer ajustando para  $1 \times 10^5$  células/mL

em meio RPMI. Desta suspensão, foram depositados 200  $\mu\text{L}$  em cada orifício de uma microplaca de 96 orifícios de maneira a se obter uma concentração celular de  $1 \times 10^4$  células/200 $\mu\text{L}$  ( $1 \times 10^4$  células/orifício) e incubadas a 35°C em atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$  por 24 a 48 horas para aderência celular a placa. A seguir foram preparadas diluições seriadas dos compostos em análise de maneira a se obter concentrações de 250 a 0,1  $\mu\text{g/mL}$ . As diluições foram adicionadas às células após a retirada de todo o meio e das células que não aderiram, sendo novamente incubadas por 24 horas. A citotoxicidade dos compostos foi determinada pela adição de 30  $\mu\text{L}$  do revelador resazurina e leitura após 6 horas de incubação. A leitura foi realizada no leitor de microplacas SpectraFluor Plus (TECAN®), utilizando-se filtros de excitação e emissão nos comprimentos de ondas de 530 e 590 nm respectivamente. A citotoxicidade ( $\text{IC}_{50}$ ) foi definida como a maior concentração do composto capaz de permitir a multiplicação (viabilidade) de pelo menos 50% das células (**figura 3**).

A porcentagem de multiplicação celular foi determinada aplicando-se a fórmula a seguir, considerando **a** igual à média da leitura dos orifícios controle-positivos (orifícios apenas com células e meio de cultura) e **b** o resultado de cada orifício com a respectiva diluição do composto analisado. Cada composto foi analisado em triplicata em dias alternados.

$$\frac{(100 \times b)}{a} = \% \text{ de Multiplicação (Viabilidade) Celular}$$



**Figura 3** - Representação esquemática do preparo da microplaca e exemplo de um resultado de IC<sub>50</sub> utilizando resazurina como revelador

#### 3.6.4. Determinação do Índice de Seletividade (IS)

De acordo com Orme et al., (2001), o índice de seletividade dos complexos metálicos e seus ligantes livres, foi calculado a partir da razão dos valores de IC<sub>50</sub> sobre CIM para o estudos de compostos com atividade biológica promissora. Quanto maior o valor de IS, o agente analisado é mais ativo contra o bacilo da tuberculose e menos citotóxico para o hospedeiro, sendo considerado um valor promissor, substâncias com IS>10.

#### 3.6.5. Atividade anti-*M. tuberculosis* intracelular dos complexos vanádio e rutênio e seus ligantes livres

Os complexos desses metais com CIM ≤ 7,80 µg/mL, baixa citotoxicidade (IC<sub>50</sub>) e alto Índice de Seletividade (IS), juntamente com seus



devidos ligantes foram avaliados quanto a atividade intracelular *in vitro* segundo Snewin et al., (1999) empregando-se o *M. tuberculosis* Erdman ATCC 35801, contendo o plasmídeo pSMT1. Os resultados das leituras de URL (unidades relativas de luz) foram comparados com os obtidos pelo cultivo e a determinação de UFC (unidades formadoras de colônias) a partir de ensaios preliminares validando a técnica. Os resultados obtidos em URL foram transformados em porcentagem de inibição.

#### 3.6.5.1. Ensaios preliminares da atividade intracelular

A monocamada de células da linhagem J774 foi coletada por raspagem (utilizando *scraper*), centrifugada (1500 rpm por 10 min) e o número de células quantificada em câmara de Neubauer e ajusta para  $5 \times 10^5$  células/mL em meio RPMI 1640. Inicialmente em uma microplaca transparente estéril de 24 orifícios (NUNC), foram depositados, em cada orifício, 1000  $\mu$ L desta suspensão, permanecendo com a concentração celular de  $5 \times 10^5$  células/orifício. A placa foi incubada a 35°C com 5% de CO<sub>2</sub>, por 24 a 48 horas para aderência celular à placa. A seguir, o meio de cultura RPMI foi retirado e o tapete de células foi 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 preparadas em meio RPMI 1640, de maneira a se obter de 1 a 5 micobactérias/célula, e incubadas 35°C com 5% de CO<sub>2</sub> por 2 horas para haver a infecção dos macrófagos (**figura 4**). 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 de T0 e determinado pela lise de 2 orifícios contendo o tapete de células, com 1000  $\mu\text{L}$  da solução aquosa de lise Triton 0,1% (Sigma). Em uma microplaca branca de 96 orifícios foi adicionada 180  $\mu\text{L}$  desta suspensão proveniente da lise das células e adicionado 20  $\mu\text{L}$  de n-decil-aldeído a 1% em etanol sendo realizada leitura da luminescência no leitor de microplacas SpectraFluor Plus (TECAN®), com parâmetros de *Luminescence Integration Time* de 100 e *Gain* de 200. Ao mesmo tempo, foi realizado o plaqueamento desta suspensão em placas de 4 quadrantes contendo meio Middlebrook 7H10 acrescido de OADC e higromicina a 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , de maneira a se semear 100  $\mu\text{L}$  da suspensão pura e das diluições:  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ . As placas foram incubada em estufa a 37°C com 5% de  $\text{CO}_2$  por 28 dias para se realizar a contagem das unidades formadoras de colônias/mL.

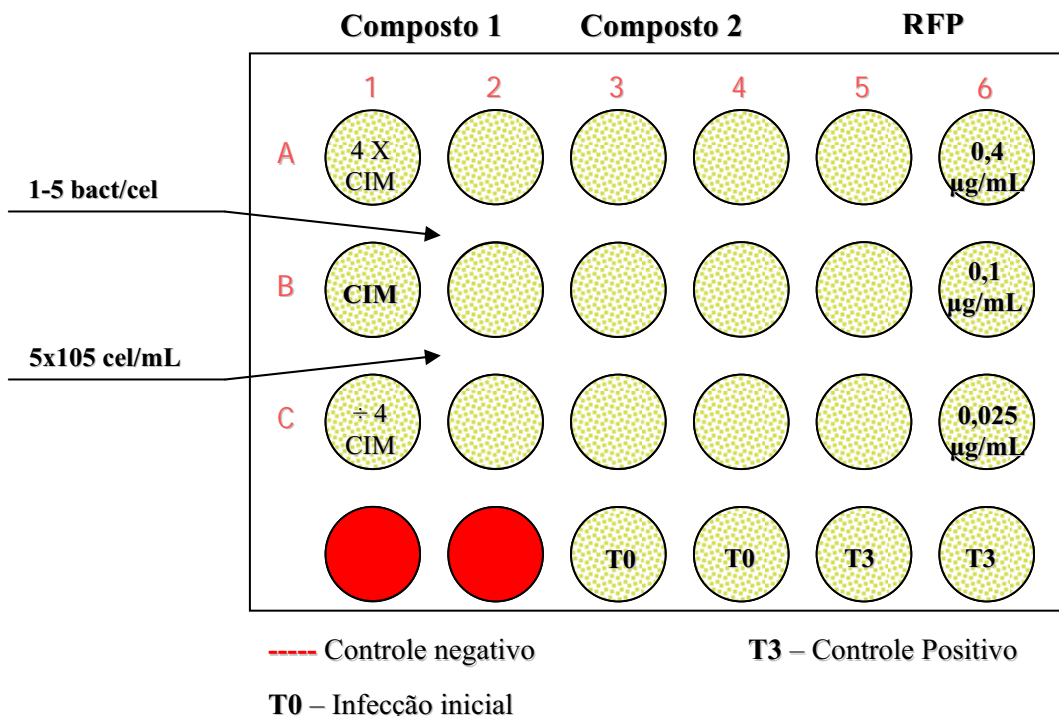
Em seguida a placa de 24 orifícios foi novamente incubada por 3, 4 e 7 dias onde nesses dias chamados de T3, T4 e T7, foram realizadas lise das células, leituras em URL e plaqueamento para contagem de colônia, da mesma maneira que no T0.

Para validar o ensaio, a rifampicina foi utilizada como droga padrão nas concentrações de 0,40; 0,10 e 0,03  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e os resultados comparados com os obtidos no trabalho de SATO, (2003).

### 3.6.5.2. Determinação da atividade anti-*M. tuberculosis* intracelular dos complexos de vanádio e rutênio e seus ligantes livres

Após realização dos ensaios preliminares, todos os compostos foram avaliados quanto à atividade intracelular, iniciando a técnica como no item 3.4.4.1. Após estes passos, foram adicionados 1000  $\mu\text{L}$  de cada diluição dos compostos 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  $\mu\text{g/mL}$  (**figura 4**). De acordo com Sato, (2003), o tempo ótimo de incubação são de 3 dias, assim, as microplacas foram incubadas a 35<sup>0</sup>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  $\mu\text{L}$  da solução aquosa de lise Triton a 0,1%. Em uma microplaca branca de 96 orifícios foi adicionada 180  $\mu\text{L}$  desta suspensão proveniente da lise das células e adicionado 20  $\mu\text{L}$  de n-decil-aldeído a 1% em etanol. A leitura foi realizada no leitor de microplacas SpectraFluor Plus (TECAN<sup>®</sup>), com parâmetros de *Luminescence Integration Time* de 100 e *Gain* de 200. 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 internalizadas) e **b** o resultado em URL de cada orifício com a respectiva diluição do composto em análise.

$$100 \times \left( 1 - \frac{b}{a} \right) = \% \text{ de Inibição da Multiplicação Bacteriana Intracelular}$$



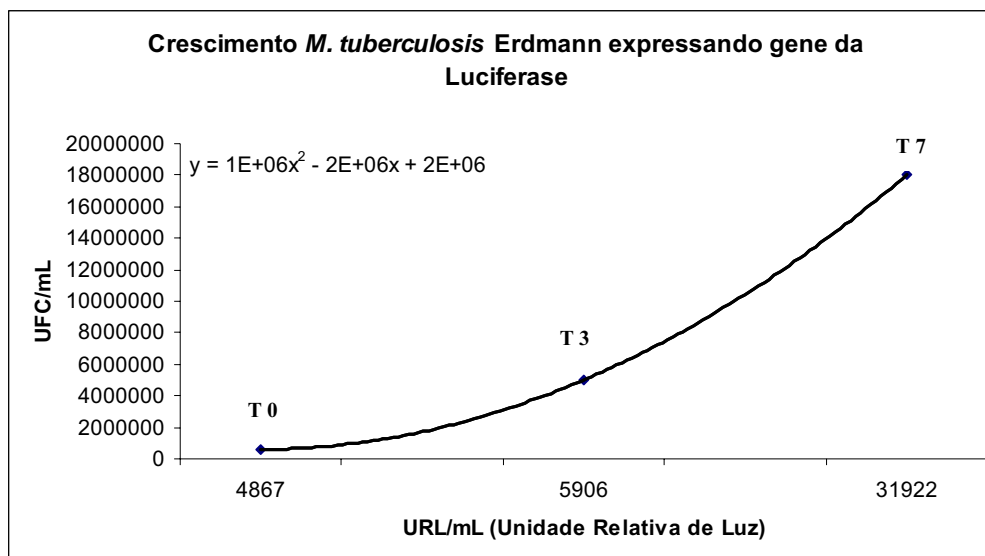
**Figura 4** - Representação esquemática do preparo da microplaca para a determinação da atividade inibitória mínima intracelular, utilizando a rifampicina como droga de referência e controle da técnica.

## 4. RESULTADOS e DISCUSSÃO

### 4.1. Ensaio Preliminares

#### 4.1.1. Avaliação da população bacilar viável nas suspensões bacilares congeladas

Para a técnica do REMA foi preconizado por Palomino et al., (2002) uma população na concentração de  $10^5$  UFC/mL para o início do ensaio, afim de se obter no final do experimento (7° dia)  $1 \times 10^7$  UFC/mL. Assim, neste estudo, a concentração populacional de cada *ependorf* contendo a suspensão de micobactérias congelada foi de  $28 \times 10^5$  UFC/mL. Para cada ensaio a suspensão bacilar diluída 25 vezes e aplicada na placa estava na concentração de  $1,1 \times 10^5$  UFC/mL. A população bacilar viável foi determinada pelo plaqueamento de uma alíquota da suspensão do *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv ATCC 27294 em meio de cultura Middlebrook 7H10 acrescido de OADC como descrito no item 3.6.1. Na técnica de luciferase intracelular a densidade populacional do *M. tuberculosis* Erdman ATCC 35801 contendo o plasmídeo pSMT1 foi determinada pelo plaqueamento em meio de cultura Middlebrook 7H10 contendo higromicina na concentração de 50 µg/mL (item 3.6.1.). A população bacilar foi correlacionada com a URL (Unidade Relativa de Luz) após a adição de n-decil-aldeído a 1% em etanol nos períodos de incubação de 0 dias (T0), 3 dias (T3) e 7 dias (T7) como mostrado no **gráfico 1**.



**Figura 5.** - Cinética da multiplicação do *M. tuberculosis* Erdmann extra celular, no período de incubação de 7 dias correlacionando as UFC/mL com a Unidade Relativa de Luz/mL (URL/mL) .

Ao correlacionar a população bacilar viável (UFC/mL) com as URL/mL foram verificados valores graduais correspondentes nos períodos analisados. Assim, no período T0 para  $6 \times 10^5$  UFC/mL a emissão de luz foi de 4867 URL/mL, no período T3 para  $5 \times 10^6$  UFC/mL a emissão de luz foi de 5906 URL/mL e no período T7 para  $1,8 \times 10^7$  a emissão de luz foi de 31922 URL/mL.

#### 4.1.2. Padronização da luciferase intracelular e determinação da atividade intracelular utilizando a rifampicina como modelo

Os resultados da atividade de diferentes concentrações da rifampicina sobre *M. tuberculosis* recombinante internalizado nas células de macrófago J774, obtidas após 3 dias de incubação (SATO, 2003) são apresentados na **Tabela 5**. Cada resultado expressa a média de três repetições em duplicatas.

**Tabela 5.** Atividade intracelular da rifampicina em diferentes concentrações empregado o *M. tuberculosis* Erdman ATCC 35801 contendo o plasmídeo pSMT1

Concentração em µg/mL	URL	% Inibição
0.40	835	80,40
0.10	2066	51,50
0.03	3234	24
Controle de crescimento bacteriano intracelular	4258	-----

Sato, (2003), nas concentrações de 0,16; 0,04 e 0,01 µg/mL obteve valores inibitórios para rifampicina intracelular de 70, 51 e 17% respectivamente. Observando os valores encontrados neste trabalho, vemos uma proximidade nos resultados dos ensaios, validando assim a técnica empregada.

#### 4.2. ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS COMPOSTOS

De acordo com o National Institute of Allergy and Infectious Diseases e pelo National Institutes of Health (EUA), cada composto foi avaliado frente ao *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv ATCC 27294 utilizando a técnica de *Resazurin Microtiter Assay* (REMA), determinando a sua Concentração Inibitória Mínima (CIM). Os compostos ativos, com atividade biológica igual ou inferior a 7,80 µg/mL, foram avaliados quanto a sua citotoxicidade (IC<sub>50</sub>) empregando culturas de macrófagos (linhagem J774), onde foi determinada a maior concentração do composto capaz de permitir a viabilidade de 50% das células. Assim, um Índice de Seletividade (IS), foi determinado, pela razão entre o IC<sub>50</sub> e o CIM. Quando

o IS resultou em um valor maior ou igual a 10, então o composto foi submetido ao ensaio de determinação da atividade intracelular, ou seja, foi verificada a capacidade do composto em inibir a multiplicação do *M. tuberculosis* Erdmann ATCC 35801 no interior dos macrófagos (ORME et al., 2001). Os resultados dos compostos de vanádio e rutênio são apresentados e discutidos nos itens a seguir.

#### **4.2.1. Propriedades biológicas *in vitro* dos ligantes livres e dos complexos de vanádio**

Nosso grupo objetivou sintetizar complexos de vanádio com atividade contra o bacilo da tuberculose, substituindo-se o N(4) do vanádio por complexos orgânicos tiossemicarbazonas, semicarbazonas e hidrazonas cuja atividade antituberculose já foi devidamente comprovada (PATOLE et al., 2003).

As propriedades biológicas (CIM e IC<sub>50</sub>) *in vitro* dos ligantes livres (tiossemicarbazonas, semicarbazonas e hidrazonas) e dos complexos de vanádio são apresentados nas **Tabelas 6, 7, 8 e 9**.

##### **4.2.1.1. Compostos contendo tiossemicarbazonas**

Na tabela 6 são apresentados os resultados da atividade biológica dos complexos de vanádio contendo tiossemicarbazonas e de seus ligantes livres.



**Tabela 6 – Resultados das avaliações biológicas (CIM e IC<sub>50</sub>) e determinação do IS dos compostos contendo Tiossemicarbazonas**

Siglas	Compostos	CIM		IC <sub>50</sub>		IS
		µg/mL	µM	µg/mL	µM	CIM/IC <sub>50</sub>
<b>Tiossemicarbazonas</b>						
<b>Lig14</b>	<b>Haptsc</b>	31,25	160,90	156,30	805	5
V1	[VO(acac)(aptsc)]	62,50	173,90	9,80	27,30	0,16
V2	[VO <sub>2</sub> (aptsc)]	31,25	113,10	19,50	70,60	0,60
<b>Lig15</b>	<b>Happtsc</b>	15,60	57,70	3,90	14,43	0.25
V4	[VO(acac)(apptsc)]	1,56	3,58	3,90	9	2,50
V5	[VO <sub>2</sub> (apptsc)]	15,60	44,28	15,60	222	1
<b>Lig5</b>	<b>Hapmtsc</b>	7,80	37,40	<1,90	<5,30	<0,25
Vb6	[VO <sub>2</sub> (apmtsc)]	3,90	13,40	<1,90	<6,50	<0,50
Vb7	[VO(acac)(apmtsc)]	3,90	10,40	<1,90	<5,90	<0,50
<b>Lig12</b>	<b>Hapmot</b>	0,78	2,95	3,90	14,80	5
Vb18	[VO <sub>2</sub> (apmot)]	3,90	11,26	<1,90	<5,50	<0,50

Os ligantes livres de tiossemicarbazonas (Lig14, Lig15, Lig5 e Lig12) apresentaram respectivamente valores de CIM de 31,25; 15,60; 7,80 e 0,78 µg/mL respectivamente. Esses resultados confirmam a atividade anti-TB desses ligantes como já relatado por outros autores (BERALDO et al., 2004; COLLINS et al., 1982).

Segundo Nomyia et al., (2004) a atividade antibacteriana e fungicida de tiossemicarbazonas se deve a sua habilidade em quelar metais essenciais ao metabolismo dos microorganismos. A atividade de uma série de acetilpiridina-tiossemicarbazonas N(4)-substituídas depende de o composto apresentar um

caráter hidrofóbico ótimo, o qual controlaria sua passagem através da membrana celular. O único composto da classe a ser empregado clinicamente é a 4-acetamidobenzaldeído tiossemicarbazona, comercialmente conhecida como tiacetazona (COLLINS et al., 1982).

Os resultados da tabela 6 também mostram que a complexação do ligante Lig14 não melhorou a atividade dos complexos, pelo contrário, o complexo V2 apresentou um decréscimo de 2x na atividade inibitória (62,50 µg/mL), e a citotoxicidade dos complexos aumentou em 16x e 8x (V1 e V2 respectivamente). O ligante livre Lig15 (CIM de 15,60 µg/mL e IC<sub>50</sub> 3,90 µg/mL), quando complexado, melhorou a atividade inibitória em 10x para o derivado V4 (1,56 µg/mL) e manteve esse índice inalterado no complexo V5 (15,60 µg/mL). Quanto à citotoxicidade o complexo V5 apresentou-se 4x menor e o outro complexo (V4) manteve-se inalterado. O ligante Lig 5 (CIM = 7,80 µg/mL e IC<sub>50</sub> <1,90 µg/mL) apresentou uma melhora de 2x na atividade inibitória quando complexado ao V, Vb6 e Vb7 (3,90 µg/mL) e nenhuma alteração na citotoxicidade. Por fim o ligante Lig 12 (CIM de 0,78 µg/mL) quando complexado (Vb18) reduziu a sua atividade inibitória em 5x e a citotoxicidade aumentada de 2x (3,90 µg/mL e <1,90 respectivamente).

Analisando-se apenas os ligantes tiossemicarbazonas e seus derivados, verifica-se que a substituição de um dos hidrogênios ligados ao nitrogênio N(4) da tiossemicarbazona por grupos mais volumosos (fenila e metila) aumentou a atividade do ligante. Considerando os ligantes substituídos no N(4), e seus complexos, pode-se observar que os complexos V5, Vb6 e

Vb7, apresentaram uma leve melhora ou similar CIM quando comparados a seus ligantes livres.

Por outro lado, o complexo V4 apresentou uma alta atividade biológica contra o *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv (CIM = 1,56 µg/mL), sendo mais ativo que o ligante livre em 10x. Este resultado de CIM é igual ou melhor do que as drogas utilizadas na atual terapêutica contra TB, como ciprofloxacino (CIM = 2 µg/mL), ácido *p*-aminosalicílico (CIM = 0,50–2 µg/mL), etionamida (CIM = 0,63–1,25 µg/mL), cicloserina (CIM = 12,50–50 µg/mL), gentamicina (CIM = 2–4 µg/mL), etambutol (CIM = 0,94–1,88 µg/mL), kanamicina (CIM = 1,25–5 µg/mL), tobramicina (CIM = 4–8 µg/mL), claritromicina (CIM = 8–16 µg/mL) e tiacetazona (CIM = 0,13–2 µg/mL) (COLLINS & FRANZBLAU, 1997) e também a outros candidatos a agentes anti-TB como por exemplo o composto SQ109, financiado pela empresa Sequella Inc., que é um análogo do etambutol com CIM de 1,56 µg/mL e completou com sucesso a fase clínica I e está agendado para entrar na fase clínica II (PROTOPOPOVA et al., 2005)

O aumento na atividade inibitória do complexo V4 quando comparado com os íons livres pode ser justificado pela redução da polaridade do complexo devido à partição de suas cargas com a coordenação dos compostos. Esta diminuição de carga pode favorecer a permeabilidade do composto através da parede celular da bactéria rica em lipídios, resultando numa possível melhoria de atividade do complexo frente à bactéria (MAURYA et al., 2006); (PANCHAL et al., 2006).

Quanto a análise de citotoxicidade (IC<sub>50</sub>), todos os complexos aumentaram ou mantiveram o mesmo valor quando comparados aos seus

respectivos ligantes livres, indicando que a complexação não reduziu a citotoxicidade das tiossemicarbazonas como já descritas por Collins et al. (1982).

Quanto ao Índice de Seletividade (IS), nenhum dos compostos desta classe apresentou IS igual ou superior a 10. Assim, nenhum deles foi submetido ao ensaio de atividade intracelular *in vitro*.

#### 4.2.1.2. Compostos contendo semicarbazonas

Na tabela 7 são apresentados os resultados da atividade biológica dos complexos de vanádio contendo semicarbazonas e de seus ligantes livres.

**Tabela 7 – Resultados das avaliações biológicas (CIM e IC<sub>50</sub>) e determinação do IS dos compostos contendo Semicarbazonas**

Siglas	Compostos	CIM		IC <sub>50</sub>		IS
		µg/mL	µM	µg/mL	µM	CIM/IC <sub>50</sub>
<b>Semicarbazonas</b>						
<b>Lig1</b>	<b>Happs</b>	250	1037	15,60	64,70	2
Vb1	[VO <sub>2</sub> (apps)]	3,90	11,60	1,90	5,70	0,5
<b>Lig7</b>	<b>Hapsc</b>	NHICB**	NHICB**	NR*	NR*	NR*
Vb9	[VO(acac) <sub>2</sub> (Hapsc)]	NHICB**	NHICB**	NR*	NR*	NR*
Vb10	[VO <sub>2</sub> (apsc)]	250	960	NR*	NR*	NR*
<b>Lig8</b>	<b>H<sub>2</sub>hasc</b>	250	1294	NR*	NR*	NR*
Vb11	[VO <sub>2</sub> (Hhasc)]	NHICB**	NHICB**	NR*	NR*	NR*
Vb12	[VO <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> hasc)]	NHICB**	NHICB**	NR*	NR*	NR*
Vb13	[VO(acac)(Hhasc)]	NHICB**	NHICB**	NR*	NR*	NR*

\*NR – Não Realizado

\*\*NHICB – Não houve inibição da multiplicação bacteriana

Os ligantes livres de semicarbazonas apresentaram baixa atividade anti-*M. tuberculosis* com valores de CIM igual ou superior a 250 µg/mL. Estes dados contrariam os descritos por Sriram et al., (2004).

Neste trabalho, foi verificado também que todos os complexos de vanádio contendo semicarbazonas, com exceção do Vb1, não apresentaram inibição da multiplicação bacteriana considerável. O complexo Vb1 foi o mais interessante (CIM = 3,90 µg/mL), sendo 64x mais ativo do que seu ligante livre, porém, com O IC<sub>50</sub> aumentado em 8x.

Quanto ao Índice de Seletividade (IS), nenhum dos compostos desta classe apresentou IS igual ou superior a 10. Assim, nenhum deles foi submetido ao ensaio de atividade intracelular *in vitro*.

## 4.2.1.3. Compostos contendo hidrazonas

Na tabela 8 são apresentados os resultados da atividade biológica dos complexos de vanádio contendo hidrazonas e de seus ligantes livres.

**Tabela 8 – Resultados das avaliações biológicas (CIM e IC<sub>50</sub>) e determinação do IS dos compostos contendo Hidrazonas**

Siglas	Compostos	CIM		IC <sub>50</sub>		IS
		µg/mL	µM	µg/mL	µM	CIM/IC <sub>50</sub>
<b>Hidrazonas</b>						
<b>Lig2</b>	<b>H<sub>2</sub>haah</b>	15,60	57,93	NR*	NR*	NR*
Vb2	[{VO(haah)}(OMe)]	25	68,44	NR*	NR*	NR*
Vb3	[{VO(haah)} <sub>2</sub> (µ-O)]	62,50	91,31	NR*	NR*	NR*
<b>Lig3</b>	<b>Hapfh</b>	7,80	34,03	15,60	68,10	2
Vb4	[VO(acac)(apfh)]	3,90	9,89	<1,90	<4,80	<0,50
Vb5	[VO <sub>2</sub> (apfh)]	3,90	12,53	<1,90	<6,10	<0,50
<b>Lig6</b>	<b>Hfpfh</b>	250	1037	NR*	NR*	NR*
Vb8	[VO(fpvh)(fpvh.OMe)]0.5H <sub>2</sub> O	31,25	53,20	NR*	NR*	NR*
<b>Lig9</b>	<b>Hapbh</b>	1,90	7,94	<1,90	<7,90	<1
Vb14	[VO <sub>2</sub> (apbh)]	0,97	3,02	<1,90	<6	<1,90
Vb15	[VO(acac)(apbh)]	3,13	7,74	<1,90	<4,70	<0,60
<b>Lig10</b>	<b>Hapah</b>	15,60	61,35	1,90	7,50	0,13
Vb16	[VO <sub>2</sub> (apah)]	7,80	23,20	<1,90	<5,70	<0,20
<b>Lig11</b>	<b>Hsashz</b>	31,25	121,95	1250	4878	40
Vb17	[{VO(SASHZ)} <sub>2</sub> (µ-O)(µ-H <sub>2</sub> O)] <sub>2</sub> MeCN	7,80	10,28	15,60	20,60	2

\*NR – Não Realizado

\*\*NHICB – Não houve inibição da multiplicação bacteriana

Todos os ligantes livres de hidrazonas, com exceção do Lig 6 (CIM de 250 µg/mL), apresentaram atividade anti-*M. tuberculosis*, confirmando os dados de Rahman et al., (2005). O representante mais conhecido desta classe é a isoniazida (CIM = 0,015-0,03 µg/mL) é utilizada como droga de primeira linha no tratamento da TB (CASTELHO FILHO et al., 2004).

Neste trabalho, foi observado que os derivados de hidrazonas apresentaram atividade maior ou igual aos seus ligantes livres, com exceção dos complexos Vb2, Vb3, Vb15. Nota-se ainda que os complexos Vb4, Vb5, Vb14, Vb15, e Vb16 e os ligantes livres Lig3 e Lig9 apresentaram ótimos valores de atividade anti-*M. tuberculosis*, dando destaque ao complexo Vb14 (CIM = 0,97 µg/mL), comparável as drogas utilizadas na atual terapêutica (COLLINS & FRANZBLAU, 1997) e melhor do que outros candidatos a agentes anti-TB, como por exemplo, o SQ 109 (PROTOPOPOVA et al., 2005).

Este aumento na atividade inibitória dos complexos pode ser devido ao aumento da permeabilidade celular como um resultado do aumento na lipofilicidade em consequência da complexação, fato este também observado em reações de complexação com compostos antituberculose como isoniazida, tiacetazona e etambutol (TAYLOR et al., 1998); (BOTTARI et al., 2000).

Os compostos desta classe que foram avaliados quanto ao potencial citotóxico, apresentaram, da mesma maneira que as tiossemicarbazonas um aumento ou igualdade neste índice quando comparado os complexos aos respectivos ligantes.

Podemos observar ainda que nenhum dos compostos dessa classe apresentou IS igual ou superior a 10. Assim, nenhum deles foi submetido ao ensaio de atividade intracelular *in vitro*.

#### 4.2.1.4. Compostos das classes das tiocarbonoilhidrazona

Na tabela 9 são apresentados os resultados da atividade biológica dos complexos de vanádio contendo Tiocarbonoilhidrazona (tiossemicarbazona+semicarbazona) e de seus ligantes livres.

**Tabela 9 – Resultados das avaliações biológicas (CIM e IC<sub>50</sub>) e determinação do IS dos compostos contendo Tiocarbonoilhidrazonas**

Siglas	Compostos	CIM		IC <sub>50</sub>		IS
		µg/mL	µM	µg/mL	µM	CIM/IC <sub>50</sub>
<b>Tiocarbonoilhidrazona</b>						
Lig4	Hapmpt	1,90	5,30	15,60	43,50	8,20
Vb19	[VO <sub>2</sub> (apmpt)]	7,80	19,19	<1,90	<4,70	<0,20

A Tiocarbonoilhidrazona livre analisada (Lig 4) apresentou valor de CIM de 1,90 µg/mL, o mesmo valor da hidrazona Hapbh (Lig 9), entretanto com citotoxicidade muito mais reduzida (IC<sub>50</sub> 15,60 µg/mL), indicando ser por si só um bom candidato a agente anti-TB. No entanto, o Lig 4, quando complexado (Vb 19) teve sua atividade inibitória reduzida de 4x e a citotoxicidade aumentada em mais de 8x, o que resultou em um IS inferior a 10, não selecionando-o ao ensaio de atividade intracelular *in vitro*.



#### 4.2.2. Propriedades biológicas *in vitro* dos ligantes livres e dos complexos de rutênio

As propriedades biológicas (CIM e IC<sub>50</sub>) *in vitro* dos ligantes livres e dos complexos de rutênio são apresentados nas **Tabelas 10, 11, 12, 13, 14 e 15**.

##### 4.2.2.1. Compostos contendo fosfinas

Na tabela 10 são apresentados os resultados da atividade biológica dos complexos de rutênio contendo fosfinas e de seus ligantes livres.

**Tabela 10 – Resultados das avaliações biológicas (CIM e IC<sub>50</sub>) e determinação do IS dos compostos contendo fosfinas**

Siglas	Compostos	CIM		IC <sub>50</sub>		IS
		µg/mL	µM	µg/mL	µM	CIM/IC <sub>50</sub>
<b>Fosfinas</b>						
GL1	dppm	25	65	312,50	812,50	12,50
GL2	dppe	6,25	15,70	156,30	392,60	25
G18	<i>cis</i> -[RuCl <sub>2</sub> (dppm) <sub>2</sub> ]	25	26,60	9,80	10,40	0,4
G19	<i>cis</i> -[RuCl <sub>2</sub> (dppe) <sub>2</sub> ]	25	25,80	9,80	10,10	0,4

Com CIM de 6,25 µg/mL o ligante livre 1,2-bis(difenilfosfina)etano (dppe) apresentou um CIM 4x mais ativo do que quando complexado (G19), CIM de 25 µg/mL. Já o complexo G18 apresentou CIM igual ao ligante livre (GL1), bis(difenilfosfina)metano (dppm), com CIM de 25 µg/mL. Quanto à citotoxicidade, observa-se que os complexos G18 e G19 apresentaram citotoxicidade 16x mais alta e IS bem inferiores em relação aos respectivos

ligantes livres. Infelizmente os nossos dados para atividade anti-*M. tuberculosis*, são contrários aos encontrados por Naresh et al. (2006) que descreveram atividade biológica de complexos de Ru contendo fosfinas frente a uma série de bactérias gram-positivas como *S. aureus*, gram-negativa como *E. coli*, e fungos como *C. albicans* e *A. níger*. Os autores observaram ainda que os complexos apresentaram uma melhor atividade do que os ligantes livres, e que os precursores utilizados não apresentaram nenhuma atividade biológica (NARESH et al., 2006).

Nenhum composto desta classe apresentou IS igual ou superior a 10. Assim, nenhum deles foi submetido ao ensaio de atividade intracelular *in vitro*.

## 4.2.2.2. Compostos contendo fosfinas e diiminas

Na tabela 11 são apresentados os resultados da atividade biológica dos complexos de rutênio contendo fosfinas e diiminas e de seus ligantes livres.

**Tabela 11 – Resultados das avaliações biológicas (CIM e IC<sub>50</sub>) e determinação do IS dos compostos contendo fosfinas e diiminas**

Siglas	Compostos	CIM		IC <sub>50</sub>		IS
		µg/mL	µM	µg/mL	µM	CIM/IC <sub>50</sub>
<b>Fosfinas e Diiminas</b>						
GL3	dppb	>50	>117,20	625	1465	≥12,50
GL6	Bipy	25	160,10	≤9,80	≤63	≤0,40
GL7	Me-Bipy	25	135,70	≤9,80	≤53,20	≤0,40
GL8	Phen	2,34	11,80	≤9,80	≤50	≤4,20
G14	<i>cis</i> -[RuCl <sub>2</sub> (dppb)(bipy)]	3,90	5,17	78,20	104	20
G15	<i>cis</i> -[RuCl <sub>2</sub> (dppb)(Me-bipy)]	6,25	7,99	39	49,90	6,24
G16	<i>cis</i> -[RuCl <sub>2</sub> (dppb)(Cl-bipy)]	6,25	7,59	19,50	23,70	3,12
G17	<i>cis</i> -[RuCl <sub>2</sub> (dppb)(fen)]	7,80	9,80	39	49	5

A Tabela 11 apresenta um grupo de complexos que contem a fosfina dppb e diferentes tipos de diiminas em sua composição. O ligante fosfínico (GL3) mostrou ser pouco ativo contra as micobactérias (CIM de >50 µg/mL), bem como os ligantes diimínicos GL6 e GL7 (CIM de 25 µg/mL), com exceção do ligante GL8 com CIM de 2,34 µg/mL. O ligante GL8 mostra-se mais volumoso (apresenta um anel aromático benzênico a mais) quando comparado

aos outros ligantes diimínicos desse grupo, fato este que pode ser o responsável pela alta atividade inibitória e citotóxica desse ligante livre. Por outro lado o ligante GL3 apresentou um efeito citotóxico menor quando comparado aos ligantes diimínicos (GL6, GL7 e GL8). Quando os ligantes fosfínicos foram complexados ao rutênio, variando apenas o tipo de ligante diimínico, a atividade inibitória melhorou muito como observado para os complexos G14, G15 e G16, com valores de CIM variando entre 3,90 e 6,25  $\mu\text{g/mL}$ . O efeito citotóxico também diminuiu comparado aos ligantes diimínicos livres, variando o valor de  $\text{IC}_{50}$  entre 19,50 e 78,20  $\mu\text{g/mL}$ . A substituição de dois átomos de hidrogênio dos anéis aromáticos do ligante (GL6) presente na esfera de coordenação do complexo G14 por grupos volumosos como a metila (G15) ou cloreto (G16) mostrou que houve uma diminuição na atividade inibitória e um aumento do poder citotóxico desses complexos. Uma explicação para o fato da melhor atividade biológica (CIM e  $\text{IC}_{50}$ ) desses complexos pode ser devido a uma ação sinérgica entre os ligantes e/ou a complexação dos ligantes ao centro metálico. Entretanto, o complexo G17 obtido através do ligante GL8 teve sua atividade inibitória diminuída cerca de 3x (7,80  $\mu\text{g/mL}$ ), por outro lado, o índice citotóxico diminuiu mais de 4x ( $\text{IC}_{50}$  de 39  $\mu\text{g/mL}$ ), devido, talvez, aos fatores acima citados.

Os complexos G1 e G14 apresentaram valor de IS superior a 10 (16 e 20 respectivamente), o que fez com que eles fossem selecionados para o ensaio subsequente de análise da atividade intracelular *in vitro*.

## 4.2.2.3. Compostos contendo fosfinas e picolinato

Na tabela 12 são apresentados os resultados da atividade biológica dos complexos de rutênio contendo fosfinas e picolinato e de seus ligantes livres.

**Tabela 12 – Resultados das avaliações biológicas (CIM e IC<sub>50</sub>) e determinação do IS dos compostos contendo fosfinas e picolinato**

Siglas	Compostos	CIM		IC <sub>50</sub>		IS
		µg/mL	µM	µg/mL	µM	CIM/IC <sub>50</sub>
<b>Fosfinas e Picolinato</b>						
GL1	dppm	25	65	312,50	812,50	12,50
GL2	dppe	6,25	15,70	156,30	392,60	25
GL5	PPh <sub>3</sub>	25	95	156,30	596	6,30
GL9	HPic	>50	>406	312,50	2538	6,25
G5	<i>cis</i> -[Ru(pic)(dppm) <sub>2</sub> ]PF <sub>6</sub>	0,78	0,69	1,90	1,67	2,44
G6	<i>cis</i> -[Ru(pic)(dppe) <sub>2</sub> ]PF <sub>6</sub>	0,26	0,22	3,90	3,35	15,20
G13	[Ru(pic) <sub>2</sub> (PPh <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ]	>50	>57	312,50	359,20	≤6,25

Conforme observado na tabela 10, e discutido no item 4.2.2.1 a fosfina (dppm ou dppe) complexada ao metal não mostrou melhora significativa nas atividades biológicas. Na Tabela 12, os complexos que contém essas mesmas fosfinas (G5 e G6) e o picolinato (GL9), apresentaram uma maior atividade inibitória comparada a todos os ligantes, variando entre 0,26 e 0,78 µg/mL, o que corresponde a um aumento de até 32x na atividade entre o ligante livre (GL1) e complexo (G5). Nesses complexos, a adição do ligante picolinato melhorou significativamente a atividade inibitória e mostra claramente o

sinergismo entre os ligantes dppe e dppm com o picolinato. Por outro lado, os complexos apresentaram alta citotoxicidade de 1,90 e 3,90  $\mu\text{g/mL}$  para os complexos G5 e G6, respectivamente. O complexo G13 contendo o ligante fosfínico  $\text{PPh}_3$  (GL5) e o picolinato, por outro lado, não mostrou nenhuma melhora significativa na atividade biológica, isto, talvez se deva ao menor tamanho do ligante fosfínico quando comparado aos demais ligantes do grupo, sugerindo que o efeito estérico, ou o volume do complexo, é importante para sua atividade biológica.

Nenhum composto desta classe apresentou IS igual ou superior a 10. Assim, nenhum deles foi submetido ao ensaio de atividade intracelular *in vitro*.

## 4.2.2.4. Compostos contendo fosfinas, diiminas e picolinato

Na tabela 13 são apresentados os resultados da atividade biológica dos complexos de rutênio contendo fosfinas, diiminas e picolinato e de seus ligantes livres.

**Tabela 13 – Resultados das avaliações biológicas (CIM e IC<sub>50</sub>) e determinação do IS dos compostos contendo fosfinas, diiminas e picolinato**

Siglas	Compostos	CIM		IC <sub>50</sub>		IS
		µg/mL	µM	µg/mL	µM	CIM/IC <sub>50</sub>
<b>Fosfinas, Diiminas e Picolinato</b>						
<b>GL3</b>	<b>dppb</b>	>50	>117,20	625	1465	≥12,50
<b>GL6</b>	<b>Bipy</b>	25	160,10	≤9,80	≤63	≤0,40
<b>GL7</b>	<b>Me-Bipy</b>	25	135,70	≤9,80	≤53,20	≤0,40
<b>GL8</b>	<b>Phen</b>	2,34	11,80	≤9,80	≤50	≤4,20
<b>GL9</b>	<b>HPic</b>	>50	>406	312,50	2538	6,25
G7	[Ru(pic)(dppb)(bipy)]PF <sub>6</sub>	0,91	0,95	31,30	32,60	34,40
G8	[Ru(pic)(dppb)(Me-bipy)]PF <sub>6</sub>	0,49	0,50	11,70	11,90	23,90
G9	[Ru(pic)(dppb)(Cl-bipy)]PF <sub>6</sub>	0,78	0,76	31,30	30,40	40
G12	[Ru(pic)(dppb)(fen)]	0,63	0,74	19,50	23	31,20

Os dados da tabela 11 já demonstravam que os complexos G14 e G15 que contém o ligante fosfínico dppb (GL3) em ambos e as diiminas bipy (GL6) e Me-bipy (GL7) tinham a sua atividade inibitória aumentada e uma redução no índice citotóxico quando comparados aos respectivos ligantes. Nesses mesmos complexos (G14 e G15) quando ocorre a substituição dos cloretos pelo ligante

picolinato (G7 e G8) na esfera de coordenação do metal nota-se uma maior atividade inibitória variando entre 0,49 e 0,91  $\mu\text{g/mL}$  (em até 13x entre os complexos G15 e G8) e uma mudança pouco significativa na citotoxicidade quando comparado aos complexos G14 e G15, respectivamente. A mesma observação é válida na substituição dos cloretos do complexo G17 pelo íon picolinato, obtendo desse modo o complexo G12 com um alto valor inibitório de 0,63  $\mu\text{g/mL}$  e um baixo índice citotóxico de 19,50  $\mu\text{g/mL}$ . Novamente foi verificado que a associação do picolinato a esses outros ligantes e ao metal melhorou a atividade biológica dos complexos.

Os complexos G7, G8, G9, G12 apresentaram um valor de IS superior a 10 (34,40; 23,90; 40; 31,20 respectivamente), o que fez com que eles fossem selecionados para o ensaio subsequente de análise da atividade intracelular *in vitro*.



#### 4.2.2.5. Compostos contendo fosfinas, diiminas e ligantes contendo o íon tiolato

Na tabela 14 são apresentados os resultados da atividade biológica dos complexos de rutênio contendo fosfinas, diiminas e o íon tiolato e de seus ligantes livres.

**Tabela 14 – Resultados das avaliações biológicas (CIM e IC<sub>50</sub>) e determinação do IS dos compostos contendo fosfinas, diiminas e ligantes contendo o íon tiolato**

Siglas	Compostos	CIM		IC <sub>50</sub>		IS
		µg/mL	µM	µg/mL	µM	CIM/IC <sub>50</sub>
<b>Fosfinas, Diiminas e ligantes contendo o íon tiolato</b>						
GL3	dppb	>50	>117,20	625	1465	≥12,50
GL6	Bipy	25	160,10	≤9,80	≤63	≤0,40
GL7	Me-Bipy	25	135,70	≤9,80	≤53,20	≤0,40
GL10	HspymMe2	25	178,30	312,50	2228	12,50
G10	[Ru(SpymMe <sub>2</sub> )(dppb)(bipy)]PF <sub>6</sub>	0,78	0,80	1,90	1,96	2,44
G11	[Ru(SpymMe <sub>2</sub> )(dppb)(Me-bipy)]PF <sub>6</sub>	0,78	0,78	1,90	1,91	2,44
G3	[Ru(pyS) <sub>2</sub> (c-dppen)]	>50	>69,80	312,50	436	≤6,25

Pela tabela 14 é verificado que a substituição do picolinato dos complexos G7 e G8 por ligantes contendo o íon tiolato (G10 e G11) alterou pouco a atividade inibitória, mas aumentou a citotoxicidade em até 16x. Os resultados mostram que ao mesmo tempo em que o ligante contendo o íon tiolato é efetivo contra a bactéria, também é tóxico para as células. O complexo

G3 não mostrou atividade inibitória interessante, porém apresentou um índice de citotoxicidade muito baixo.

Nenhum composto desta classe apresentou IS igual ou superior a 10. Assim, nenhum deles foi submetido ao ensaio de atividade intracelular *in vitro*.

#### 4.2.2.6. Compostos contendo nitrosilo (nitrosilo-complexos)

Na tabela 15 são apresentados os resultados da atividade biológica dos complexos de rutênio contendo nitrosilos complexos e de seus ligantes livres.

**Tabela 15 – Resultados das avaliações biológicas (CIM e IC<sub>50</sub>) e determinação do IS dos nitrosilo complexos**

Siglas	Compostos	CIM		IC <sub>50</sub>		IS
		µg/mL	µM	µg/mL	µM	CIM/IC <sub>50</sub>
<b>Nitrosilo complexos</b>						
GL2	dppe	6,25	15,70	156,30	392,60	25
GL4	dcpe	>50	>118	156,30	369,80	≥3,10
GL7	Me-Bipy	25	135,70	≤9,80	≤53,20	≤0,40
G1	<i>cis</i> -[RuCl <sub>2</sub> (NO)(BPA)]	7,80	19	125	304	16
G2	<i>trans</i> -[RuCl(NO)(dppe) <sub>2</sub> ](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>	7,80	6,20	3,90	3,10	0,50
G4	[RuCl(NO)(dcpe)(Me-bipy)](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>	6,25	5,89	7,80	7,25	1,25

Nos nitrosilo-complexos observa-se que apenas o ligante livre da classe das fosfinas GL2 apresentou um alto valor inibitório (6,25 µg/mL), o outro ligante de mesma classe GL4 e o da classe das diiminas GL7 apresentaram baixa atividade inibitória variando entre 25 e >50 µg/mL.

Novamente evidenciou-se o baixo efeito citotóxico das fosfinas (156,30 µg/mL) frente a um maior efeito citotóxico da diimina ( $\leq 9,80$  µg/mL). A presença de aromaticidade no ligante GL2 comparada com o ligante GL4 pode ter sido a responsável pela diferença na atividade inibitória entre esses ligantes. O complexo G2 não mostrou um aumento significativo na atividade inibitória (7,80 µg/mL) quando comparado ao seu ligante livre (6,25 µg/mL), porém a atividade citotóxica aumentou em 40x. O complexo G4 mostrou uma maior atividade inibitória e citotóxica quando comparada aos seus ligantes livres, isto porque possivelmente ocorreu uma ação sinérgica entre os ligantes e/ou devido a complexação ao metal como discutido no item 4.2.2.2. O complexo G1 mostrou um alto valor inibitório (7,80 µg/mL) e um baixo valor citotóxico (125 µg/mL).

O complexo G1 apresentou valor de IS superior a 10 (16), o que fez com que ele fosse selecionado para o ensaio subsequente de análise da atividade intracelular *in vitro*.

#### **4.2.3. Determinação da atividade anti *M. tuberculosis* intracelular dos complexos de vanádio e rutênio e seus ligantes livres**

Para a determinação da atividade intracelular foram selecionados os compostos G1, G6, G7, G8, G9, G12 e G14 que apresentaram maior Índice de Seletividade (IS) calculado entre a razão entre o IC<sub>50</sub> e o CIM. O potencial intracelular foi determinado de acordo com a metodologia desenvolvida por Snewin et al. (1999), empregando diferentes concentrações dos compostos selecionados.

As propriedades biológicas intracelular *in vitro* dos ligantes livres de Ru e seus complexos selecionados são apresentados na **Tabela 16**.

**Tabela 16 – Resultados da atividade intracelular dos compostos selecionados em diferentes concentrações**

Siglas	Compostos	Concentrações	Valor inibitório intracelular (%)
		µg/mL	
G1	<i>cis</i> -[RuCl <sub>2</sub> (NO)(BPA)]	31,20	97,70
		7,80	94,80
		3,90	81,70
G6	<i>cis</i> -[Ru(pic)(dppe) <sub>2</sub> ]PF <sub>6</sub>	1	77,50
		0,25	55,10
		0,06	48,30
G7	[Ru(pic)(dppb)(bipy)]PF <sub>6</sub>	3,64	82,30
		0,91	73,30
		0,23	70,50
G8	[Ru(pic)(dppb)(Me-bipy)]PF <sub>6</sub>	1,96	78,90
		0,49	75,30
		0,12	65,90
G9	[Ru(pic)(dppb)(Cl-bipy)]PF <sub>6</sub>	3,12	62,30
		0,78	43,30
		0,20	31,90
G12	[Ru(pic)(dppb)(fen)]	2,50	85,20
		0,63	80,50
		0,16	47,60
G14	<i>cis</i> -[RuCl <sub>2</sub> (dppb)(bipy)]	15,60	51,10
		3,90	33,40
		0,98	19,40

Na tabela 16 observa-se que o complexo G1 contendo nitrosilo apresentou na concentração do CIM de 7,80 µg/mL, porcentagem inibitória intracelular superior a 90% (94,80%). Quando aumentada a concentração em 4x (31,20 µg/mL) a porcentagem inibitória também aumentou, chegando ao valor próximo de 100% (97,70%) e quando essa concentração foi diminuída de 4x (3,90 µg/mL) houve uma pequena redução nessa porcentagem (81,70%). A

partir da definição de que a CIM é a menor concentração do composto capaz de inibir 90% da multiplicação bacteriana intracelular (MOR et. al, 1995), pode-se afirmar que na concentração 7,80 µg/mL, todo o complexo G1 conseguiu penetrar no macrófago e inibir a multiplicação bacteriana. Esse mesmo raciocínio é observado nas demais concentrações desse complexo.

O complexo G6 contendo ligantes de fosfina e picolinato que apresentou a melhor atividade inibitória extracelular com CIM de 0,25 µg/mL (tabela 12), nessa concentração, a atividade inibitória intracelular foi de 55,10%. Quando aumentada passou para 77,50% e quando diminuída foi para 48,30%. Embora a atividade extracelular anti-*M. tuberculosis* apresentada pelo complexo G6 tenha sido excelente, pode-se observar que apenas uma parte do complexo (na concentração de 0,25 µg/mL) conseguiu penetrar na célula. Ao aumentar essa concentração de 4x, uma maior parte da substância conseguiu penetrar aumentando a capacidade de inibição.

Os complexos G7, G8, G9 e G12 são compostos contendo as mesmas classes de ligantes: fosfina, diimina e picolinato, variando entre si apenas os ligantes de diiminas. O complexo G7 (contendo a diimina bipy) na concentração de 0,91 µg/mL (CIM) apresentou inibição de 73,30% dos bacilos intracelulares. Quando a concentração foi aumentada de 4x (3,64 µg/mL) a inibição passou para 83,30% e quando diminuída de 4x (0,23 µg/mL) foi para 70,50%. Pode-se aplicar o mesmo raciocínio discutido para o complexo G6, porém, nota-se que a redução na concentração em 4x não mostrou significativa perda da atividade inibitória, pois essa reduziu apenas em 2,80%. O complexo G8 (contendo a diimina Me-bipy) na concentração de 0,49 µg/mL (CIM) apresentou 75,30% de

inibição intracelular. Quando aumentado a concentração (1,96 µg/mL) esse valor passou para 78,90% e quando diminuída a concentração (0,12 µg/mL) foi para 65,90%. Aqui se faz válida a mesma discussão apresentada para os complexos G6 e G7, porém com uma diferença, pois para estes compostos o aumento da concentração não mostrou significativa perda da atividade inibitória, pois essa aumentou apenas em 3,60% diferente do fato ocorrido para o complexo G7. O complexo G9 (contendo a diimina Cl-bipy) foi o que apresentou menor atividade inibitória intracelular. Neste no valor do CIM (0,78 µg/mL) o índice bacilar intracelular inibido foi apenas de 43,30%, quando aumentado essa concentração para 3,12 µg/mL, essa porcentagem foi para 62,30% e quando diminuída (0,20 µg/mL) esse valor foi para 31,90%. O complexo G12 (contendo a diimina fen) apresentou 80,50% de inibição quando testado na concentração de 0,63 µg/mL (CIM) e quando aumentada (2,50 µg/mL) essa porcentagem foi para 85,20%, pode-se afirmar que esse complexo esteve muito próximo da penetração total do composto na célula, devido a esses valores estarem muito próximos de 90%. Porém, quando diminuída essa concentração (0,16 µg/mL), a porcentagem inibitória reduziu significativamente para 47,60%.

Em relação ao complexo G14 contendo ligantes de fosfina e diimina, este apresentou 33,40% de inibição na concentração do CIM (3,90 µg/mL), quando a concentração foi aumentada de 4x, o valor inibitório intracelular passou para 51,10% e quando diminuída a concentração para 0,98 µg/mL, o valor inibitório também reduziu para 19,40%. Os valores de atividade intracelular obtidos para esse complexo foram os menores comparados com os

outros complexos selecionados. Nota-se que a diferença existente entre esse complexo (G14) e o complexo G7 é a substituição do Cl do complexo G14 por um ligante de picolinato formando o complexo G7. Novamente percebemos que a associação do picolinato a esses outros ligantes e ao metal melhorou não apenas a atividade biológica extracelular (CIM e IC<sub>50</sub>) do complexo, mas também a atividade intracelular.

Os resultados da atividade intracelular (tabela 16) mostraram claramente que apesar do complexo G6 ter apresentado a melhor atividade inibitória extracelular (0,23 µg/mL), foram os complexos G7, G8 e G12 que em concentrações mais baixas foram os mais ativos contra os bacilos internalizados em macrófagos.

Uma possível explicação para este fato é de que os testes baseados na exposição direta das bactérias às drogas não podem refletir exatamente a forma como os parasitas bacterianos intracelulares sofrem atuação dos fármacos nas células do hospedeiro. Muitos fatores em potencial podem afetar a atividade da droga durante sua interação com as células do hospedeiro infectada que não são avaliados por ensaios de sensibilidade em bactérias extracelulares (SKINNER et al., 1994). Por exemplo, os mecanismos de transporte celular podem influenciar a concentração intracelular da droga independentemente da sua concentração externa; nesta consideração algumas drogas, tais como os macrolídeos e rifamicinas, sabidamente se concentram bem dentro dos macrófagos (BERMUDEZ & YOUNG, 1988); (SAITO & TOMIOKA, 1988), enquanto que outras drogas, tais como os aminoglicosídeos e 3-lactamas (ELLNER et al., 1991), podem ser expulsas das células. Outra

possibilidade, é o pH local que pode afetar a atividade da droga, por exemplo, a claritromicina é mais eficaz em pH básico do que próximo a neutralidade (TRUFFOT-PERNOT et al., 1991).

### 4.3. Avaliação geral dos complexos de vanádio e rutênio analisados

Em relação aos complexos de vanádio e seus ligantes livres, neste estudo foram analisados 37 compostos (14 ligantes livres e 23 complexos). Destes, 17 (46%) compostos (5 ligantes livres e 12 complexos) apresentaram valores de CIM promissores ( $\leq 7,80 \mu\text{g/mL}$ ), variando entre 0,97 e 7,80  $\mu\text{g/mL}$ . Entretanto devido à alta citotoxicidade apresentada pelos complexos, o cálculo do IS foi inferior a 10 e assim, não submetendo nenhum complexo a avaliação intracelular. Dentre os complexos de vanádio é verificado, por exemplo, que os complexos V4 e Vb1 tiveram suas atividades anti-*M. tuberculosis* aumentada de 10x e 64x, respectivamente, em relação aos seus ligantes livres (Lig15 e Lig1). Para Turel et al., (2003) o aumento de atividade dos complexos de vanádio em relação aos ligantes livres pode ser justificado pela maior facilidade dos complexos em interferir dentro ou sobre a membrana celular e no transporte de substratos e íons.

Em relação aos complexos de rutênio e seus ligantes livres, foram analisados 29 compostos (10 ligantes livres e 19 complexos). Destes, 17 (59%) compostos (2 ligantes livres e 15 complexos) apresentaram valores de CIM promissores ( $\leq 7,80 \mu\text{g/mL}$ ), variando entre 0,26 e 7,80  $\mu\text{g/mL}$ . Destes, 7 compostos apresentaram reduzida citotoxicidade, resultando em um valor de IS



superior a 10. Os compostos selecionados foram G1, G6, G7, G8, G9, G12 e G14, onde foi determinada a atividade inibitória intracelular. Desses compostos, com exceção do G9 e G14, os demais apresentaram boa capacidade de permear a membrana do macrófago e alcançar a micobactéria internalizada.

Em relação aos complexos contendo rutênio, há de se considerar também que em alguns casos a maior eficiência do complexo em relação à molécula orgânica se deve ao fato de que o complexo como um todo, ou o centro metálico em particular, pode servir como um transportador do fármaco, protegendo-o de degradações prematuras, ou mesmo viabilizando o transporte do mesmo através das membranas celulares, permitindo assim que o medicamento, que pode ser a espécie orgânica simplesmente, alcance o alvo onde irá de fato atuar (SANCHEZ et al., 1996).

Protopopova et al., (2005) realizou um estudo com 63.238 compostos análogos de etambutol com diferentes atividades biológicas contra *M. tuberculosis*. Nesse estudo apenas 27 compostos mostraram ter atividade igual ou melhor do que etambutol e apenas 10 foram avaliados quanto a atividade intracelular. Desses, 2 na concentração de 15,60 µg/mL, apresentaram porcentagem inibitória intracelular inferior a 90% e 2 superior a 90%. Na concentração de 7,80 µg/mL, 3 compostos apresentaram porcentagem inibitória inferior a 90% e 2 com valores superiores a 90%. O composto SQ 109 que foi avaliado todo seu perfil pré-clínico e agora está entrando na fase clínica, apresentou um valor inibitório intracelular superior a 90% na concentração de 1,56 µg/mL. Comparando este estudo com o nosso podemos avaliar os nossos resultados como bastante promissores. Uma vez que, dos 66

compostos analisados neste trabalho, 5 (7,60%) apresentaram atividade inibitória intracelular promissora contra os 10 (0,002%) dos 62.238 compostos analisados por Protopopova et al., (2005).

## 5. CONCLUSÕES

Os compostos contendo vanádio analisados, embora apresentando alta atividade contra o *M. tuberculosis*, mostraram ser altamente citotóxicos frente aos macrófagos.

Dos 66 compostos analisados neste trabalho, 7 complexos contendo o rutênio, *cis*-[RuCl<sub>2</sub>(NO)(BPA)] (**G1**), *cis*-[Ru(pic)(dppe)<sub>2</sub>]PF<sub>6</sub> (**G6**), [Ru(pic)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub> (**G7**), [Ru(pic)(dppb)(Me-bipy)]PF<sub>6</sub> (**G8**), [Ru(pic)(dppb)(Cl-bipy)]PF<sub>6</sub> (**G9**), [Ru(pic)(dppb)(fen)] (**G12**), *cis*-[RuCl<sub>2</sub>(dppb)(bipy)] (**G14**), foram qualificados como potenciais agentes anti-TB, porque apresentaram atividade inibitória (CIM) melhor do que algumas drogas comumente utilizadas no tratamento da tuberculose, baixa citotoxicidade (IC<sub>50</sub>) e alta atividade inibitória intracelular.

Dos 7 complexos selecionados, observa-se claramente uma ação de sinergismo entre os ligantes e o Ru, favorecendo a ação contra o bacilo da tuberculose e inibindo o efeito citotóxico contra as células eucarióticas.

Este trabalho comprovou que a associação entre a química inorgânica e a farmacologia podem formar potenciais agentes a ser utilizados na terapêutica da tuberculose.

## 6. Referências Bibliográficas

AHMED, S. A.; GOGAL, R. M.; WALSH, J. E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H]thymidine incorporation assay. **J Immunol Methods**, v.170, n.2, p. 211-224, 1994.

ALLARDYCE C.S.; DYSON P.J.; ELLIS D.J.; SALTERAND P.A.; SCOPELLITI R. Synthesis and characterisation of some water soluble ruthenium(II)–arene complexes and an investigation of their antibiotic and antiviral properties. **J Organometal Chem**, v.668, n.1-2, p. 35-42, 2003.

BERNERS-PRICE, S.J.; BOWEN, R.J.; GALETTIS, P.; HEALY, P.C.; MCKEAGE, M.J. Structural and solution chemistry of gold(I) and silver(I) complexes of bidentate pyridyl phosphines: selective antitumour agents, **Coordination Chem Reviews**, v.185-186, p. 823-836, 1999.

BERALDO, H. Semicarbazonas e tiosemicarbazonas: o amplo perfil farmacológico e usos clínicos. **Quim Nova**, v.27, n.3, p. 461-471, 2004.

BERMUDEZ, L.E.; YOUNG L.S. Activities of amikacin, rozithromycin, azithromycin alone or in combination with tumor necrosis factor against *Mycobacterium avium* complex. **Antimicrob Agents Chemother** v.32, p. 1149-1153, 1988.

BOTTARI, B.; MACCARI, R.; MONFORTE, F.; OTTANÀ, R.; ROTONDO, E.; VIGORITA, M.G. Isoniazid-related copper(II) and nickel(II) complexes with antimycobacterial *in vitro* activity. **Bioorg Med Chem Lett**, v.10, n.7, p. 657–660, 2000.

CASTELO FILHO, A. et al. II Consenso Brasileiro de Tuberculose. Normas Brasileiras para Tuberculose. **J Bras Pneumol**, v.30, n.1, p. 54-56, 2004.

CHEN, P.; et al. Sinergistic interactions of SQ 109, a new ethylene diamine, with front-line antitubercular drugs *in vitro*. **J Antimicrob Chemother**, v.58, n.2, p. 332-337, 2006.

CHO, S.H.; et al. Low-oxygen-recovery assay for high-throughput screening of compounds against nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.51, n.4, p. 1380-1385, 2007.

COCCO, M.T.; CONGIU, C.; ONNIS, V.; PELLERANO, M.L.; DE LOGU, A. Synthesis and antimycobacterial activity of new S-alkylisothiosemicarbazone derivatives. **Bioorg Med Chem**, v.10, n.3, p. 501-506, 2002.

COLLINS, F.M.; KLAYMAN, D.L.; MORRISON, N.E. Correlations between structure and antimycobacterial activity in a series of 2-acetylpyridine thiosemicarbazones. **J Gen Microbiol**, v.128, n.6, p. 1349-1356, 1982.

COLLINS, L.A.; FRANZBLAU, S.G. Microplate Alamar Blue Assay versus BACTEC 460 System for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.41, n.5, p. 1004-1009, 1997.

CRANS, D.C.; SMEE, J.J.; GAIDAMAUSKAS, E.; YANG, L. The chemistry and biochemistry of vanadium and the biological activities exerted by vanadium compounds. **Chem Rev**, v.104, n.2, p. 849-902, 2004.

DE ROSSI, E.; AÍNSA, J.A.; RICCARDI, G. Role of mycobacterial efflux transporters in drug resistance: an unresolved question. **FEMS Microbiol Rev**, v.30, n.1, p. 36-52, 2006.

DIMMOCK, J.R.; PANDEYA, S.N.; QUAIL, J.W.; PUGAZHENTHI, U.; ALLEN, T.M.; KAO, G.Y.; BALZARINI, J.; DECLERCQ, E. Evaluation of the semicarbazones, thiosemicarbazones and bis-carbohydrazones of some aryl alicyclic ketones for anticonvulsant and other biological properties. **Eur J Med Chem**, v.30, n.4, p. 303-314, 1995.

ELLNER, J.J.; GOLDBERGER M.J.; PARENTI D.M. *Mycobacterium avium* infection and AIDS: a therapeutic dilemma in rapid evolution. **J Infect Dis**, v. 163, p. 1326-1335, 1991.

FARRELL, N. Biomedical uses and applications of inorganic chemistry. An overview. **Coord Chem Rev**, v.232, n.1. p.1-4, 2002.

GENOVA, P.; VARADINOVA, T.; MATESANZ, A.I.; MARINOVA, D.; SOUZA, P. Toxic effects of bis(thiosemicarbazone) compounds and its palladium(II) complexes on herpes simplex virus growth. **Toxicol Appl Pharmacol**, v.197, n.2, p. 107-112, 2004.

Global Alliance for TB Drug Development. Disponível em: [www.tb Alliance.org](http://www.tb Alliance.org). Acesso em: 15/01/2009.

GLOBE, M.; ISEMAN, M.D.; MADSEN, L.A.; WAITE, D.; ACKERSON, L.; HORSBURGH, C.R. Jr. Treatment of 171 patients with pulmonary tuberculosis resistant to isoniazid and rifampin. **N Engl J Med**, v.328, n.8, p. 527-532, 1993.

GRUPPO V.; et al. Rapid microbiologic and pharmacologic evaluation of experimental compounds against *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.50, n.4, p. 1245-1250, 2006.

GUO, Z.; SADLER, P.J. **Advances in inorganic chemistry**. Medicinal inorganic chemistry, Editora Elsevier, p. 183–306, 2000

HEYM, B.; et al. Implications of multidrug resistance for the future of short-course chemotherapy of tuberculosis: a molecular study. **Lancet**, v.344, p. 293-298, 1994.

HU, W.X.; ZHOU, W.; XIA, C.N.; WEN, X. Synthesis and anticancer activity of thiosemicarbazones. **Bioorg Med Chem Lett**, v.16, n.8, p. 2213-2218, 2006.



MENEZES E SILVA, C. H. P.; NEUFELD, P. M.; LEITE, C. Q. F.; SATO, D. N. Bacteriologia e Micologia: Para o Laboratório Clínico. Rio de Janeiro: **Revinter**, p. 317–333, 2006.

MOR, N.; SIMON, B.; MEZO, N.; HEIFETS, L. Comparison of activities of rifapentine and rifampin against *Mycobacterium tuberculosis* residing in human macrophages. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.39, n.9, p. 2073-2077, 1995.

NARESH, K.K.; RAMESH, R.; LIU, Y. Synthesis and structure of cycloruthenated carbonyl complexes and their emission, redox and biological properties. **J Inorg Biochem**, v.100, n.1, p. 18-26, 2006.

NASCIMENTO, F. B.; POELHSITZ, G. V.; PAVAN, F. R.; SATO, D. N.; LEITE, C. Q. F.; ARAÚJO, H. S. S.; ELLENA, J.; CASTELLANO, E. E.; DEFLON, V. M.; BATISTA, A. A. Synthesis, characterization, X-ray structure and in vitro antimycobacterial and antitumoral activities of Ru(II) phosphine/diimine complexes containing the “SpymMe2” ligand, SpymMe2 = 4,6-dimethyl-2-mercaptopyrimidine. **J Inorg Biochem**, v.102, p. 1783-1789, 2008.

NOMIYA, K.; et al. Syntheses, crystal structures and antimicrobial activities of monomeric 8-coordinate, and dimeric and monomeric 7-coordinate bismuth(III) complexes with tridentate and pentadentate thiosemicarbazones and pentadentate semicarbazone ligands. **J Inorg Biochem**, v.98, n.4, p. 601-615, 2004.

ORME, I.; et al. Search for new drugs for treatment of tuberculosis. **Antimicrob Agents Chemother**, v.45, n.7, p. 1943-1946, 2001.

PALOMINO, J.C.; MARTIN A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS F. Resazurin Microtiter Assay Plate: Simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.46, n.8, p. 2720-2722, 2002.



PANCHAL, P.K.; PAREKH, H.M.; PANSURIYA, P.B.; PATEL, M.N. Bactericidal activity of different oxovanadium(IV) complexes with Schiff bases and application of chelation theory. **J Enz Inhib Med Chem**, v.21, n.2, p. 203-209, 2006.

PATOLE, J.; SANDBHOR, U.; PADHYE, S.; DEOBAGKAR, D. N.; ANSON, C. E.; POWELL, A. Structural chemistry and *in vitro* antitubercular activity of acetylpyridine benzoyl hydrazone and its copper complex against *Mycobacterium smegmatis*. **Bioorg Med Chem Lett**, v.13, p. 51-55, 2003.

PRIMM, T.P.; FRANZBLAU, S.G. Recent advances in methodologies for the discovery of antimycobacterial drugs. **Current Bioactive Compounds**, v.3, n.3, p. 201-208, 2007.

PROTOPOPOVA, M.; et al. Identification of a new antitubercular drug candidate, SQ109, from a combinatorial library of 1,2-ethylenediamines. **J Antimicrob Chemother**, v.56, n.5, 2005.

PUBLIC HEALTH WATCH. Política de TB no Brasil – Uma perspectiva da sociedade civil. Rio de Janeiro: **Open Society Institute**, p. 22-23, 2006a.

PUBLIC HEALTH WATCH. Política de TB no Brasil – Uma perspectiva da sociedade civil. Rio de Janeiro: **Open Society Institute**, p. 59, 2006b.

RAHMAN, V.P.M.; MUKHTAR, S.; ANSARI, W. H; LEMIERE, G. Synthesis, stereochemistry and biological activity of some novel long alkyl chain substituted thiazolidin-4-ones and thiazan-4-one from 10-undecenoic acid hydrazide. **Eur J Med Chem**, v.40, n.2, p. 173-184, 2005.

SAITO, H.; TOMIOKA, H. Comparative *in vitro* and *in vivo* activity of rifabutin and rifampicin against *Mycobacterium avium* complex. **Tubercle**, v.69, p. 187-192, 1988.

SATO, D.N. **Avaliação rápida do perfil de sensibilidade do agente da 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.

SAKURAI, H.; KOJIMA, Y.; YOSHIKAWA, Y.; KAWABE, K.; YASUI, H. Antidiabetic vanadium(IV) and zinc(II) complexes. **Coord Chem Rev**, v.226, n.1, p. 187-198, 2002.

SANCHEZ-DELGADO, R.A.; NAVARRO, M.; PEREZ, H.; URBINA, J.A. Toward a novel metal-based chemotherapy against tropical diseases. 2. Synthesis and Antimalarial Activity *in Vitro* and *in Vivo* of New Ruthenium- and Rhodium-Chloroquine Complexes. **J Med Chem**, v.39, n.5, p. 1095-1099, 1996.

SCHWARTZ et al. Novel conjugate of moxifloxacin and carboxymethylated glucan with enhanced activity against *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.50, n.6, p. 1982-1988, 2006.

SCOVILL, J.P.; KLAYMAN, D.L.; LAMBROS, C.; CHILDS, G.E.; NOTSCH, J.D. 2-Acetylpyridine thiosemicarbazones. 9. Derivatives of 2-acetylpyridine 1-oxide as potential antimalarial agents. **J Med Chem**, v.27, n.1, p. 87-91, 1984.

SHAIENDRA; BHARTI, N.; GONZALEZ-GARZA, M.T.; CRUZ-VEGA, D.E.; GARZA, J.C.; SALEEM, K.; NAQVI, F.; AZAM, A. Synthesis, characterisation and antiamebic activity of new thiophene-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone derivatives and their cyclooctadiene Ru(II) complexes. **Bioorg Med Chem Lett**, v.11, p. 2675-2678, 2001.

SKINNER P.S.; FURNEY S.K.; JACOBS M.R.; KLOPMAN G.; ELLNER J.J.; ORME I.M. A bone marrow-derived murine macrophage model for evaluating efficacy of antimycobacterial drugs under relevant physiological conditions. **Antimicrob Agents Chemother**, v.38, n.1, p. 2557-2563, 1994.

SNEWIN V.A.; GARES M.; GAORA P.Ó.; HASAN Z.; BROWN I.N.; YOUNG D.B. Assessment of immunity to mycobacterial infection with luciferase reporter constructs. **Infect Immun**, v.67, n.9, p. 4586-4593, 1999.

SOUZA, M.V.N.; VASCONCELOS, T.R.A. Fármacos no combate à tuberculose: passado, presente e futuro. **Quim Nova**, v.28, n.4, p. 678-682, 2005.

SRIRAM, D.; YOGESWARI, P.; THIRUMURUGAN, R. Antituberculous activity of some aryl semicarbazone derivatives. **Bioorg Med Chem Lett**, v.14, p. 3923-3924, 2004.

TOMIOKA H. Development of new antituberculous agents based on new drug targets and structure-activity relationship. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v.3, n.1, p. 21-49, 2008.

TAYLOR, D.M.; WILLIAMS, D.R. In trace element medicine and chelation therapy. London: Royal Society of Chemistry, 1998.

TRUFFOT-PERNOT, C.; BAOHONG J. L.; GROSSET J. Effect of pH on the in vitro potency of clarithromycin against *Mycobacterium avium* complex. **Antimicrob Agents Chemother**, v.35, p. 1677-1678, 1991.

TUREL, I.; GOLOBIC, A.; KLAVZAR, A.; PIHLAR, B.; BUGLYO, P.; TOLIS, E.; REHDER, D.; SEPCIC, K. Interactions of oxovanadium(IV) and the quinolone family member-ciprofloxacin. **J Inorg Biochem**, v.95, p. 199-207, 2003.

Wikipédia, disponível em: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Rut%C3%AAnio>. Acesso em 10/01/2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION: **Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing**. Geneva: WHO Report, WHO/HTM/TB/2007.376, (2007)

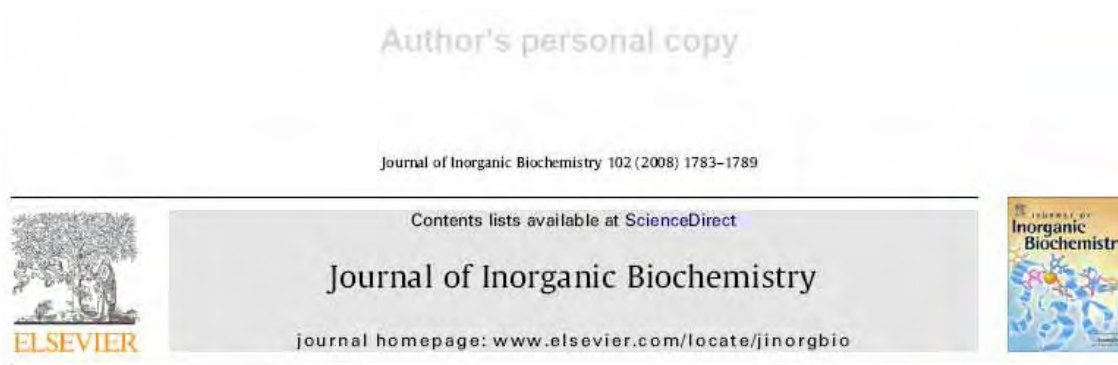
ZHANG, Y. The magic bullets and tuberculosis drug targets. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v.45, p. 529-564, 2005.

ZHANG, Y.; AMZEL, L.M. Tuberculosis drug targets. **Curr drug targets**, v.3, p. 131-54, 2002.

## 7. PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

## 7.1. Artigos completos publicados em periódicos

## 7.1.1.



Synthesis, characterization, X-ray structure and *in vitro* antimycobacterial and antitumoral activities of Ru(II) phosphine/diimine complexes containing the “SpymMe<sub>2</sub>” ligand, SpymMe<sub>2</sub> = 4,6-dimethyl-2-mercaptopyrimidine

Fábio B. do Nascimento<sup>a</sup>, Gustavo Von Poelhsitz<sup>b,\*</sup>, Fernando R. Pavan<sup>c</sup>, Daisy N. Sato<sup>d</sup>, Clarice Q.F. Leite<sup>c</sup>, Heloisa S. Selistre-de-Araújo<sup>e</sup>, Javier Ellena<sup>e</sup>, Eduardo E. Castellano<sup>f</sup>, Victor M. Deflon<sup>g</sup>, Alzir A. Batista<sup>h,\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, CP 676, CEP 13565-905, São Carlos, SP, Brazil

<sup>b</sup>Departamento de Química, Campus Catalão, Universidade Federal de Goiás, CP 56, CEP 75704-020, Catalão, GO, Brazil

<sup>c</sup>Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, CEP 14800-900, Araraquara, SP, Brazil

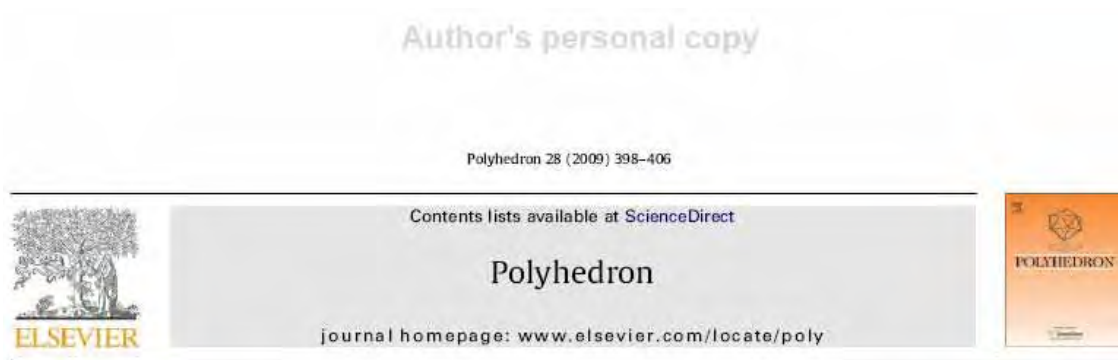
<sup>d</sup>Instituto Adolfo Lutz, Laboratório de Ribeirão Preto, CEP 14085-410, Ribeirão Preto, SP, Brazil

<sup>e</sup>Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos, CP 676, CEP 13565-905, São Carlos, SP, Brazil

<sup>f</sup>Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, CP 369, CEP 13560-970, São Carlos, SP, Brazil

<sup>g</sup>Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, CP 780, CEP 13560-970, São Carlos, SP, Brazil

## 7.1.2.



Vanadium complexes with thiosemicarbazones: Synthesis, characterization, crystal structures and anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity

Pedro I. da S. Maia<sup>a</sup>, Fernando R. Pavan<sup>b</sup>, Clarice Q.F. Leite<sup>b</sup>, Sebastião S. Lemos<sup>c</sup>, Gerimário F. de Sousa<sup>c</sup>, Alzir A. Batista<sup>d</sup>, Otaciro R. Nascimento<sup>e</sup>, Javier Ellena<sup>e</sup>, Eduardo E. Castellano<sup>e</sup>, Elke Niquet<sup>f</sup>, Victor M. Deflon<sup>g,\*</sup>

<sup>a</sup>Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, CP 780, 13560-970 São Carlos, SP, Brazil

<sup>b</sup>Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, 14801-902 Araraquara, SP, Brazil

<sup>c</sup>Instituto de Química, Universidade de Brasília, 70919-970 Brasília, DF, Brazil

<sup>d</sup>Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, 13565-905 São Carlos, SP, Brazil

<sup>e</sup>Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, CP 369, 13560-970 São Carlos, SP, Brazil

<sup>f</sup>Institut für Anorganische Chemie, Universität Tübingen, D-72076 Tübingen, Germany

## 7.2. Capítulos de livros publicados

### 7.2.1. Synthesis and anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity of vanadium complexes with *N,N,O*-donor ligands



*Metal Ions in Biology and Medicine*: vol. 10. Eds Ph. Collety, J. Maynard, T. Theopphanides, L. Khassanova, T. Collety. John Libbey Eurotext, Paris © 2008 pp. 197-203.

### **Synthesis and anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity of vanadium complexes with *N,N,O*-donor ligands**

Pedro Ivo da S. Maia<sup>1</sup>, Victor M. Deflon<sup>1</sup>, Fernando R. Pavan<sup>2</sup>,  
Clarice Q. F. Leite<sup>2</sup>, Claudia C. Gatto<sup>3</sup>, Sebastião S. Lemos<sup>3</sup>, Alzir A. Batista<sup>4</sup>

<sup>1</sup>*Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, CP 780, 13560-970 São Carlos – SP, Brazil; e-mail: deflon@iqsc.usp.br*

<sup>2</sup>*Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, 14801-902 Araraquara – SP, Brazil*

<sup>3</sup>*Instituto de Química, Universidade de Brasília, 70919-970 Brasília – DF, Brazil*

<sup>4</sup>*Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, 13565-905 São Carlos – SP, Brazil*