



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
REGIONAL CATALÃO
UNIDADE ACADÊMICA ESPECIAL DE
FÍSICA E QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
QUÍMICA



**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NOVAS BASES DE
SCHIFF, A PARTIR DOS ÁCIDOS 4- E 5-
AMINOSSALICÍLICO**

FRANCIELLE CAMPOS LIMA

Bolsa CAPES

CATALÃO – GO
Fevereiro/2016

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: **Dissertação** **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

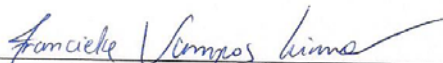
Nome completo do autor: FRANCIELLE CAMPOS LIMA

Título do trabalho: SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NOVAS BASES DE SCHIFF, A PARTIR DOS ÁCIDOS 4- E 5-AMINOSSALICÍLICO

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.



Assinatura do (a) autor (a)

Data: 20 / 09 / 2016

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
REGIONAL CATALÃO
UNIDADE ACADÊMICA ESPECIAL DE
FÍSICA E QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
QUÍMICA



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NOVAS BASES DE SCHIFF, A PARTIR DOS ÁCIDOS 4- E 5- AMINOSSALICÍLICO

FRANCIELLE CAMPOS LIMA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Goiás Regional Catalão como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química

Orientador: Prof. Dr. Lincoln Lucilio Romualdo

CATALÃO – GO
Fevereiro/2016

Ficha catalográfica elaborada automaticamente
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob orientação do Sibi/UFG.

Lima, Francielle Campos

Síntese e caracterização de novas bases de Schiff, a partir dos ácidos 4- e 5-aminossalicílico [manuscrito] / Francielle Campos Lima. - 2016.

xiv, 115 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Lincoln Lucilio Romualdo.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Regional Catalão, Catalão, Programa de Pós-Graduação em Química, Catalão, 2016.

Bibliografia. Apêndice.

Inclui siglas, abreviaturas, símbolos, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Bases de Schiff. 2. Ácido 4-aminossalicílico. 3. Ácido 5-aminossalicílico. 4. Agentes antimicrobianos. I. Romualdo, Lincoln Lucilio, orient. II. Título.

Relatório de Defesa de Dissertação
 Candidata: **Francielle Campos Lima**

Aos 25/02/2016 às 14 horas e 30 minutos, realizou-se na Universidade Federal de Goiás – Regional Catalão nas formas e termos do Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Química a Defesa de Dissertação de Mestrado sob o título: “**Síntese e elucidação estrutural de novas bases de Schiff, a partir dos ácidos 4- e 5-aminosalicílico**” apresentada pela candidata: **Francielle Campos Lima**. Ao final dos trabalhos a banca examinadora reuniu-se em sessão reservada para o julgamento tendo os membros chegado ao seguinte resultado:

Participantes da Banca:	Função	Instituição
Prof. Dr. Lincoln Lucílio Romualdo	Presidente	UFG – Catalão
Prof. Dr. Márcio Peres de Araújo	Titular	UFPR
Prof. Dr. Alberthermeiry Teixeira de Figueiredo	Titular	UFG – Catalão

Resultado Final: Aprovada.

Parecer da Comissão Julgadora:

Considerar as sugestões de correções apontadas.

Encerrada a sessão reservada, o presidente informou ao público presente o resultado. Nada mais havendo a tratar, a sessão foi encerrada e, para constar eu Michelle Aparecida Machado representante do Programa de Pós Graduação em Química lavrei o presente relatório que será assinado por mim e pelos membros da banca examinadora.

Prof. Dr. Lincoln Lucílio Romualdo

Prof. Dr. Márcio Peres de Araújo

Prof. Dr. Alberthermeiry Teixeira de Figueiredo

Michelle Aparecida Machado
 Representante do PPG Michelle Aparecida Machado

() Não houve alteração no título. (X) Houve. O novo título passa a ser:

Síntese e Caracterização de novas bases de Schiff, a partir dos Ácidos 4- e 5- Aminossalicílico

AGRADECIMENTOS

Sobretudo à **Deus**, o unigênito. Digno por me conceder todas as oportunidades, bem como perseverança e fé, que me trouxeram até aqui.

Ao **Prof. Dr. Lincoln Lucilio Romualdo** por ter me acolhido nesta instituição e dado oportunidade de crescimento profissional e pessoal, mediados pela discussão não só de assuntos pertinentes a vida acadêmica, mas pela lição de vida passada, realçada ainda pela paciência, respeito, confiança e digna orientação ao longo de toda a caminhada.

A **Profª. Dra. Claudia Cristina Gatto**, e todos os colegas do Laboratório de Síntese Inorgânica e Cristalografia (LASIC) – UnB, pela receptividade e por compartilharem sua rotina e ensinamentos ao longo dos dias em que me acolheram, sem dúvida tornaram-se grandes amigos.

A **Profª. Dra. Jupyracyara** e ao **Thyago** por todo auxílio com os ensaios microbiológicos e atenção dada sempre que precisei.

O **Prof. Dr. André Luiz Bogado** e ao **Grupo de Química Inorgânica – Facip UFU Ituiutaba** pela colaboração e análises CHN realizadas.

O **Prof. Dr. Luciano Moraes Lião** e a toda a equipe do **Laboratório de RMN do Instituto de Química da UFG Regional Goiânia** pela colaboração e análises de RMN realizadas.

A **Profª. Dra. Vanessa Pasqualotto** e **Michele Machado** por todas as contribuições dadas as caracterizações de RMN.

Aos meus Pais, **Walter e Lourdes**, e irmãos, **Dany e Bibi**, a principal motivação. Os responsáveis pela base e princípios consolidados, a verdadeira definição de certo e errado. O verdadeiro sentido de amar.

Aos meus amigos, aqueles verdadeiros que não só foram ou são ‘amigos’ nos bons momentos, mas aqueles fiéis que me suportaram nos meus piores dias de angústia, estresse, raiva, revolta, fôssia ou qualquer outro drama que fizesse. Dentre os melhores, os citados.

Bárbara, sem dúvida a melhor de todas, o verdadeiro refúgio. Por pior que seja o momento ele pode ser esquecido ao seu lado, você sempre tem algo pior pra poder me confortar. Bendito ‘desencargo de consciência’ que nos trouxe até aqui, que nos mantenha.

Rafaela, quem diria que pra quem se odiava tanto um dia, fosse tornar tão cúmplices?! A vida realmente nos surpreende, e positivamente. Sou grata pela irmã científica e por todos momentos de sabedoria compartilhados, sem dúvidas sempre de grande valia.

Ao **Yuri** (Físico-turista), gratidão inexpressável por palavras, o melhor... O meu melhor. A minha pessoa!

A **Amanda**, aquela que não abre o olho, mas enxerga tudo. Obrigada por todos os almoços compartilhados, as pipocas e lanches da tarde. Nada melhor que ter alguém que goste dos mesmos programas de comida e comida que a gente.

Cidoca, ou seria Maria Aparecida?! Qual o nível de intimidade e/ou seriedade do momento? (rs) Tenho tanta carona pra agradecer. Sou grata pela amizade, por sempre estar disponível e ser tão prestativa. Inesquecíveis foram os momentos compartilhados, shows, barzinhos, cachoeiras, e os passeios de bike então?! Que perdurem!

A **Paula**, a escandalosa. Gênio difícil, mas que me acolheu bem como ‘sobrinha’, diria mais até, como uma filha. Sou grata por toda consideração, preocupação e amizade... Há reciprocidade!

A pequena grande **Nara**. Uma das pessoas mais admiráveis, puras e companheiras que já conheci na vida, digna de uma perseverança invejável, desejável. Risos incontidos tive ao longo do tempo convivendo contigo, muitas vezes por razões desconhecidas, outras por motivos esdrúxulos, mas ainda assim eram risos, sinceros. Até as faxinas eram divertidas com você, obrigada por trazer leveza a minha vida.

Por fim, de uma forma geral, **Carioca, Pandinha, Írlei, Raphael, Jordâna, Carol, Bruna** e todos os demais amigos e colegas de laboratório que de uma forma ou outra contribuíram com meu trabalho, ou não, aqueles que muitas vezes nem sabiam do que se tratava mas que ainda assim estavam ali para me apoiar.

A **Universidade Federal de Goiás Regional Catalão**, a **Unidade Acadêmica Especial de Física e Química** e a todos os docentes, funcionários e tias da limpeza que de forma direta ou indireta contribuíram para esta conquista.

Ao **CNPq** e **CAPES** pelo auxílio financeiro concedido para desenvolvimento da pesquisa.

Aos mencionados, MINHA ETERNA GRATIDÃO!

“Nós passamos toda nossa vida nos preocupando com o futuro, planejando para o futuro, tentando prever o futuro. Como se imaginar fosse, de alguma forma, amortecer o impacto. Mas o futuro é a casa dos nossos medos mais profundos e de nossas esperanças mais selvagens. Mas uma coisa é certa... Quando ele finalmente se revela, o futuro nunca é do jeito que imaginávamos.”

Greys Anatomy

RESUMO

Bases de Schiff são compostos imínicos com amplas aplicações nas mais diversas áreas do conhecimento, destacando-se principalmente na área da biologia, com destaque para aplicações como antimicrobianos. A síntese de seis novas bases de Schiff (BS), obtidas a partir da condensação direta de soluções metanólicas de fármacos já ativos (4- e 5-ASA) com diferentes aldeídos, é apresentada. Os compostos sintetizados foram caracterizados quanto ao seu ponto de fusão, solubilidade, análise elementar CHN, espectroscopia de absorção na região do infravermelho, espectroscopia eletrônica na região do ultravioleta visível e espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio. Os produtos sintetizados foram avaliados em ensaios biológicos frente a estirpes de *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*. A natureza da classe de compostos caracterizada confirma a obtenção dos produtos conforme objetivado. Dois resultados dos ensaios biológicos foram obtidos, sendo a variável analisada, a composição da solução estoque preparada. Com DMF os resultados se apresentaram tendenciosos, a partir dos quais nada pode ser afirmado devido a possibilidade de influenciar em um resultado falso positivo. Já os demais resultados utilizando-se solução estoque com DMSO, exibiram um panorama positivo em relação aos valores de CMI, com atenção especial para os ligantes BS6 e BS9 que mostraram melhor atividade.

Palavras-chave: Bases de Schiff, ácido 4-aminosalicílico, ácido 5-aminosalicílico, agentes antimicrobianos.

ABSTRACT

Schiff bases are imine compounds with wide applications in several areas of knowledge, highlighting mainly in the biology fields, especially for antimicrobial applications. The synthesis of six new Schiff bases (SB) are displayed. They were obtained from the direct condensation methanolic solutions of drugs already active (4- and 5-ASA) with different aldehydes. The synthesized compounds were characterized as to their fusion point, solubility, CHN elementary analysis, infrared absorption spectroscopy, ultraviolet visible spectroscopy and nuclear magnetic resonance of hydrogen. The synthesized products were evaluated in bioassays on *E. coli*, *S. aureus* and *P. aeruginosa* strains. The nature of the characterized compounds class confirms the acquired products as objectified. Two biological results were obtained, as the analyzed variable, the composition of the prepared stock solution. With DMF, the results were biased, from which nothing can be stated because of the possibility of influencing as a false positive result. The other results using DMSO stock solution exhibited a positive prospect regarding the MIC values, with special attention to the BS6 and BS9 ligands which showed better activity.

Keywords: Schiff bases, 4-amino salicylic acid, 5-aminosalicylic acid, antimicrobial agents.

Lista de Figuras

FIGURA 1.1 – Reação de formação de base de Schiff (CLAYDEN, 2001).....	2
FIGURA 1.2 – Estrutura química do DOBAMBC.....	6
FIGURA 1.3 – Exemplos de bases de Schiff bioativas (DA SILVA <i>et al.</i> , 2011).....	6
FIGURA 1.4 – Estrutura da base de Schiff derivada de Isatina (DA SILVA <i>et al.</i> , 2011).....	7
FIGURA 1.5 – Estrutura da base de Schiff derivada de Isoniazida (DA SILVA <i>et al.</i> , 2011).....	8
FIGURA 1.6 – Esquema de obtenção de bases de Schiff a partir da conjugação de diferentes ligantes com ácido <i>p</i> -aminossalicílico (PATOLE <i>et al.</i> , 2006).....	8
FIGURA 1.7 – Coloração de Gram de uma preparação de sedimento de urina: bastonetes Gram-negativos arredondados, alguns cocóide (LEVY, 2004; KAYSER, 2005).....	13
FIGURA 1.8 – Coloração de Gram de uma preparação pus: cocos Gram-positivos característicos da espécie <i>S. aureus</i> (KAYSER, 2005).....	17
FIGURA 0. 9 – Estrutura molecular do PAS.....	22
FIGURA 1.10 – Estrutura molecular do 5-ASA.....	25
FIGURA 1.11 – Compostos com 5-ASA e esquema de liberação (SANDBORN e FAUBION, 2000; BIONDO-SIMÕES <i>et al.</i> , 2009).....	30
FIGURA 3.1 – Esquema de preparação do ligante Base de Schiff denominado BS4... 35	
FIGURA 3.2 – Esquema de preparação do ligante Base de Schiff denominado BS5... 36	
FIGURA 3.3 – Esquema de preparação do ligante Base de Schiff denominado BS6... 37	
FIGURA 3.4 – Esquema de preparação do ligante Base de Schiff denominado BS7... 37	
FIGURA 3.5 – Esquema de preparação do ligante Base de Schiff denominada BS8... 38	
FIGURA 3.6 – Esquema de preparação do ligante Base de Schiff denominado BS9... 39	
FIGURA 3.7 – Representação e disposição da placa de Elisa utilizada nos ensaios... 49	
FIGURA 3.8 – Equação representativa da reação do corante TCT na mitocôndria.... 51	
FIGURA 4.1 – Espectros de absorção na região do infravermelho (IV) do ligante BS4 em pastilha de KBr (1% m/m).....	57
FIGURA 4.2 – Espectros de absorção na região do infravermelho (IV) do precursor 4-ASA em pastilha de KBr (1% m/m).....	58
FIGURA 4.3 – Espectro de absorção na região do infravermelho (IV) do precursor aldeído DMAB em pastilha de KBr (1% m/m).....	58

FIGURA 4.4 – Espectros de absorção na região do infravermelho (IV) do ligante BS5 em pastilha de KBr (1% m/m).....	60
FIGURA 4.5 – Espectros de absorção na região do infravermelho (IV) do precursor 5-ASA em pastilha de KBr (1% m/m).....	61
FIGURA 4.7 – Espectros de absorção na região do infravermelho (IV) do ligante BS7 em pastilha de KBr (1% m/m).....	63
Figura 4.6 – Espectros de absorção na região do infravermelho (IV) do ligante BS6 em pastilha de KBr (1% m/m).....	63
FIGURA 4.8 – Espectro de absorção na região do infravermelho (IV) do precursor aldeído DHB em pastilha de KBr (1% m/m).....	64
FIGURA 4.9 – Espectros de absorção na região do infravermelho (IV) do ligante BS8 em pastilha de KBr (1% m/m).....	64
FIGURA 4.10 – Espectros de absorção na região do infravermelho (IV) do ligante BS9 em pastilha de KBr (1% m/m).....	65
FIGURA 4.11 – Espectro de absorção na região do infravermelho (IV) do precursor aldeído DEAS em pastilha de KBr (1% m/m).....	65
FIGURA 4.12 – Espectros Eletrônica na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) (– –) para o ligante BS4 em metanol.....	67
FIGURA 4.13 – Formação dos orbitais moleculares (PAVIA <i>et al.</i> , 2010).....	68
FIGURA 4.14 – Comparação dos níveis de energia do orbital molecular e a energia das transições $\pi \rightarrow \pi^*$ no eteno e no 1,3-butadieno (PAVIA <i>et al.</i> , 2010).....	69
FIGURA 4.15 – Comparação dos espaçamentos de energia $\pi \rightarrow \pi^*$ em uma série de polienos de comprimento de cadeia crescente (PAVIA <i>et al.</i> , 2010).....	70
FIGURA 4.16 – Espectros Eletrônica na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) (– –) para o ligante BS5 em metanol.....	72
FIGURA 4.17 – Espectros Eletrônica na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) (– –) para o ligante BS6 em metanol.....	72
FIGURA 4.18 – Espectros Eletrônica na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) (– –) para o ligante BS7 em metanol.....	74
FIGURA 4.19 – Espectros Eletrônica na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) (– –) para o ligante BS8 em metanol.....	74
FIGURA 4.20 – Espectros Eletrônica na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) (– –) para o ligante BS9 em metanol.....	75
FIGURA 4.21 – Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) do ligante BS4.....	76

FIGURA 4.22 – Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) na região ampliada para o ligante BS4.....	77
FIGURA 4.23 – Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) do ligante BS4.....	79
FIGURA 4.24 – Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) do ligante BS5.....	79
FIGURA 4.25 – Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) na região ampliada para o ligante BS5.....	80
FIGURA 4.26 – Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) do ligante BS6.....	81
FIGURA 4.27 – Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) na região ampliada para o ligante BS6.....	81
FIGURA 4.28 – Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) na região ampliada para o ligante BS6.....	82
FIGURA 4.29 – Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) do ligante BS7.....	83
FIGURA 4.30 – Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) na região ampliada para o ligante BS7.....	84
FIGURA 4.31 – Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) do ligante BS8.....	85
FIGURA 4.32 – Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) do ligante BS9.....	86
FIGURA 4.33 – Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) na região ampliada para o ligante BS8.....	87
FIGURA 4.34 – Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) na região ampliada para o ligante BS9.....	87
FIGURA 4.35 – Comparação entre regiões ampliadas do espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) para os ligantes BS8 e BS9.....	88
FIGURA 4.36 – Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) na região ampliada para o ligante BS8.....	89
FIGURA 4.37 – Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) na região ampliada para o ligante BS9.....	90
FIGURA 4.38 – Revelação por TCT da primeira batelada de ensaios microbiológicos. Colocação rósea evidenciando o crescimento bacteriano, translúcido morte.....	92
FIGURA 4.39 – Gráfico que apresenta a relação das bases de Schiff com seu respectivo fármaco precursor (4-ASA).....	94
FIGURA 4.40 – Gráfico que apresenta a relação das bases de Schiff com seu respectivo fármaco precursor (5-ASA).....	94
Figura A.1. Espectro Eletrônica na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) do precursor 4-ASA em metanol.....	111

Figura A.2. Espectro Eletrônica na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) do precursor 5-ASA em metanol.....	112
Figura A.3. Espectro Eletrônica na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) do precursor DMBA em metanol.....	113
Figura A.4. Espectro Eletrônica na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) do precursor DHB em metanol.....	114
Figura A.5. Espectro Eletrônica na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) do precursor DEAS em metanol.....	115

Lista de Tabelas

TABELA 1.1 – Espécies bacterianas comuns em infecções nosocomiais.....	12
TABELA 1.2 – Procedimentos médicos comuns associados com infecções nosocomiais.....	19
TABELA 3.1 – Procedência, natureza e pureza dos solventes utilizados.....	24
TABELA 3.2 – Solventes utilizados para os testes de solubilidade.....	40
TABELA 4.1 – Solventes utilizados para os testes de solubilidade.....	54
TABELA 4.2 – Rendimento químico obtido mediante a síntese dos ligantes bases de Schiff.....	54
TABELA 4.3. Testes de solubilidade para os ligantes base de Schiff sintetizados.....	55
TABELA 4.4 – Resultados da análise elementar CNH para os ligantes sintetizados...	56
TABELA 4.5 – Principais frequências (cm^{-1}) atribuídas ao espectro de absorção na região do infravermelho do ligante BS4 (PAVIA <i>et al.</i> , 2010; SILVERSTEIN <i>et al.</i> , 2012).....	59
TABELA 4.6 – Principais frequências (cm^{-1}) atribuídas ao espectro de absorção na região do infravermelho do ligante BS5 (PAVIA <i>et al.</i> , 2010; SILVERSTEIN <i>et al.</i> , 2012).....	61
TABELA 4.7 – Principais frequências (cm^{-1}) atribuídas aos espectros de absorção na região do infravermelho dos ligantes BS6 e BS7, BS8 e BS9 (PAVIA <i>et al.</i> , 2010; SILVERSTEIN <i>et al.</i> , 2012).....	62
TABELA 4.8 – Resultado da CMI das bases de Schiff sintetizadas nas diferentes doses espécies microbiológicas testadas.....	93

Lista de Abreviaturas

TB	Tuberculose
4-ASA ou PAS	Ácido 4-aminossalicílico ou Ácido ρ -aminossalicílico
5-ASA	Ácido 5-aminossalicílico
CMI	Concentração Mínima Inibitória
CMB	Concentração Mínima Bactericida
DII	Doença Inflamatória Intestinal
DC	Doença de Crohn
RU	Retocolite Ulcerativa
IL-1	Interleucina 1
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
ELAM-1	Molécula de adesão de leucócitos e endotélio-1
ECAM-1	Molécula de adesão intercelular-1
DMF	N,N-dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
EtOH	Etanol
MeOH	Metanol
DEAS	ρ -(dietilamino)salicildeído
DMAB	ρ -(dimetilamino)benzaldeído
DHB	2,3-dihidroxibenzaldeído
BS4	Ácido 4-((4'-dimetilamino)benzilideno) amino-2-hidroxibenzoico
BS5	Ácido 5-((4'-dimetilamino) benzilideno) amino-2-hidroxibenzoico
BS6	Ácido 4-(2',4'-dihidroxibenzilideno) amino-2-hidroxibenzoico
BS7	Ácido 5-(2',4'-dihidroxibenzilideno) amino-2-hidroxibenzoico
BS8	Ácido 4-((4'-dietilamino)-2'-hidroxibenzileno) amino-2-hidroxibenzoico
BS9	Ácido 5-((4'-dietilamino)-2'-hidroxibenzileno) amino-2-hidroxibenzoico
P.F	Ponto de Fusão
H ₂ O	Água
AE CHN	Análise elementar de Carbono, Hidrogênio e Oxigênio.
RMN	Ressonância Magnética Nuclear

^1H RMN	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
^{13}C RMN	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
<i>J</i>	Spin nuclear
MHz	MegaHertz
Hz	Hertz
UV-Vis	Espectroscopia de Absorção na Região do Ultravioleta-Visível
IV	Espectroscopia de Absorção Vibracional na Região do Infravermelho
μ	Momento de Dipolo Elétrico
FT-IR	Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier
T %	Transmitância (%)
cm^{-1}	Unidade de Medida de Número de Onda
ν	Deformação Axial (estiramento)
δ	Deformação Angular
m/m	Massa por massa
(Ar)	Aromático
(FP)	Fora do Plano
ϵ	Coefficiente de Absortividade Molar
<i>l</i>	Caminho Óptico
<i>J</i>	Momento Angular
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute – Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais
ATCC	American Type Culture Collection – Coleção de Cultura Tipo Americano
MH	Meio de cultura Muller-Hilton
UFC/mL	Unidades Formadoras de Colônias por Mililitro
TCT	2,3,5-triphenyl-2H-tetrazolium chloride - 2,3,5 cloreto de trifêniltetrazólio
s	Singleto
d	Dubleto
dd	Duplo-dubleto
dt	Duplo-triplete
δ_{H}	Descolamento Químico de Hidrogênio

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	1
1. INTRODUÇÃO	2
1.1 Bases de Schiff	2
1.2 Infecções bacterianas comumente evidenciadas em humanos	11
1.2.1 <i>Escherichia coli</i>	13
1.2.2 <i>Pseudomonas sp</i>	15
1.2.3 <i>Staphylococcus aureus</i>	16
1.3 Transmissão Cruzada Da Microbiota Patogênica.....	18
1.4 A Química No Tratamento Das Enfermidades Bacterianas	19
1.4.1 Ácido 4-amonosalicílico ou ácido p-aminosalicílico (4-ASA ou PAS)	22
1.4.2 Ácido 5-aminossalicílico (5-ASA).....	24
1.5 Atividade Antimicrobiana <i>in vitro</i>	25
1.6 Processo Inflamatório	26
1.7 Doenças Inflamatórias Intestinais e Terapia de Controle.....	27
CAPÍTULO 2	31
2. OBJETIVOS	32
2.1. Objetivo Geral.....	32
2.2. Objetivos Específicos	32
CAPÍTULO 3	33
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	34
3.1. Materiais.....	334
3.2. Síntese dos ligantes bases de Schiff obtidas a partir dos princípios 4-ASA e 5-ASA.....	32
3.2.1. Ácido 4-((4'-dimetilamino) benzilideno) amino-2-hidroxibenzoíco (BS4)	35
3.2.2. Ácido 5-(4'- dimetilamino) benzilideno) amino-2-hidroxibenzoíco (BS5)	36
3.2.3. Ácido 4-(2',4'-dihidroxibenzilideno) amino-2-hidroxibenzoíco (BS7).....	36
3.2.4. Ácido 5-(2',4'-dihidroxibenzilideno) amino-2-hidroxibenzoíco (BS7).....	37
3.2.5. Ácido 4-((4'-dietilamino)-2'-hidroxibenzileno) amino-2-hidroxibenzoíco (BS8).....	38

3.2.6. Ácido 5-((4'-dietilamino)-2'-hidroxibenzileno) amino)-2-hidroxibenzoíco (BS9).....	38
3.3. Instrumentação e Técnicas Experimentais de Caracterização.....	39
3.3.1. Pontos de Fusão (P.F)	39
3.3.2. Testes de Solubilidade	39
3.3.3. Análise Elementar de Carbono, Hidrogênio e Nitrogênio (AE CHN).....	400
3.3.4. Espectroscopia de Absorção Vibracional na Região do Infravermelho (IV).....	411
3.3.5. Espectroscopia Eletrônica na Região do Ultravioleta-Visível (UV-Vis).....	455
3.3.6. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	466
3.4. Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI)	488
CAPÍTULO 4.....	52
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	53
4.1. Solubilidade.....	55
4.2. Análise Elementar CHN	56
4.3. Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (IV).....	56
4.4. Espectroscopia Eletrônica na região do Ultravioleta-Visível (UV-Vis).....	66
4.5. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de Hidrogênio ¹ H. 76	
CAPÍTULO 5.....	97
5. CONCLUSÕES	98
CAPÍTULO 6.....	99
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100
APÊNDICE	111

“Você não sabe o quanto eu caminhei, pra chegar até aqui. Percorri milhões de milhas antes de dormir. Eu não cochilei”

(A estrada- Cidade Negra)

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

1.1. Bases de Schiff

As bases de Schiff estão entre os compostos orgânicos mais estudados e amplamente utilizados da atualidade. Explanadas pelo pesquisador alemão naturalizado Italiano, Hugo Schiff em 1864, são iminas (também conhecidas como azometinas) caracterizadas pela ligação -HC=N- . São comumente obtidas a partir da condensação entre uma cetona ou aldeído, com uma amina primária apropriada sob as mais variadas condições, condições estas que determinam a posição de equilíbrio dependendo da natureza dos intermediários. São também denominadas como bases devido a capacidade de ser designada, bem como atuar, como uma Base de Lewis, em virtude da presença de um par de elétrons livres no orbital sp^2 hibridizado do átomo de nitrogênio após condensação, o qual confere a estes compostos importantes potenciais de ligação e consequentemente de aplicação (DA SILVA *et al.*, 2011; MOHINI *et al.*, 2014; EL-BINDARY *et al.*, 2015).

O mecanismo da reação de obtenção da base de schiff é apresentado na Figura 1.1.

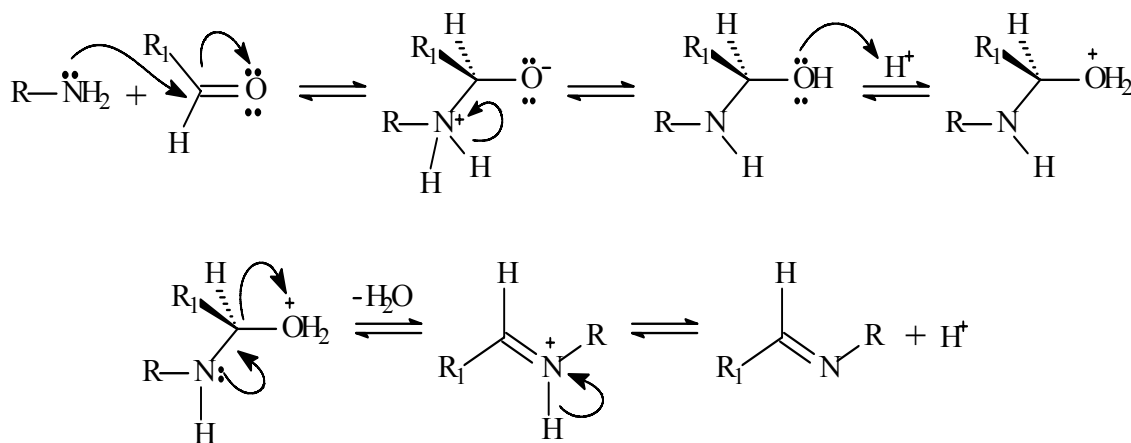


FIGURA 1.1 – Reação de formação de base de Schiff (CLAYDEN, 2001).

A formação da base de Schiff é dada a partir da adição nucleofílica de uma amina ao grupo carbonila. Na primeira parte do mecanismo, a amina reage com o aldeído ou cetona dando origem a um intermediário instável carbonil-amina, com liberação de água quando catalisado por ácido ou base (CAREY, 2008).

Normalmente, a desidratação do carbonil-amina é a etapa determinante da taxa de formação de base de Schiff e é por isso que a reação é catalisada por ácidos. Na presença de um ácido, o íon hidrogênio protona o oxigênio da carbonila diminuindo a energia de ativação para o ataque nucleofílico, visto que o oxigênio adquire elétrons π sem ter que receber um aumento da sua carga negativa. Apesar da necessidade a concentração do mesmo não pode ser muito alta, uma vez que as aminas são compostos básicos. Se a amina é protonada e torna-se não nucleofílico, o equilíbrio é deslocado para a esquerda e a formação carbonil-amina pode não ocorrer. Portanto, muitas sínteses de base Schiff são melhores realizadas no pH levemente ácido (MORRISON e BOYD, 1998; CLAYDEN, 2001).

A natureza dos precursores também é considerada como um fator determinante na obtenção das bases de Schiff. Dentre os fatores contribuintes têm-se a preferência pela utilização de aldeídos a cetonas, bem como a presença de substituintes arila. Tais preferências são justificadas pela facilidade da adição nucleofílica em aldeídos de compostos aromáticos quando comparadas as cetonas de alquilas (MORRISON e BOYD, 1998).

Primeiramente, a diferença de reatividade entre aldeídos e cetonas pode ser explicada de acordo com o estado de transição a qual envolve fatores estéricos e eletrônicos. Dessa forma, o aldeído por conter um grupo menos volumoso ligado a carbonila (átomo de hidrogênio), diferentemente das cetonas (grupo alquil), encontra-se mais susceptível ao ataque nucleofílico em virtude do menor efeito estérico presente no seu estado de transição (MORRISON e BOYD, 1998).

Outro fator relevante, em relação à cadeia lateral 'R' dos aldeídos, é que quando se tem um grupo substituinte alquil este doa elétrons à carbonila instabilizando o estado de transição pelo aumento da densidade eletrônica sobre o oxigênio. Sendo assim, quando o substituinte R dos aldeídos é um grupo aril, por efeito indutivo retirador de elétrons, o estado de transição é estabilizado e conseqüentemente a sua reação é acelerada, contudo o grupo estabiliza o estado de transição por efeito de ressonância contribuindo para desestabilizar o carbono da carbonila, favorecendo desta forma o ataque nucleofílico por parte da amina e a obtenção da imina correspondente (MORRISON e BOYD, 1998).

O processo de obtenção de bases de Schiff é completamente reversível. Grupos imínicos são facilmente hidrolisados em condições ácidas dando origem aos compostos de partida. Na maioria das vezes essa prática é muito comum para identificar as entidades geradoras desses compostos.

As Bases de Schiff apresentam um papel importante na química de coordenação, pois estas têm a capacidade de formar complexos estáveis com vários metais de transição. A consolidação desses compostos de coordenação se dá em parte pela coordenação ao nitrogênio imínico, o que faz com que esses compostos sejam considerados ligantes “privilegiados”. No entanto, a força da ligação C=N é insuficiente para, sozinha, formar complexos de coordenação através do par de elétrons livres a um íon metálico (COZZI, 2004).

Em contraste a essa ocorrência, e visando a formação de compostos estáveis, é necessário que esta ligação tenha outro grupo funcional próximo a um átomo de hidrogênio substituível, preferencialmente um grupo hidroxila, bom doador de elétrons (BARREIRO e FRAGA, 2005). Dessa forma, as propriedades reconhecidas desses compostos se devem a sua capacidade de ligar-se as bases de Lewis, no caso específico às bases de Schiff, dando origem a complexos estáveis em virtude do modo de coordenação quelante, as quais favorecem a formação de anéis de cinco ou seis membros, conferindo aos complexos formados uma estabilidade favorável e, no geral, características coloridas (ECHEVARRIA *et al.*, 2004).

Desta forma, complexos de metais de transição contendo oxigênio e nitrogênio são considerados bons ligantes doadores nas bases de Schiff e têm sido objeto de intensas investigações devido à versatilidade de suas propriedades estéricas e eletrônicas. Os metais nestes complexos atuam como sítios ativos e, assim, tem capacidade de catalisar as reações químicas, visto que constituem uma das classes de ligantes mais eficientes capazes de formar catalisadores de alto desempenho. A oxidação dessas bases tem sido utilizada como indicadores de reações na catálise de oxidação-redução, especialmente quando a taxa de reação é determinada por meio de medições fluorimétricas ou fotométricas (CHAKRABORTI *et al.*, 2004; KRISHNARAJ *et al.*, 2008; NAGHIPOUR e FAKHRI, 2016).

Recentemente, as bases de Schiff foram reconhecidas como excelentes alternativas para fosfinas em reações orgânicas do tipo Suzuki-Miyaura. Semelhante a

fosfinas, as características estéricas e eletrônicas das bases de Schiff podem ser manipuladas escolhendo-se os aldeídos e aminas de condensação adequados, mas o diferencial mesmo envolve o melhor manuseio e insensibilidade a umidade, bem como a capacidade de estabilizar metais nos seus mais variados números de oxidação. Tal fato permite que muitos catalisadores homogêneos e heterogêneos sejam derivados dessas bases de Schiff, os mesmos com capacidade de serem aplicados não só em reações do tipo Suzuki-Miyaura, mas também como epoxidação (GAO *et al.*, 2009), polimerização (SAKUMA *et al.*, 2007), hidrogenação e reações de acoplamento cruzado (MOLNÁR, 2011; DAS e LINERT, 2016).

Ainda, como já reportado para essa classe de compostos, os mesmos são portadores de uma estrutura interessante que têm sido amplamente exploradas nas mais variadas áreas do conhecimento, destacando-se em vários campos e proporcionando uma vasta gama de aplicações, dentre elas, têm-se mostrado funcionais em química analítica, onde por meio da síntese de funcionalização de compostos obtendo-se um produto final com seletividade específica tanto para determinação de metais quanto para o tratamento, por meio da adsorção, de amostras reais (MONIER, 2012; AWUAL *et al.*, 2015), como cristais líquidos, pela capacidade do grupamento (C=N) estabelecer ponte para a transmissão dos efeitos eletrônicos entre os anéis aromáticos, favorecendo a planaridade do sistema e conferindo propriedades mesogênicas (ESTEVES-SOUZA *et al.*, 2004; GALLARDO *et al.*, 2010), ainda em ciência de materiais (KAUR *et al.*, 2012), eletrônica e tecnologias fotônicas (FORREST e THOMPSON, 2007), biologia (MAHMOUD *et al.*, 2015; NIU *et al.*, 2015) entre outros.

Em 1975, Bob Meyer e colaboradores sintetizaram o primeiro cristal líquido ferroelétrico a partir do reagente quiral (*S*)-(-)-2-metil-1-butanol. De forma análoga, foi sintetizado o composto 4-*n*-deciloxibenzilideno-4-amino 2-metilbutilacrinamato (DOBAMBC), conforme na figura 1.2, sendo a primeira base de Schiff cristal líquido possuindo polarização espontânea (MEYER *et al.*, 1975; MERLO *et al.*, 2001).

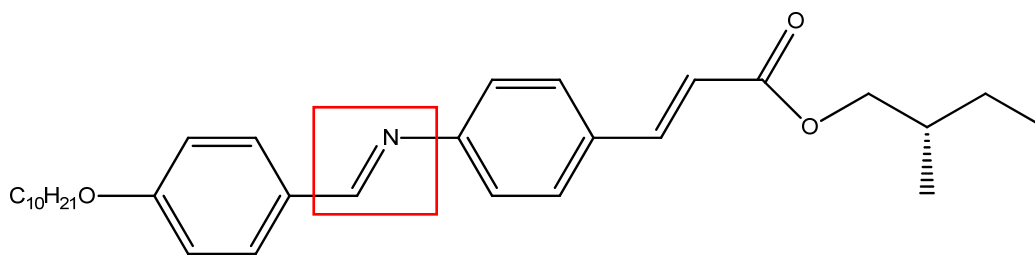


FIGURA 1.2 – Estrutura química do DOBAMBC.

Para aplicações em óptica não linear, as bases de Schiff, bem como seus complexos metálicos compõem um diferencial no que diz respeito à versatilidade das estruturas possíveis, há uma vasta concepção de materiais com moderna tecnologia de acordo com a planaridade que é passível de ocorrência a partir dessa metodologia de síntese (PAL *et al.*, 2000; SHEIKHSHOAI E FABIAN, 2006; CISTERNA *et al.*, 2015).

Apesar de satisfatório todo o desempenho das bases de Schiff nas mais diversas aplicações, as propriedades de cunho biológico são as responsáveis pelo grande interesse dessa classe de compostos, a flexibilidade sintética permite na maioria das vezes a funcionalização de propriedades estruturais específicas, além do que esses compostos são conhecidos pelas suas semelhanças, bem como por comporem partes estruturais em sistemas biológicos naturais, natural derivado e não-naturais (Figura 1.3), o que contribui para a potencial aplicação nesses sistemas, como modelos de macromoléculas, sejam as bases coordenadas a íons metálicos (metalo-proteínas e metalo-enzimas), ou livres como ligantes bioativos (COTTON, 1999).

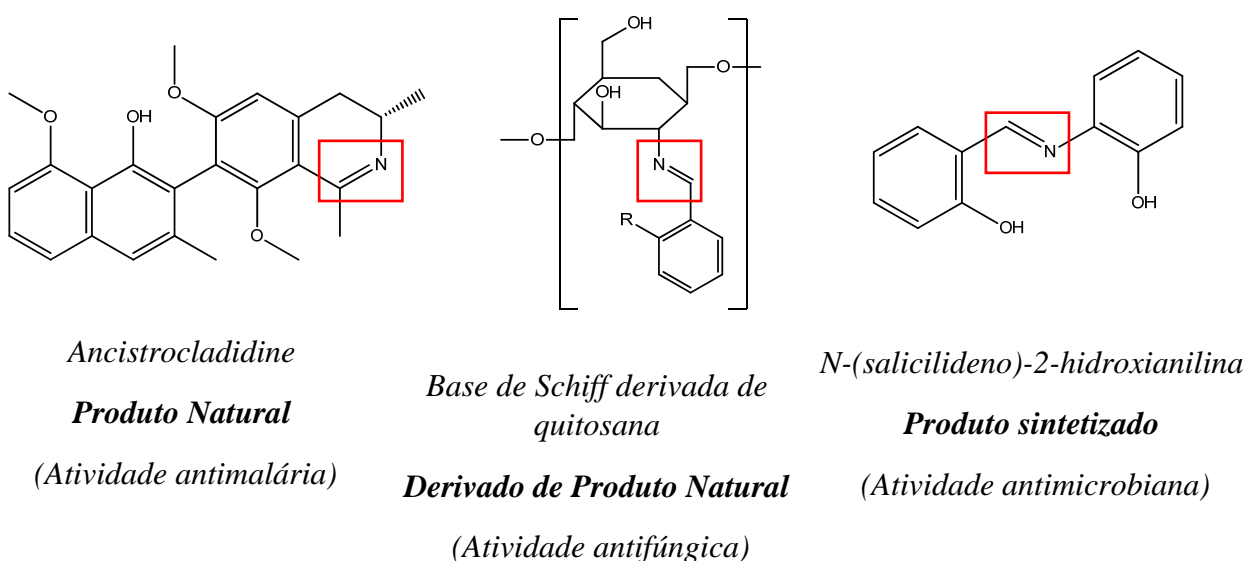


FIGURA 1.3 – Exemplos de bases de Schiff bioativas (DA SILVA *et al.*, 2011).

Além da capacidade de compor parte do sistema biológico, já tem sido reportadas em literaturas diversas utilizações como agentes terapêuticos, bactericidas e antifúngicos. De uma forma geral bases de Schiff derivadas de fármacos, o que contribui ainda mais para a atividade dos compostos sintetizados (PANDEYA *et al.*, 1999).

Nesse contexto, Pandeya e colaboradores (1999) avaliaram a atividade biológica da base de Schiff derivada de isatina (Figura 1.4) frente a vinte e oito espécies bacterianas de interesse clínico. Os autores descreveram que o produto sintetizado é o mais potente entre os sintetizados contra todas as bactérias patogênicas estudados, sendo que sua atividade sobressai inclusive ao antibiótico sulfametoxazol comercialmente utilizado (PANDEYA *et al.*, 1999; DA SILVA *et al.*, 2011).

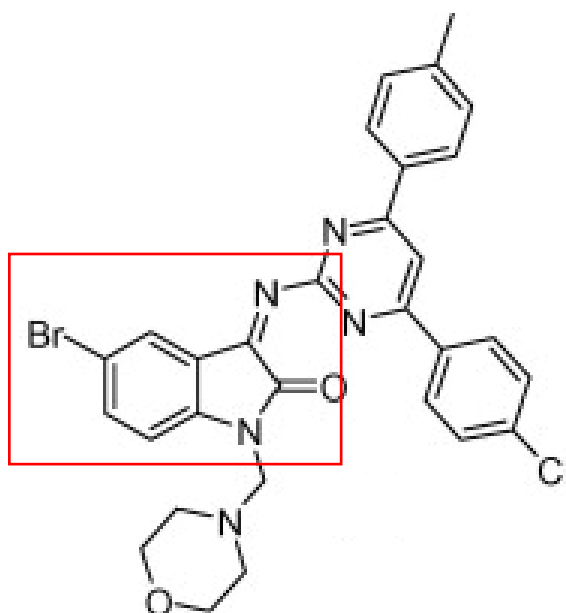


FIGURA 1.4 – Estrutura da base de Schiff derivada de Isatina (DA SILVA *et al.*, 2011).

Outro derivado, a base de isoniazida (Figura 1.5), mostrou-se ativo contra *M. tuberculosis*, o mesmo que exibiu valor de CMI bem satisfatório, 0,03 mg.L⁻¹. Ainda, além do baixo valor de CMI, a base apresentou atividade superior a do próprio fármaco comercial, da mesma forma que não apresentou toxicidade contra nenhuma linhagem celular sadia.

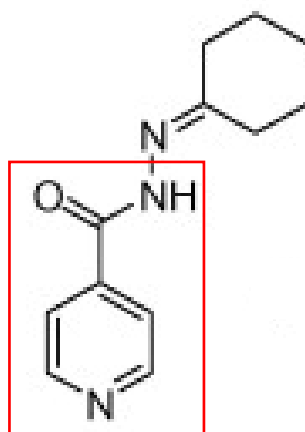


FIGURA 1.5 – Estrutura da base de Schiff derivada de Isoniazida (DA SILVA *et al.*, 2011).

Conjugados de bases de Schiff com ácido *p*-aminossalicílico (PAS) contendo cadeias laterais variáveis (R = L1, L2, L3, L4, L5, L6) ricas em hidroxila mostram reforçada atividade antimicrobacteriana contra o gênero *Mycobacterium*. Compostos a base de PAS, com diferentes grupos substituintes (Figura 1.6) foram sintetizados e avaliados contra a estirpe bacteriana. Os resultados dos ensaios para os compostos antimicrobacterianos apresentaram uma porcentagem de inibição numa concentração única, 650 μ M para o gênero *M. smegmatis* e 52 μ M para o *M. bovis*, indicando que a conjugação de ligantes contendo grupos hidroxilas é eficaz para aumentar sinergicamente à atividade antimicrobiana dos compostos. No mais, ambos os resultados foram positivos em relação à atividade do fármaco livre (PATOLE *et al.*, 2006).

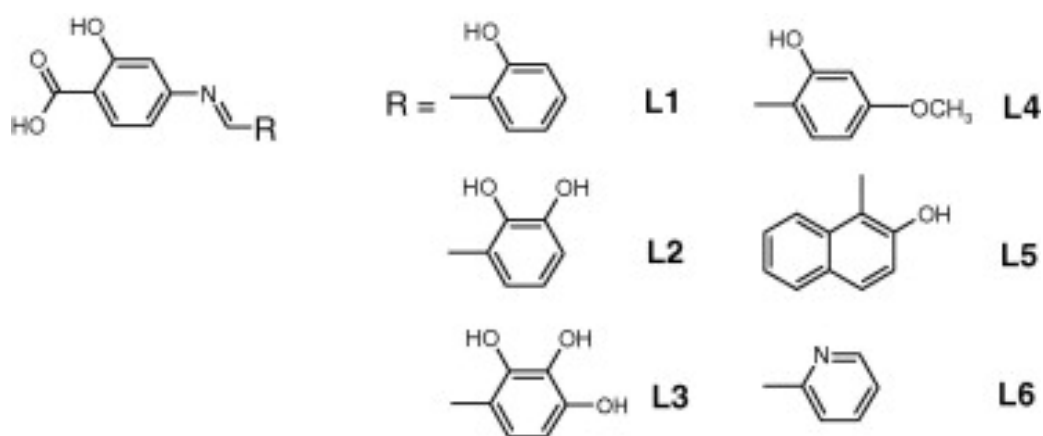


FIGURA 1.6 – Esquema de obtenção de bases de Schiff a partir da conjugação de diferentes ligantes com ácido *p*-aminossalicílico (PATOLE *et al.*, 2006).

Em estudos recentes, pesquisadores avaliaram a atividade da base de Schiff de N, N'-bis (salicilideno) -1,2-fenilenodiamina, salophen, substância que apresenta o sinergismo quando combinado com amicacina contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. O composto sintetizado apresentou que a atividade antibiótica dos amicacina contra *S. aureus* e *E. coli* (39 e 19,5 ug / mL) foi aumentada na presença do produto em comparação com o controle (156,25 e 78 ug / mL), enquanto não mostrou qualquer efeito sobre a atividade de gentamicina e neomicina. Contra *P.aeruginosa* foi observada nenhuma atividade modificadora em contraste com antibiótico desta base de Schiff, o que já era esperado com base na maior resistência por parte dessa estirpe. Em conclusão, a base de Schiff de N, N '-bis (salicilideno)-1,2-fenilenodiamina mostrou sinergismo quando combinado com amicacina contra o *S. aureus* e *E.coli*, o que demonstrou a capacidade de síntese desses novos compostos como agentes terapêuticos contra essa linhagem de patógenos (DE TOLEDO *et al.*, 2016).

Além da utilização de fármacos na formação das bases de Schiff, outras moléculas, sejam elas de origem natural ou não são plataformas para a síntese de bases de Schiff com atividades antibacterianas, as mesmas que incluem aminoácidos, cumarinas, sulfonamidas, ou resacetophenones, bromocoumarins aminotiazolilo, éteres de coroa ou 2-aminofenol e 1,2, 4-triazóis (DA SILVA *et al.*, 2011).

Tais compostos apresentam ainda uma atividade melhorada quando associada a metais que contém uma atividade já bem reconhecida.

A interação de bases de Schiff com complexos metálicos e o sistema biológico tem sido amplamente estudadas nas últimas décadas. Complexos de metais e ligantes orgânicos mistos desempenham um papel importante na ativação de enzimas e exibem boa atividade de clivagem nucleolítica, além do que são utilizados para armazenamento e transporte de material ativo através da membrana celular (PRIYADHARSHINI *et al.*, 2015).

A curcumina [1,7-bis (4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona] com atividades terapêuticas já reconhecidas (atividade anti-oxigenação, antibiose, anti-tumoral) a tempos tem sido avaliada mediante modificações estruturais e associada a diferentes metais, em compostos de coordenação, com objetivo de definir a tenacidade que tal associação confere às atividade tumorais no organismo, bem como

compreender melhor o modo de ligação de tais compostos com moléculas bioativas (PRIYADHARSHINI *et al.*, 2015).

Complexos de base de Schiff e cefradina estão entre os mais conhecidos complexos metálicos foto-reativos (NAMAN *et al.*, 2002). Tais bases quando ligadas ao cobre tem chamado muita atenção, além do metal ser um elemento essencial para a vida, as mesmas estão associadas com número de enzimas dependentes do cobre que são a chave em processos biológicos (SORENSEN, 1998). Além disso, o zinco também tem papel multifacetado no sistema biológico como um constituinte de proteínas e enzimas que pertencem a vias de sinalização celular. Metais de transição têm um lugar importante dentro de bioquímica medicinal, ainda mais quando associados a moléculas que já apresentam alguma atividade biológica, tal associação agrega funcionalidade nos compostos, em consequência aumenta a atividade biológica das mesmas (ABDEL-KADER *et al.*, 2016).

Complexos de platina (II) contendo base de Schiff de salicilaldeído e 2-furaldeído com o- e p-fenilenodiamina foram relatados como agentes antibacterianos contra as estirpes de *E. coli*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*. Os dados da atividade mostraram que os complexos de platina (II) são antimicrobianos mais potentes do que os ligantes base de Schiff contra um ou mais microorganismos (GABALLA *et al.*, 2007).

As atividades mais elevadas dos complexos metálicos podem ser relacionadas ao efeito dos íons metálicos na membrana celular normal. Quelatos de metais suportam propriedades polares e não polares em conjunto; isso os torna adequados para a permeação para as células e tecidos. Além disso, a quelação pode aumentar ou suprimir o potencial bioquímico das espécies bioativas orgânicas (ABU-DIEF e MOHAMED, 2015).

Adicionalmente ao que já foi apresentado, diversas outras aplicações de bases de Schiff são reportadas, sendo que grande parte destas como antibacterianas e antifúngicas (WALSH *et al.*, 1996; SRIDHAR *et al.*, 2001; MLADENOVA *et al.*, 2002; PANNEERSELVAM *et al.*, 2005), como também antivirais (JAYANDRAN *et al.*, 2014), fungicidas (WALSH *et al.*, 1996), anti-HIV (KHADRA *et al.*, 2015) e de uma forma bem expressiva como anticancerígena (LI *et al.*, 2015), essa última que tem tido grande

expressão, uma vez que cada vez mais se faz necessárias novas alternativas terapêuticas contra patologias de maior complexidade.

Compostos de coordenação contendo bases de Schiff também têm recebido considerável atenção, tendo em vista a sua importância em muitos campos da química Bioinorgânica. As bases de Schiff compõem intermediários-chave em muitas reações metabólicas de aminoácidos catalisadas por enzimas (ADNAN e MIKA, 2006; TRZESOWSKA-KRUSZYNSKA, 2012).

O mecanismo de ação biológica em muitos casos envolve a complementaridade das drogas com o receptor ativo no organismo, dessa forma a utilização de ligantes, bem como complexos metálicos desses compostos funcionalizados são os principais responsáveis pelo avanço do desenvolvimento de terapias funcionais de doenças. A modificação estrutural de formulações já ativas tem sido uma estratégia promissora em diversos casos. O novo produto obtido, modificado, é mais ativo que o seu princípio livre, podendo desencadear atividade como agente citotóxico e fazer decrescer a resistência celular à droga. Alguns efeitos colaterais causados pelas formulações convencionais podem também ser suprimidas pela sua modificação e/ou complexação ao centro metálico (WEST *et al.*, 1991).

Desta forma, o estudo de novos compostos, complexos com bases de Schiff quimioterapêuticas tem atraindo bastante atenção dos químicos medicinais pelo amplo espectro de atividades biológicas oferecidas.

1.2. Infecções bacterianas comumente evidenciadas em humanos

As infecções representam alvo importante de discussões em nível mundial, seja em unidades de saúde e/ou instituições que realizem a assistência ao humano, ou em centros de ensino e pesquisa que buscam novas alternativas de combate a essa patogenia. Em geral, a preocupação dos órgãos vigilantes competentes está associada às infecções nosocomiais; nomenclatura comumente usada para elucidar enfermidades adquiridas pós-internação. Contudo, sob o ponto de vista etimológico nosocomial tem origem grega *nosokomeion* e significa *nosos* (doença) + *komeion* (cuidar de). Assim, infecção nosocomial refere-se a infecção adquirida em quaisquer outras instituições (MACEDO *et al.*, 2003; JAY, 2005; LECOUR, 2010)

Cabe destacar que a instalação e proliferação das infecções geram uma desordem socioeconômica (MACEDO *et al.*, 2003), pois é necessário investir elevado recurso financeiro para implantar medidas corretivas para evitar o óbito dos pacientes. De acordo com o Ministério da Saúde, as infecções de âmbito cirúrgico são responsáveis por boa parte dos casos de todas as infecções hospitalares recorrentes no Brasil, diferentemente do que é observado em países desenvolvidos, onde a média de casos não ultrapassam os 10%. Com índices de morbidade e mortalidade elevados, há um aumento nos custos hospitalares o que causa um desprendimento maior em relação ao tempo de recuperação do paciente (MALONE *et al.*, 2002).

De fato, a melhor forma é prevenir a instalação da enfermidade ou controlá-la, ambas atividades supervisionadas pela Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) de cada instituição. Tal monitoramento, caracteriza importante indicador crítico de qualidade da assistência médica prestada (AMAVISIT *et al.*, 2001; MEDEIROS *et al.*, 2003).

O ambiente hospitalar é inevitavelmente suscetível às mais diversas bactérias patogênicas e oportunistas, de modo que infecções estão sujeitas a todos e em todo momento, podendo ser adquirida também, mesmo que em menor frequência, por funcionários e acompanhantes do local. Geralmente os sítios de infecção hospitalar comumente atingidos são as feridas cirúrgicas e em geral, os trato respiratório e urinário (Tabela 1.1).

TABELA 1.1 – Espécies bacterianas comuns em infecções nosocomiais.

Grupos Microbianos	Sítios comuns de isolamento do patógeno
Bactérias Gram negativas	
<i>Enterobacter</i> sp, <i>Klebsiella</i> sp	Feridas cirúrgicas, trato respiratório e urinário
<i>Escherichia coli</i>	Feridas cirúrgicas, sangue e trato urinário
<i>Proteus</i> sp	Feridas cirúrgicas e trato urinário
<i>Pseudomonas</i> sp	Queimaduras, trato respiratório e urinário
Bactérias Gram positivas	
<i>Streptococcus</i> sp	Feridas cirúrgicas, trato respiratório e urinário
<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i>	Feridas cirúrgicas, pele e sangue

Fonte: Adaptado de Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (2004).

Dentre os micro-organismos responsáveis pelas infecções pós internação, destacam-se as bactérias. Essas, em geral, constituem a microbiota humana e estabelece uma relação comensal com esse hospedeiro. Todavia, essas bactérias podem se oportunizar da deficiência no sistema imune do indivíduo, desencadeando a patologia. As espécies bacterianas frequentemente registradas em infecções nosocomiais são *Escherichia coli*, *Pseudomonas* sp. e *Staphylococcus aureus*, como cita PELEG e HOOPER (2010) (LEVY, 2004; KAYSER, 2005).

1.2.1. *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* ou simplesmente *E.coli*, foi descrita pela primeira vez em 1885 pelo Dr. Theodor Echerich, no decorrer das suas investigações acerca do agente etiológico da cólera e causas de enfermidades infantis comuns da época (TH e BETTELHEIM, 1989).

A *E.coli* (Figura 1.7) é caracterizada como sendo um espécie bacilar não esporulada Gram-negativa, pertencente à família *Enterobacteriaceae*. Algumas cepas são imóveis, outras movimentam-se por flagelos que se posicionam em toda a extensão da célula, designando uma célula peritríquia. Ainda, destaca-se o fato de serem quimio-organotróficas, aeróbias facultativas e apresentarem ótimo desenvolvimento em temperatura corporal humana (MADIGAN *et al.*, 2000).

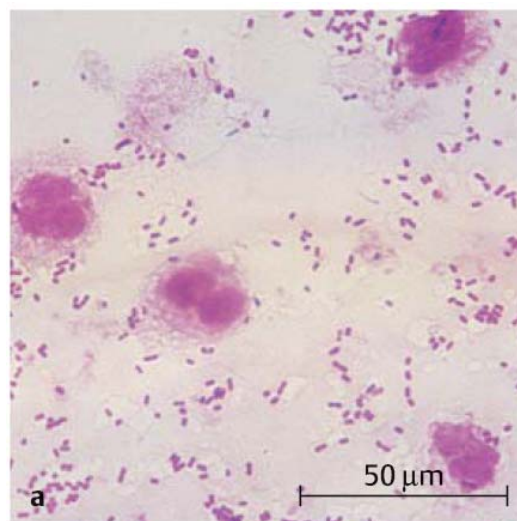


FIGURA 1.7 – Coloração de Gram de uma preparação de sedimento de urina: bastonetes Gram-negativos arredondados, alguns cocóide (LEVY, 2004; KAYSER, 2005).

Em ensaios laboratoriais, as estirpes de *E. coli* podem ser diferenciadas com base nos antígenos encontrados em estrutura da superfície bacteriana, sendo eles os somáticos “O” termoestáveis (relacionados aos polissacarídeos de membrana externa), flagelares “H” termolábeis (relacionados a proteínas dos flagelos) e capsulares “K” termoestáveis (relacionados aos polissacarídeos capsulares) (DE MELO FRANCO e LANDGRAF, 1996; MACEDO *et al.*, 2003).

A *E. coli* pertence ao grupo de coliformes termotolerantes, anteriormente, denominados coliformes fecais. Esses, são capazes de desenvolver em temperatura entre 44° - 45°C. É considerada o segundo principal agente responsável por doenças de origem alimentar nos Estados Unidos, onde corresponderam a 7,4% dos surtos e 28,6% das mortes provocadas por bactérias no período de 1993-1997 (SILVA *et al.*, 2003).

‘O caráter comensal também é característica desse micro-organismo, o qual é predominante na microbiota anaeróbica facultativa do trato intestinal de humanos e de animais homeotérmicos. São comumente associadas a gastroenterites em crianças, adultos e animais, diferenciando quanto as manifestações clínicas e epidemiológicas, bem como aos fatores de virulência (DRASAR e SHINER, 1969; LUNESTAD *et al.*, 2016).

No que se refere as Doenças Veiculadas por Alimentos – DVAs, as cepas de *E. coli* são destaques, sendo também importante bioindicador da contaminação da matriz alimentícia por fezes e presença de outros micro-organismos enteropatogênicos. Desenvolvem muito bem em temperaturas baixas o que faz com que as mesmas sobrevivam bem e por um prolongado tempo em alimentos congelados (VARNAM e EVANS, 1991).

A susceptibilidade à infecção por *Escherichia coli* segue o exemplo habitual da idade, onde jovens indivíduos susceptíveis às infecções sofrem grandes riscos, e que pode ser agravado de acordo com o estado do indivíduo infectado. Contaminações por *E. coli* são causadas pela ingestão de quantidades de 10^6 a 10^{10} células viáveis e cultiváveis que devem colonizar o intestino e produzir enterotoxinas (JAY e VILAS, 1981).

O processo de adesão em nível intestinal, é primordial para o início da interação do micro-organismo à célula hospedeira. Esse é mediado pelo por um plasmídeo, que sintetiza um fator de enteroaderência ao enterócito (DE MELO FRANCO e LANDGRAF, 1996). Posterior a isso a *E.coli* invade as células epiteliais do intestino

(ROSENSHINE *et al.*, 1992), podendo destruir suas microvilosidades (KNUTTON *et al.*, 1987).

Em um Hospital Universitário localizado no sudeste do Irã, o monitoramento de casos de infecção hospitalar, permitiu constatar que 26,1% (129/493) foram vítimas de infecção nosocomial. Dentre esses, 18,5% apresentaram infecção no trato urinário causado por *Escherichia coli* (TABATABAEI *et al.*, 2015).

No Estado indiano, Nova Bombaim, dentre os 122 agentes causadores de infecções nosocomiais, 45 foram identificados como *Escherichia coli*, os quais foram isolados da urina (40%) seguida da amostra de sangue (10,52%) (CHAUDHARY *et al.*, 2014).

As Unidades de Terapia Intensiva – UTI são também pode ser ambientes de colonização de *Escherichia coli*. No Brasil, cepas de *Escherichia coli* com perfil resistente a antibióticos e não resistentes foram isoladas de indivíduos com infecção nosocomial atendidos na UTI de um hospital universitário, sendo responsáveis por 15,1% e 10,8% dos casos de infecções nosocomiais, nessa ordem (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

1.2.2. *Pseudomonas sp*

O gênero *Pseudomonas* é pertencente à família Pseudomonadaceae, apresenta morfotipo bacilar retos ou ligeiramente curvos e caráter Gram-negativos, são aeróbios estritos e a maioria das cepas apresentam motilidade por meio de um ou mais flagelos polares. Trata-se de um patógeno oportunista de infecções articulares, ósseas, sistêmicas e do trato urinário (LEVY, 2004; KAYSER, 2005).

Uma característica da gênero, em específico da *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) é a capacidade de produzir um pigmento azul-esverdeado (piocianina), uma espécie de fluído que caracteriza o processo infeccioso por parte desses patógenos. Presente em queimaduras, fibrose cística, leucemia aguda, transplante de órgãos e drogas endovenosas, tais infecções são observadas em sítios onde exista tendência ao acúmulo de umidade: traqueostomias, cateteres permanentes, queimaduras, ouvido externo (ouvido de nadador) e feridas cutâneas exsudativas o qual é passível de contaminação (KONEMAN e ALLEN, 2008).

O patógeno *P. aeruginosa* é considerado como um dos mais prevalentes agentes de infecção hospitalar em virtude da sua habilidade de no ar, fluidos, reservatórios de água e superfícies inanimada.

Considerada um potencial de contaminação, o gênero *Pseudomonas* é considerado um dos grandes responsáveis pelos casos de bacteremia causada por Gram-negativos. A mortalidade causada por esses microrganismos chega a ser alarmante, resultante do alto poder de resistência aos antibióticos. Essa resistência é mediada por uma barreira de permeabilidade oferecida pela membrana externa composta de lipopolissacarídeos (LPS) presente em micro-organismos Gram-negativos, que dificultam a penetração do antibiótico no interior da célula, causando uma série de efeitos colaterais bem como troca de material genético, resultando em mutação e consequente resistência a um antibiótico (LEVY, 2004; KAYSER, 2005).

Dentre os representantes do gênero *Pseudomonas*, destaca-se a espécie *P. aeruginosa*. Essa bactéria foi apontada por Khan, Ahmad e Mehboob (2015) como uma das responsáveis por 11 % de todas as infecções nosocomiais, resultando em elevados escores de mortalidade e morbidade, principalmente no que se refere aos indivíduos imuno-comprometidos.

1.2.3. *Staphylococcus aureus*

As bactérias do gênero *Staphylococcus* são cocos Gram-positivas anaeróbias facultativas ou aeróbias pertencentes à família Micrococcaceae. Apresentam temperatura de crescimento na faixa de 7 a 47,8 °C, com capacidade de produzir enterotoxinas na faixa aproximada de 10 e 46 °C. A maioria das cepas de *S. aureus* cresce na faixa de pH 4,5 a 9,3, sendo que o valor de pH mais adequado para a produção de toxinas é próximo a neutralidade (pH ~ 6-7) (LEVY, 2004; KAYSER, 2005).

Os estafilococos possuem diâmetro aproximando de 0,5 a 1,5 µm dispostos na forma de cachos, pares ou cadeias curtas. Esporos e flagelos não são observados, a presença de cápsula é variável e a parede celular consiste em proteínas e polissacarídeos. Pigmentos carotenoides na membrana celular podem conferir coloração “áurea” (do latim *aureus*) às colônias de *S. aureus*, motivo pelo qual o gênero recebe essa denominação (QUINN *et al.*, 2005).

A espécie *S. aureus* (Figura 1.8) faz parte da microbiota humana, sendo encontrada na região nasofaríngea e pele (ANDRADE e ZELANTE, 1989). É considerado um dos principais causadores de infecções hospitalares e bacteremia adquirida, sendo a taxa de incidência global atingida de 14-40 casos por 100 mil habitantes (VOGEL *et al.*, 2016).

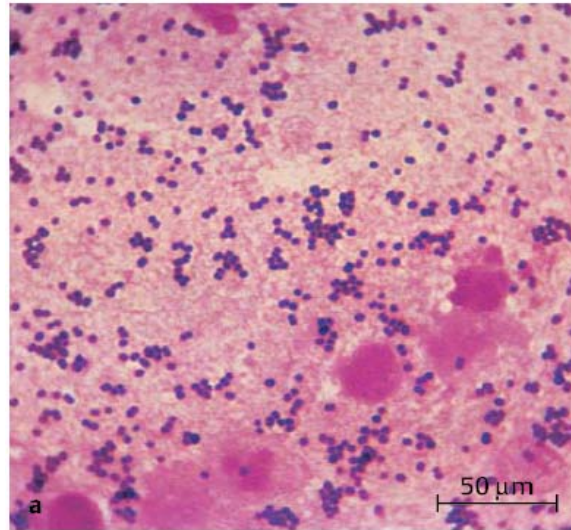


FIGURA 1.8 – Coloração de Gram de uma preparação pus: cocos Gram-positivos característicos da espécie *S. aureus* (KAYSER, 2005).

O contágio por *S. aureus* pode ser relacionado a intoxicações provenientes de alimentos, sendo associado a capacidade de sobrevivência em um teor de umidade bastante variável e em condições aeróbias, podendo também de produzir enterotoxinas (LEVY, 2004; KAYSER, 2005).

A síntese de toxinas possui correlação positiva ao aumento de células viáveis fato que explica a presença de proteínas tóxicas em alimentos contaminados com índice igual ou superior a 10^6 células de *S. aureus* (JAY, 2005). As contaminações por esse patógeno é variável dependendo do estado imune do indivíduo, mas há registro de diarreia, vômito, fadiga, náuseas, dores de cabeça e abdominais. Em alguns casos é possível acarretar o óbito do indivíduo (RIEDEL, 2005; SAAD, 2006).

As enterotoxinas são particularmente importantes no processo de gastroenterite de origem alimentar e intoxicação estafilocócica que na maioria das vezes é provocada pela ingestão de alimentos contendo a enterotoxina pré-formada.

São vários os tipos de enterotoxina envolvidos em intoxicações alimentares por *Staphylococcus*, no entanto a maioria das intoxicações têm sido causadas preferencialmente pelo gênero *Staphylococcus aureus* (SAAD, 2006)

A prevalência da incidência de casos infecciosos causados, em partes, pelo gênero é antigo. Desde o primeiro relato de resistência de *Staphylococcus aureus* aos antibióticos sulfanilamida (1930), penicilina (1959), meticilina (1970) e vancomicina (1997) os número de casos infecciosos tem crescido de maneira vertiginosa em todo o mundo. Embora os registros sejam mais recorrentes em ambientes hospitalares, casos graves podem ser relatados no cotidiano da população (SANTOS *et al.*, 2007).

Esse perfil de resistência, primeiro nos hospitais e depois na comunidade é hoje um padrão conhecido que recorre a cada introdução e uso de um antimicrobiano na prática clínica. Vale destacar que as infecções ocorrem tipicamente como infecções na pele, tecidos moles, pulmonares, e representam cerca de 16,7% das incidências em toda Europa, dado até o ano de 2008. Tal situação gerou uma preocupação em nível mundial o que fez com que autoridades da área de saúde investissem mais e melhor na qualidade dos serviços (GELATTI *et al.*, 2009; VOGEL *et al.*, 2016).

Casos preocupantes envolvendo a resistência aos antibióticos também tem sido registrados no Japão, país este que tem se destacado pela alta prevalência de estirpes resistentes adquiridas no ambiente ambulatorial. Cerca e 50-60% (dados de 2015) de casos são evidenciados como sendo decorrentes dessa resistência (DIEKEMA *et al.*, 2001; KIMURA *et al.*, 2016; VOGEL *et al.*, 2016).

1.3. Transmissão Cruzada Da Microbiota Patogênica

Os patógenos implicados nas infecções hospitalares são transmitidos ao indivíduo através dos mais diversificados vetores e normalmente por vias endógena (pela própria microbiota do paciente) e/ou exógena (mãos, secreção salivar, fluidos corpóreos, ar e materiais contaminados, como por exemplo, equipamentos e instrumentos utilizados em procedimentos médicos) (LEVY, 2004; KAYSER, 2005).

No ambiente hospitalar parte dos procedimentos utilizados são invasivos (Tabela 1.2), isto é, penetram as barreiras de proteção do corpo humano, de modo a elevar ainda mais o risco de infecção, conforme apresentado.

TABELA 1.2 – Procedimentos médicos comuns associados com infecções nosocomiais.

Procedimento	Doença	Patógeno
Cateterização urinária	Cistite	Bacilos Gram-negativos, enterococos
Cirurgia	Feridas, septicemia	Bacilo Gram-negativos, bacteroides <i>Staphylococcus</i> sp,
Diálise renal	Sepse, reação pirogênica	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas</i> sp, Vírus da hepatite B,
Intubação respiratória	Pneumonia	<i>Klebsiella</i> sp, <i>Serratia</i> sp e <i>Pseudomonas</i> sp,
Terapia intravenosa	Infecção no local de injeção, septicemia	<i>Enterobacter</i> sp, <i>Klebsiella</i> sp, <i>Serratia</i> sp, <i>Staphylococcus</i> sp

Fonte: Adaptado de ANVISA (2004).

O status imunológico, idade, procedimentos médicos, imunossupressão, falhas nos procedimentos de controle de infecção, ambiente e uso abusivo de antibióticos, também constituem fatores determinantes que influenciam diretamente na ocorrência e evolução do processo infeccioso (LEVY, 2004; KAYSER, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2010).

1.4. A Química No Tratamento Das Enfermidades Bacterianas

O advento dos antibióticos no início do século XX impulsionou a revolução médica reduzindo drasticamente a mortalidade devido a infecções bacterianas. Juntamente com vários outros avanços na área da saúde, tais como vacinas

e saneamento básico, os antibióticos contribuíram para uma extensão da expectativa de vida mensurável (MAXSON e MITCHELL, 2015).

Os antibióticos por vezes são considerados o elemento crítico de uma série de procedimentos médicos, os quais incluem desde tratamento de patologias de menor expressão à cirurgias e transplantes, os mesmos sujeitos a uma taxa de complicações graves e morte por infecção que de outra forma seria inaceitavelmente elevado. Décadas de pesquisa em desenvolvimento antibiótico produziram antibióticos altamente eficazes e seguros, oferecendo tanto aos médicos quanto aos pacientes uma ampla gama de ferramentas para prevenir e combater as infecções bacterianas. No entanto, a resistência tem acompanhado de igual maneira o lançamento de cada novo medicamento (SABOL *et al.*, 2005; GENTRY *et al.*, 2008; MAXSON e MITCHELL, 2015). A rápida propagação de patógenos resistentes tornou-se um problema grave, resultando em pelo menos 23.000 mortes só no ano de 2013 nos Estados Unidos (CDCP, 2013).

Os mecanismos de resistência ou mesmo insensibilidade as drogas são diversos e sujeitos em áreas terapêuticas distintas. No entanto, a resistência por parte de agentes infecciosos é a única resistência passível de contaminação direta transmissível de pessoa para pessoa, o que contribui ainda mais para o agravamento da situação. Várias alternativas tem sido avaliadas no intuito de minimizar tais índices de resistência, entretanto sem grandes sucessos, devido a persistência do uso irracional de antibióticos por médicos e população leiga (SANTOS *et al.*, 2007; VAZ, 2009) (CDCP, 2013).

As estratégias para a descoberta de novos antibióticos têm sido cada vez mais raras. Na maioria das vezes portando uma farmacodinâmica complexa, ou mesmo com um mecanismo de ação não conhecido completamente, os prováveis antibióticos ficam restritos no que diz respeito ao progresso de seu desenvolvimento, além do fator financeiro, se não o maior determinante, um fator muito importante (ROCHA *et al.*, 2011; BUTLER *et al.*, 2013).

O retorno financeiro baixo é a principal causa da falta de incentivo. A inserção de novos antibióticos no mercado é visto como um mau investimento, e por isso são reservados como drogas de última instância ou ainda de curta duração do tratamento. Ainda, estão sujeitos a um regime de preços ditados por um mercado saturado de inúmeras outras drogas genéricas de atividade similares (BUTLER *et al.*, 2013; WRIGHT, 2015) (SHLAES *et al.*, 2013; SHLAES, 2015).

Cabe destacar que as empresas que investem no ramo farmacêutico são ambiciosas a ponto de buscarem formulações com agentes de amplo espectro de ação visando ampliar seu potencial no mercado. Todavia essa proposta nem sempre é bem vista, uma vez que esses casos requerem um maior tempo de pesquisa, e consequentemente investimentos elevados, correndo o risco de apresentarem baixa efetividade diante da biodiversidade microbiana. Tal alternativa, quando mal sucedida, acaba entrando para as estatísticas.

Nos últimos 30 anos notou-se um decaimento significativo nas recusas de novos antibióticos pelo principal órgão de regulamentação dos Estados Unidos FDA - *Food and Drug Administration* (Administração de Alimentos e Medicamentos), o que acaba gerando uma preocupação geral da população em detrimento da rápida e crescente resistência aos medicamentos já disponíveis, levando a situação a um estado crítico por parte de especialistas (SPELLBERG *et al.*, 2008; GOULD, 2009; COOPER e SHLAES, 2011).

Com o declínio do desenvolvimento de novos antibióticos, novas políticas de incentivo têm sido criadas para impulsionar as pesquisas nesse seguimento.

Em 2012 o Congresso dos Estados Unidos aprovou a lei denominada GAIN, do inglês “*Generating Antibiotic Incentives Now*”, “Lei de Incentivos a Geração de Antibióticos já (agora)” (BROWN, 2013) seguido por uma Ordem Executiva 13676 de combate a bactérias resistentes a antibióticos, que orienta os órgãos governamentais a promoverem o desenvolvimento de novas drogas e diagnósticos, identificar meios de retardar a resistência, e reforçar as diligências de vigilância para as bactérias resistentes (13676, 2014).

Uma série de sugestões específicas foram apresentadas para estimular o desenvolvimento de antibióticos, incluindo o fornecimento de mais incentivos financeiros, como créditos e bolsas de investigação e desenvolvimento, flexibilizando as restrições regulamentares, e promover colaborações acadêmicas do setor (HWANG *et al.*, 2015; MAXSON e MITCHELL, 2015).

A partir das políticas de incentivo, uma série de novas ideias tem surgido: estratégias que promovam a descoberta de produtos naturais, funcionalização de fármacos inativos em decorrência do aparecimento de resistência são consideradas estratégias promissoras no desenvolvimento de novos antibióticos.

Vale ressaltar que outra abordagem potencialmente bem-sucedida é reavaliar antigas formulações, sejam elas as vetadas pelos órgãos de regulação, as abandonadas em fases de desenvolvimento (testes) e/ou mesmo as contendo baixa atividade (KOEHN, 2008). Drogas “de aproveitamento”, desenvolvidas para outras finalidades terapêuticas, também podem produzir novos antibióticos ou agentes antivirulentos, com o benefício adicional de perfis farmacocinéticos e de segurança conhecidas (GOULD e VAN DER MEER, 2011).

1.4.1. Ácido 4-aminosalicílico ou ácido *p*-aminosalicílico (4-ASA ou PAS)

O ácido 4-aminosalicílico ou ainda, ácido *p*-aminosalicílico (4-ASA ou PAS) (Figura 1.9) foi sintetizado pela primeira vez em 1902 por Seidel e Bittner. Classificado como um composto orgânico, desde a sua descoberta como agente terapêutico o mesmo vem sendo utilizado como agente anti-tuberculose (CHINSEMBU, 2016), bem como contra inflamações associadas complicações intestinais (LEHMANN, 1946; LEHMANN, 1949; DHANESHWAR *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2016).

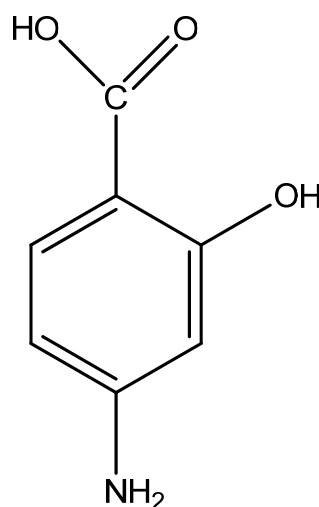


FIGURA 1.9 – Estrutura molecular do PAS.

O primeiro episódio da efetividade quimioterapêutica do PAS foi em 1943, onde Lehmann e seus colaboradores, observaram que o mesmo inibia alguns precursores essenciais ao metabolismo de micobactérias, resultando na morte desse patógeno (CHINSEMBU, 2016).

O PAS foi utilizado pela primeira vez (1943) e de forma bem sucedida fazendo uso de uma solução neutra de 10%, contra abscessos tuberculosos. Em 1944, no Sanatório Renstroemska em Gothenburg, Suécia, foi realizado um monitoramento em um grupo de 20 pacientes portadores de tuberculose, onde por via oral o fármaco foi administrado. Em relação aos estudos microbiológicos, nenhuma resposta concreta foi disponibilizada, entretanto foi notória a resposta clínica observada por meio da normalização da temperatura corporal, ganho de peso e diminuição da taxa de sedimentos de eritrócitos dos pacientes (LEHMANN, 1946).

Desde então, uma infinidade de formulações, agregados de PAS, foram desenvolvidos com o intuito de otimizar a atividade, bem como a liberação do princípio frente a tuberculose, como forma da eficiência no tratamento.

Com o sucesso clínico inicial apresentado, investiu-se em novos estudos randômicos objetivando avaliar as diferentes formas de administração do medicamento, bem como as dosagens e combinações com demais drogas. A maioria das respostas obtidas nessa fase foram positivas, em resumo, a presença de baixas concentrações de PAS só atrasou o aparecimento de resistência a outras formulações, enquanto que em concentrações maiores a utilização de PAS, e em conjunto com outras drogas antibióticas, suprimiu o crescimento de bacilos resistentes, retardando assim o progresso e até mesmo a erradicação da doença (LEHMANN, 1946).

Dois mecanismos principais mediam a atividade anti-tuberculose por parte do PAS. O primeiro consiste no bloqueio da síntese de sideróforos por parte da ação anti-salicilato do mesmo. A presença de ácido salicílico é essencial para a conversão dos sideróforos responsáveis pelo armazenamento intracelular e liberação controlada de ferro para o citoplasma, atividade que conduz o desenvolvimento bacteriano (RATLEDGE, 2004), de forma análoga bloqueia o metabolismo em função do consumo de oxigênio das células (CHINSEMBU, 2016).

Outro mecanismo baseia-se na atividade do PAS por meio da biotransformação, seja pela por meio da acetilação (Acetil-PAS) ou conjugação, interação com proteínas (glicina-PAS) (LEHMANN, 1969; MCCRAY e ONORATO, 2000). A atividade mediada pela biotransformação ocorre com a absorção do PAS sendo acompanhada pela passagem da primeira acetilação rápida no intestino e em seguida no fígado, sendo o PAS, nessa condição, rapidamente detectado e alcançando sua concentração máxima dentro de duas horas. No entanto é um processo limitado em

virtude da baixa disponibilidade da coenzima acetil-CoA, que inibe a função enzimática das células (DONALD e DIACON, 2015).

Recentemente, vários trabalhos abordando o tratamento da Tuberculose (TB) mediada por PAS têm sido publicados (PATOLE *et al.*, 2006; KIBLEUR *et al.*, 2014; DONALD e DIACON, 2015; PHAM *et al.*, 2015; DASGUPTA *et al.*, 2016).

Palote e colaboradores (2006) publicaram em seu trabalho os resultados referentes a síntese de seis diferentes ligantes bases de Schiff (iminas produtos da condensação de amins primárias com aldeídos) contendo PAS. A análise dos ensaios desenvolvidos forneceram respostas satisfatórias comparadas as do PAS livre. Um aumento significativo da atividade antimicrobiana dos novos agregados foi observada (PATOLE *et al.*, 2006). Já DASGUPTA *et al.* (2016) publicaram em seu trabalho mecanismos de liberação de PAS mediada por sistemas de encapsulamento compostos por diferentes polímeros. Uma certa porção do fármaco foi incorporada no sistema de encapsulamento composto por poliésteres e xilitol o qual foi responsável pela liberação adequada da droga. A medida que o sistema de encapsulamento era degradado pelo meio biológico em questão o fármaco era então liberado e em consequência ativo, desta forma, a atividade antimicrobiana era alcançada com êxito de acordo com as condições fisiológicas do meio de liberação. A degradação dos poliésteres variou de 48% a 76% e a liberação de PAS 54% a 65% da sua carga inicial num período controlado de 7 dias.

De forma geral, desde a primeira síntese até os dias atuais, vários análogos de PAS foram sintetizados. Desta forma, seria agora oportuno reavaliar esta molécula bem como sua potencialidade, e produzir novas modificações da mesma, objetivando encontrar agentes quimioterápicos que podem, eventualmente, ser mais eficazes contra as estirpes resistentes ao PAS livre.

1.4.2 Ácido 5-aminossalicílico (5-ASA)

O ácido 5-aminossalicílico (5-ASA) (Figura 1.10) é um composto orgânico pertencente a classe dos salicilatos muito comum por apresentar propriedades terapêuticas contra diferentes patologias vinculadas a tuberculose, em virtude da sua similaridade estrutural com o PAS (fármaco de segunda linha que exibe grande atividade antituberculose), antitumoral (KIM *et al.*, 2009), imunomodulador (RAJU *et al.*, 2014) e principalmente à inflamação intestinal (HORÁCIO LOPES, 2009; XU *et al.*, 2014).

Estudos recentes apresentam ainda a sua aplicação na área biológica, assim como reporta Soliman e Mohamed (2013), em seu estudo abordando a síntese e emprego desses em compostos de coordenação, bem como ensaios microbiológicos.

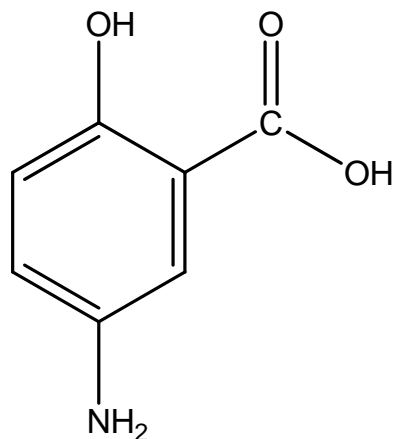


FIGURA 1.10 – Estrutura molecular do 5-ASA.

1.5 Atividade Antimicrobiana *in vitro*

A pesquisa de novos agentes antimicrobianos se faz necessária devido ao surgimento de microrganismos resistentes e de infecções oportunistas fatais, associadas a diversas ocorrências, dentre as mais comuns a AIDS, quimioterapia antineoplásica e transplantes (PENNA *et al.*, 2001). O estudo de agentes antimicrobianos tem grande abrangência, sendo ponto crucial em vários setores. Outro ponto a ser ressaltado é a utilização desse estudo como primeira triagem na descoberta da atividade farmacológica de novos agentes, sendo de extrema importância no desenvolvimento de novas drogas. Desta forma, tais pesquisas podem contribuir significativamente no desenvolvimento do campo da saúde em nível mundial, encontrando substâncias mais eficazes e menos tóxicas na corrida contra a resistência e o surgimento de microrganismos patogênicos (HO *et al.*, 2001; MICHELIN *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2008).

Atualmente, existem vários métodos para avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica de novos compostos sintetizados. Os mais conhecidos incluem método de difusão em ágar, método de macrodiluição e microdiluição, sendo este último o mais comumente utilizado. Esse método é muito útil na determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) ou a Concentração Mínima Bactericida (CMB) de compostos (OSTROSKY *et al.*, 2008).

Desenvolvido por Eloff em 1998, tal método é reconhecidamente um dos mais viáveis (relação entre desenvolvimento e tempo de resposta), preciso, de baixo custo, além do que sua reprodutibilidade é considerada 30 vezes mais sensível quando comparada a outros métodos reportados na literatura. Os protocolos para realização desta técnica requerem ainda uma pequena quantidade de amostra para os ensaios, as mesmas que podem ser utilizadas para um grande número destes. Mesmo que existam alguns inconvenientes, tais como células de alguns microrganismos que se aderem à base do poço, precipitação de compostos e a coloração dos mesmos em concentração alta que poderão interferir na análise, essa técnica é a mais adequada (OSTROSKY *et al.*, 2008).

A técnica de microdiluição em caldo é uma adaptação da macrodiluição em caldo, e é assim denominada devido a capacidade de envolver o uso de pequenos volumes de caldo colocados em placas de 80, 96 ou mais poços de fundo redondo ou cônico estéreis (placa de ELISA), próprias para microdiluição. As placas de microdiluição inoculadas devem ser incubadas a 35 °C por 16-24 h, com no máximo quatro placas em cada pilha, a fim de manter a mesma temperatura de incubação para todas as culturas de forma uniforme. Os fatores primários que influenciam nos valores de CMI no método de diluição em caldo são os mesmos tanto para a técnica de macrodiluição como para de microdiluição, ou seja, a sensibilidade do organismo, o diluente utilizado, o estágio e a taxa de crescimento bacteriano (CHRISTOFILOGIANNIS, 2001).

Nesta técnica os agentes antimicrobianos são geralmente testados em diluições consecutivas, sendo a menor concentração capaz de inibir o crescimento de um organismo a considerada como CMI (MURRAY *et al.*, 1995). Segundo Andrews (2001), as CMI's são consideradas excelentes ferramentas para determinar a susceptibilidade dos organismos aos antimicrobianos e, portanto, usadas para julgar a performance de todos os outros métodos de susceptibilidade (ANDREWS, 2001).

1.6 Processo Inflamatório

A inflamação consiste em um mecanismo adaptativo de resposta a estímulos agressivos no sentido de manter o equilíbrio homeostático, respostas estas que incluem uma série de alterações bioquímicas, fisiológicas e imunológicas (WHITE,

1999). Mediada por diferentes mecanismos, a resposta inflamatória pode ser dividida em duas fases distintas: fase aguda e fase crônica (LAWRENCE e GILROY, 2007).

A fase aguda consiste em um evento transitório, de início rápido, com duração curta e caracterizada pela presença de exsudação de fluido e proteínas plasmáticas (edema) e a migração de leucócitos, predominantemente de neutrófilos; já a fase crônica, de duração maior e histologicamente associada com a presença de linfócitos e macrófagos, proliferação de vasos sanguíneos, degeneração tissular e reparação fibrótica (LAWRENCE e GILROY, 2007).

As características fisiológicas do processo inflamatório são iniciadas e reguladas por mediadores inflamatórios (produtos de leucócitos e plaquetas ativados, do metabolismo do ácido araquidônico, prostaglandinas e leucotrienos e das cascatas da coagulação e do complemento) que agem localmente no sentido de restringir as consequências e a extensão do dano tecidual (ABBAS *et al.*, 2000). Neste caso, o processo inflamatório tem apenas repercussão local se não, quando passa completamente despercebido. Em condições em que esta capacidade homeostática local não é superada, ou pela magnitude do estímulo agressor ou pela insuficiência dos mecanismos reguladores, a resposta inflamatória extravasa os limites do seu microambiente e pode se manifestar de modo sistêmico em todo organismo ou ainda, dependendo da quantidade de citocinas liberadas pode ter consequências catastróficas (VOLTARELLI, 1994).

A resposta inflamatória só é benéfica quando atua na tentativa de controlar os danos teciduais locais, de forma a agir para limitar a sobrevivência e proliferação dos patógenos invasores, promovendo a sobrevivência do tecido, reparo e recuperação, além de conservar a energia do organismo. No entanto, quando a inflamação torna-se sistêmica, ela pode trazer graves consequências ao organismo a ponto de se generalizar dificultando todo e qualquer tratamento terapêutico (VOLTARELLI, 1994).

1.7 Doenças Inflamatórias Intestinais e Terapia de Controle

As doenças inflamatórias intestinais (DII) são doenças crônicas de etiologia desconhecida, apesar de algumas ocorrências já terem sido avaliadas, que compreende, principalmente, doença de Crohn (DC) e Retocolite Ulcerativa

Inespecífica (RU). Há indícios que as DII decorram de respostas imunológicas descontroladas, presumivelmente contra a flora presente no intestino, mais precisamente de anormalidades imunológicas celulares, ou seja, da reatividade anormal dos linfócitos T da mucosa gastrointestinal a uma microbiota normal não patogênica, ainda desconhecida (MATSUMOTO *et al.*, 2001).

As DII caracterizam-se por inflamações intestinais crônicas não infecciosas e manifestam-se clinicamente por diarreia, dor abdominal, perda ponderal, náuseas e, dependendo da evolução do problema, podem atingir um estado crítico causando câncer de cólon e podendo levar os pacientes até mesmo à morte. A DC caracteriza-se por episódios recorrentes de inflamação envolvendo qualquer parte do canal alimentar, da boca ao ânus. A inflamação é transmural resultando em fístulas e perfurações, e descontínua, podendo atingir todo o trato gastrointestinal. Já a RU consiste em uma inflamação que envolve a mucosa do cólon e do reto, de forma contínua, sendo o principal efeito decorrente desse distúrbio a diarreia sanguinolenta, seguido de dor abdominal e perda de peso (MAS-MOYA e SINGHI, 2015).

Atualmente tem-se observado um agravante tanto no fato que diz respeito ao surgimento de novas irritações quanto no estágio de desenvolvimento de patologias intestinais. Muitos destes problemas não tem uma etiologia bem fundamentada, no entanto existem hipóteses que supõem a causa como sendo um conjunto de fatores, os quais incluem, principalmente, uma predisposição genética, caráter hereditário, envolvimento do ambiente (fumo, alimentação, dietas, etc), microbiota atípica, bem como as próprias alterações e/ou desregulação da resposta imune (MAS-MOYA e SINGHI, 2015).

Algumas terapias têm sido avaliadas com objetivo de suprimir a ocorrência bem como a reincidência das DII, com esse propósito a melhoria da atividade tem sido alcançada com a utilização de salicilatos e imunorreguladores. Tentativas terapêuticas não convencionais também compõem alternativa para inibir o desenvolvimento da doença, essas incluem a utilização de nicotina, probióticos, dietas e heparina. Todas essas tentativas têm sido avaliadas a partir de estudos em animais, incluindo inibição de citocinas pró-inflamatórias, em específicas a do fator nuclear kappa B e do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (CANTORNA *et al.*, 2000).

A descoberta sulfasalazina, por exemplo, apresentou um grande passo para cura de DII. Potenciais terapêuticos interessantes são observados neste, no entanto seu uso contínuo apresenta importantes limitações. Além de recidivas comuns em pacientes que fazem uso dessa medicação, efeitos adversos são comuns em mais de um terço dos doentes, em muitos casos ocorrendo de forma frequente, necessitando, em casos mais extremos, da suspensão da medicação (PODOLSKY, 2002).

Desta forma, objetivando a redução de tais efeitos colaterais e consequentemente permitindo manter a administração, bem como a eficácia do tratamento de tais doenças, pesquisas foram realizadas no intuito de avaliar separadamente os dois componentes que compõem a sulfasalazina. Mediante investigações, ficou comprovado que a fração responsável pela maioria dos efeitos adversos nos pacientes era causados pelo radical sulfapiridina, enquanto que a função terapêutica (antiinflamatória) era exercida pela fração do ácido 5-aminosalicílico (5-ASA), sendo responsável pela inibição da síntese de prostaglandinas, redução do metabolismo do ácido araquidônico, efeito inibitório na quimiotaxia dos leucócitos e a secreção da adenosina induzida, bloqueio das vias da ciclooxigenase e lipoxigenase, redução da formação de radicais livres de oxigênio, bem como age na inibição do fator de necrose tumoral kappa β (PODOLSKY, 2002; CALTABIANO, 2010).

Apesar do grande número de drogas que podem atuar como antiinflamatórios gerais ou seletivos contra DII, as mesmas não asseguram a cura total da doença. Ainda assim, conforme amplo espectro de atividade, a classe de fármacos mais atrativa na terapia convencional de doenças inflamatórias do intestino são à base de 5-ASA (BIONDO-SIMÕES *et al.*, 2009).

Nos últimos quinze anos uma variedade de compostos contendo a fração 5-ASA foram lançados com objetivo de serem melhor adaptados e efetivos ao tratamento das inflamações conforme estágio da doença. Compostos orais com 5-ASA são apropriados para diferentes modulações da doença intestinal, dentre os quais incluem os apresentados na Figura 1.11.

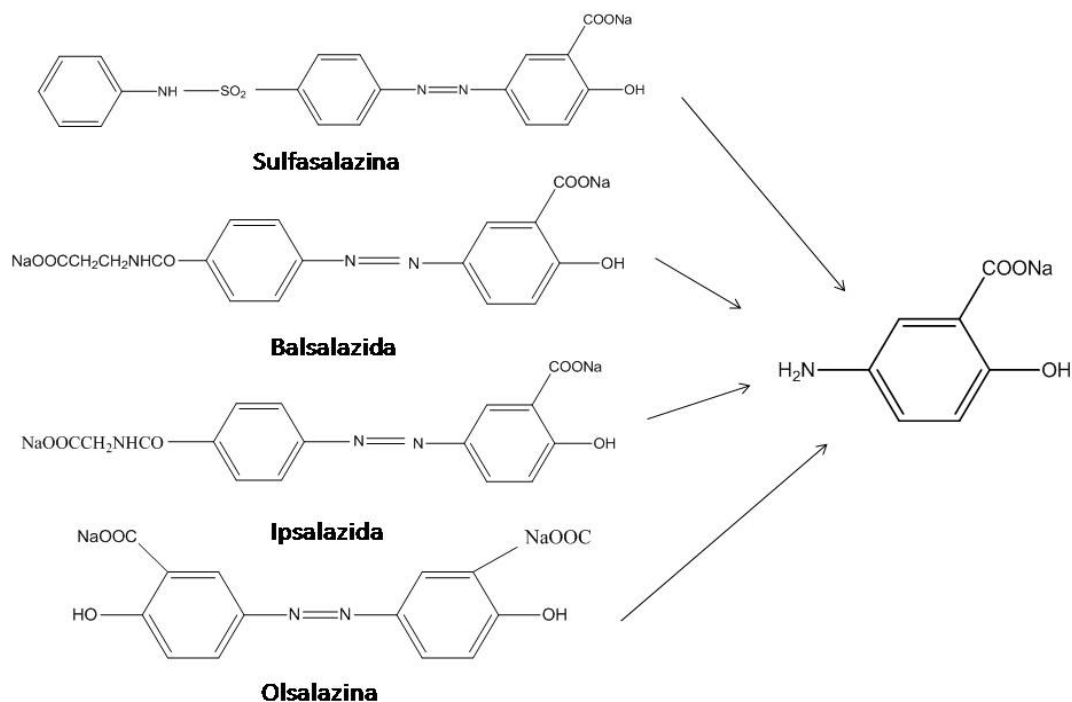


FIGURA 1.11 – Compostos com 5-ASA e esquema de liberação (SANDBORN e FAUBION, 2000; BIONDO-SIMÕES *et al.*, 2009).

Na ausência de atividade satisfatória de tratamentos convencionais das DII, e partindo da mesma motivação das alternativas do PAS, várias opções terapêuticas tem sido avaliadas, dentre elas, a utilização dos corticosteroides, anticorpos monoclonais quimérico, moduladores do princípio ativo e modificações estruturais, conforme a motivação do referido estudo.

Os corticosteróides agem controlando a doença de maneira complexa, incluem modulação de fosfolipase A, interleucina 1 (IL-1), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), molécula de adesão nas interações entre os leucócitos e o endotélio-1 (ELAM-1) e molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) e a lise dos linfócitos e eosinófilos (PODOLSKY, 2002). Já o uso de anticorpos monoclonais quimérico, os mesmos que compreendem regiões constantes humanas e regiões variáveis murinas que reconhecem o TNF- α , neutralizando a sua atividade biológica, causando em consequência disso o controle da doença por meio do fechamento de fístulas causadas pelas DII (SANDBORN e FAUBION, 2000; BEN-HORIN *et al.*, 2014). Já a modulação do 5-ASA por meio da funcionalização estrutural intermediada por modificações estruturais se mostra uma interessante alternativa que viabiliza o tratamento das DII.

CAPÍTULO 2

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Sintetizar e caracterizar ligantes do tipo base de Schiff fazendo uso dos ácidos 4- e 5-aminosalicílico visando aplicação biológica.

2.2 Objetivos Específicos

- Sintetizar novos ligantes a partir do 4- e 5-ASA;
- Caracterizar os ligantes obtidos por meio de ponto de fusão, solubilidade, análise elementar CHN, espectroscopia de absorção na região do infravermelho, espectroscopia de absorção na região do ultravioleta visível, ressonância magnética nuclear de ^1H ;
- Avaliar, por meio de ensaios microbiológicos, a atividade biológica *in vitro* [concentrações mínimas inibitórias (CMIs)] dos ligantes obtidos a partir de cepas de *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*.

CAPÍTULO 3

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Materiais

Todos os materiais de partida, incluindo produtos químicos e solventes, estão comercialmente disponíveis em grau analítico e foram utilizados como adquiridos, sem purificação adicional.

Neste trabalho, foram empregados reagentes e solventes de diferentes naturezas e procedências, conforme listados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Procedência, natureza e pureza dos solventes utilizados.

Solvente/ Reagente	Fórmula química	Massa molecular (g.mol ⁻¹)	Procedência/ Fabricante	Pureza (%)
<i>Acetona</i>	<i>C₃H₆O</i>	<i>58,08</i>	<i>Isofar</i>	<i>P.A</i>
<i>Acetonitrila</i>	<i>CH₃CN</i>	<i>41,05</i>	<i>Merck</i>	<i>P.A</i>
<i>Ácido 4-aminossalicílico (4-ASA)</i>	<i>C₇H₇NO₃</i>	<i>153,12</i>	<i>Aldrich</i>	<i>99</i>
<i>Ácido 5-aminossalicílico (5-ASA)</i>	<i>C₇H₇NO₃</i>	<i>153,12</i>	<i>Aldrich</i>	<i>95</i>
<i>Benzeno</i>	<i>C₆H₆</i>	<i>78,11</i>	<i>Isofar</i>	<i>P.A</i>
<i>Clorofórmio</i>	<i>CHCl₃</i>	<i>119,38</i>	<i>Synth</i>	<i>P.A</i>
<i>Diclorometano</i>	<i>CH₂Cl₂</i>	<i>84,93</i>	<i>Neon</i>	<i>P.A</i>
<i>Dimetilformamida (DMF)</i>	<i>C₃H₇NO</i>	<i>73,09</i>	<i>Vetec</i>	<i>P.A</i>
<i>Dimetilsulfóxido (DMSO)</i>	<i>C₂H₆OS</i>	<i>78,13</i>	<i>Vetec</i>	<i>P.A</i>
<i>Etanol (EtOH)</i>	<i>C₂H₆O</i>	<i>46,07</i>	<i>Panreac</i>	<i>PA</i>
<i>Hexano</i>	<i>C₆H₁₄</i>	<i>86,18</i>	<i>Neon</i>	<i>P.A</i>
<i>Metanol (MeOH)</i>	<i>CH₄O</i>	<i>32,04</i>	<i>Synth</i>	<i>PA</i>
<i>p-(dietilamino)salicialdeído (DEAS)</i>	<i>C₁₁H₁₅NO₂</i>	<i>193,24</i>	<i>Aldrich</i>	<i>98</i>
<i>p-(dimetilamino)benzaldeído (DMAB)</i>	<i>C₉H₁₁NO₂</i>	<i>149,19</i>	<i>Aldrich</i>	<i>98</i>
<i>2,3 dihidroxibenzaldeído (DHB)</i>	<i>C₇H₆O₃</i>	<i>138,12</i>	<i>Aldrich</i>	<i>97</i>

3.2 Síntese dos ligantes bases de Schiff obtidas a partir dos princípios 4-ASA e 5-ASA

As bases de Schiff sintetizadas foram obtidas pela condensação direta dos princípios ativos, cada qual com um aldeído correspondente.

3.2.1 Ácido 4-((4'-dimetilamino) benzilideno) amino-2-hidroxi-benzoico (BS4)

Em um béquer com capacidade de 25 mL foram adicionados uma solução de aproximadamente 0,1531 g (1 mmol) de 4-ASA em 5 mL de metanol, e em seguida verteu-se sob a solução em agitação, 0,1657 g (1 mmol) de *p*-(dimetilamino)benzaldeído (DMAB) em 5 mL de metanol, obtendo de forma instantânea o produto sólido de interesse, conforme o esquema da síntese apresentada na figura 3.1, o qual foi filtrado e seco para posterior caracterização.

Fórmula Molecular = C₁₆H₁₆N₂O₃

Massa molecular = 284,31 g.mol⁻¹

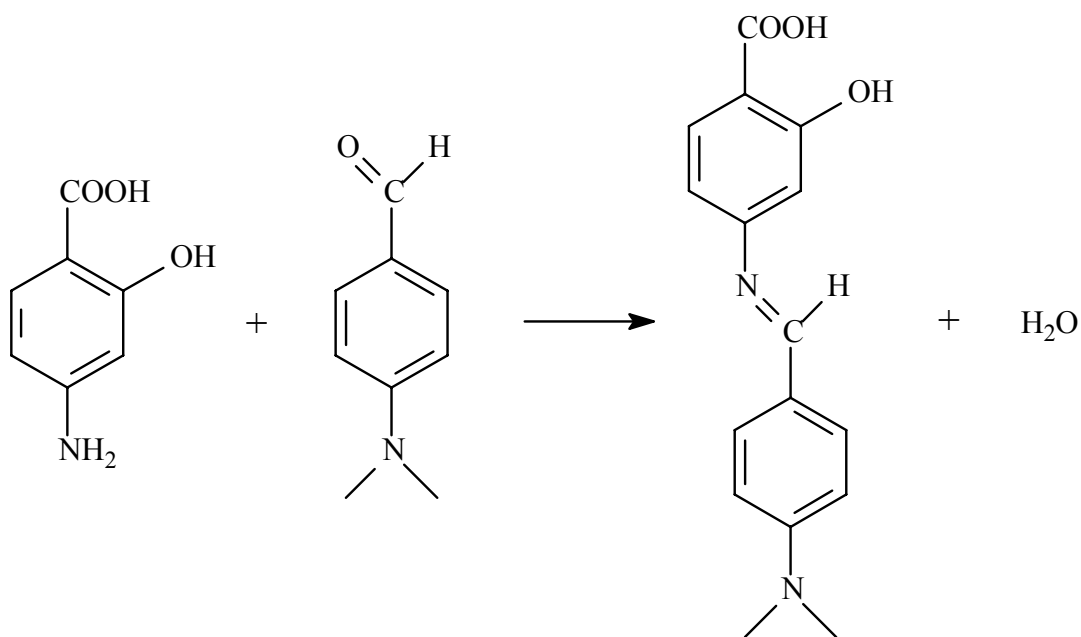


FIGURA 3.1 – Esquema de preparação do ligante Base de Schiff denominado BS4.

3.2.2 Ácido 5-((4'-dimetilamino) benzilideno) amino-2-hidroxi-benzoico (BS5)

Em um béquer com capacidade de 25 mL foram adicionados uma solução de aproximadamente 0,1531 g (1 mmol) de 5-ASA em 5 mL de metanol, e em seguida verteu-se sob a solução em agitação, 0,1657 g (1 mmol) de DMAB em 5 mL de metanol, obtendo de forma instantânea o produto sólido de interesse, conforme o esquema da síntese apresentada na figura 3.2, o qual foi filtrado e seco para posterior caracterização.

Fórmula Molecular = $C_{16}H_{16}N_2O_3$

Massa molecular = $284,31 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

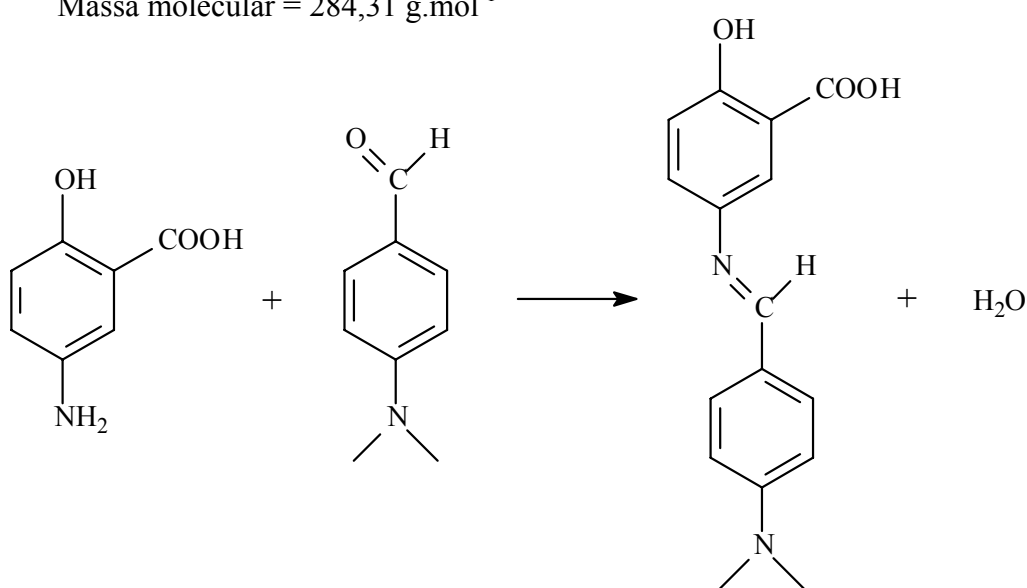


FIGURA 3.2 – Esquema de preparação do ligante Base de Schiff denominado BS5.

3.2.3 Ácido 4-(2',4'-dihidroxi-benzilideno) amino-2-hidroxi-benzoico (BS6)

Em um béquer com capacidade de 25 mL foram adicionados uma solução de aproximadamente 0,1531 g (1 mmol) de 4-ASA em 5 mL de metanol, e em seguida verteu-se sob a solução em agitação, 0,13812 g (1 mmol) de 2,4 dihidroxi-benzaldeído (DHB) em 5 mL de metanol, obtendo de forma instantânea o produto sólido de interesse, conforme o esquema da síntese apresentada na figura 3.3, o qual foi filtrado e seco para posterior caracterização.

Fórmula Molecular = $C_{14}H_{11}NO_5$

Massa molecular = $273,25 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

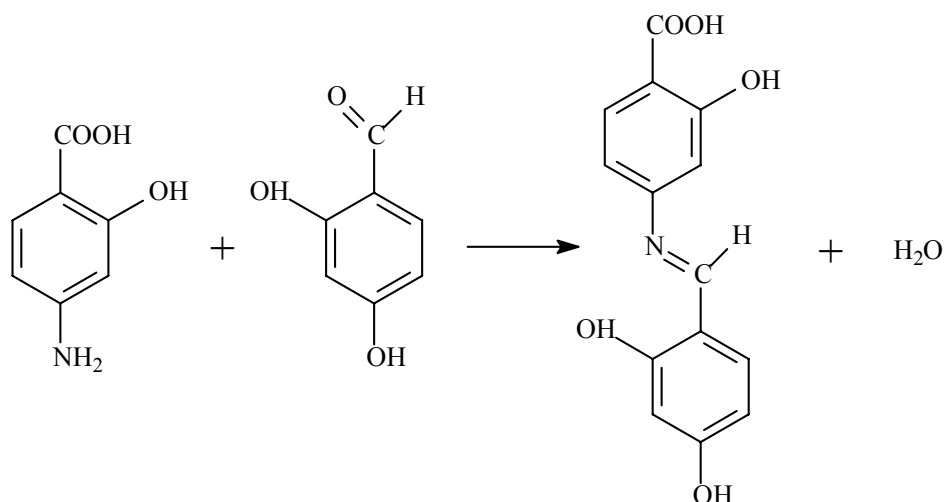


FIGURA 3.3 – Esquema de preparação do ligante Base de Schiff denominado BS6.

3.2.4 Ácido 5-(2',4'-dihidroxibenzilideno) amino-2-hidroxi benzoico (BS7)

Em um béquer com capacidade de 25 mL foram adicionados uma solução de aproximadamente 0,1531 g (1 mmol) de 5-ASA em 5 mL de metanol, e em seguida verteu-se sob a solução em agitação, 0,13812 g (1 mmol) de DHB em 5 mL de metanol, obtendo de forma instantânea o produto sólido de interesse, conforme o esquema da síntese apresentada na figura 3.4, o qual foi filtrado e seco para posterior caracterização.

Fórmula Molecular = $C_{14}H_{11}NO_5$

Massa molecular = $273,25 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

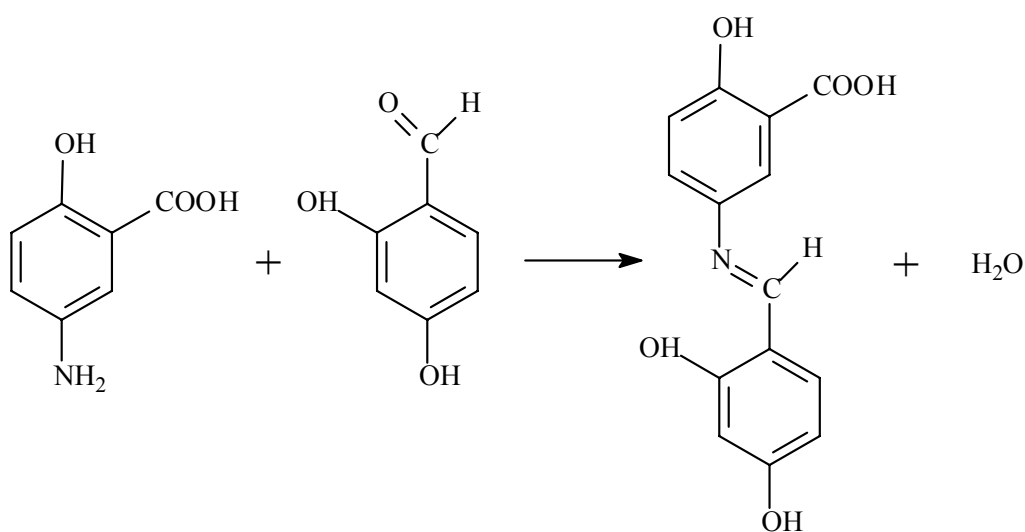


FIGURA 3.4 – Esquema de preparação do ligante Base de Schiff denominado BS7.

3.2.5 Ácido 4-((4'-dietilamino)-2'-hidroxibenzileno) amino)-2-hidroxi-benzoico (BS8)

Em um béquer com capacidade de 25 mL foram adicionados uma solução de aproximadamente 0,1531 g (1 mmol) de 4-ASA em 5 mL de metanol, e em seguida verteu-se sob a solução em agitação, 0,1934 g (1 mmol) de *p*-(dietilamino)salicilaldeído (DEAS) em 5 mL de metanol, obtendo de forma instantânea o produto sólido de interesse, conforme o esquema da síntese apresentada na figura 3.5, o qual foi filtrado e seco para posterior caracterização.

Fórmula Molecular = C₁₈H₂₀N₂O₄

Massa molecular = 328,37 g.mol⁻¹

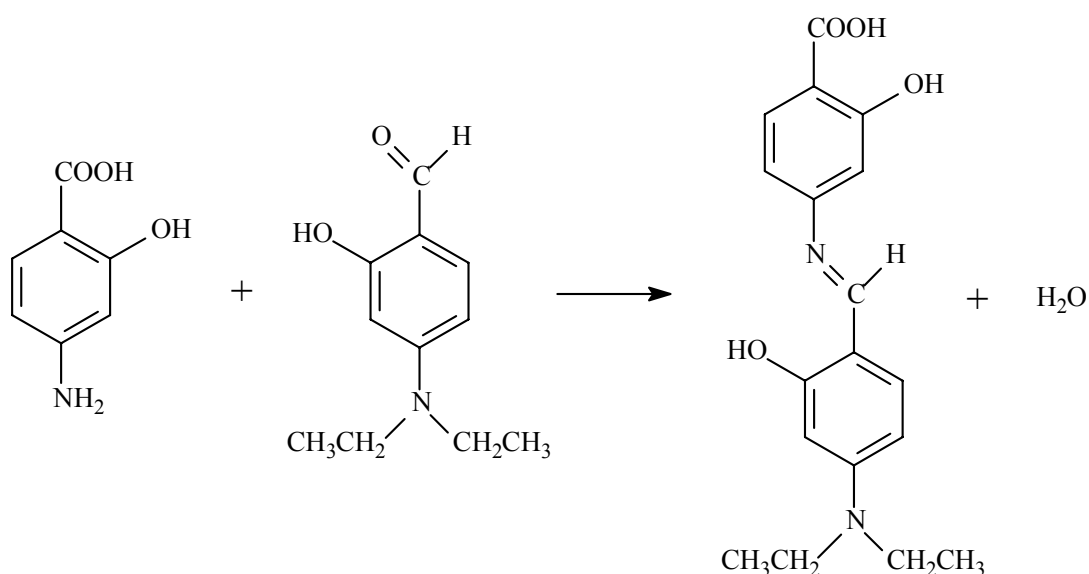


FIGURA 3.5 – Esquema de preparação do ligante Base de Schiff denominada BS8.

3.2.6 Ácido 5-((4'-dietilamino)-2'-hidroxibenzileno) amino)-2-hidroxi-benzoico (BS9)

Em um béquer com capacidade de 25 mL foram adicionados uma solução de aproximadamente 0,1531 g (1 mmol) de 5-ASA em 5 mL de metanol, e em seguida verteu-se sob a solução em agitação, 0,1934 g (1 mmol) de DEAS em 5 mL de metanol, obtendo de forma instantânea o produto sólido de interesse, conforme o esquema da síntese apresentada na figura 3.6, o qual foi filtrado e seco para posterior caracterização.

Fórmula Molecular = $C_{18}H_{20}N_2O_4$

Massa molecular = $328,37 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

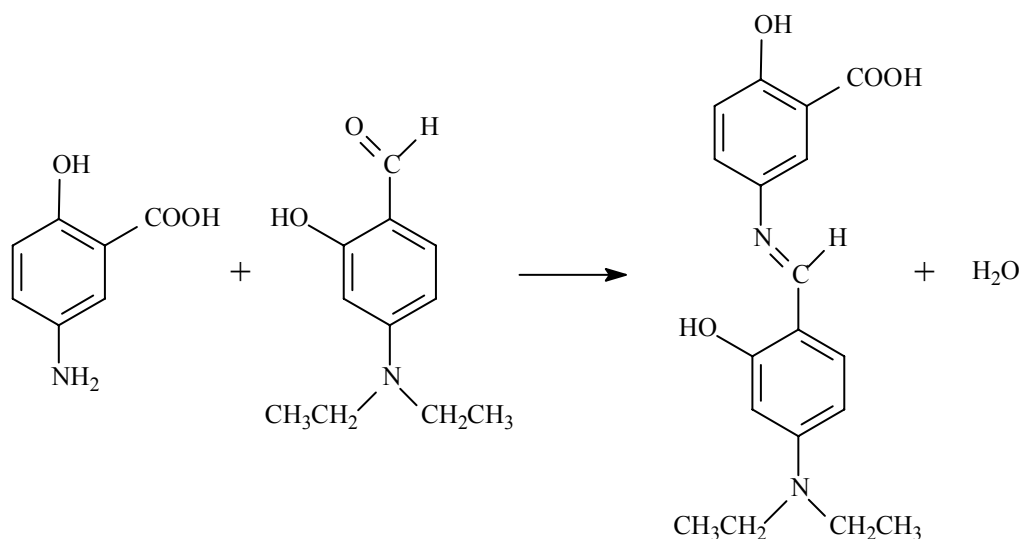


FIGURA 3.6 – Esquema de preparação do ligante Base de Schiff denominado BS9.

3.3 Instrumentação e Técnicas Experimentais de Caracterização

Os compostos sintetizados foram caracterizados no estado sólido e em solução pelas técnicas descritas abaixo:

3.3.1 Pontos de Fusão (P.F)

Os pontos de fusão (sem correção) foram determinados em um aparelho modelo PFMII disponível no Departamento de Química UFG/RC.

3.3.2 Testes de Solubilidade

A solubilidade dos produtos formados foi verificada mediante a realização de testes com diferentes solventes, os mesmos realizados adicionando-se uma pequena quantidade do produto sólido em aproximadamente 4 mL de solvente. (Tabela 3.2).

TABELA 3.2 – Solventes utilizados para os testes de solubilidade.

Solvente	Polaridade
<i>Acetona</i>	<i>Polar</i>
<i>Acetonitrila</i>	<i>Alta Polaridade</i>
<i>Água (H₂O)</i>	<i>Polar</i>
<i>Benzeno</i>	<i>Apolar</i>
<i>Clorofórmio</i>	<i>Apolar</i>
<i>Diclorometano</i>	<i>Polar</i>
<i>Dimetilformamida (DMF)</i>	<i>Alta Polaridade</i>
<i>Dimetilsulfóxido (DMSO)</i>	<i>Alta Polaridade</i>
<i>Etanol (EtOH)</i>	<i>Polar</i>
<i>Hexano</i>	<i>Apolar</i>
<i>Metanol (MeOH)</i>	<i>Polar</i>

3.3.3 Análise Elementar de Carbono, Hidrogênio e Nitrogênio (AE CHN)

A análise elementar (AE) de CHN (carbono, hidrogênio e nitrogênio) é utilizada para medir a fração de massa correspondente de tais átomos em moléculas por meio de um processo o qual baseia-se no clássico método de Pregl-Dumas, em que as amostras são sujeitas à combustão em uma atmosfera de oxigênio puro, e os gases resultantes dessa combustão são quantificados em um detector TCD (detector de condutividade térmica) (THOMPSON, 2008).

O princípio da técnica consiste na combustão completa a temperaturas de 900 a 1200° C de uma amostra de massa conhecida do material de interesse na presença de excesso de oxigênio produzindo CO₂, H₂O, NO_x e SO_x. Tais gases formados são rapidamente homogeneizados em uma câmara de mistura. Após a mistura, os gases são despressurizados e carregados por um gás inerte e de alta pureza através de uma coluna cromatográfica, onde os mesmos são separados e em seguida analisados através de um detector de condutividade térmica (MA e GUTTERSON, 1974; SKOOG *et al.*, 2002) (THOMPSON, 2008).

Na presença dos demais elementos, alguns até mesmo indesejados, os mesmos são convertidos em seus respectivos produtos de combustão e então eliminados por adsorventes, bem como todo oxigênio remanescente do processo, uma vez que o

sistema é munido ainda de uma câmara que contém cobre de alta pureza, que sob aquecimento de 600° C, tem por função a captura de produtos indesejados antes da separação e análise pelo detector (THOMPSON, 2008).

Essa técnica se mostra muito útil no que diz respeito não somente a caracterização qualitativa dos componentes da substância (por meio da comparação das proporções obtidas experimentalmente e as obtidas por cálculos teóricos), como também a determinação da pureza da amostra.

Desta forma, as determinações dos teores de carbono, hidrogênio e nitrogênio das amostras foram realizadas em um Analisador Elementar CHNS/O da Thermo Scientific, modelo FLASH 2000 acoplado a uma ultra-microbalança da Mettler - Toledo (precisão: 1,000 mg +ou- 0,001) disponível no Departamento de Química da Universidade Federal de Uberlândia – UFU Campus de Ituiutaba-MG.

3.3.4 Espectroscopia de Absorção Vibracional na Região do Infravermelho (IV)

Um dos mais proeminentes entre os métodos espectroscópicos de vibração é a espectroscopia de absorção na região infravermelho (IV), tratando-se de uma técnica, apesar de robusta, padrão para a caracterização de compostos, principalmente no seu estado sólido. Este método oferece informações sobre a estrutura e conformação molecular através das vibrações das ligações entre os átomos (SKOOG *et al.*, 2002; PAVIA *et al.*, 2010; SILVERSTEIN *et al.*, 2012).

De modo geral, a técnica de absorção na região do infravermelho tem como fundamento as frequências vibracionais específicas das ligações dos compostos, as quais correspondem a níveis de energia da molécula, aos modos vibracionais. Tais frequências são dependentes da forma da superfície de energia potencial da molécula, da geometria molecular, das massas dos átomos e eventualmente do acoplamento de vibração. Deste modo, grupos funcionais distintos apresentaram absorções com intensidade e em regiões distintas do espectro, fazendo da espectroscopia de infravermelho uma metodologia bastante útil na identificação de compostos e na identificação de polimorfos, uma vez que os mesmos terão espectros característicos. É por vezes considerada uma técnica de caracterização complementar, no entanto é de grande relevância na elucidação estrutural quando diz respeito as regiões digitais dos espectros (SKOOG *et al.*, 2002; PAVIA *et al.*, 2010; SILVERSTEIN *et al.*, 2012).

A condição para que ocorra absorção da radiação infravermelha é que haja variação do momento de dipolo elétrico da molécula como consequência de seu movimento vibracional, bem como o espectro de infravermelho tem origem quando a radiação eletromagnética incidente tem uma componente com a frequência correspondente a uma transição entre dois níveis vibracionais (SKOOG *et al.*, 2002; PAVIA *et al.*, 2010; SILVERSTEIN *et al.*, 2012).

Durante o movimento vibracional de uma molécula ocorre a mudança periódica do momento de dipolo elétrico (μ) da mesma, numa mesma direção do eixo das coordenadas fixas no espaço. Quando a frequência dessa oscilação entra em ressonância com a frequência da radiação incidente ocorre a absorção na região do infravermelho. A absorção de radiação infravermelha envolve transições entre estados vibracionais e a probabilidade com que estas transições ocorrem depende do estado vibracional inicial, final e do momento de dipolo elétrico da molécula (μ). De outra forma, pode-se dizer que o espectro de absorção no infravermelho tem origem quando a radiação eletromagnética incidente tem uma componente com a frequência correspondente a uma transição entre dois níveis vibracionais (SKOOG *et al.*, 2002; STUART, 2004; PAVIA *et al.*, 2010; SILVERSTEIN *et al.*, 2012; GAUGLITZ e MOORE, 2014).

Considerando a vibração como um oscilador harmônico simples, as frequências nas quais as moléculas vibram são denominadas frequências normais de vibração e correspondem às frequências que as moléculas absorvem, e que se associam, preferencialmente, aos movimentos dos átomos nas moléculas, podendo ser de alta ou baixa frequência, absorção ativa (associadas a mudança de momento de dipolo) ou inativa (frequências normais de vibração que provocam mudança somente na distribuição de carga) (STUART, 2004; GAUGLITZ e MOORE, 2014).

Como já apresentado, para que uma determinada molécula apresente absorção no IV, suas vibrações moleculares devem resultar numa alteração do momento dipolar. As vibrações moleculares podem ser classificadas em deformações axiais ou estiramentos e deformações angulares. Os estiramentos são as alterações da distância internuclear dos átomos envolvidos, ou seja, aumento e diminuição dessa distância, alternadamente. Já as deformações angulares podem consistir de uma mudança no ângulo de ligação com um grupo de átomos ou o movimento de um grupo de átomos em relação ao restante da molécula. O número de modos vibracionais de uma molécula é

determinado de acordo com seus graus de liberdade de vibração, por exemplo, uma molécula não linear (de n átomos) tem $3n-6$ graus de liberdade vibracionais, já moléculas lineares apresentam $3n-5$ graus de liberdade vibracionais (CANTOR e SCHIMMEL, 1980).

Quando há interesse sobre um grupo funcional específico que pertence a uma molécula, a regra dos $3n-6$ graus de liberdade não é aplicável, pois se trata de uma pequena porção da molécula. Dessa forma devem aparecer vários modos vibracionais. As transições vibracionais normalmente observadas num espectro de IV são conhecidas como transições fundamentais que geram as bandas fundamentais; elas ocorrem entre o nível fundamental vibracional da molécula e o seu primeiro estado excitado, respeitando a regra de seleção para osciladores harmônicos. Além da banda fundamental existem ainda as bandas de sobreposição. A energia necessária para que haja a transição fundamental é quantizada e é dada pela equação 1:

$$\Delta E = hf \quad \text{Equação 1}$$

Onde ΔE é a diferença de energia entre os níveis excitado e fundamental, h a constante de Planck e f a frequência vibracional.

A partir de algumas informações das moléculas é possível ainda calcular o número de onda de absorção das deformações axiais aplicando-se a lei de Hooke, fazendo analogia a um sistema onde dois átomos e suas ligações são representados por duas massas presas a uma mola. O sistema é tratado como um oscilador harmônico simples, a partir do qual se tem a representação por meio da equação 2 que dá o valor de n para uma molécula diatômica; onde: c é a velocidade da luz; k é a constante de força de ligação interatômica; m é a massa reduzida de uma molécula diatômica, onde cada um de seus átomos tem massas m_1 e m_2 , respectivamente, de modo que $m = m_1 m_2 / m_1 + m_2$ (CANTOR e SCHIMMEL, 1980; SILVERSTEIN *et al.*, 2012).

$$\nu = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad \text{Equação 2}$$

O equipamento usado nas medidas das vibrações moleculares é o espectrofotômetro de infravermelho. Os primeiros espectrofotômetros eram conhecidos como espectrofotômetros dispersivos, e faziam uso de um prisma para fazer a separação

dos comprimentos de onda da radiação eletromagnética que seria incidida na amostra. Posteriormente os prismas foram substituídos por grades de difração, porém o processo de medição era essencialmente o mesmo. Os espectrofotômetros dispersivos começaram a ser substituídos pelos espectrofotômetros de transformada de Fourier no início da década de 1980. Os equipamentos atuais têm seu funcionamento baseado na interferometria para produzir o espectro, e esta técnica é chamada de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (do inglês Fourier transform infrared ~ FT-IR) (STUART, 2004; PAVIA *et al.*, 2010; SILVERSTEIN *et al.*, 2012; GAUGLITZ e MOORE, 2014).

O princípio da transformada de Fourier é fundamentado, especialmente, pelo componente óptico denominado interferômetro de Michelson. Neste, um feixe de luz, radiação infravermelha, é dividida em dois feixes perpendiculares, por intermédio de um divisor de feixes (beamsplitter), que quando posicionado em um ângulo de 45° reflete parte da feixe para uma fonte móvel e outro para uma fonte fixa. Os dois feixes, provenientes da mesma fonte, são refletidos pelas fontes fazendo com que regressem novamente ao beamsplitter. Quando os dois feixes se reencontram eles se recombinam por meio de interferências construtivas e destrutivas. Este feixe recombinado atravessa a amostra interagindo com a mesma, tal radiação que atravessa é então coletada por um detector, o qual registra o sinal conduzindo-o a um computador que será responsável por realizar a transformada de Fourier e converter o interferograma registrado em um espectro de infravermelho (STUART, 2004; PAVIA *et al.*, 2010; SILVERSTEIN *et al.*, 2012; GAUGLITZ e MOORE, 2014).

Em suma, os analisadores de infravermelho absorvem radiação, em diferentes comprimentos de ondas, dos grupos químicos específicos presentes nas moléculas. A resposta, o espectro de infravermelho, é obtido pela passagem da radiação infravermelha através de uma amostra determinando a fração da radiação incidente que é absorvida com uma determinada energia. Em resposta a interação das vibrações com o momento de dipolo elétrico da molécula é registrado a porcentagem de radiação eletromagnética que atravessou a amostra (transmitância (T %)) em função do comprimento de onda. No entanto, na espectroscopia de absorção na região do infravermelho não é usual se expressar em comprimento de ondas e sim o inverso do comprimento de onda, para se ter uma relação direta com a frequência. Desta forma, o inverso do comprimento de onda é denominado número de onda e sua unidade é o cm^{-1} ,

logo os espectros são expressos em valores de transmitância (%) vs. número de onda (cm^{-1}).

Os espectros de IV foram obtidos utilizando o espectrofotômetro FT-IR de modelo IR PRESTIGIE 21 (na região entre $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$) da empresa Shimadzu instalado no laboratório de Instrumentação II nas dependências do Departamento de Química UFG/RC, onde foi preparada a amostra na forma de pastilhas contendo os ligantes, os compostos coordenados com o metal e brometo de potássio (KBr) 1% m/m para a realização da análise.

3.3.5 Espectroscopia Eletrônica na Região do Ultravioleta-Visível (UV-Vis)

A Espectroscopia Eletrônica UV/Visível resulta das transições eletrônicas que ocorrem devido à absorção de radiação pelos elétrons nas ligações ou grupos funcionais específicos na molécula, os chamados grupos cromóforos. O comprimento de onda de absorção é uma medida de energia necessária para a referida transição, enquanto a intensidade, em termos do coeficiente de absorção molar, é função da probabilidade da ocorrência da transição, ou seja, obtêm-se bandas de absorção correspondentes às transições eletrônicas do estado fundamental a um estado excitado (OWEN, 1996; LAKOWICZ, 2007).

A espectroscopia eletrônica na região do UV-Vis envolve a absorção de luz UV/Visível através de uma molécula, promovendo a passagem de um elétron de um orbital molecular de menor energia (HOMO) para uma orbital de maior energia (LUMO). Sendo assim, esta técnica baseia-se na energia de excitação que é necessária para a transição de elétrons entre orbitais moleculares que permite obter informação estruturais do sistema (LAKOWICZ, 2007).

A espectroscopia UV/Visível é uma técnica quantitativa, uma vez que a radiação absorvida por uma espécie (absorbância) depende diretamente da sua concentração na amostra, relação descrita pela lei de Beer – Lambert (Equação 1), onde tem-se a absorbância representado por A , o coeficiente de absorção molar da espécie ($\text{L mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) por ϵ , l é o caminho óptico (cm) do feixe (cubeta utilizada para medida) e C é a concentração molar da espécie analisada.

$$A = \epsilon \cdot l \cdot c$$

Equação 3

Para ligantes, moléculas de constituição predominantemente orgânicas, as principais bandas de absorção esperadas correspondem a transições de elétrons provenientes de grupos funcionais, compostos carbonílicos e carboxílicos bem como compostos com duplas ou triplas conjugadas, compostos aromáticos, em orbitais não ligantes, n , ou ligantes, π , para orbitais anti-ligantes ($n \rightarrow \pi^*$) e ($\pi \rightarrow \pi^*$).

No que diz respeito aos complexos metálicos, a absorção da radiação Ultravioleta ou Visível pode ser resultante de uma ou mais das seguintes transições:

- Transições de orbitais $d \rightarrow d$ do íon metálico, que no caso dos metais de transição são transições $d \rightarrow d$;
- Transições entre orbitais do ligante (conforme já citado);
- Transições de transferência de carga ligante-metal, metal-ligante, ligante-ligante, ou metal-metal;

Todas as transições passíveis de ocorrer dependem diretamente da constituição da matéria, do ligante, e para compostos de coordenação dependem ainda do íon metálico, dos átomos envolvidos na coordenação e da geometria do complexo. De uma forma geral, é necessário ter conhecimento prévio do sistema a ser caracterizado uma vez que prováveis interações sempre estão sujeitas de ocorrer ao longo da experimentação interferindo no sinal esperado. Um exemplo comum a ser mencionado é o efeito do solvente, o qual influencia na variação da posição, intensidade e formato das bandas de absorção, refletido pela interação soluto-solvente que modifica a diferença de energia entre os estados, o que pode vir a causar resultados diferentes dos esperados ou mesmo conflitantes (OWEN, 1996; LAKOWICZ, 2007; PAVIA *et al.*, 2010).

Os espectros de excitação na região do UV-Vis foram obtidos em solução de metanol usando-se um espectrofotômetro VARIN CARY 50 com resolução de 1,5 nm, instalado nas dependências do Departamento de Química UFG/RC.

3.3.6 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é reconhecidamente uma das mais importantes técnicas para a investigação molecular, constitui um método analítico, em particular, adequado para a elucidação de estruturas

químicas de moléculas orgânicas e inorgânicas pela interpretação de seus espectros uni e bidimensionais, originados pelos mais diferentes núcleos como, por exemplo, ^1H , ^{13}C , ^{19}F , ^{15}N , ^{31}P , ^{11}B , ^{119}Sn ; sendo ^1H e ^{13}C os mais utilizados na química de um modo geral.

A espectroscopia de RMN baseia-se no estudo das propriedades de spin nuclear dos átomos e explora os efeitos de um campo magnético nos núcleos, baseando-se na absorção de energia na gama das radiofrequências por parte de núcleos numa molécula na presença de um campo forte (GIL e DE GUSMÃO CAMPOS GERALDES, 2002).

Alguns núcleos possuem momento angular de spin (ou spin nuclear) (J), que resulta da combinação dos spins dos prótons e dos nêutrons desse núcleo. Quando os números de prótons e de nêutrons são ambos pares, essa combinação resulta num spin nuclear nulo e os núcleos são inativos em RMN. Para todas as outras combinações, o spin nuclear é diferente de zero e o núcleo assume determinados estados de spin bem definidos que estão relacionados com as orientações permitidas para o spin nuclear. Na presença de um campo magnético muito intenso, a degenerescência destes estados energéticos é avaliada, podendo ocorrer transições entre os diferentes estados de spin nuclear. Essas transições são de baixa energia quando comparadas com outras técnicas espectroscópicas e a radiação eletromagnética envolvida encontra-se na gama de comprimentos de onda das radiofrequências. Num espectrômetro de RMN, a ocorrência de transições pode ser detectada através da radiação emitida quando os núcleos excitados regressam ao estado fundamental (PAVIA *et al.*, 2010; SILVERSTEIN *et al.*, 2012).

O núcleo de um elemento pode dar origem a vários sinais numa região vizinha, por isso o sinal de ressonância de um núcleo não depende só das características do próprio núcleo, como também de sinais que compõem toda a vizinhança química, a qual é composta pela presença dos átomos constituintes da molécula.

O fenômeno de ressonância magnética ocorre quando pulsos de radiofrequência são aplicados sobre uma amostra submersa em um campo magnético intenso. Alguns núcleos atômicos irão absorver energia, uma vez que parte desses núcleos possui momentos magnéticos notadamente capazes de entrar em ressonância com a fonte magnética (alinhando-se a favor do campo) e havendo mudança de energia,

enquanto outros não, os quais sofrem movimento de precessão, dependendo das propriedades magnéticas de cada um (PAVIA *et al.*, 2010; SILVERSTEIN *et al.*, 2012).

Os sinais de RMN detectados são dependentes do ambiente eletrônico do núcleo e do movimento das moléculas. Por isso a espectroscopia de RMN é uma técnica extremamente informativa sobre a estrutura da matéria, uma vez que caracteriza os deslocamentos químicos, intensidade, multiplicidade e algumas propriedades de relaxação fornecendo, portanto, informação sobre o ambiente em que se encontra o núcleo e em consequência disso tem-se a elucidação da molécula de interesse (SILVERSTEIN *et al.*, 2012).

As análises de RMN ^1H e ^{13}C foram feitas em amostras dos ligantes, bases de Schiff, dissolvidas em dimetilsulfóxido deuterado (DMSO- d_6). Os espectros foram registrados em um espectrômetro BRUKER AVANCE III – 11,7 Teslas (500 MHz para frequência de ^1H e 125 MHz para ^{13}C) pertencentes ao Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Departamento de Química da Universidade Federal de Goiás – UFG.

3.4 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI)

Os ensaios microbiológicos seguiram o protocolo de Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de acordo com CLSI (do inglês, Clinical and Laboratory Standards Institute – Instituto de padrões clínicos e laboratoriais) M07-A9 9th edition, 2012 (CLSI, 2002).

As cepas microbianas utilizadas foram: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

Antes dos microrganismos serem utilizadas nos ensaios de citotoxicidade, uma série de procedimentos e materiais foram utilizados como descritos a seguir.

Em um primeiro momento todos os materiais utilizados, incluindo o caldo Müller–Hinton (MH), foram anteriormente esterilizados em autoclave por 15 minutos a 121 °C e pressão de 15 psi.

Os microrganismos da espécie, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, foram cultivados em 2 mL de caldo MH estéril no

período de 4-6 horas antes do experimento, de modo a obter microrganismos em escala log. Após a turvação do meio de cultura inoculado, padronizou-se na escala de 0,5 de McFarland em caldo MH, resultando em 1×10^8 UFC/mL. Para o teste de microdiluição em placas de ELISA diluiu-se o padronizado na fração de 1:40.

Preparou-se uma solução estoque (uma em caldo MH com 25% de DMF (N,N'-dimetilformamida) e outra em caldo MH e 1% de DMSO) de concentração 10240 µg/ml (10,24 mg/ml) para cada composto de interesse a ser testado.

Com a pipeta multicanal, dentro da cabine de biossegurança e de modo asséptico, distribuiu-se 100 µL de MH estéril em todos os poços da placa (Figura 3.7) que foram utilizados no ensaio. No caso específico, para as três espécies microbianas, preencheram-se os poços A-F 1-12. Cada par de letras recebeu uma espécie microbiana em duplicata [*E. coli* (A-B); *P. aeruginosa* (C-D); e *S. aureus* (E-F)], e as diluições testadas (512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2 e 1 µg/mL, de acordo com CLSI) foram distribuídas ao longo dos poços numerados de 1-10.

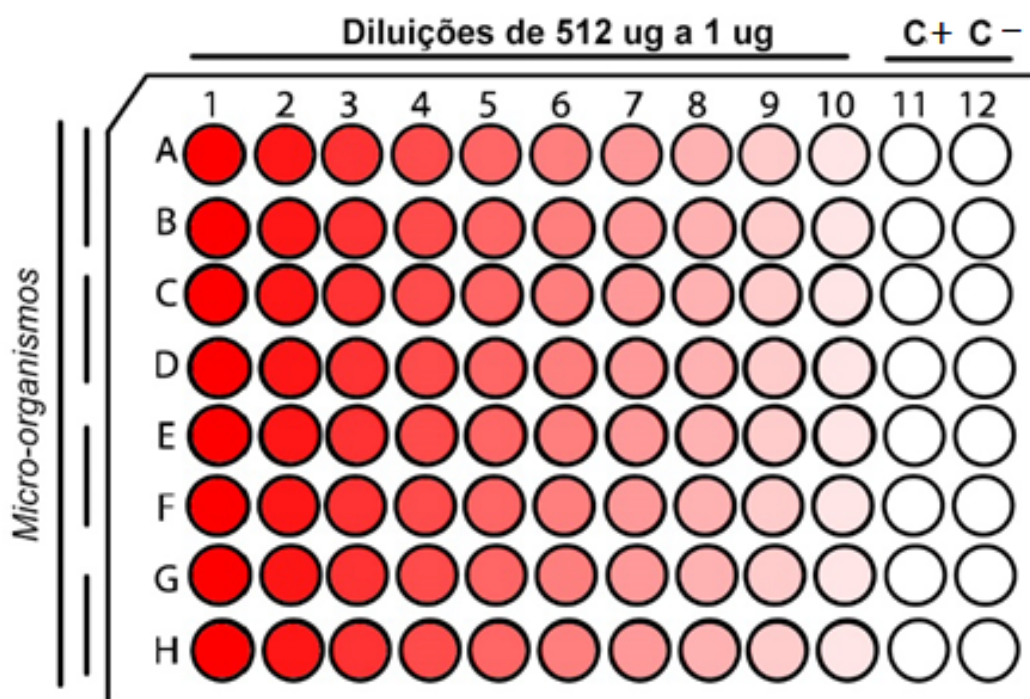


FIGURA 3.7 – Representação e disposição da placa de Elisa utilizada nos ensaios.

Como apresentado na figura, a coluna 11 foi designada para ser o controle positivo (+): amoxicilina tri-hidratada 32 µg/mL; e a coluna 12 o controle negativo (-): caldo MH + 24 µL inóculo respectivo.

As diluições foram realizadas de forma seriada. Com a pipeta multicanal, em ambiente estéril da cabine de biossegurança e de modo asséptico, pipetou-se 100 µL da solução padronizada a ser testada na coluna 1. Homogeneizou a solução pipetando-se duas vezes a mesma solução nos poços. Da mesma forma aspirou-se 100 µL dos poços da coluna 1 e pipetou-se na coluna 2, homogeneizando de forma semelhante ao citado anteriormente. Repetiu-se o processo até completar a placa, descartando os 100 µL excedentes.

Com os poços devidamente preenchidos com caldo MH e os compostos a serem testados nas suas respectivas concentrações, os microrganismos foram adicionados (24 µL) aos mesmos e ao controle positivo a fim de obter uma concentração aproximada de 5×10^4 UFC/mL a 5×10^5 UFC/mL por poço.

Seguido o protocolo conforme explanado, a placa foi fechada, devidamente protegida com plástico filme e homogeneizada. Incubou-se a mesma por 18-24h sob estufa a temperatura de 37 °C.

Após o tempo de crescimento, as placas foram novamente levadas a estufa e adicionou-se 20 µL do corante TCT (do inglês, 2,3,5-triphenyl-2H-tetrazolium chloride ~ 2,3,5 cloreto de trifeniltetrazólio) (0,25 %) para revelação dos ensaios conforme mudança de coloração dos poços.

A revelação mediada pela utilização do corante baseia-se na atividade das enzimas desidrogenases as quais catalizam as reações respiratórias nas mitocôndrias, durante a glicólise e o ciclo de Krebs. Estas enzimas, particularmente a desidrogenase do ácido málico, reduzem o sal de tetrazólio em tecidos vivos, conforme apresentado na Figura 3.8 (NETO *et al.*, 1998).

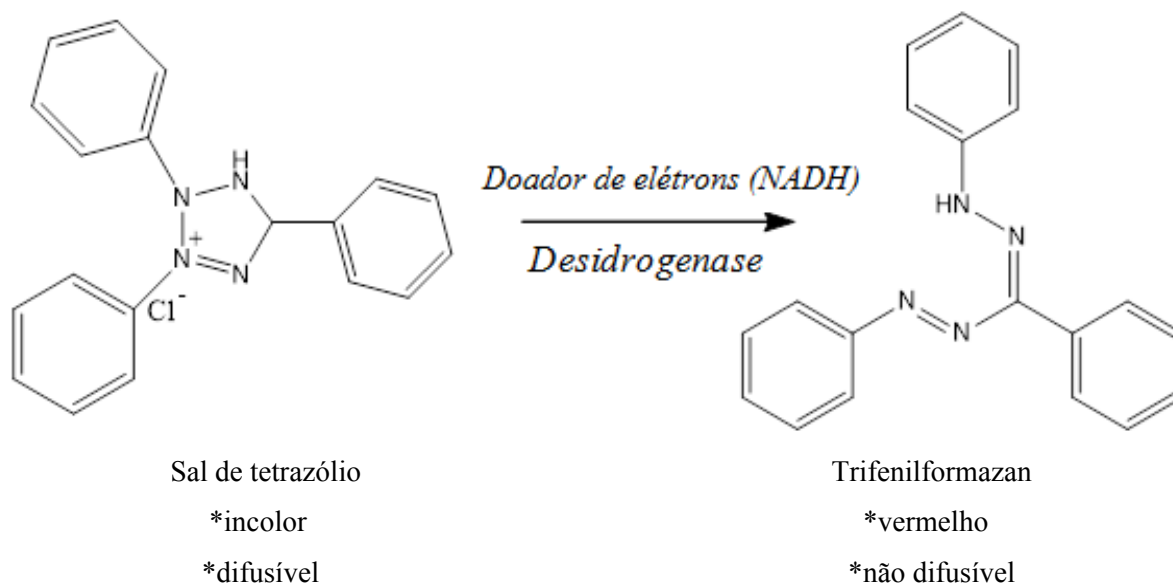


FIGURA 3.8 – Equação representativa da reação do corante TTC na mitocôndria.

Quando o TTC é reduzido, formando o trifenilformazan, isto indica que há atividade respiratória nas mitocôndrias, significando que há viabilidade celular e do tecido. Portanto, a coloração resultante da reação é uma indicação positiva da viabilidade através da detecção da respiração a nível celular. Tecidos não viáveis não reagem e conseqüentemente não são coloridos. Sendo o tecido vigoroso, haverá a formação de uma coloração avermelhada; se o tecido está em deterioração, um vermelho mais intenso será formado, em virtude da maior intensidade de difusão da solução de TTC pelas membranas celulares comprometidas de tais tecidos; se o mesmo é não viável, a redução do sal não ocorrerá, e o tecido morto contrastará como branco (não colorido) com o tecido colorido viável. A observação de tais diferenças de cor, juntamente com o conhecimento de diversas características dos controles, permite a determinação da presença, da localização e da natureza dos distúrbios que podem ocorrer nas estirpes (NETO *et al.*, 1998).

CAPÍTULO 4

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nesta seção são apresentados os resultados e discussões dos ligantes, bases de Schiff, que foram caracterizados em solução e no estado sólido por técnicas de ponto de fusão, solubilidade, análise elementar CHN, espectroscopia de vibração na região do infravermelho, espectroscopia na região do ultravioleta visível e de ressonância magnética nuclear de hidrogênio ^1H .

Os novos ligantes, representados pelas bases de Schiff, foram obtidos a partir da síntese dos princípios ativos com os precursores aldeídos em uma reação de condensação direta, como proposto na seção 3.2.

A escolha dos precursores para a formação das bases de Schiff foi pensada partindo da motivação de relatos da atividade biológica dos princípios ativos (4 e 5-ASA), o que abre a perspectiva para otimizar esse potencial agregando funcionalidade no composto quando formador de bases de Schiff. Em relação aos aldeídos, os mesmos foram escolhidos com base em testes experimentais e revisão da literatura, os quais permitiram a escolha por meio da viabilidade sintética, bem como o interesse estrutural, uma vez que um dos objetivos do seguinte trabalho é a síntese de bases de Lewis, ligantes, funcionais e com um amplo espectro de atividade e coordenação, por meio dos novos sítios de ligação obtidos.

Os resultados para as caracterizações dos produtos sintetizados sugeriram a formação dos ligantes, bases de Schiff, mediante o que foi apresentado nos objetivos.

A primeira evidência da formação dos produtos é tida pela transformação da matéria, realçada não só pelo aspecto do sólido obtido, mas também a partir das diferenças do ponto (ou faixas) de fusão (P.F) dos mesmos quando comparados aos seus precursores (Tabela 4.1).

TABELA 4.1 – Solventes utilizados para os testes de solubilidade.

Ligante (Base de Schiff)	Aspecto	Ponto de Fusão (P.F °C)
4-ASA	Sólido branco	138-142
5-ASA	Sólido marfim	260-262
p-(dietilamino)salicialdeído	Sólido marrom	57-59
p-(dimetilamino)benzaldeído	Sólido branco	66-69
2,3 dihidroxibenzaldeído	Sólido branco	148-152
BS4	Sólido vermelho intenso	208-210
BS5	Sólido vermelho claro	291-293
BS6	Sólido amarelo intenso	175-178
BS7	Sólido esverdeado	Decompôs
BS8	Sólido amarelo	205-210
BS9	Sólido alaranjado	281-283

A obtenção dos produtos apresenta uma viabilidade sintética desejável quando comparada a outras metodologias. O fato da condensação dos precursores acontecer de forma direta contribui para que se tenha um rendimento satisfatório, chegando a ser quantitativo, ainda que para alguns produtos. Desta forma, para os ligantes temos os rendimentos apresentados na tabela 4.2.

TABELA 4.2 – Rendimento químico obtido mediante a síntese dos ligantes bases de Schiff.

Ligante (Base de Schiff)	Rendimento (%)
BS4	92,8
BS5	75,6
BS6	83,8
BS7	78,4
BS8	94,6
BS9	95,7

4.1 Solubilidade

Os testes de solubilidade dos ligantes foram realizadas no intuito de avaliar as afinidades com diferentes solventes bem como facilitar as posteriores aplicações dos mesmos, uma vez que dependendo do meio biológico há restrição dos mesmos.

Os resultados apresentados para essa variável a temperatura ambiente (25°C) inferem que os ligantes exibem um bom caráter de solubilidade em solventes orgânicos predominantemente polares, o que já era esperado conforme as características estruturais dos produtos, bem como é encontrado também estudos semelhantes para essa classe de compostos (ATAHAN e DURMUS, 2015).

Os testes levaram em consideração os seguintes graus de solubilidade:

- Solúvel (++)
- Pouco solúvel (+)
- Insolúvel (-)

E os mesmos são apresentados na Tabela 4.3 abaixo.

TABELA 4.3 – Testes de solubilidade para os ligantes base de Schiff sintetizados.

Ligante	BS4	BS5	BS6	BS7	BS8	BS9
H ₂ O	-	-	+	+	-	-
EtOH	++	-	++	+	++	++
MeOH	++	++	++	+	++	++
Diclorometano	-	-	-	-	+	-
Clorofórmio	-	-	-	-	+	-
Hexano	-	-	-	-	-	-
Benzeno	-	-	-	-	-	-
DMF	++	++	++	++	++	++
DMSO	+	+	++	++	+	++
Acetona	+	-	++	-	+	-
Acetonitrila	+	-	+	-	+	-

4.2 Análise Elementar CHN

Os resultados de análise elementar para os ligantes obtidos indicaram que as proporções equivalentes as massas de carbono, hidrogênio e nitrogênio presentes nos mesmos foram bem próximas aos valores das proporções encontradas teoricamente, o que se mostra de acordo com as fórmulas propostas, bem como o grau de pureza destes, uma vez que, como apresentado na tabela 4.4, a relação foi próxima o suficiente para alegar tais condições.

TABELA 4.4 – Resultados da análise elementar CNH para os ligantes sintetizados.

Ligante (Base de Schiff)	Fórmula Molecular	%C exp. (calc.)	%H exp. (calc.)	%N exp. (calc.)
BS4	$C_{16}H_{16}N_2O_3$	67,119 (67,592)	5,532 (5,672)	9,927 (9,853)
BS5	$C_{16}H_{16}N_2O_3$	67,193 (67,592)	5,511 (5,672)	9,939 (9,853)
BS6	$C_{14}H_{11}NO_5$	60,949 (61,539)	4,152 (4,057)	4,999 (5,126)
BS7	$C_{14}H_{11}NO_5$	60,796 (61,539)	4,512 (4,057)	5,009 (5,126)
BS8	$C_{18}H_{20}N_2O_4$	65,368 (65,839)	6,092 (6,139)	7,401 (8,531)
BS9	$C_{18}H_{20}N_2O_4$	63,018 (65,839)	6,195 (6,139)	8,368 (8,531)

4.3 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (IV)

Nesse trabalho foi utilizado a espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV) para identificar os modos vibracionais dos precursores e dos ligantes sintetizados, objetivando otimizar a elucidação estrutural dos produtos, uma vez que a presença de algumas bandas características nos precursores ao mesmo tempo em que ausentes nas bases de Schiff, são as evidências chave para a elucidação da estrutura dos ligantes sintetizados.

Os resultados de espectroscopia de absorção na região do infravermelho obtidos para os ligantes BS4, BS5, BS6, BS7, BS8 e BS9 foram, em um primeiro momento, comparados com os espectros obtidos para seus precursores, no intuito de identificar visualmente as principais diferenças. De um modo geral os espectros de infravermelho possuem semelhanças entre si, uma vez que, o que difere uns dos outros são basicamente os deslocamentos, a presença e/ou ausência de bandas de vibração dos grupos substituintes.

Os espectros de infravermelho possuem uma semelhança na formação com seus fármacos de partida, no entanto nota-se de forma aparente no resultado obtido para o produto BS4 a influência da formação do novo ligante por meio da presença de uma banda acentuada característica de estiramento (ν) C=N, proveniente da condensação da amina primária do 4-ASA com o aldeído correspondente, em números de onda igual a 1592 cm^{-1} (Figura 4.1), bem como de forma direta é perceptível ausência das duas bandas (dubleto) de deformação axial simétrica e assimétrica, estiramento, da ligação N-H em números de onda $3481\text{--}3360\text{ cm}^{-1}$ (Figura 4.2), provenientes da amina primária presente no 4-ASA (SILVERSTEIN *et al.*, 2012).

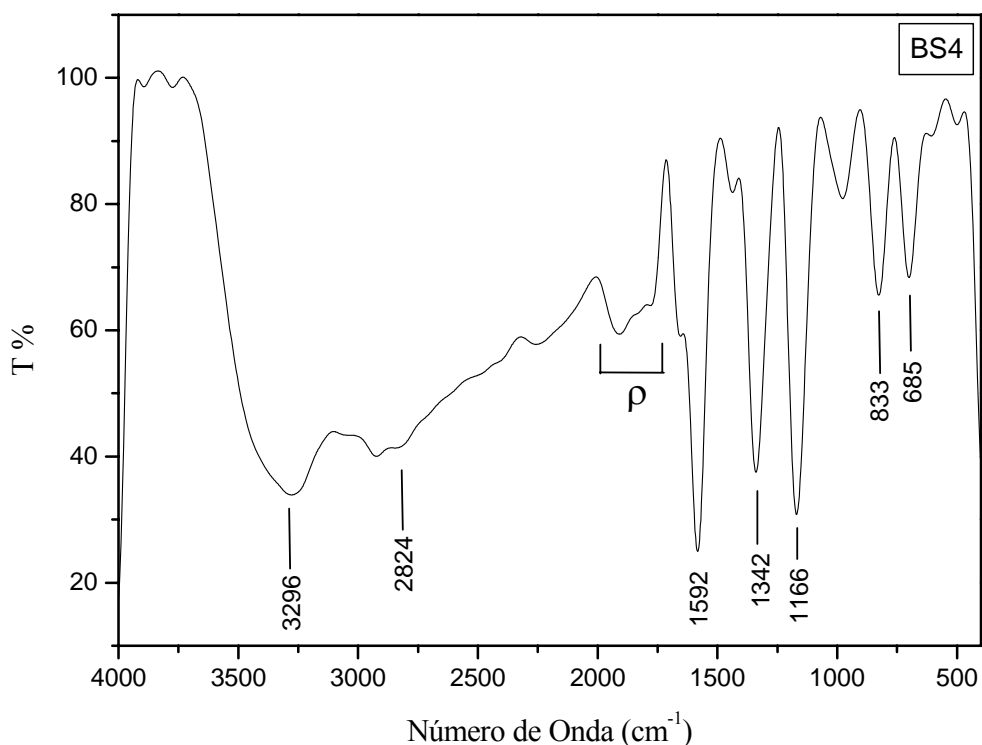


FIGURA 4.1 – Espectros de absorção na região do infravermelho (IV) do ligante BS4 em pastilha de KBr (1% m/m).

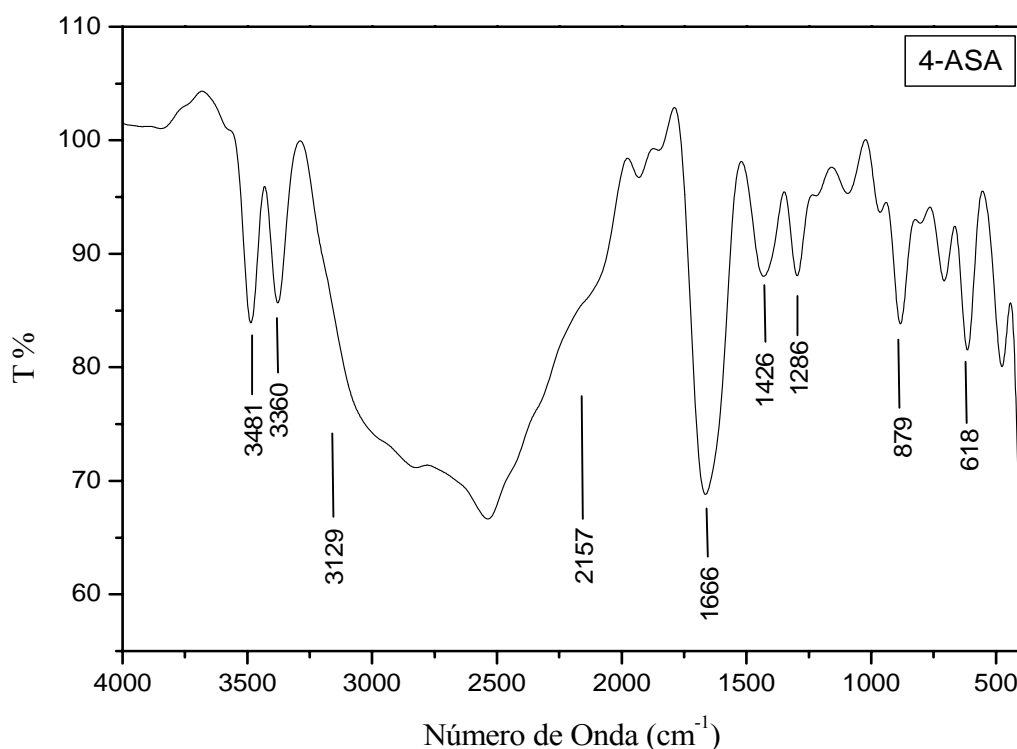


FIGURA 4.2 – Espectros de absorção na região do infravermelho (IV) do precursor 4-ASA em pastilha de KBr (1% m/m).

Mesmo com algumas semelhanças com os fármacos precursores, adicionalmente as evidências já apresentadas, outra diferença do espectro do produto obtido é dada em relação ao espectro do aldeído, onde a discrepância deste para com o produto é evidente, conforme observado na figura 4.3.

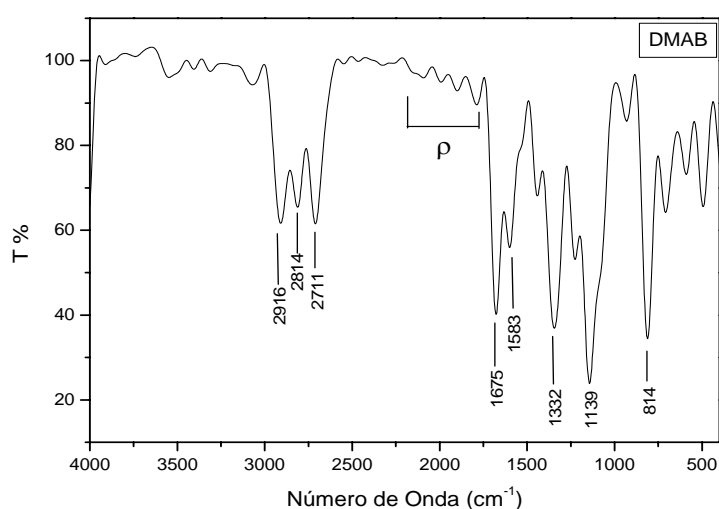


FIGURA 4.3 – Espectro de absorção na região do infravermelho (IV) do precursor aldeído DMAB em pastilha de KBr (1% m/m).

Além das bandas classificadas como evidências chave, o espectro do ligante sintetizado BS4 (Figura 4.1) apresenta ainda sinais típicos de vibração de grupos funcionais característicos das moléculas, os mesmos que são apresentados na tabela 4.5.

TABELA 4.5 – Principais frequências (cm^{-1}) atribuídas ao espectro de absorção na região do infravermelho do ligante BS4 (PAVIA *et al.*, 2010; SILVERSTEIN *et al.*, 2012).

Atribuições (cm^{-1})	ν O–H	ν C=N	δ C–O–H	ν C–O	δ O–H	ν C–H _(FP)
BS4	3296-2824	1592	1342	1166	833	685

A contribuição da estrutura de ressonância iônica explica a larga e intensa vibração de deformação axial da hidroxila livre em $3296\text{-}2824\text{ cm}^{-1}$. Bandas de deformação axial de C–H mais fracas se sobrepõem geralmente à larga banda de O–H. Outra peculiaridade na região do espectro característica de grupos carboxílicos é a presença de bandas de deformação axial de C=O, que nesse caso específico fica sobreposta à banda de estiramento C=N na região de número de onda de 1592 cm^{-1} . A presença de bandas em 1166 cm^{-1} e 1342 cm^{-1} são resultados da interação entre a deformação axial de C–O e a deformação angular (δ) no plano de C–O–H, respectivamente. Já a deformação angular fora do plano do grupo O–H é evidente na região próxima a 833 cm^{-1} . Entre $1926\text{-}1759\text{ cm}^{-1}$ tem-se bandas fracas de combinação e harmônicos e o aspecto dessas bandas ajudam a identificar o modo de substituição do anel. Segundo Pavia (2010), tais bandas identificadas (Figura 4.1) são proeminências características de anel aromático predominantemente dissubstituído na posição *para*, o que está de acordo com parte da estrutura proposta. Em uma região de mais baixa frequência, número de onda 685 cm^{-1} tem-se a deformação fora do plano da ligação C–H característica de anel aromático (PAVIA *et al.*, 2010; SILVERSTEIN *et al.*, 2012).

Tendo como base as estruturas propostas, é esperado a presença de algumas bandas de vibração além das já citadas, a omissão destas podem estar relacionadas seja com a complexidade da estrutura e do espectro, o que infere na dificuldade de identificação das mesmas, ou mesmo com as possíveis sobreposições que são passíveis de ocorrer, uma vez que algumas bandas por possuírem números de onda próximos e na maioria das vezes ocorrem em intensidades e até mesmo larguras diferentes são caracterizadas preferencialmente de acordo com a vibração de maior

evidência e influência no espectro, em concordância sempre com o que já é reportado em literaturas.

Em relação ao ligante BS5 as evidências se resumem na diferença com o precursor aldeído (Figura 4.3) e na presença de uma banda melhor resolvida de estiramento C=N em número de onda igual a 1602 cm^{-1} (Figura 4.4), uma vez que em relação à ausência das deformações axiais simétrica e assimétrica de N-H nada pode ser afirmado, devido à falta de identificação das mesmas em decorrência da larga banda de deformação axial da hidroxila livre em $3453\text{--}1879\text{ cm}^{-1}$, como pode ser visto na figura 4.5.

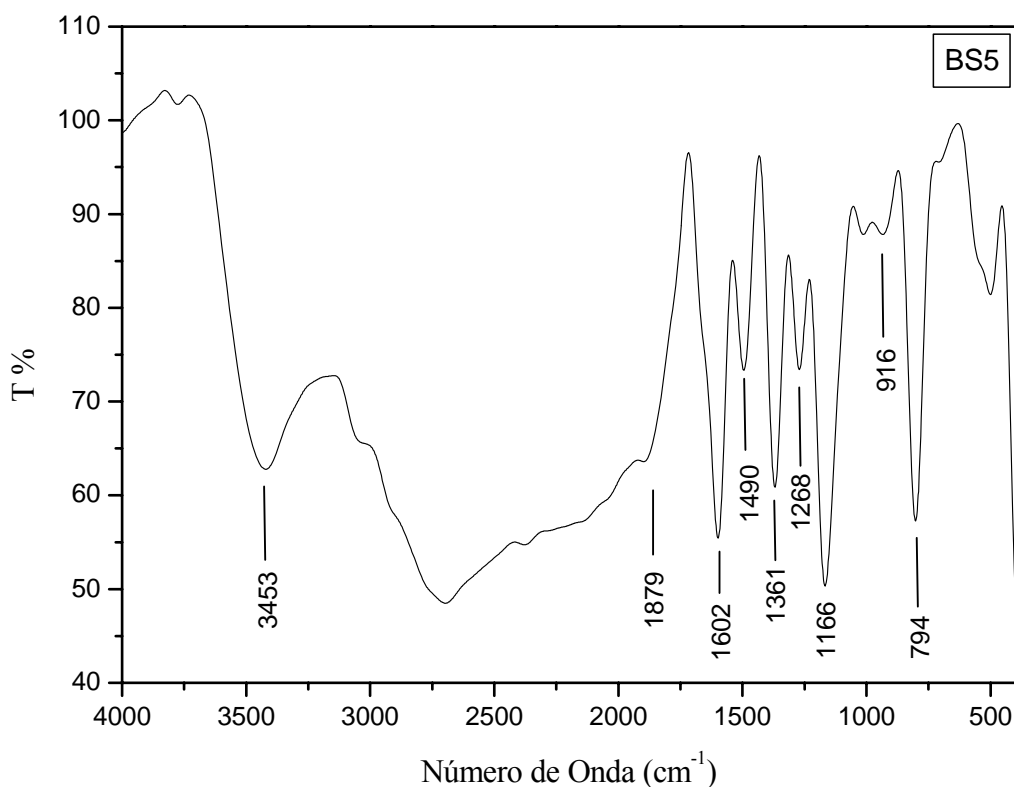


FIGURA 4.4 – Espectros de absorção na região do infravermelho (IV) do ligante BS5 em pastilha de KBr (1% m/m).

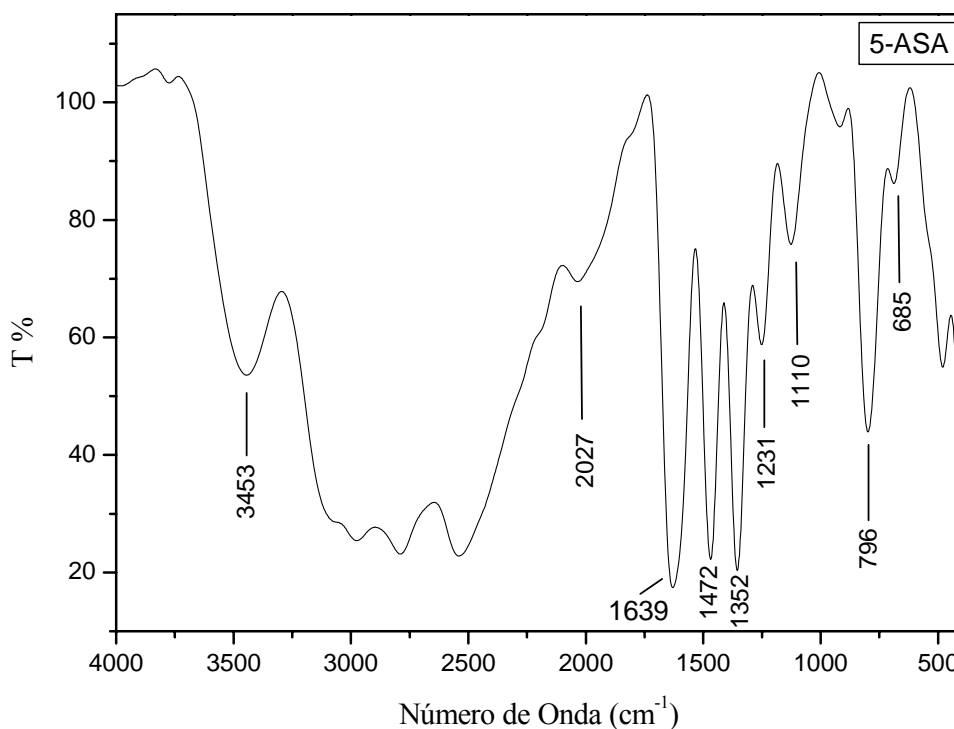


FIGURA 4.5 – Espectros de absorção na região do infravermelho (IV) do precursor 5-ASA em pastilha de KBr (1% m/m).

Os sinais atribuídos as bandas das moléculas são apresentados na tabela 4.6, da mesma forma que justificados posteriormente.

TABELA 4.6 – Principais frequências (cm^{-1}) atribuídas ao espectro de absorção na região do infravermelho do ligante BS5 (PAVIA *et al.*, 2010; SILVERSTEIN *et al.*, 2012).

Atribuições (cm^{-1})	ν O–H	ν C=N	ν C–C (Ar)	δ C–O–H	ν C–O	δ O–H	ν C–H (FP)
BS5	3453-1879	1602	1490	1352	1166	916	794

Apesar da presença de grupos carboxílicos, as bandas de deformação axial de C=O encontram-se ocultas, se não sobrepostas as deformações axiais C=N em 1602 cm^{-1} . As deformações, axial de C–O e angular (δ) no plano de C–O–H encontram-se em torno de 1166 cm^{-1} e 1361 cm^{-1} , respectivamente. Bandas de deformação angular fora do plano do grupo O–H em ligação de hidrogênio são evidentes na região próximo a 916 cm^{-1} , da mesma forma que em número de onda 1490 cm^{-1} encontram-se estiramentos referentes à ligação C–C de anel aromático, em 794 cm^{-1} a deformação

fora do plano de ligações C–H de anel aromático (PAVIA *et al.*, 2010; SILVERSTEIN *et al.*, 2012).

De forma análoga é apresentada a caracterização para os produtos BS6 e BS7, BS8 e BS9 (Figuras 4.6, 4.7, 4.9 e 4.10 respectivamente), onde a principal evidência continua sendo a predominância do estiramento da ligação C=N marcada em números de onda 1612, 1620, 1621 e 1619 cm^{-1} para os ligantes respectivamente, bem como a diferença notória relacionada a comparação com os aldeídos precursores DHB (Figura 4.8) e DEAS (Figura 4.11) (PAVIA *et al.*, 2010; SILVERSTEIN *et al.*, 2012).

Em relação às demais vibrações características, as mesmas são apresentadas na tabela 4.7, onde são relacionados os números de onda com as respectivas atribuições das vibrações para cada ligante.

TABELA 4.7 – Principais frequências (cm^{-1}) atribuídas aos espectros de absorção na região do infravermelho dos ligantes BS6 e BS7, BS8 e BS9 (PAVIA *et al.*, 2010; SILVERSTEIN *et al.*, 2012).

Atribuições (cm^{-1})	ν O–H	ν C=N	ν C–C _(Ar)	ν O–H	ν C–O	δ O–H	ν C–H (FP)
BS6	3416-2648	1612	1485	1324	1212	814	676
BS7	3462-2351	1620	1481	1361	1130	796	676
BS8	3647-3184	1621		1342	1139	944	685
BS9	3768-3194	1619	1518	1352		797	

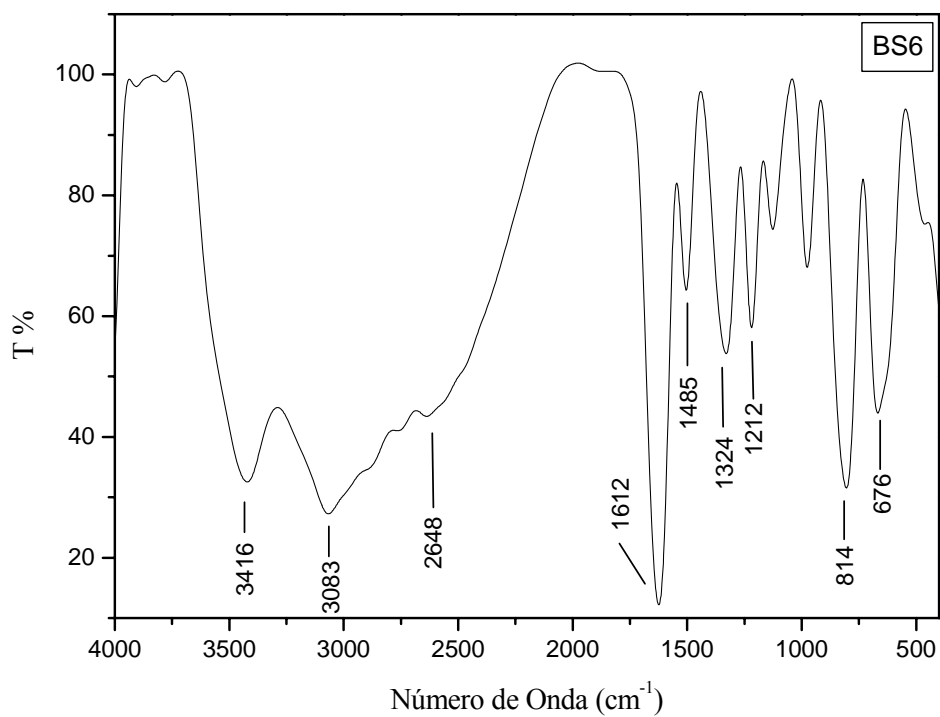


Figura 4.6 – Espectros de absorção na região do infravermelho (IV) do ligante BS6 em pastilha de KBr (1% m/m).

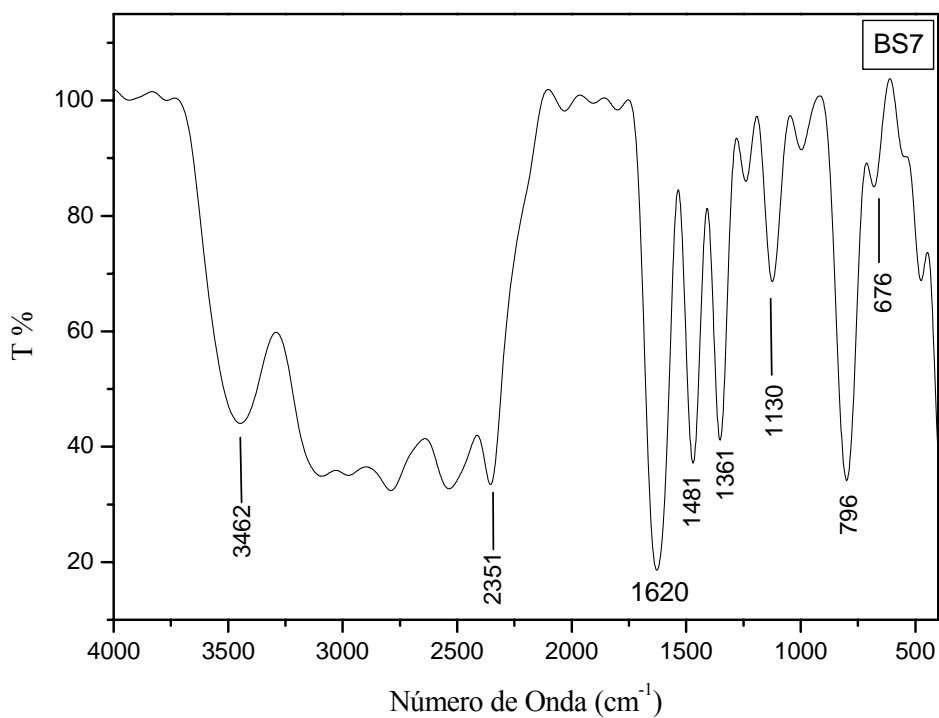


FIGURA 4.7 – Espectros de absorção na região do infravermelho (IV) do ligante BS7 em pastilha de KBr (1% m/m).

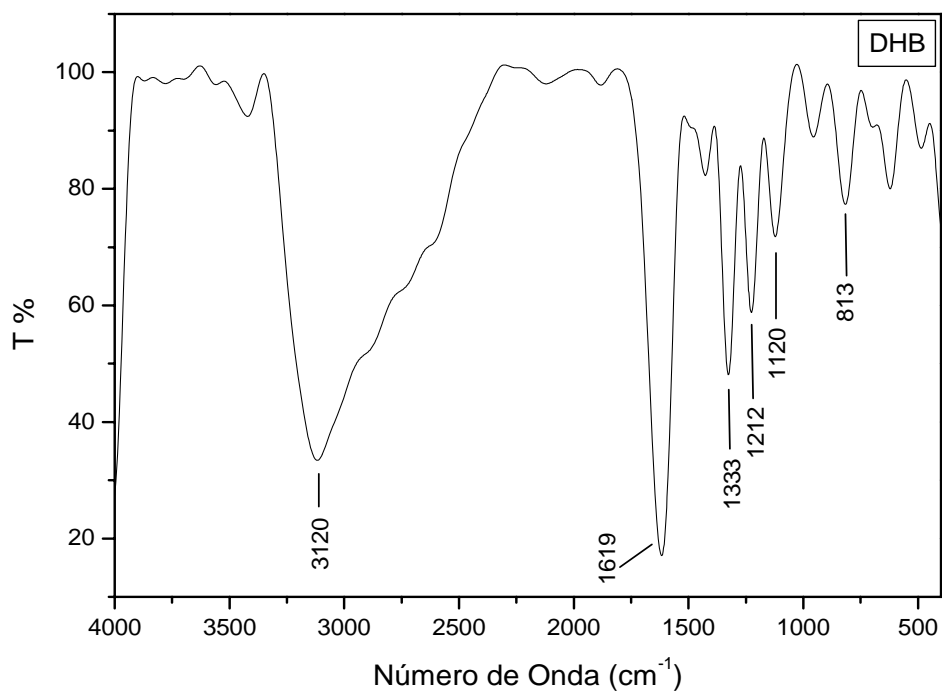


FIGURA 4.8 – Espectro de absorção na região do infravermelho (IV) do precursor aldeído DHB em pastilha de KBr (1% m/m).

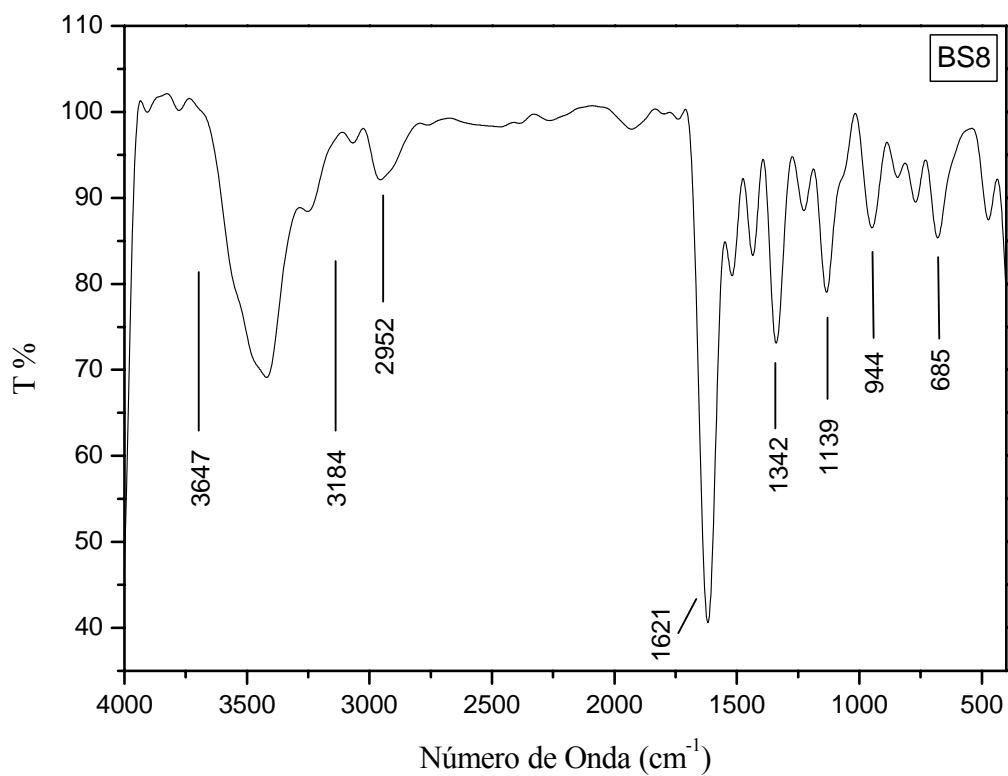


FIGURA 4.9 – Espectros de absorção na região do infravermelho (IV) do ligante BS8 em pastilha de KBr (1% m/m).

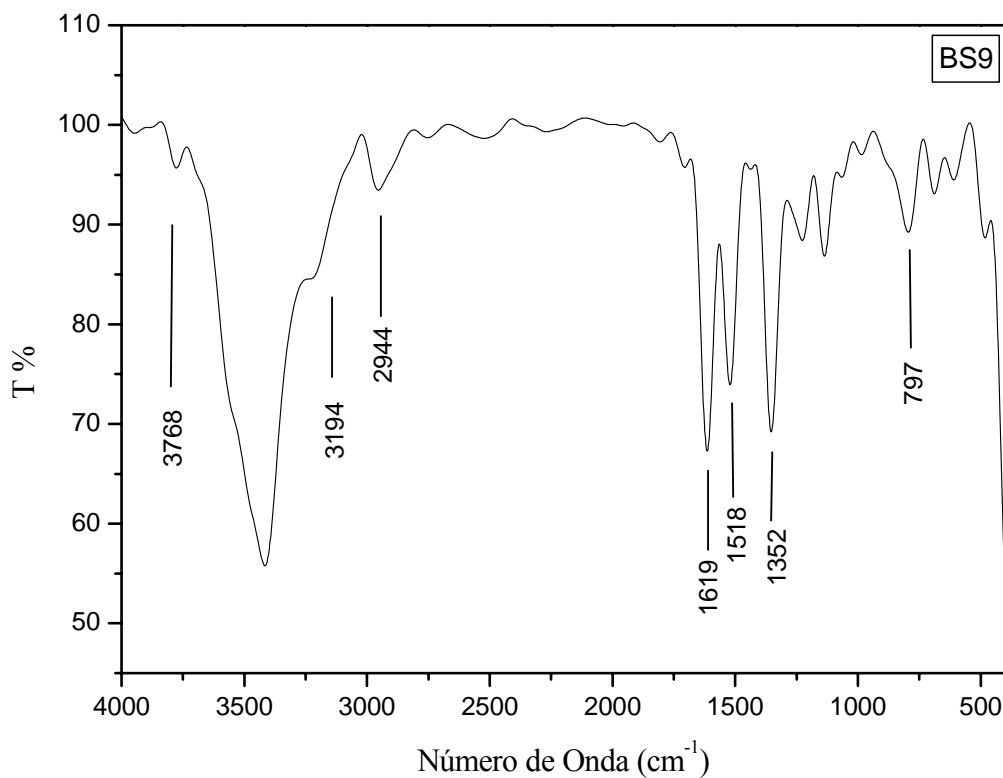


FIGURA 4.10 – Espectros de absorção na região do infravermelho (IV) do ligante BS9 em pastilha de KBr (1% m/m).

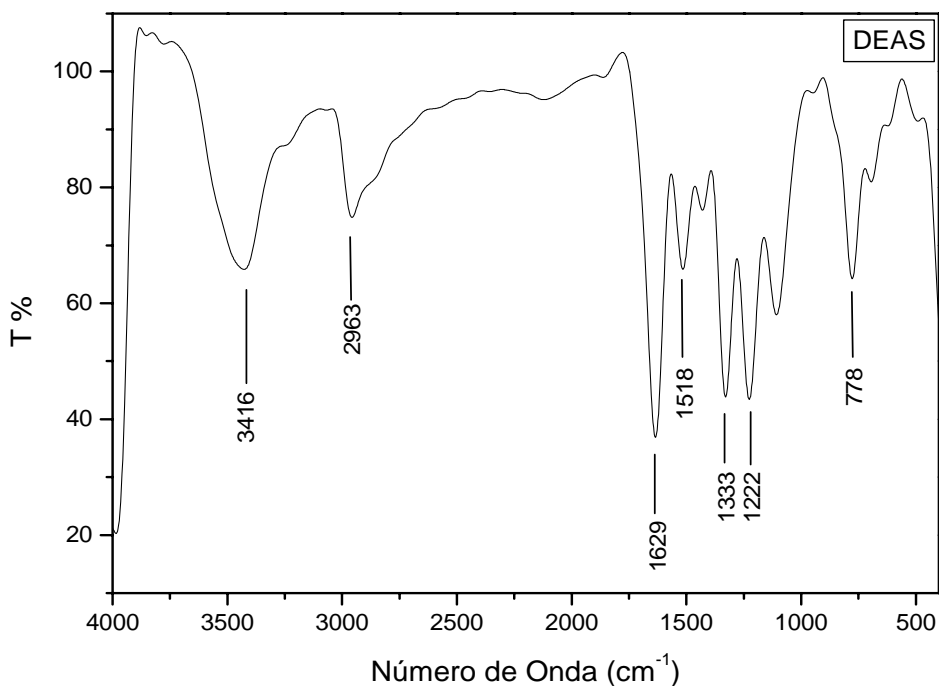


FIGURA 4.11 – Espectro de absorção na região do infravermelho (IV) do precursor aldeído DEAS em pastilha de KBr (1% m/m).

4.4 Espectroscopia Eletrônica na região do Ultravioleta-Visível (UV-Vis)

As caracterizações de espectroscopia UV-Vis são apresentadas de forma semelhante para todos os ligantes sintetizados, uma vez que os mesmos apresentam grande similaridade estrutural, além disso, os resultados são comparados com os espectros dos precursores (Apêndice), os mesmos que confirmam a formação do novo composto.

Apesar da absorção de radiação ultravioleta resultar na excitação de elétrons do estado fundamental, os núcleos que os elétrons unem em ligações têm um papel importante na determinação de quais comprimentos de onda da radiação serão absorvidos. Os núcleos determinam a força com a qual os elétrons são ligados e, assim, influenciam o espaçamento de energia entre os estados fundamental e excitado. Por conseguinte, a energia característica de uma transição e o comprimento de onda da radiação absorvida são propriedades de um grupo de átomos e não dos elétrons individualmente. Portanto a caracterização dos compostos deve ser avaliada como um todo, o conjunto e influência dos cromóforos presentes (PAVIA *et al.*, 2010).

De forma geral a estrutura das bases de Schiff obtidas tem contribuições de compostos aromáticos, grupos substituintes que absorvem em energias características, bem como a natureza dos substituintes que agregam ainda para ressonância da estrutura como um todo. Espera-se, baseando-se nas estruturas das mesmas a presença de bandas na região de 200 a 400 nm do espectro atribuídas principalmente as transições $\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$ de compostos aromáticos, grupos carbonílicos e imínicos, sendo a última transição considerada uma das mais interessantes e estudadas (PAVIA *et al.*, 2010). Transições localizadas em comprimentos de onda mais altos (400 a 800 nm), região do visível, podem ser atribuídas a transições $n \rightarrow \pi^*$ relativas às transições de elétrons não ligantes.

Os compostos sintetizados são de natureza conjugada, o que faz deles bons agentes cromóforos. Para o produto BS4 a principal evidência que caracteriza o cromóforo conjugado é a presença de três bandas deslocadas, em relação aos precursores (ANEXO), na região do ultravioleta, como apresentado na figura 4.12, as quais são atribuídas, preferencialmente, às transições eletrônicas do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$.

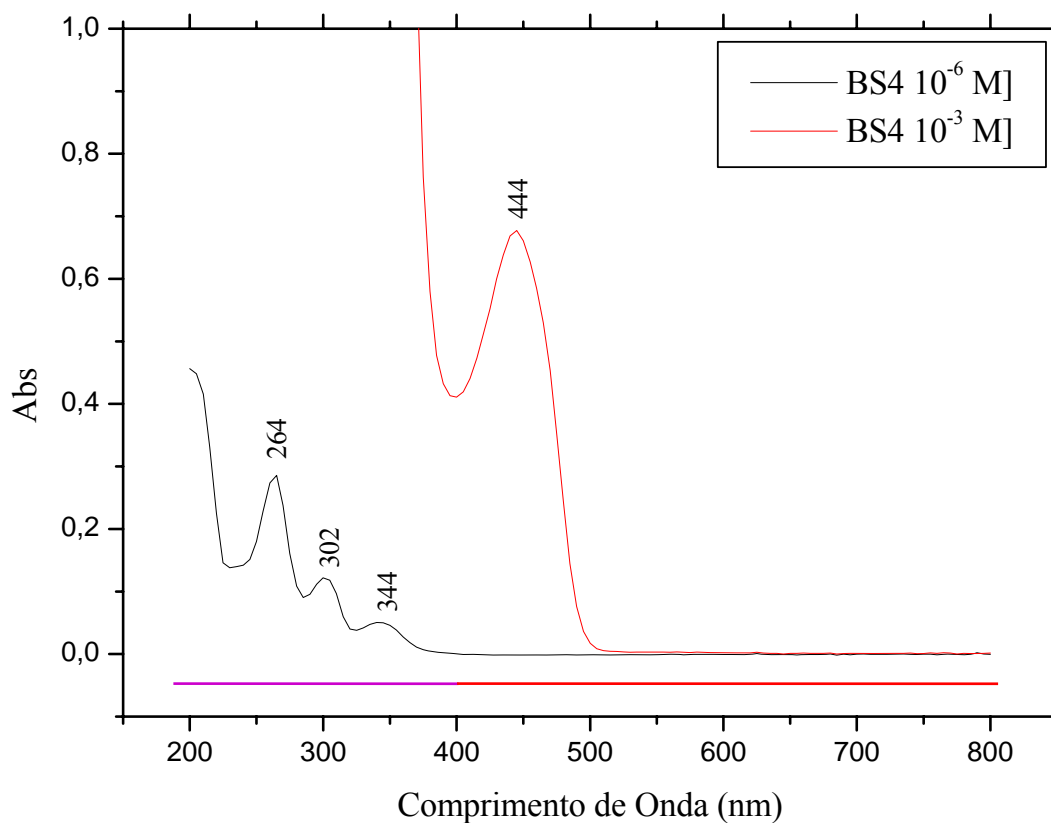


FIGURA 4.12 – Espectros Eletrônica na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) (—) para o ligante BS4 em metanol.

O deslocamento apresentado é explicado, em partes, pela extensão da conjugação, originando um deslocamento batocrômico. O mesmo é evidenciado pela proximidade dos níveis de energias que reduzem a energia necessária para a transição eletrônica, aumentando, em consequência, o comprimento de onda de absorção. Tal deslocamento pode ser melhor explicado fazendo uso da teoria do orbital molecular (TOM) conforme exemplificado para o eteno ($H_2C=CH_2$) na figura 4.13 (PAVIA *et al.*, 2010).

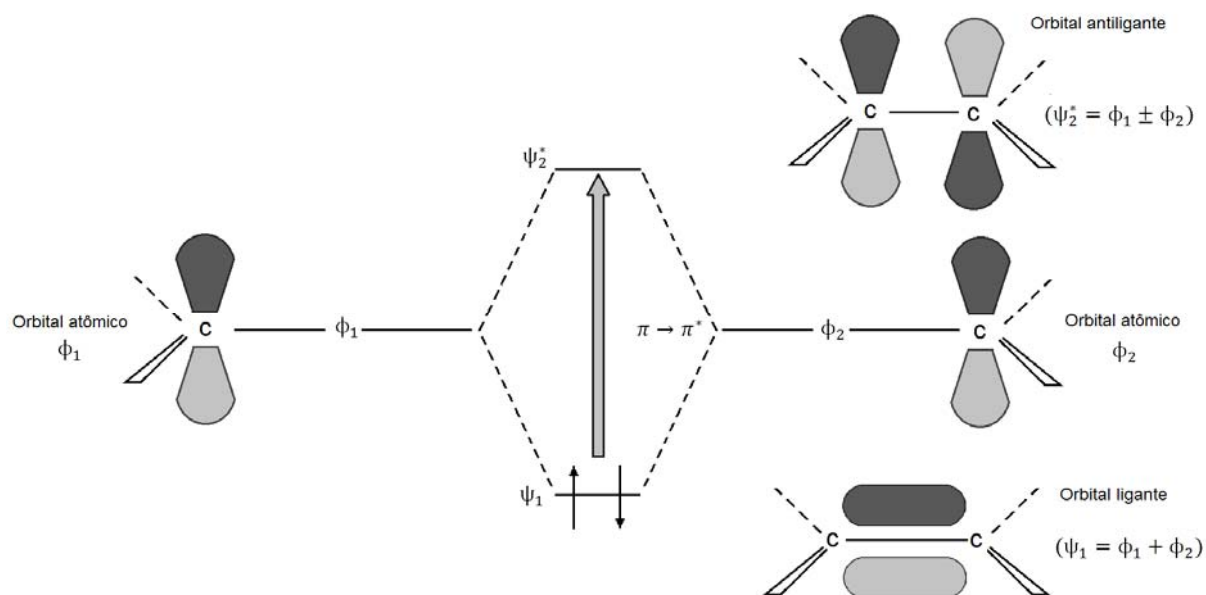


FIGURA 4.13 – Formação dos orbitais moleculares (PAVIA *et al.*, 2010).

Combinações lineares de orbitais atômicos (OA's) e suas respectivas funções de onda dão origem a orbitais moleculares (OM's), sendo eles: o ligante de menor energia (resultante da soma das funções de onda dos OA's) e o antiligante de maior energia (resultante da subtração das funções de onda dos OA's). Como resultado dessa combinação os elétrons que haviam em cada um dos OA's passam a pertencer agora aos OM's, no caso específico, no orbital de mais baixa energia (π ligante), constituindo uma ligação química (SHRIVER e ATKINS, 2008). Logo, a transição eletrônica possível nesse sistema é a $\pi \rightarrow \pi^*$.

Sistemas contendo mais duplas conjugadas, maior número de OA's, terão uma maior quantidade de OM's, visto que haverá uma quantidade maior de combinações dos orbitais entre si. Nota-se que para o 1,3-butadieno ($\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}_2$) os quatro OA's deram origem a quatro novos OM's (Figura 4.14).

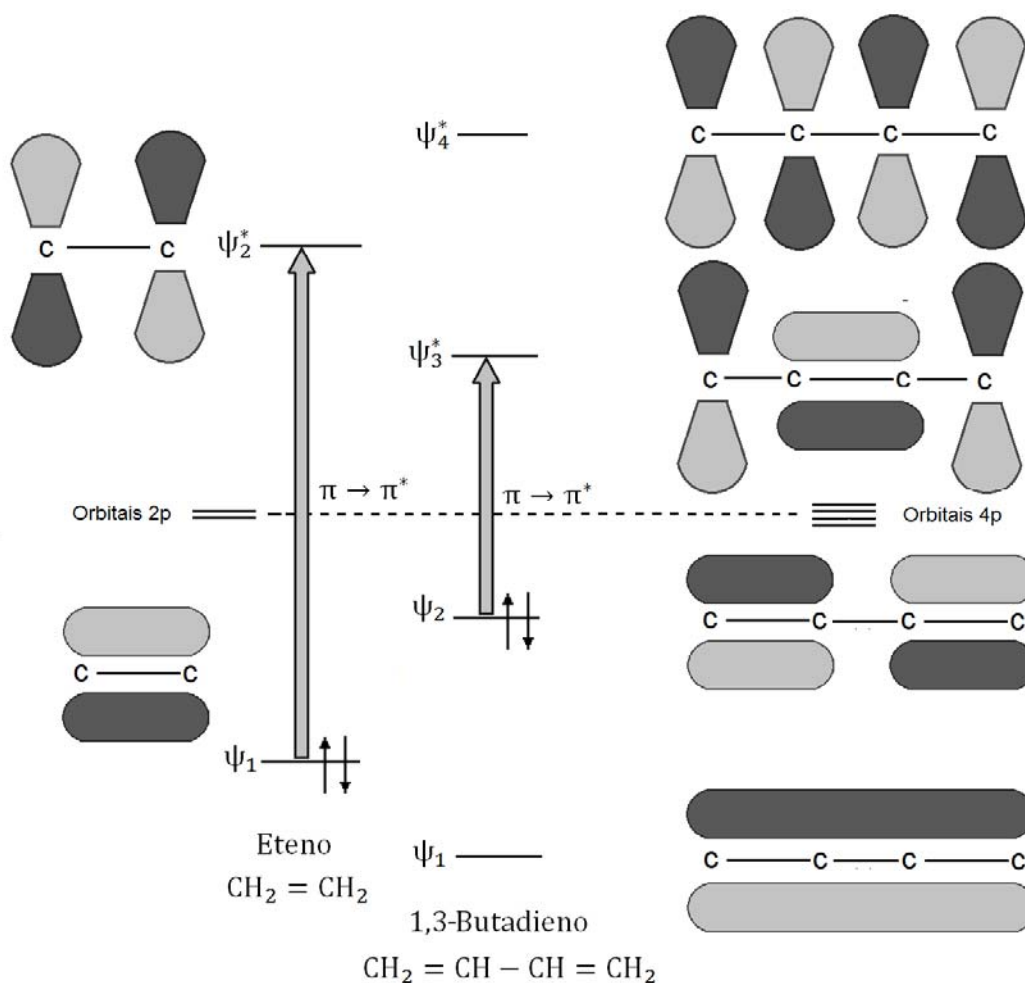


FIGURA 4.14 – Comparação dos níveis de energia do orbital molecular e a energia das transições $\pi \rightarrow \pi^*$ no eteno e no 1,3-butadieno (PAVIA *et al.*, 2010).

Fazendo analogia no que já foi explanado, a transição de menor energia para este é uma transição do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ com uma energia menor quando comparado com o eteno (Figura 4.11). Essa ocorrência é geral. Quanto maior o número de orbitais p no sistema conjugado, a transição do orbital molecular ocupado de maior energia (HOMO) para o orbital molecular desocupado de menor energia (LUMO) tem energia cada vez menor. O espaçamento de energia separando os orbitais ligante e antiligante torna-se cada vez menor com o aumento da conjugação (Figura 4.15), o que desencadeia o aumento no comprimento de onda de absorção da transição (PAVIA *et al.*, 2010).

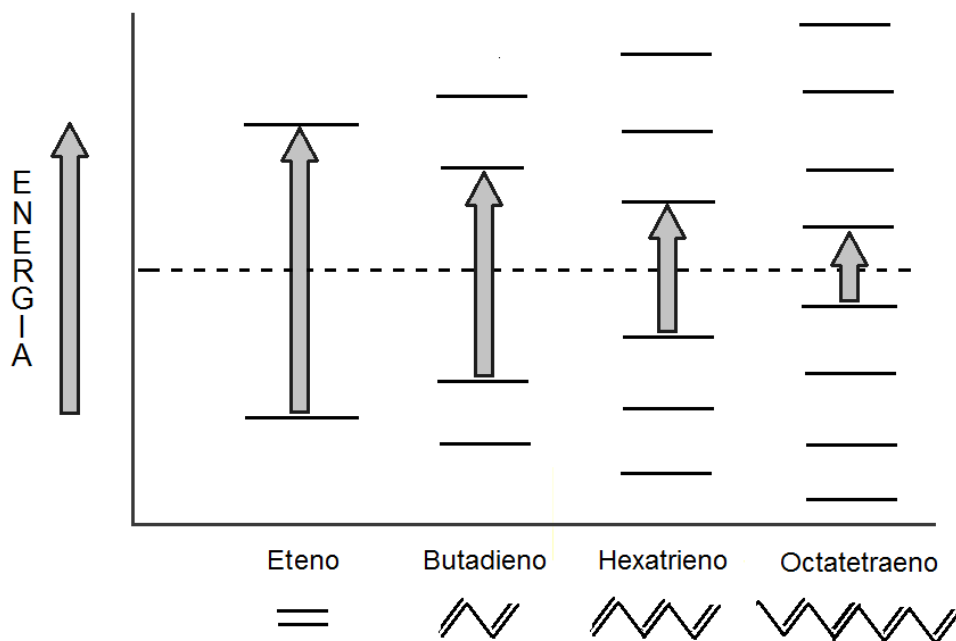


FIGURA 4.15 – Comparação dos espaçamentos de energia $\pi \rightarrow \pi^*$ em uma série de polienos de comprimento de cadeia crescente (PAVIA *et al.*, 2010).

Apesar das quatro transições que são possíveis para o benzeno, todas são de mesma energia, e por isso o espectro de UV é composto por um pico de absorção. Entretanto, existem fatores que fazem com que o aspecto obtido para compostos dessa natureza sejam diferentes do que é esperado. As repulsões elétron-elétron e as considerações de simetria fazem com que os estados de energia reais a partir de onde ocorrem as transições eletrônicas sejam modificados. Desta forma três transições eletrônicas ocorrem para os estados excitados, dentre elas as bandas chamadas de *primárias* (duas ocorrências) e *secundárias* (uma ocorrência) (PAVIA *et al.*, 2010).

Para compostos aromáticos mononucleares é comum a aparição de apenas duas dessas bandas, sendo a primeira banda primária não observada em decorrência da sua aparição em uma região do ultravioleta de vácuo do espectro, o que não é verificado em condições experimentais dos equipamentos. Logo, a justificativa para a aparição de todas as bandas correspondentes aos compostos aromáticos do BS4 se dão pela extensão da conjugação por meio da presença de anéis policíclicos, que adicionalmente com a presença dos grupos substituintes, os mesmos que contribuem para os diferentes valores de energia das transições passíveis de ocorrência, influenciam nos valores de absorção.

As possíveis substituições em estruturas de anéis benzênicos influenciam os deslocamentos batocrômicos e hiperacrômicos das transições. Isso acontece devido as contribuições dos próprios substituintes, se os mesmos possuem ou não elétrons não ligantes que participam da conjugação do sistema. No espectro do BS4 os sinais de contribuição da estrutura do anel aparecem tão deslocados em relação ao que é referido na teoria que são explicados em virtude dos vários grupos funcionais presentes na estrutura, os mesmos que contribuem tanto para a ressonância quando para transições de natureza $n \rightarrow \pi^*$.

Um fato interessante observado é que independente da influência de distribuição de elétrons, efeito doador e/ou retirador, as bandas primárias características desses cromóforos apresentam-se sempre em comprimentos de onda deslocados, o que explica a presença em 264 nm e 302 nm, e não em 184 nm e 202 nm como cita a literatura (PAVIA *et al.*, 2010).

A banda em 344 nm é proveniente dos demais grupos do anel, os mesmos que são, por si só, considerados grupos cromóforos [carboxilas, hidroxilas (*o*), e iminas(*p*)], contendo, em geral, elétrons π , assim como elétrons não ligantes, exercendo grande influência nas absorções. A interação entre o anel e os elétrons n dos substituintes podem produzir uma nova banda de transferência de elétrons predominante, ocultando inclusive a banda secundária de sistemas aromáticos. A tendência dessas substituições são observadas de acordo com os grupos, uma vez que podem ser doadores ou retiradores da densidade do anel. De toda forma, os sinais para esses sistemas são modificados, a resposta é dependente da magnitude do efeito predominante dos grupos, que causa o deslocamento e até mesmo a sobreposição dos sinais (PAVIA *et al.*, 2010).

De forma análoga, a explicação para a banda na região do visível (Figura 4.9) é devido a extensão da conjugação de compostos aromáticos policíclicos juntamente com a presença de substituintes na estrutura, os mesmos que dão origem a transições de natureza $n \rightarrow \pi^*$.

A similaridade estrutural dos produtos é fundamentada também nas caracterizações de UV-Vis. A tendência observada para BS5 e BS6 segue a mesma apresentada para BS4, conforme representado nas figuras 4.16 e 4.17.

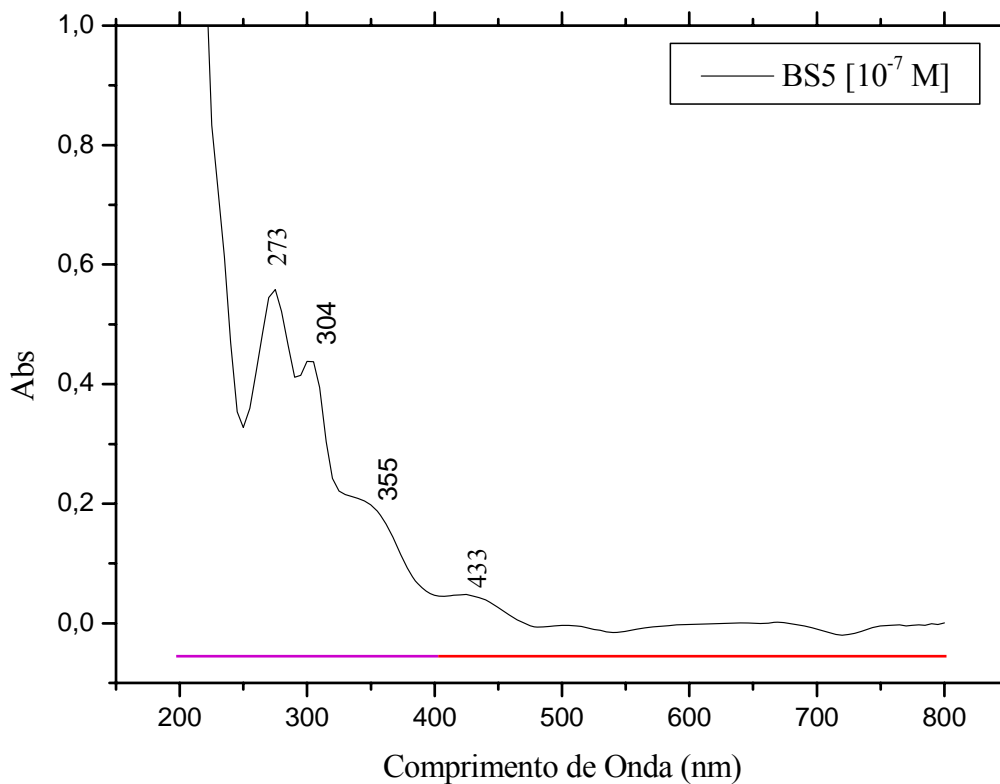


FIGURA 4.16 – Espectros Eletrônica na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) (—) para o ligante BS5 em metanol

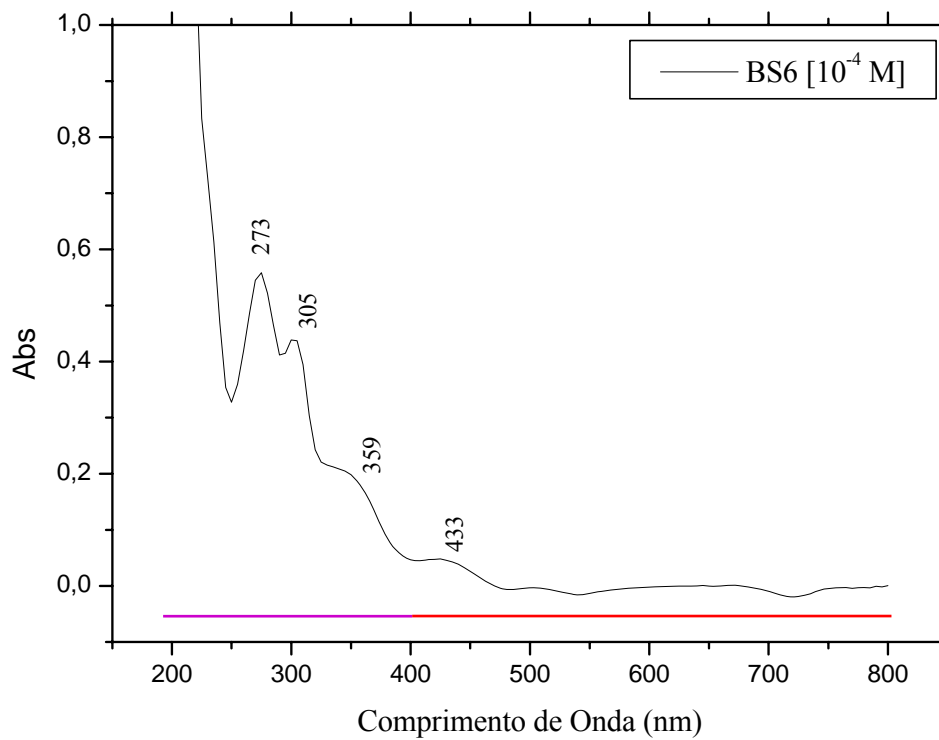


FIGURA 4.17 – Espectros Eletrônica na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) (—) para o ligante BS6 em metanol.

As estruturas dos demais compostos sintetizados seguem uma mesma analogia de caracterização, sendo as alterações apresentadas nos resultados, originadas pelos diferentes cromóforos adicionais que compõem a estrutura dos compostos, os mesmos que contribuem distintamente para os deslocamentos e intensidades das bandas.

A presença do cromóforo principal, composto aromático policíclico agregado a um sistema conjugado (por meio de onde se tem a extensão da conjugação), é atribuída as bandas presentes na região do ultravioleta do espectro, as mesmas provenientes de transições $\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$, sujeitas a deslocamento batocrômico em virtude da presença das diferentes substituições nos compostos em questão. Já a banda na região do visível é atribuída as transições $n \rightarrow \pi^*$ em decorrência da extensão da conjugação de compostos aromáticos policíclicos juntamente com a presença de substituintes portadores de elétrons não ligantes na estrutura.

Desta forma, as alterações apresentadas nos resultados de UV-Vis para os demais produtos se dão pelos deslocamentos acima mencionados, estes diretamente associados a presença de cromóforos adicionais ligados a estrutura, contribuindo de maneira e intensidade distintas na estrutura.

Os resultados para BS7, BS8 e BS9 diferem em quantidade de bandas em relação aos demais.

Para o BS7 (Figura 4.18), a ausência de uma banda primária apresentada na região típica de UV do espectro é explicada, em partes, pela condição experimental do equipamento. Apesar de perceptível o sinal dentro da fronteira da região UV, sinal este que ultrapassa o limite de Absorbância (Abs) do equipamento, o mesmo não é evidenciado quando a amostra é diluída. Tal observação remete a teoria explanada para classe de compostos aromáticos, onde algumas bandas primárias destes absorvem em regiões que a maioria dos equipamentos não conseguem detectar.

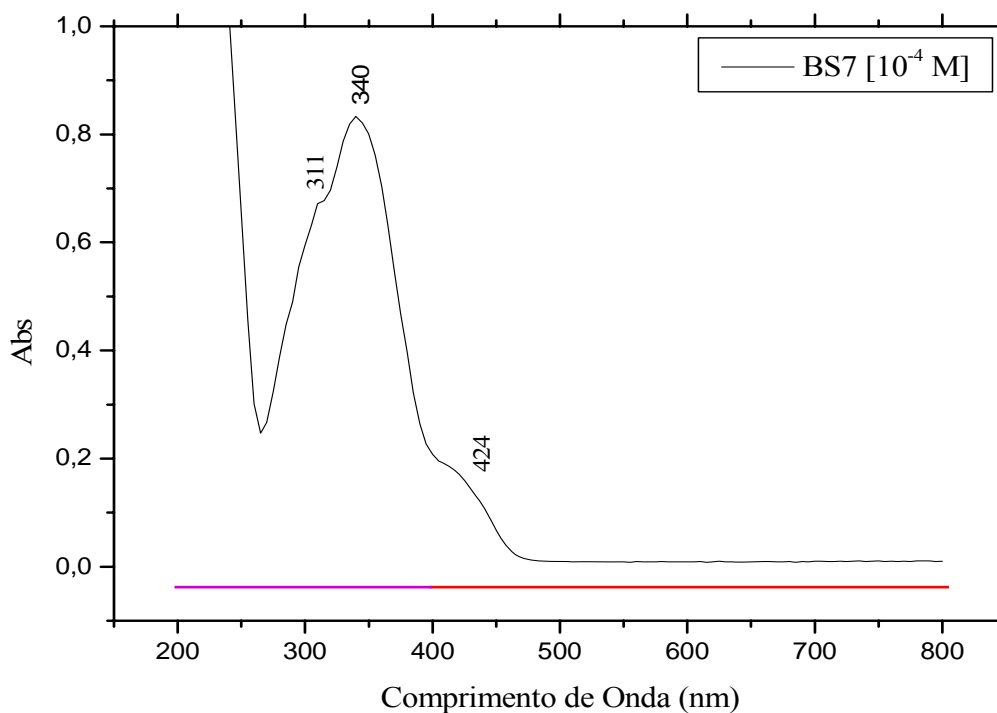


FIGURA 4.18 – Espectros Eletrônica na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) (—) para o ligante BS7 em metanol.

O inverso é apresentado para BS8, onde a presença de uma quantidade maior de bandas é observada (Figura 4.19).

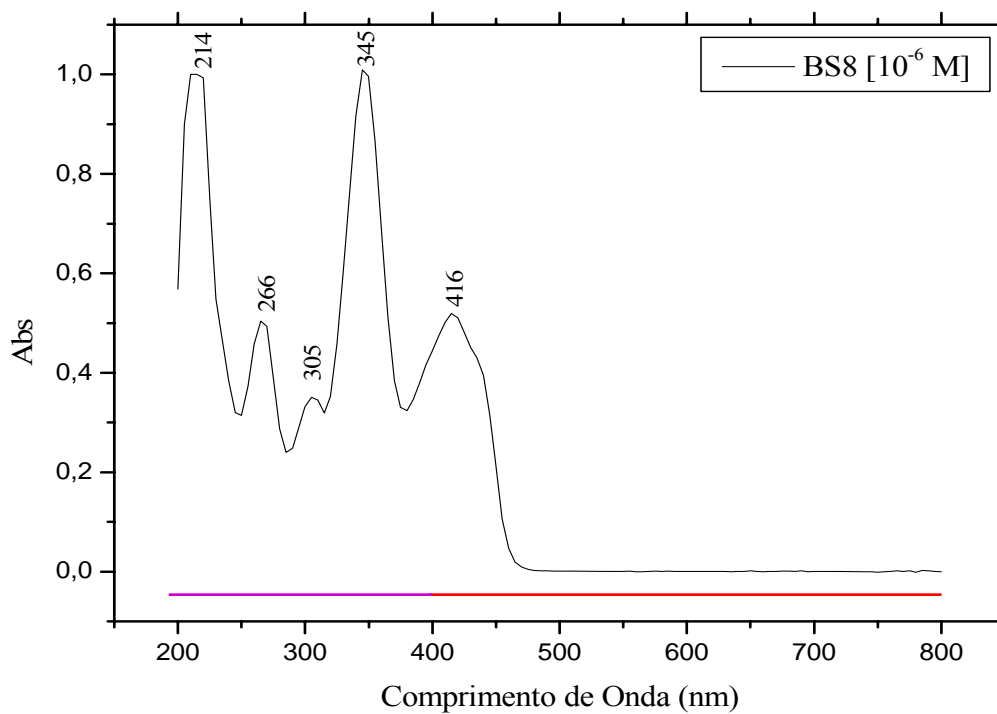


FIGURA 4.19 – Espectros Eletrônica na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) (—) para o ligante BS8 em metanol.

Era de se esperar uma similaridade dos resultados para os produtos BS6 e BS7, entretanto a presença de uma banda atípica em comprimento de onda 345 nm no espectro do BS7 foge o padrão de caracterização dos compostos. Tal presença gera dúvida sobre a real obtenção do produto objetivado como majoritário, uma vez que o sinal obtido tem contribuições de bandas adicionais em região semelhante ao espectro do aldeído precursor (Figura A.5 – Apêndice). Tal afirmação pode ser confirmada pela ausência de sinais semelhantes nos demais compostos, os mesmos que possuem grandes semelhanças estruturais.

A larga banda em comprimento de onda 398 nm e presença de um ‘ombro’ apresentados no espectro do BS9 (Figura 4.20) é o grande diferencial da caracterização desse produto. Essa ocorrência é explicada pela sobreposição da intensa banda no visível com a banda secundária na região do UV confirmada tanto pelo ombro presente quanto pela região do espectro por onde a banda começa a aparecer, região típica do visível.

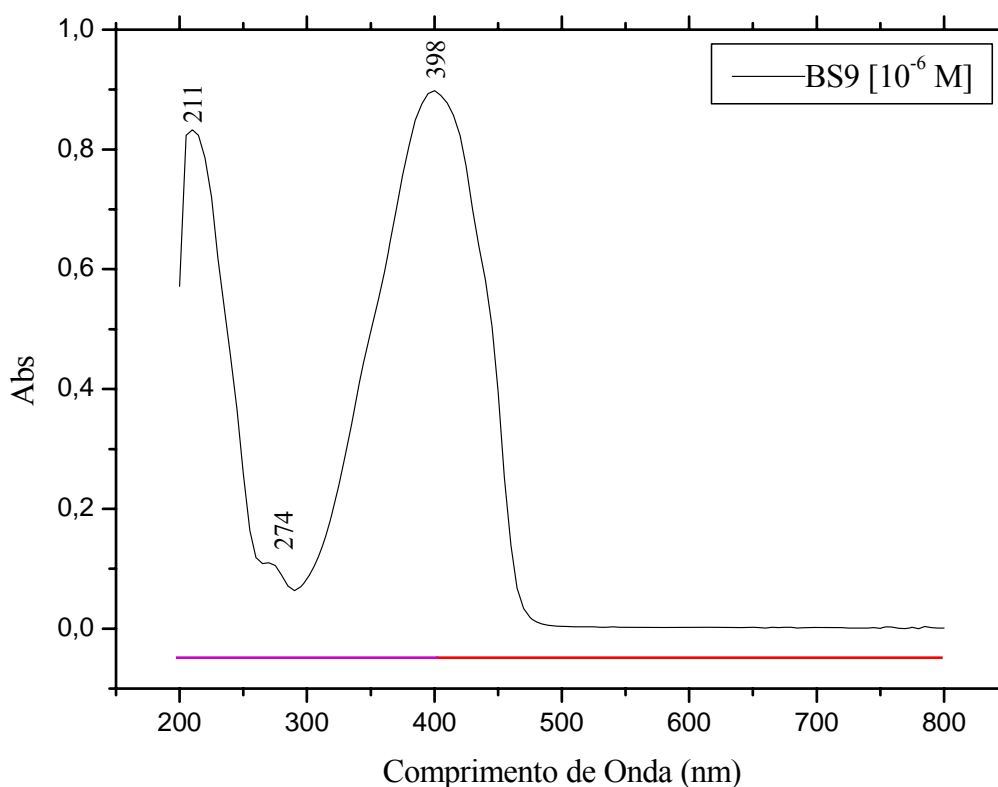


FIGURA 4.20 – Espectros Eletrônica na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) (—) para o ligante BS9 em metanol.

4.5 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de Hidrogênio ^1H

A fim de identificar as estruturas dos ligantes, bases de Schiff, espectros de ^1H RMN foram registrados em dimetilsulfóxido (DMSO-d_6) como solvente. Os resultados de RMN confirmam a identidade dos ligantes preparados.

No espectro de RMN de ^1H para o ligante BS4 (Figura 4.21) é possível identificar a presença de um singleto (s) bem evidente em deslocamento químico (δ_{H}) 0,5344 que é atribuído aos hidrogênios ligados aos carbonos de hibridização sp^3 dos grupos metila presentes, os quais tem ressonância característica em regiões de deslocamento entre 0-2 ppm (PAVIA *et al.*, 2010). De acordo com Pavia e colaboradores (2010) as características dos picos presentes nos espectros de RMN fornecem ainda valiosas informações acerca das características dos prótons presentes. Prótons encontrados em regiões quimicamente idênticas dentro de uma molécula são considerados quimicamente equivalentes, bem como a área do pico é considerada proporcional ao número de hidrogênios presentes na molécula. Desta forma conforme caracterizado para o composto sintetizado, a área integrada do pico fornece o valor de 6 hidrogênios, o que está de acordo com a molécula proposta, uma vez que corresponde aos hidrogênios metílicos que são quimicamente idênticos em virtude da simetria da molécula.

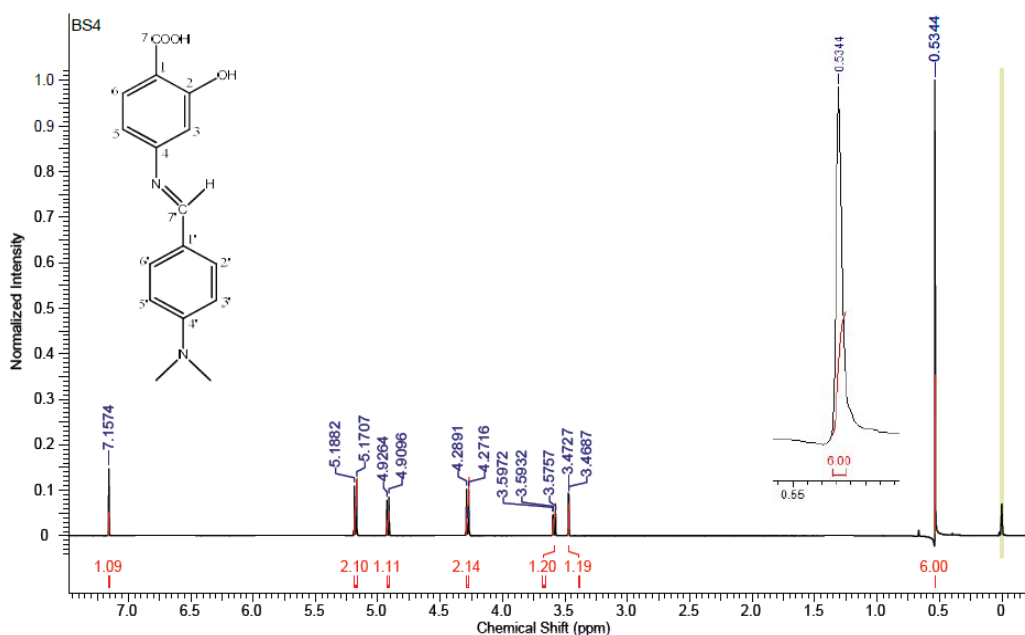


FIGURA 4.21 – Espectro de RMN de ^1H (DMSO-d_6 , 500 MHz) do ligante BS4.

Em relação aos demais picos, na região ampliada da figura 4.21, é possível caracterizar os sinais dos demais hidrogênios (Figura 4.22).

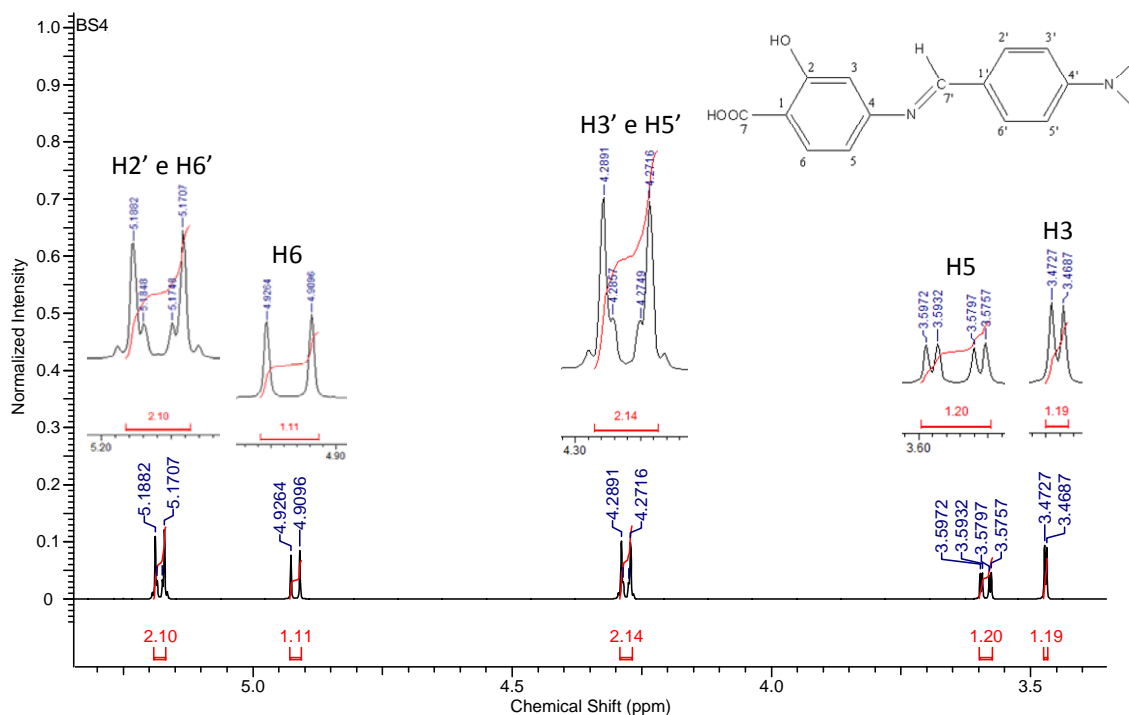


FIGURA 4.22 – Espectro de RMN de ¹H (DMSO-d⁶, 500 MHz) na região ampliada para o ligante BS4.

Hidrogênios ligados a anéis aromáticos são facilmente identificados. Encontram-se em uma região característica no espectro (6,5-8,0 ppm) em que poucos outros tipos de hidrogênios apresentam absorção. No entanto, em contraste a essa propriedade, hidrogênios não equivalentes ligados em um anel benzênico irão interagir uns com os outros produzindo padrões de separação *spin-spin*. A intensidade de interação entre esses hidrogênios dependem diretamente da separação ou distância entre os mesmos. Desta forma, hidrogênios *orto* (³J ~ 7-10 Hz) acoplam-se com mais intensidade que hidrogênios *meta* (⁴J ~ 2-3 Hz), que, por sua vez, acoplam-se com mais intensidade do que hidrogênios *para* (⁵J ~ 0-1 Hz) (PAVIA *et al.*, 2010).

O dubleto (d) em δ_H 3,4687-3,4727 ppm tem constante de acoplamento (J) 2,02 Hz e é atribuído ao H3, uma vez que o mesmo acopla em *meta* com o núcleo do H5. De forma análoga, porém em uma região mais desblindada (δ_H 4,9096-4,9264 ppm)

em decorrência da proximidade da carboxila (grupo anisotrópico) que atrai a densidade eletrônica, tem-se um dubleto referente ao H6, o mesmo que acopla em *orto* com H5 ($^3J = 8,41$ Hz). Já o sinal de multiplicidade duplo-dubleto (dd) na região de δ_H 3,5757-3,5972 ppm é caracterizado como sendo do H5, uma vez que suas constantes de acoplamento sugerem acoplamento em *orto* com H6 ($^3J = 8,75$ Hz) e *meta* com H3 ($^4J = 2,02$ Hz).

Como já explanado anteriormente, hidrogênios em ambientes quimicamente idênticos são consideradas quimicamente equivalentes, sendo assim, os hidrogênios 2' e 6' e os 3' e 5' são considerados semelhantes entre si, condição confirmada pelos valores de integrais calculados para os mesmos (2,14 e 2,10). Os mesmos são identificados na região de δ_H 4,2662-4,2951 ppm e 5,1653-5,1953 ppm respectivamente, onde os sinais de H2' e H6' encontram-se mais deslocados em relação aos outros hidrogênios (H3' e H5') e ao TMS. A explicação para este consiste no fato de que o sinal para H2' e H6' é mais desblindado devido à presença de um átomo de Nitrogênio e dupla ligação próximos, os quais por possuírem uma densidade eletronegativa considerável atraem a densidade eletrônica e desblindam os sinais sentidos por parte dos hidrogênios em questão, além do fato de que os hidrogênios 3' e 5' encontrarem-se mais impedidos tanto estericamente, em detrimento a presença de grupos volumosos ligados aos nitrogênio sp^3 e os mesmos, grupos N-R, contribuírem para a densidade do anel a partir do efeito indutivo doador de elétrons, por meio de hiperconjugação.

O singlete presente na região mais deslocada – δ_H 7,1574 ppm e integral $\sim 1,09$ – (Figura 4.23) é atribuído ao sinal do H7, que encontra-se mais desblindado pela imina, isso em virtude da eletronegatividade e concentração de densidade eletrônica tanto do par de elétrons disponível do nitrogênio próximo a ligação, bem como na dupla ligação da imina característica do ligante, ambos atraindo a densidade deixando o núcleo do hidrogênio mais livre.

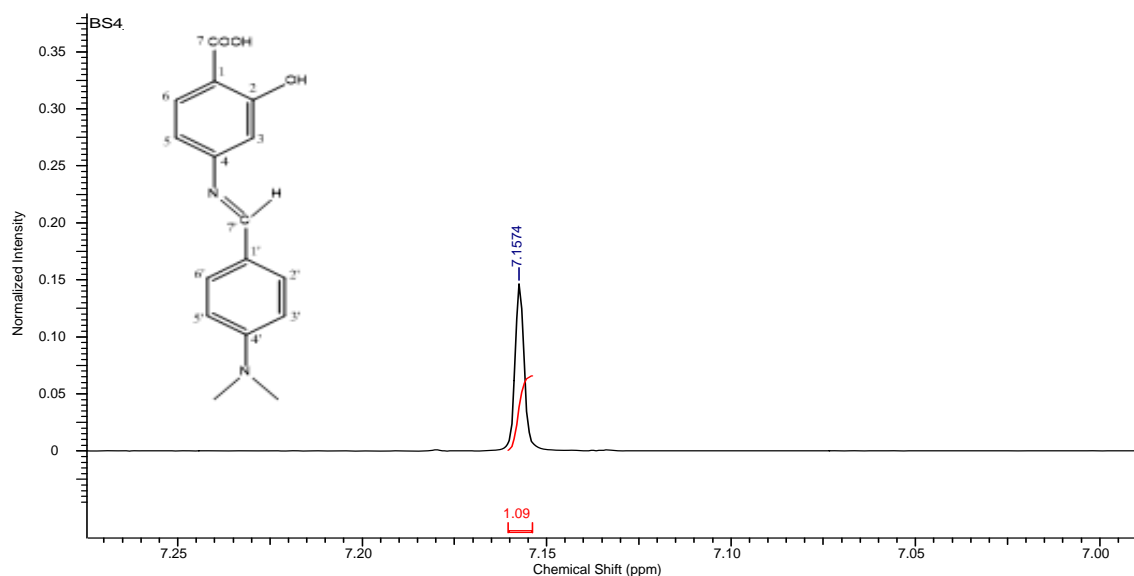


FIGURA 4.23 – Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) do ligante BS4.

Os espectros obtidos para os ligantes BS5 e BS6 não apresentam uma boa resolução, o que dificulta, em partes, as atribuições dos sinais. A falta de resolução pode ser associada tanto ao pouco tempo de análise, como também a possível mistura de compostos no produto.

O resultado para BS5 é apresentado nas figuras 4.24 e 4.25, a partir dos quais é notória a presença de picos com multiplicidades duvidosas, bem como sinais suprimidos.

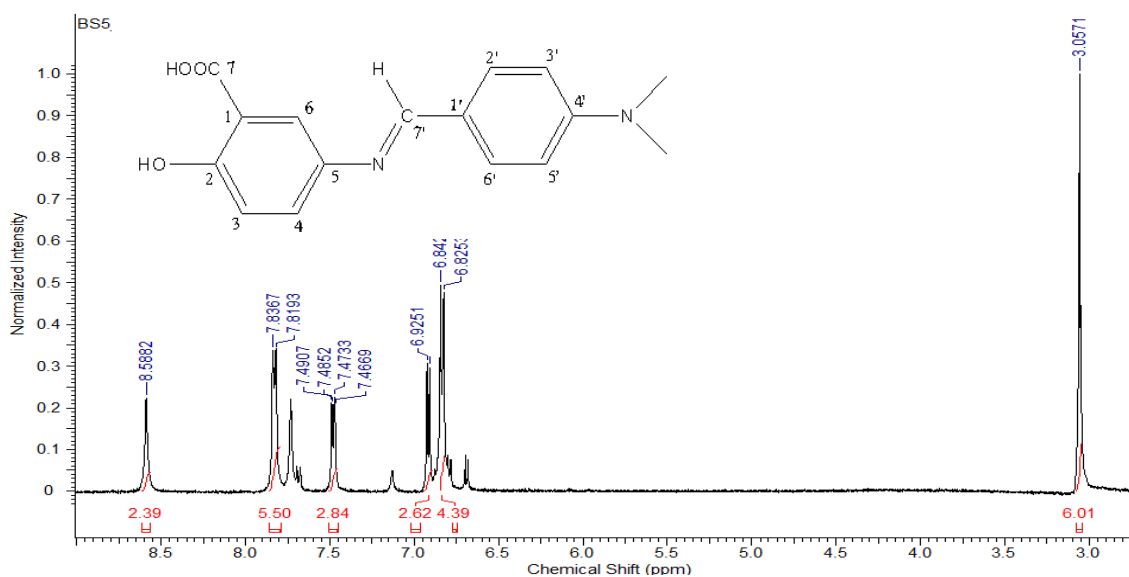


FIGURA 4.24 – Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) do ligante BS5.

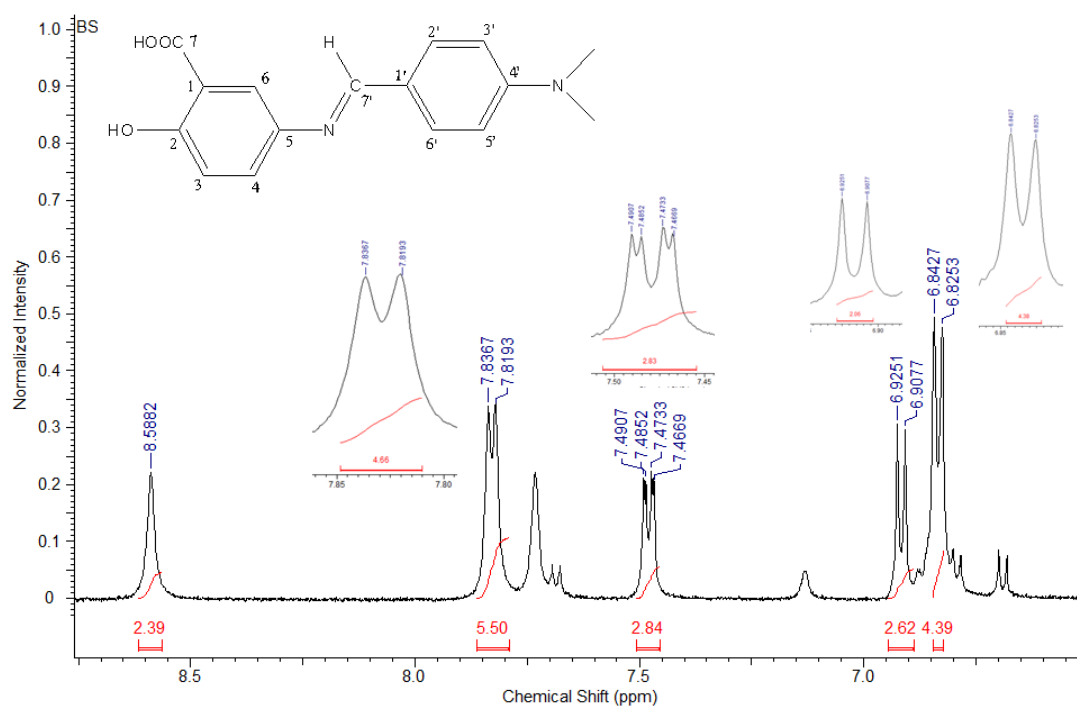


FIGURA 4.25 – Espectro de RMN de ¹H (DMSO-d⁶, 500 MHz) na região ampliada para o ligante BS5.

Mesmo com a possibilidade de comparação com o BS4, a dificuldade pertinente a atribuição e correlação dos sinais dos picos para os hidrogênios pertencentes à molécula inviabilizam a elucidação para este ligante.

Diferentemente, é possível prever a resolução do espectro para o BS6, como pode ser visto nas figuras 4.26, 4.27 e 4.28.

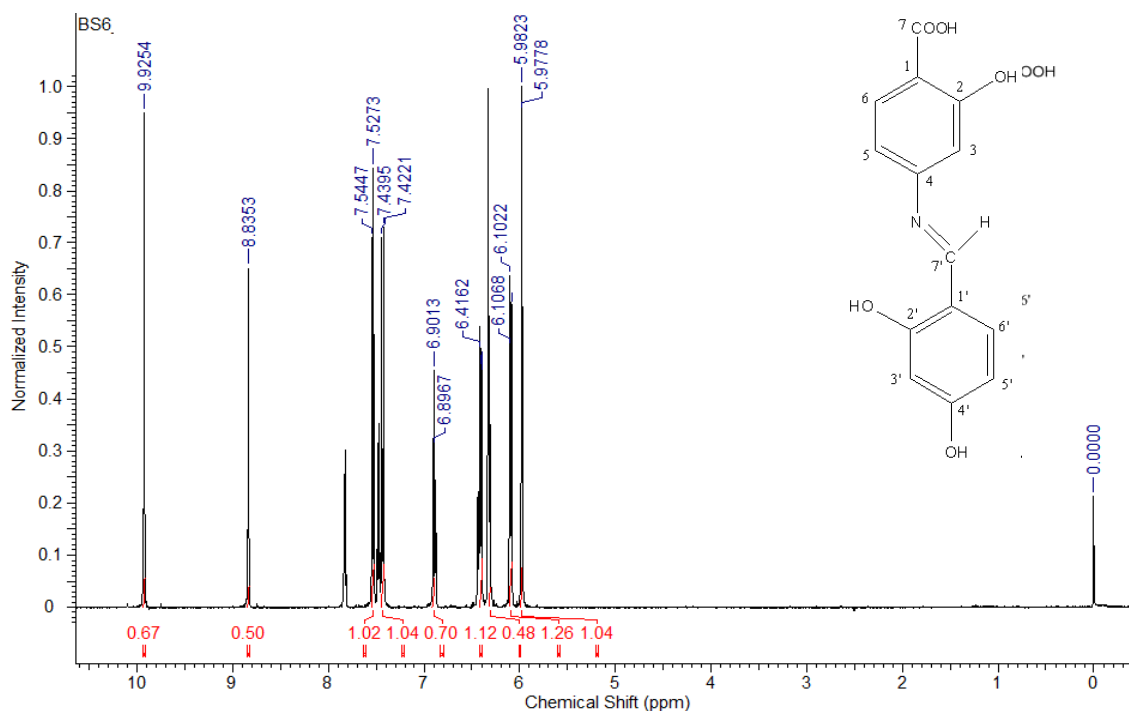


FIGURA 4.26 – Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) do ligante BS6.

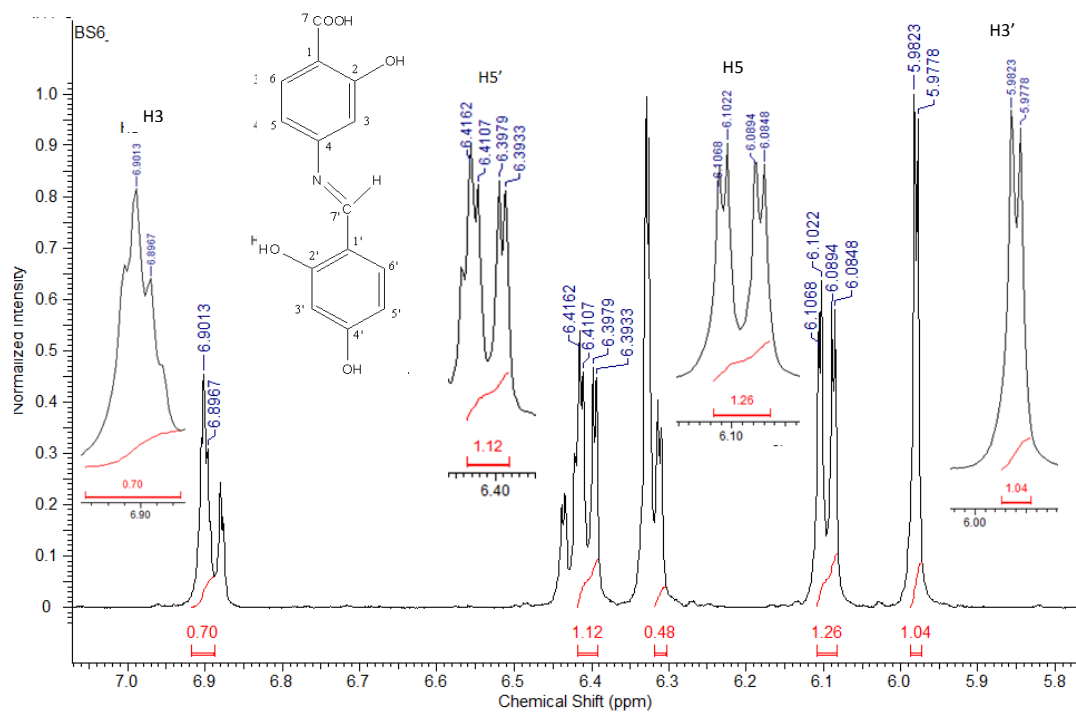


FIGURA 4.27 – Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) na região ampliada para o ligante BS6.

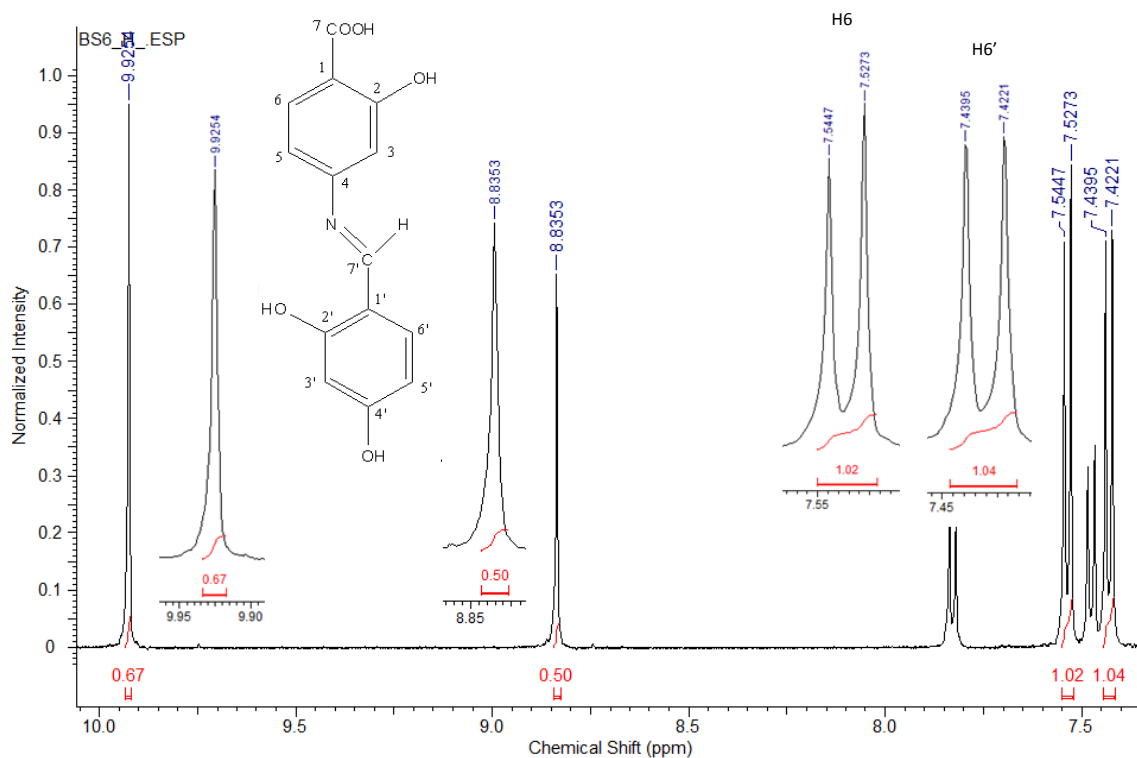


FIGURA 4.28 – Espectro de RMN de ^1H (DMSO-d_6 , 500 MHz) na região ampliada para o ligante BS6.

Os picos evidenciados, cada qual com sua multiplicidade ampliada, são atribuídos como pertencentes à molécula BS6. O duplete presente na região mais desblindada em δ_{H} 5,9778–5,9823 ppm é designado ao sinal do H3', o mesmo que acopla em *meta* com o núcleo de H5' ($^4J = 2,29$ Hz). Tal sinal apresenta-se nessa região em virtude das contribuições das hidroxilas vizinhas a este hidrogênio, as quais doam densidade ao anel por meio da ressonância dos pares de elétrons não ligantes. Em consequência deste fato, a posição α à hidroxila encontra-se mais carregada, influenciando na ressonância do núcleo. Os dois sinais dd em regiões próximas, δ_{H} 6,0848–6,1068 ppm e δ_{H} 6,3933–6,4162 ppm, são apresentados como pertencentes aos H5 e H5', respectivamente, cada qual acoplado com seus respectivos vizinhos em *orto* ($^3J = 8,24$ Hz) e *meta* ($^4J = 2,29$ Hz).

O duplete distorcido em δ_{H} 6,8967–6,9013 ppm é atribuído ao sinal de H3, o mesmo com valor de acoplamento em *meta* $^4J = 2,29$ Hz. Já os dois dubletos próximos em δ_{H} 7,4221–7,4395 ppm e δ_{H} 7,5273–7,5447 ppm são sinais pertencentes a

ressonância dos H6' e H6, respectivamente, ambos acoplando com seus respectivos vizinhos em *orto* ($^4J = 8,70$ Hz).

Os dois singletos presentes na região mais desblindada do espectro são provenientes dos hidrogênios da imina (δ_H 8,8353 ppm) e hidroxila (δ_H 9,9254 ppm).

Os resultados de caracterização para o ligante BS7 são apresentados na figura 4.29, com base nos sinais resolvidos é possível identificar os mesmos como sendo da estrutura do ligante em questão, entretanto é notória a presença de sinais sem atribuição, isso em virtude da possível mistura de produtos. Acredita-se que não trata-se de um produto de natureza completamente impura, visto que os resultados de caracterizações de faixa de fusão (Seção 3.3.1) e AE CHN (Seção 3.3.3) confirmam o grau de pureza das amostras, o que é esperado na verdade é que seja a presença de material de partida (precursores) que não tenham reagido, o que justificaria os resultados apresentados.

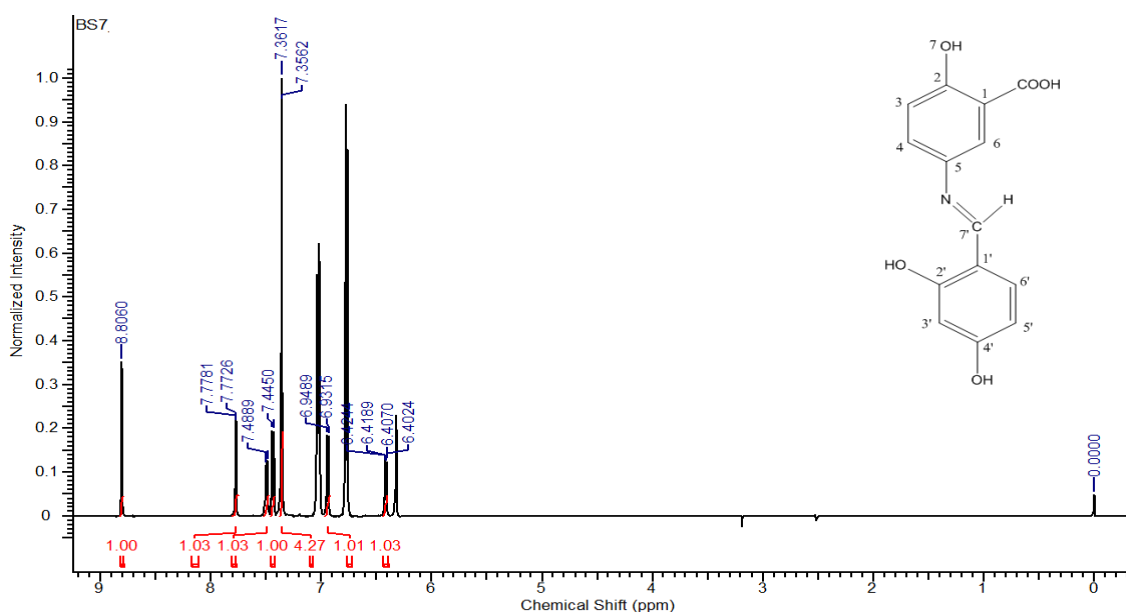


FIGURA 4.29 – Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) do ligante BS7.

Em uma visão ampliada do espectro (Figura 4.30) é possível caracterizar os sinais para os hidrogênios da molécula em uma região característica de compostos aromáticos, sinais comuns em deslocamentos variando de 6,5-8,0.

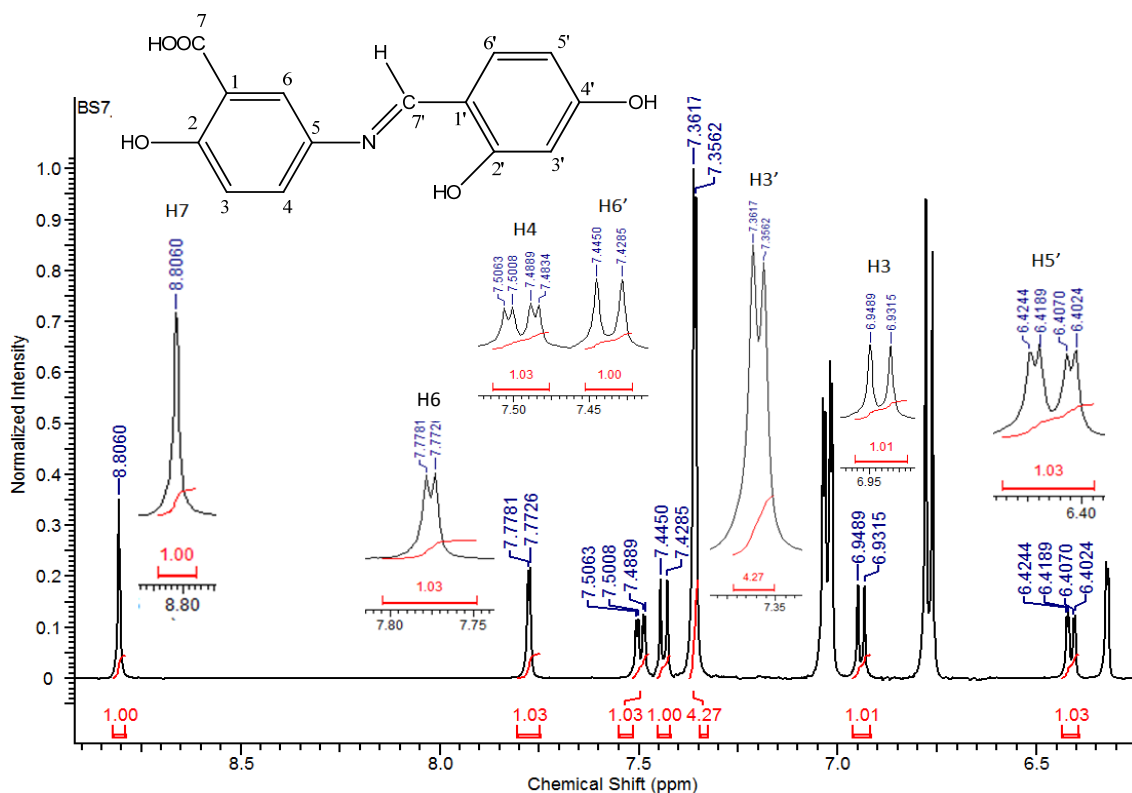


FIGURA 4.30 – Espectro de RMN de ¹H (DMSO-d₆, 500 MHz) na região ampliada para o ligante BS7.

Na região mais blindada do espectro, próximo ao TMS (tetrametilsilano), é possível identificar os sinais para os hidrogênios 5' e 3. O duplo dubleto em δ_H 6,4024-6,4244 ppm é atribuído ao sinal do H5', o mesmo que tem valores de acoplamento em *orto* (H3') e *meta* (H6') ($^3J = 8,24$ Hz e $^4J = 2,29$ Hz, respectivamente), enquanto que o dubleto em δ_H 6,9315-6,9489 ppm é caracterizado para o H3, o qual acopla em *orto* como H4 ($^3J = 8,70$ Hz).

Apesar da presença de um sinal (d) a ser atribuído ao H3' em δ_H 7,3562-7,3617 ppm, o mesmo com constante de acoplamento $^4J = 2,75$ Hz (valor consistente ao acoplamento em *meta* com H5'), é perceptível uma incoerência no que diz respeito ao valor da integral para este sinal. Integrando para 4 hidrogênios, este é mais uma confirmação da mistura de produtos que compõem a amostra. Como mencionado, a presença de picos adicionais no espectro sugere sobre a pureza do produto obtido, sugestão essa que é agora confirmada.

De forma análoga, os sinais dos hidrogênios H6' (d) ($\delta_{\text{H}}7,4285\text{-}7,4450$) ($^3\text{J} = 8,24$ Hz), H4 (dd) ($\delta_{\text{H}}7,4834\text{-}7,5063$ ppm) ($^4\text{J} = 2,75$ Hz e $^3\text{J} = 8,70$ Hz) e principalmente o H6 (d) ($\delta_{\text{H}}7,7728\text{-}7,7781$ ppm) ($^4\text{J} = 2,75$ Hz) aparecem em uma região mais desblindada no espectro de RMN ^1H . A presença dessa disparidade de sinais, mesmos que para alguns ainda que semelhantes em termos de atribuições se devem ao fato das diferentes contribuições dos grupos substituintes presentes, os mesmos que em sua maioria são anisotrópicos, retirando densidade eletrônica do sistema e deixando os núcleos de parte dos Hidrogênios mais ressonantes quando comparado aos demais.

O singlete presente na região mais desblindada ($\delta_{\text{H}} 8,8060$ ppm) do espectro segue a mesma tendência apresentada para os demais ligantes, é característico do H7, o qual encontra-se mais desblindado em virtude da imina, tanto da eletronegatividade e concentração de densidade eletrônica no Nitrogênio próximo a ligação bem como a dupla ligação da imina característica do ligante, ambos atraindo a densidade deixando o núcleo do Hidrogênio mais livre.

As caracterizações para os ligantes BS8 e BS9 seguem uma tendência semelhante entre si, como pode ser visto nas figuras 4.31 e 4.32 abaixo.

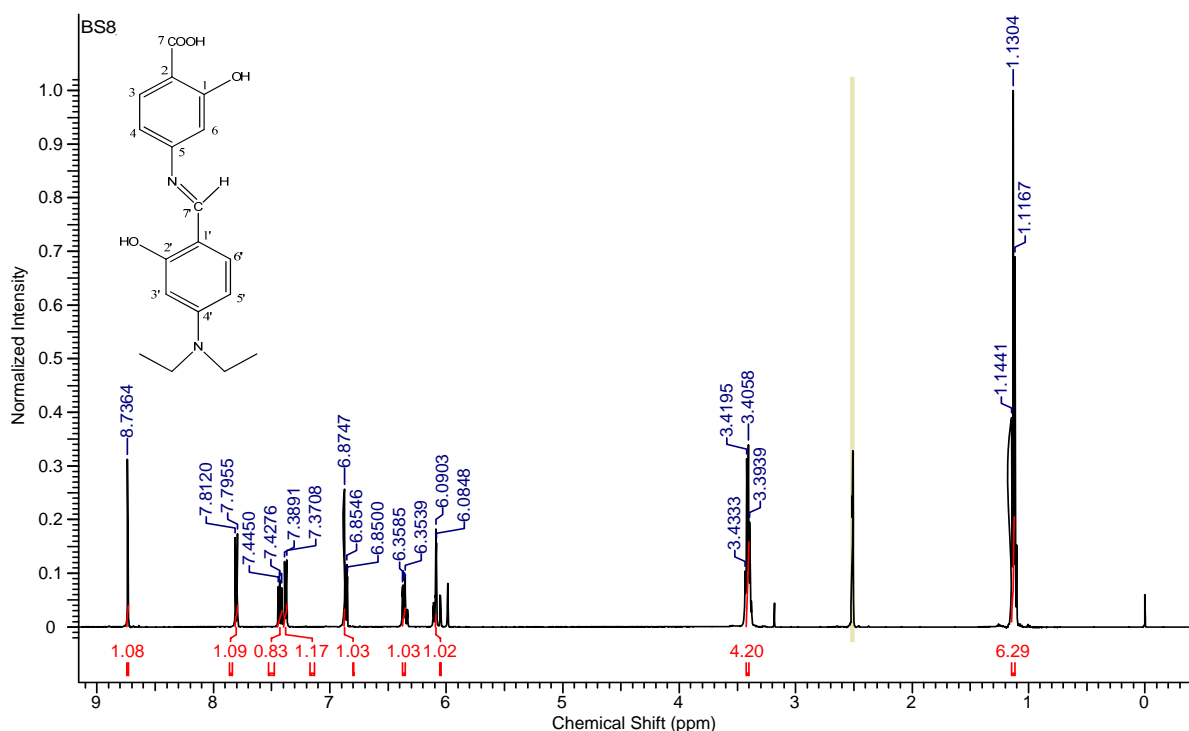


FIGURA 4.31 – Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) do ligante BS8.

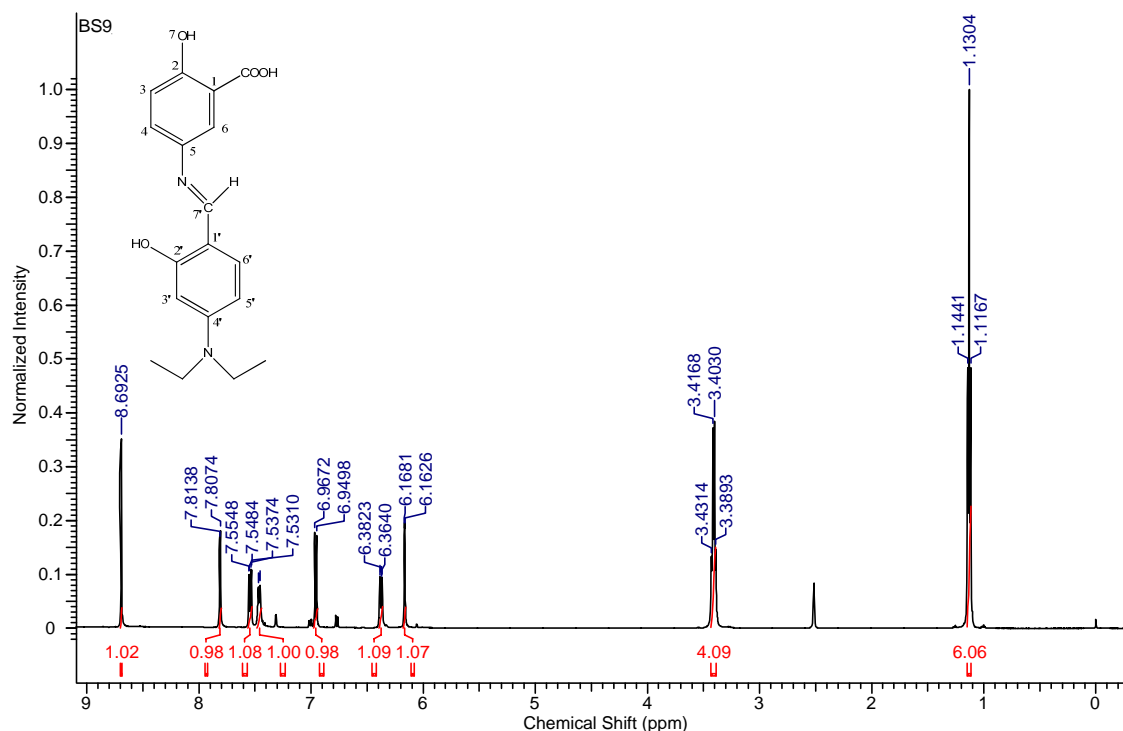


FIGURA 4.32 – Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) do ligante BS9.

O conjunto de sinais dos hidrogênios equivalentes do substituinte etil são evidenciados na região mais blindada do espectro, mais próximos ao TMS. No substituinte dos ligantes BS8 e BS9 existem dois tipos de hidrogênios que diferem o sinal quando caracterizados. A princípio a diferença desses sinais pode ser distinguida observando-se a multiplicidade dos picos, onde temos que a multiplicidade do sinal para um determinado núcleo é dada pela relação desse núcleo com a vizinhança, sendo assim segue a fórmula $n + 1$, em que n é o número de hidrogênios o qual o núcleo está sob efeito de ressonância. Desta forma, é possível prever as características básicas dos sinais para cada núcleo apenas pela multiplicidade do sinal (PAVIA *et al.*, 2010).

Pela regra $(n + 1)$, teoria esplanada e de acordo com as figuras 4.33 e 4.34 ampliadas, os sinais de multiplicidade tripleto (t) em δ_{H} 1,1167-1,1441 ppm para ambas as bases (BS8 e BS9), são atribuídos aos hidrogênios $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ dos dois substituintes etil equivalentes, enquanto que o quadrupeto, ou quarteto (q) em δ_{H} 3,3939-3,4333 ppm para BS8 e δ_{H} 3,3893-3,4314 ppm para BS9 são atribuídos aos hidrogênios $-\text{CH}_2\text{CH}_3$, dos substituintes etil equivalentes. Tais designações são

confirmadas pelos valores de integrais calculados, onde, com base neles, é possível identificar a quantidade de núcleos referentes a cada sinal.

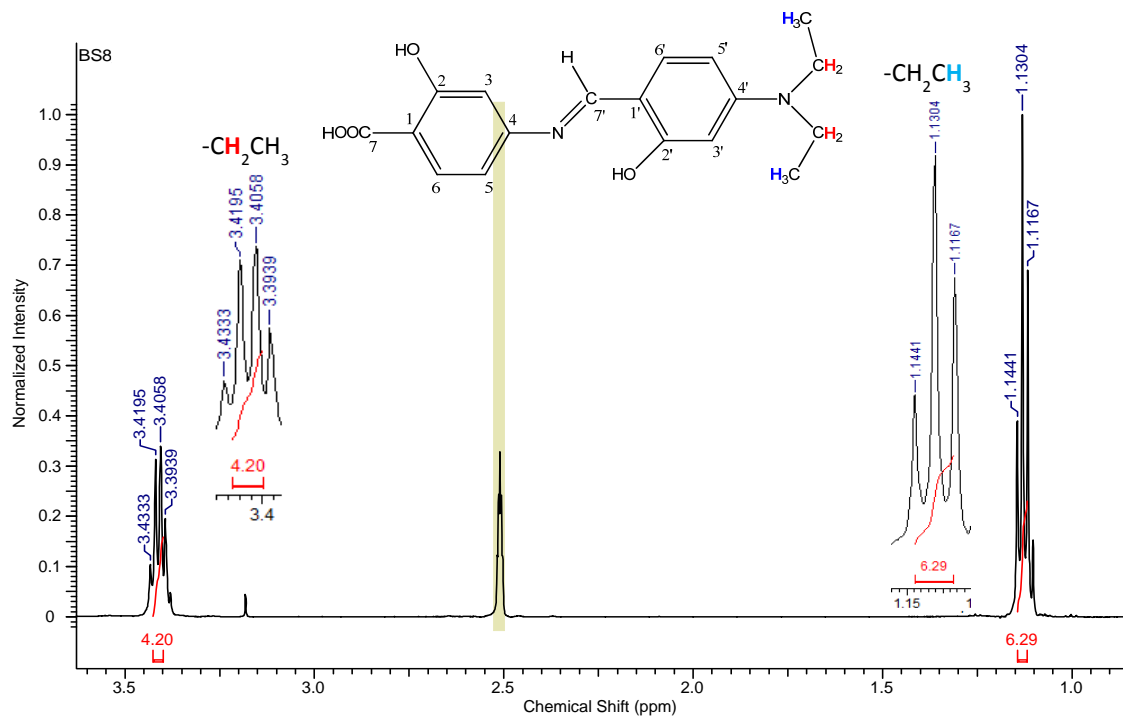


FIGURA 4.33 – Espectro de RMN de ^1H (DMSO-d_6 , 500 MHz) na região ampliada para o ligante BS8.

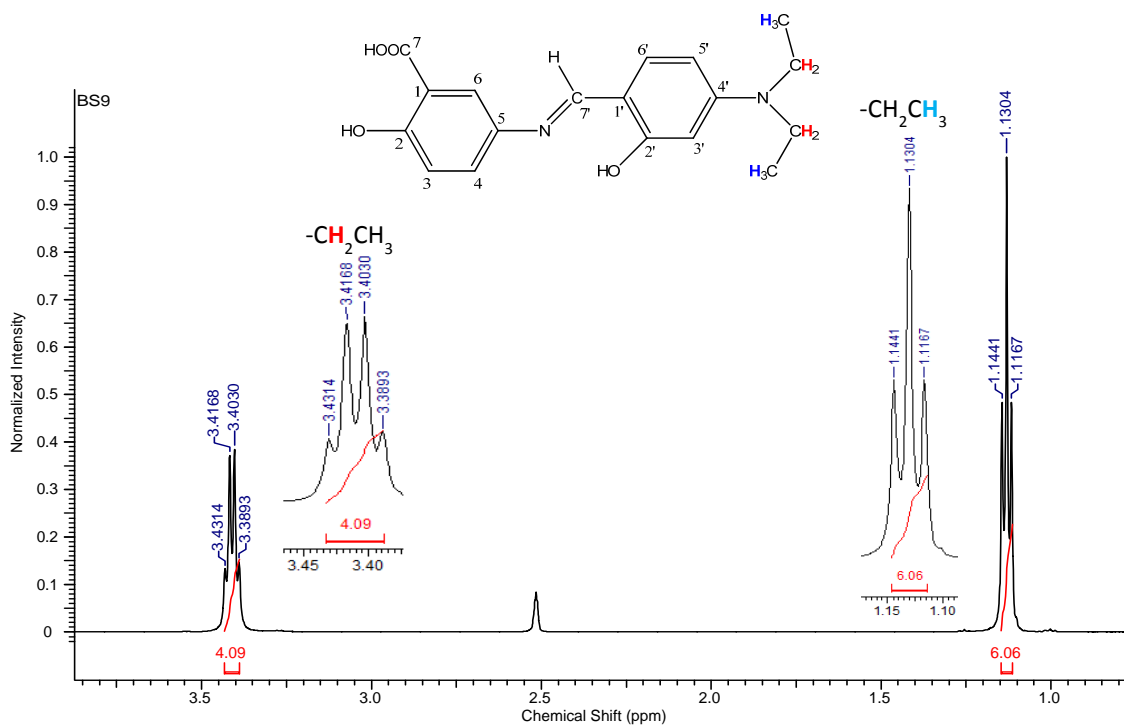


FIGURA 4.34 – Espectro de RMN de ^1H (DMSO-d_6 , 500 MHz) na região ampliada para o ligante BS9.

O sinal do hidrogênio imínico aparece na região mais desblindada do espectro, com multiplicidade singlete, para ambos os compostos.

De forma semelhante aos que já foram apresentados, os demais sinais seguem o mesmo padrão de atribuição, aqui de forma mais clara e reforçada pela comparação de regiões próximas para os dois produtos, conforme figura 4.35.

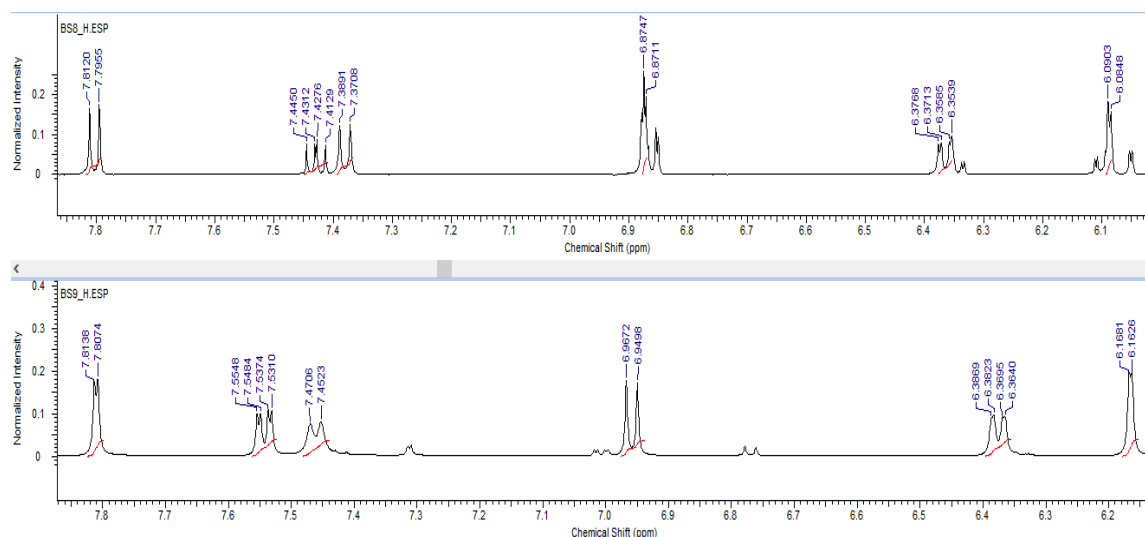


FIGURA 4.35 – Comparação entre regiões ampliadas do espectro de RMN de ¹H (DMSO-d₆, 500 MHz) para os ligantes BS8 e BS9.

Apesar das semelhanças apresentadas, as caracterizações dos sinais diferem em termos de deslocamento químico e conseqüentemente atribuição dos mesmos, como podem ser evidenciadas baseando-se nos espectros ampliados e caracterizados separadamente, conforme as figuras 4.36 e 4.37.

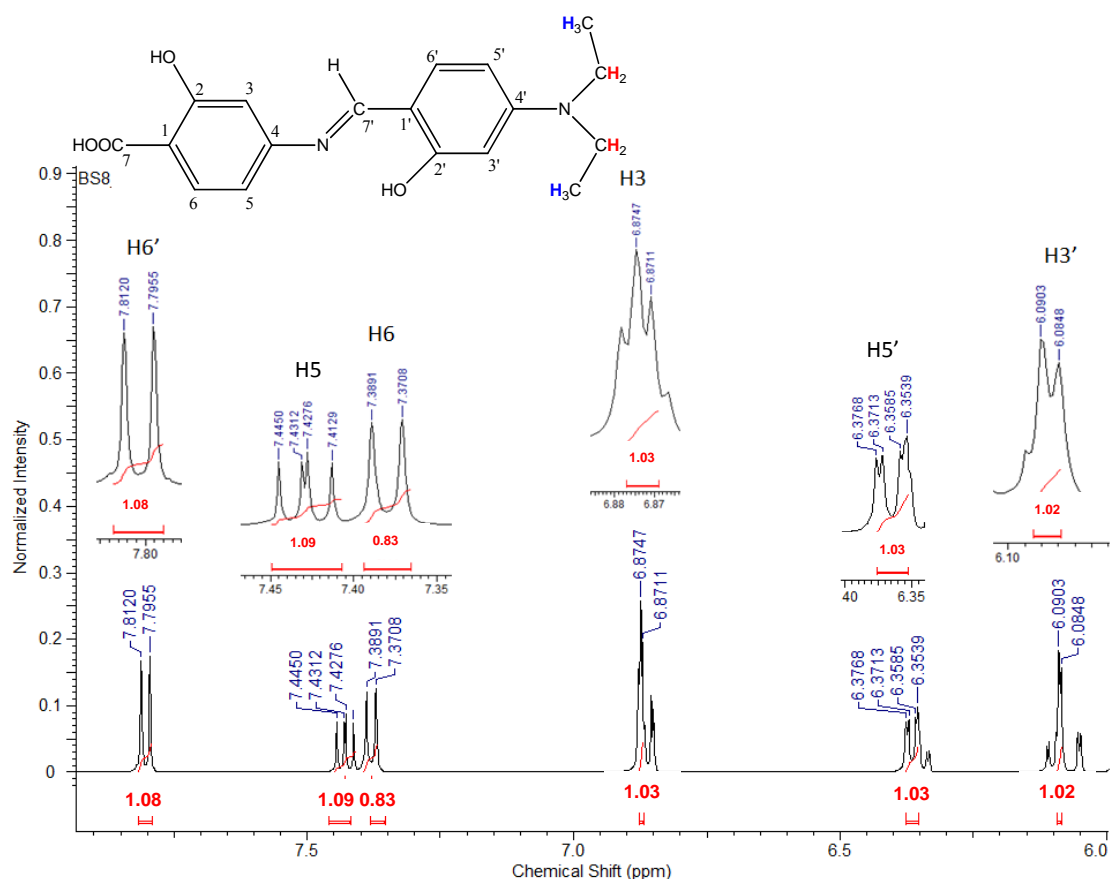


FIGURA 4.36 – Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) na região ampliada para o ligante BS8.

Dos compostos sintetizados, esses são os que apresentam sinais a serem melhor atribuídos. Além de todos os grupos semelhantes aos compostos anteriormente já citados, para os ligantes BS8 e BS9 há presença de grupos mais volumosos, esses que além de influenciarem a partir do considerável impedimento estérico, influenciam na densidade do anel, uma vez que tais grupos são do tipo N-R_2 , por efeito indutivo doador de elétrons. Os carbonos do substituinte doam densidade ao nitrogênio, que por si só comporta tal carga. O mesmo com par de elétrons remanescente e hibridizado em sp^3 participa da ressonância, contribuindo ainda mais para o acúmulo de densidade eletrônica no anel, e consequentemente, para blindagem dos sinais dos núcleos próximos. Desta forma, o dubleto mais blindado, em virtude ao que já foi explanado, em δ_{H} 6,0848-6,0903 ppm é atribuído ao $\text{H3}'$, o mesmo que acopla em *meta* com o $\text{H5}'$, como confirmado pelo valor da constante $^4\text{J} = 2,75$ Hz. O dd próximo é caracterizado para o $\text{H5}'$ ($^4\text{J} = 2,75$ Hz e $^3\text{J} = 9,16$ Hz), da mesma forma que os dubletos em deslocamentos intermediários do espectro são caracterizados como sendo do H3 (δ_{H}

6,8711-6,8747 ppm) e H6 (δ_H 7,3708-7,3891 ppm), sendo que o primeiro acopla em *meta* com H5 ($^4J = 1,83$ Hz) e o segundo em *orto* com H5 ($^3J = 9,16$ Hz).

O dd presente na região mais desblindada é atribuído ao sinal do H5, da mesma forma que o dupletto mais desblindado ao H6', ambos presentes em tal região provenientes as contribuições dos grupos retiradores de densidade próximos, os mesmos que favorecem para a maior ressonância dos núcleos.

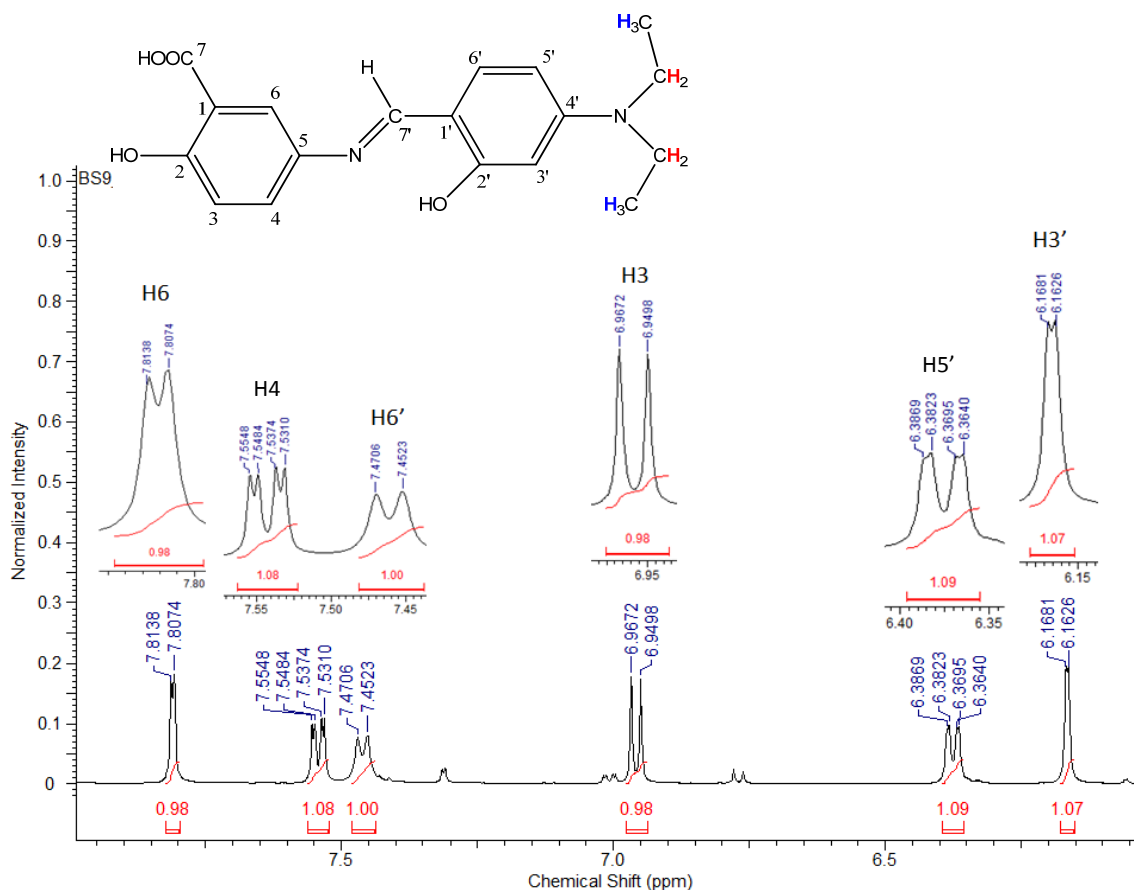


FIGURA 4.37 – Espectro de RMN de 1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) na região ampliada para o ligante BS9.

Semelhantemente ao que já foi apresentado, o dupletto encontrado na região mais blindada é atribuído ao H3' (δ_H 6,1626-6,1681 ppm), acoplado em *meta* com H5' ($^4J = 2,75$ Hz). O dd próximo a essa região é equivalente ao H5', este que acopla em *orto* com H6' ($^3J = 8,70$ Hz) e em *meta* com H3' ($^4J = 2,29$).

Os dubletos presentes na região mediana, de deslocamentos δ_H 6,9498-6,9272 ppm e δ_H 7,4523-7,4706 ppm, são apresentados aos H3 e H6', ambos acoplados em *orto* com H4 e H5' ($^3J = 8,70$ Hz e $^3J = 9,16$ Hz), respectivamente.

Já na região mais desblindada do espectro espera-se obter sinais de hidrogênios próximos a grupos anisotrópicos, ou mesmo, grupos que favoreçam no deslocamento da densidade da estrutura. Desta forma, o dd nessa mesma região é designado ao sinal de H4 ($^3J = 8,70$ Hz e $^4J = 2,29$ Hz) e o dubleto mais desblindado ao H6 ($^4J = 2,75$ Hz).

4.6 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI)

De acordo com a aplicabilidade das bases de Schiff explanada anteriormente, resolveu-se avaliar a atividade dos compostos sintetizados como forma de determinar o quão eficiente os mesmos são, frente a uma linhagem de estirpes bacterianas comumente associadas a infecções evidenciadas em humanos.

Os resultados dos ensaios microbiológicos foram avaliados conforme a inibição das estirpes, desta forma os mesmos são apresentados em conformidade com diferentes controles, sendo eles o positivo, o negativo, e os respectivos fármacos precursores.

O controle positivo, coluna 11, foi designado para a inibição total dos microrganismos, o negativo (12) ao crescimento, e os demais controles foram a título de comparação, uma vez que os mesmos já apresentam atividade, bem como formam parte da estrutura sintetizada (4- e 5-ASA).

Dois diferentes ensaios foram realizados, os quais diferiram no passo de preparo das amostras.

Os resultados para a primeira batelada de ensaios, com soluções a 25% de DMF, apresentaram uma tendência um tanto quanto diferenciada. As cepas microbianas cresceram em uma faixa específica da placa, na região mediana da mesma, enquanto que a inibição foi percebida nas suas extremidades (Figura 4.38).

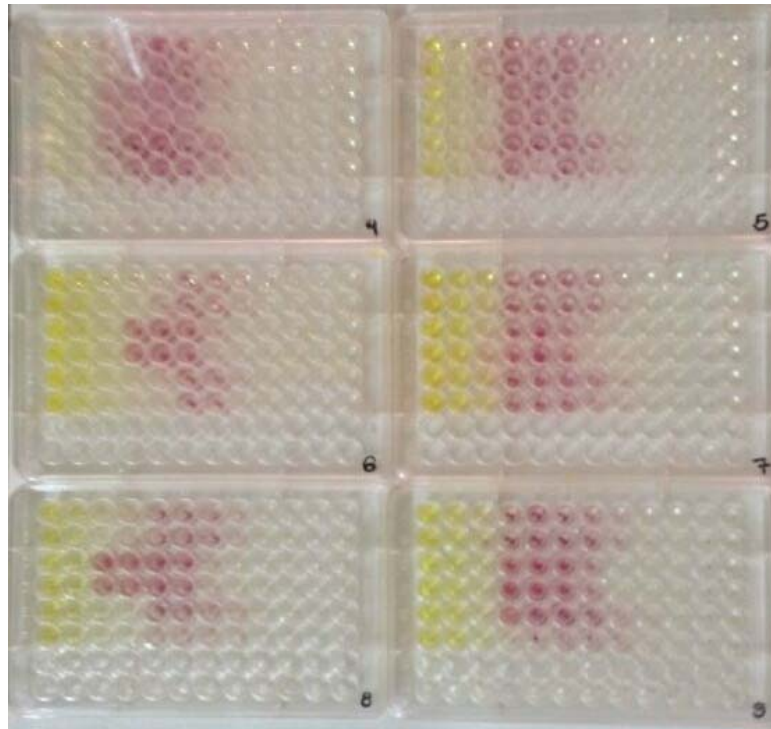


FIGURA 4.38 – Revelação por TCT da primeira batelada de ensaios microbiológicos. Colocação rósea evidenciando o crescimento bacteriano, translúcido morte.

Um fato interessante e inesperado é que nenhum crescimento foi observado no controle negativo (12). Essa ocorrência gera vários questionamentos, tanto sobre o desenvolvimento do protocolo quanto sobre a real atividade dos compostos.

A ocorrência de um resultado tendencioso para todas as placas descarta a possibilidade de erro humano na execução do ensaio. Em contrapartida abre perspectiva sobre a explicação da atividade apresentada para os mesmos.

Segundo resolução presente no protocolo da CLSI M07-A9 (2002), soluções estoque com a 25% de DMF são alternativas para preparação de soluções dos compostos a serem testados, no entanto, baseado na prática realizada, ficou claro que a presença do DMF interfere nos resultados, favorecendo inclusive em um resultado falso positivo.

Barry e Lasner (1975) obtiveram um resultado semelhante diante seus ensaios de atividade microbiológica do composto nitrofurantoína. Fazendo uso do mesmo meio de preparação da solução estoque e utilizando a mesma para diferentes linhagens bacterianas, descreveu em seu trabalho uma observação similar. Trabalhando com concentrações de 2,0, 1,0, 0,4, 0,2, e 0,1 mL de DMF em 20 mL de caldo MH foi

observado que para os ensaios que continham uma maior concentração de DMF, 2,0 e 1,0 mL, inibiram completamente o crescimento das estirpes, bem como o crescimento vertiginoso das cepas foi observado para concentrações medianas, 0,4 e 0,2 mL, assim como é observado para os ensaios aqui apresentados.

Acredita-se que em altas concentrações, a presença de DMF seja considerada tóxica para os microrganismos, ao passo em que a redução dessas concentrações favorece o crescimento por meio da nutrição do metabolismo dos microrganismos, os mesmos que se oportunizam da presença de possíveis substratos presentes no meio, os quais são mediados pelas interações com o próprio DMF (BARRY e LASNER, 1975).

Desta forma, nenhum antagonismo claro ou sinergismo entre os compostos poderiam ser documentados, pois as reais concentrações inibidoras dos mesmos foram mascararam pelos efeitos do próprio DMF, pelos motivos já documentados.

Em decorrência de um primeiro resultado não satisfatório, um segundo ensaio foi realizado, porém em outro meio de solução (DMSO 1%). Os valores de inibição bacterianos obtidos a partir desses são apresentados na tabela 4.8 e adicionalmente nos gráficos das figuras 4.39 e 4.40, esses últimos que correlacionam às bases sintetizadas, cada qual com o fármaco precursor específico, fazendo uma correlação direta dos valores de CMI para ambos.

TABELA 4.8 – Resultado da CMI das bases de Schiff sintetizadas nas diferentes doses espécies microbiológicas testadas.

Microrganismos	Ligantes (Bases de Schiff)							
	CMI ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)							
	4-ASA	5-ASA	BS4	BS5	BS6	BS7	BS8	BS9
<i>E. coli</i>	128	256	512	**512	64	**256	**256	**512
<i>P. aeruginosa</i>	256	512	512	**512	128	**512	512	**256
<i>S. aureus</i>	128	256	512	**512	64	**256	**256	**512

** CMI₅₀ – Concentração mínima inibitória de 50 % da população.

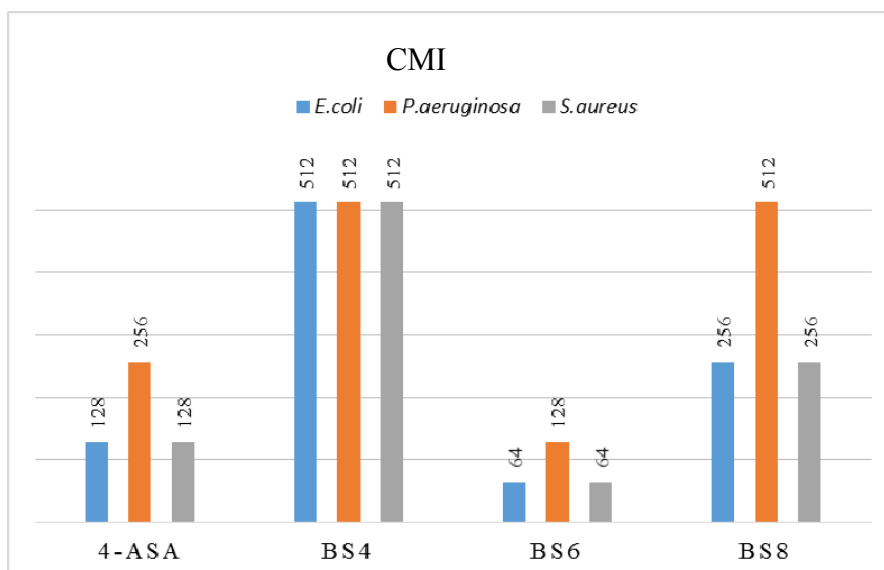


FIGURA 4.39 – Gráfico que apresenta a relação das bases de Schiff com seu respectivo fármaco precursor (4-ASA).

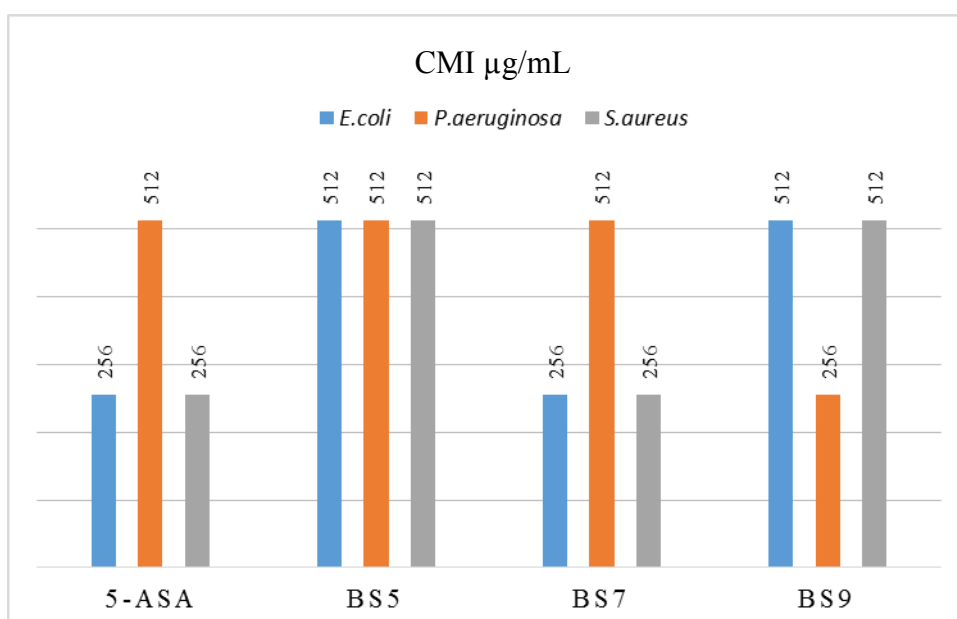


FIGURA 4.40 – Gráfico que apresenta a relação das bases de Schiff com seu respectivo fármaco precursor (5-ASA).

De forma geral, os resultados para as bases de Schiff modificadas a partir do 4-ASA apresentaram melhores valores de CMI quando relacionados às demais, entretanto não são tão satisfatórias, uma vez que possui CMI elevada até mesmo quando comparados aos controles dos fármacos.

Não há nada referenciado sobre tais compostos na literatura, tampouco sobre a sua aplicação, visto que a sua obtenção é inédita. Sendo assim, o embasamento aqui apresentado é tido de forma generalizada.

O que é esperado para o resultado dos ensaios microbiológicos é que os valores de CMI encontrados sejam os menores possíveis, o que não é o caso para esses. A inibição não foi obtida na faixa esperada (baixas concentrações), assim como é evidente a maior resistência das cepas por parte de um grupo de produtos (BS4 e BS5).

O produto BS6 foi o que apresentou uma CMI mais baixa, sendo duas vezes menor que o próprio controle 4-ASA. Essa ocorrência é considerada interessante do ponto de vista microbiológico. A redução de metade da CMI oferece grandes benefícios ao passo que é capaz de exercer uma mesma função como agente antimicrobiano em uma concentração bem reduzida, o que é capaz de reduzir inclusive os efeitos adversos que alguns antibióticos podem vir a causar no organismo, ainda mais quando em altas concentrações.

A maior tenacidade apresentada pela estirpe *P. aeruginosa* é explicitada em decorrência de ser um microrganismo mais resistente, em comparação com os demais. Essa peculiaridade é explicada em virtude dessa espécie ser Gram-negativa, a mesma que possui uma parede celular mais complexa, composta por uma camada extra de polissacarídeos (LPS) que dificulta a absorção por parte dos antibióticos e outros medicamentos, sobressaindo, portanto, aos agentes antimicrobianos (LEVY, 2004; KAYSER, 2005).

Outro fator pode ser mencionado ainda em relação à resistência por parte desta. Múltiplos mecanismos de resistência associados a enzimas modificadoras podem ser expressos, os mesmos que acabam conferindo uma resistência natural ou adquirida a um grande número de antibióticos, dificultando o tratamento e reduzindo as opções terapêuticas (AZZOPARDI *et al.*, 2011).

Apesar da maior resistência aos compostos apresentada por parte da espécie *P. aeruginosa*, esta foi melhor suprimida na presença do ligante BS9, o mesmo que reduziu a concentração tóxica suficiente para inibir seu metabolismo pela metade, o que apresenta-se como um resultado satisfatório tendo em vista a maior prevalência de resistência por parte dessa espécie, como já reportado.

A explicação para essa peculiaridade ainda não foi definida, em virtude até mesmo da complexidade de ação e combate dessa espécie, entretanto baseando-se nos mecanismos de resistência aos antibióticos por parte desta, pode-se prever que a ação de algum desses mecanismos esteja sendo afetado, ou até mesmo bloqueado, desencadeando assim a inibição do crescimento bacteriano ou até mesmo a morte do microrganismo quando na presença do composto.

De um modo geral, mesmo que em concentrações elevadas os resultados CMI mostraram-se satisfatórios para as estirpes estudadas com destaque para a BS6 que apresentou resultado de inibição em uma concentração reduzida a metade comparada ao controle do fármaco, e ainda a BS9 com grande potencial antimicrobiano para a espécie *P. aeruginosa*.

CAPÍTULO 5

5 CONCLUSÕES

A síntese de seis novas bases de Schiff foi obtida, obtendo-se rendimentos satisfatórios, sendo as estruturas dos produtos confirmados pelo conjunto de técnicas de caracterização utilizado, mediados, em um primeiro momento, pela diferença das faixas de fusão quando comparadas aos pontos de fusão dos precursores, correspondência dos valores das caracterizações elementares CHN e sendo confirmados pelos resultados espectroscópicos.

A evidência da formação dos compostos foi dada pela presença de uma banda de deformação axial (ν) da ligação C=N nos espectros dos produtos, ligação característica de iminas, e ausência da banda de deformação axial da ligação N-H das aminas dos fármacos. Os espectros de UV-Vis confirmaram a estrutura dos compostos obtidos com base na presença de bandas características do cromóforo majoritário, representado pela extensão da conjugação do sistema, e por fim, a estrutura foi confirmada com base nas atribuições dos sinais do espectro de ^1H RMN aos hidrogênios característicos da molécula.

A aplicação das bases de Schiff como agentes antimicrobianos, avaliada frente a diferentes estirpes, exibiu uma resposta satisfatória. Ainda que os compostos tenham demonstrado atividade em CMI elevada, notou-se uma atividade melhorada, em relação aos controles dos fármacos, para os produtos sintetizados BS6 e BS9, os mesmos que abrem grande perspectiva de melhor avaliação como agente terapêutico.

Em suma, conclui-se que a obtenção de compostos pertencentes a essa classe compreendem uma alternativa interessante do ponto de vista biológico, visto que a sua utilização é muito visada como agente antimicrobiano e mesmo terapêutico, em decorrência de toda a sua versatilidade estrutural e sintética.

CAPÍTULO 6

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

13676, E. O. **Combating Antibiotic-resistant Bacteria**. REGISTER, F.: Washington. 80 2014.

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Cellular and Molecular Immunology: Electronic Slide**. Elsevier Books, Oxford, 2000.

ABDEL-KADER, N. S.; EL-ANSARY, A. L.; EL-TAYEB, T. A.; ELNAGDI, M. M. F. Synthesis and characterization of Schiff base complexes derived from cephradine: Fluorescence, photostability and photobiological applications. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 321, p. 223-237, 2016.

ABU-DIEF, A. M.; MOHAMED, I. M. A. A review on versatile applications of transition metal complexes incorporating Schiff bases. **Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 4, n. 2, p. 119-133, 2015.

ADNAN, S. A.-S.; MIKA, K. Platinum Group Antitumor Chemistry: Design and development of New Anticancer Drugs Complementary to Cisplatin. **Current Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 11, p. 1337-1357, 2006.

AMAVISIT, P.; MARKHAM, P. F.; LIGHTFOOT, D.; WHITHEAR, K. G.; BROWNING, G. F. Molecular epidemiology of Salmonella Heidelberg in an equine hospital. **Veterinary Microbiology**, v. 80, n. 1, p. 85-98, 2001.

ANDRADE, G. P. D.; ZELANTE, F. Ocorrência simultânea de Staphylococcus aureus enterotoxigênicos nas mãos, boca e fezes em portadores assintomáticos. **Revista de Saúde Pública**, v. 23, p. 277-284, 1989.

ANDREWS, J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, n. suppl 1, p. 5-16, July 1, 2001.

ATAHAN, A.; DURMUS, S. 1-Amino-2-hydroxy-4-naphthalenesulfonic acid based Schiff bases or naphtho[1,2-d]oxazoles: Selective synthesis and photophysical properties. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 144, p. 61-67, 2015.

AWUAL, M. R.; ELDESOKY, G. E.; YAITA, T.; NAUSHAD, M.; SHIWAKU, H.; ALOTHMAN, Z. A.; SUZUKI, S. Schiff based ligand containing nano-composite adsorbent for optical copper(II) ions removal from aqueous solutions. **Chemical Engineering Journal**, v. 279, p. 639-647, 2015.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. A questão da inovação em fármacos no Brasil: proposta de criação do programa nacional de fármacos (Pronfar). **Química Nova**, v. 28, p. S56-S63, 2005.

BARRY, A. L.; LASNER, R. A. Inhibition of Bacterial Growth by the Nitrofurantoin Solvent Dimethylformamide. **AWNMICROIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY**, v. 9, n. 3, p. 549-550, 1975.

BEN-HORIN, S.; KOPYLOV, U.; CHOWERS, Y. Optimizing anti-TNF treatments in inflammatory bowel disease. **Autoimmunity Reviews**, v. 13, n. 1, p. 24-30, 2014.

BIONDO-SIMÕES, M. D. L. P.; TETILLA, M. R.; BIONDO-SIMÕES, R.; MARTIN, M. M.; REPKA, J. C. D.; ZANATO, D. A influência da nicotina na densidade de

- colágeno em cicatrizes cutâneas, em ratos. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 36, p. 425-430, 2009.
- BROWN, E. D. Is the GAIN Act a turning point in new antibiotic discovery? **Canadian Journal of Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 153-156, 2013.
- BUTLER, M. S.; BLASKOVICH, M. A.; COOPER, M. A. Antibiotics in the clinical pipeline in 2013. **J Antibiot**, v. 66, n. 10, p. 571-591, 2013.
- CALTABIANO, C. **AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO ÁCIDO 5-AMINOSALICÍLICO CONTRA O DANO OXIDATIVO AO DNA NA COLITE DE EXCLUSÃO. ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS**. 97 Mestrado (Mestre). Ciências da Saúde, Universidade São Francisco, Bragança Paulista, 2010.
- CANTOR, C. R.; SCHIMMEL, P. R. **Biophysical Chemistry: Part I**. San Francisco: Freeman and Company, 1980.
- CANTORNA, M. T.; MUNSICK, C.; BEMISS, C.; MAHON, B. D. 1,25-Dihydroxycholecalciferol prevents and ameliorates symptoms of experimental murine inflammatory bowel disease. **Journal of Nutrition**, v. 130, p. 2648-1652, 2000.
- CAREY, F. A. **Organic Chemistry**. Mc Graw Hill Higher Education, 2008.
- CDCP, C. F. D. C. A. P. **ANTIBIOTIC RESISTANCE THREATS** 2013.
- CHAKRABORTI, A. K.; BHAGAT, S.; RUDRAWAR, S. Magnesium perchlorate as an efficient catalyst for the synthesis of imines and phenylhydrazones. **Tetrahedron Letters**, v. 45, n. 41, p. 7641-7644, 2004.
- CHAUDHARY, B. L.; SRIVASTAVA, S.; SINGH, B. N.; SHAKLA, S. Nosocomial Infection due to Multidrug Resistant (MDR) Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae in Intensive Care Unit. **Journal Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 3, n. 8, p. 630-635, 2014.
- CHINSEMBU, K. C. Tuberculosis and nature's pharmacy of putative anti-tuberculosis agents. **Acta Tropica**, v. 153, p. 46-56, 2016.
- CHRISTOFILOGIANNIS, P. Current inoculation methods in MIC determination. **Aquaculture**, v. 196, n. 3-4, p. 297-302, 2001.
- CISTERNA, J.; DORCET, V.; MANZUR, C.; LEDOUX-RAK, I.; HAMON, J.-R.; CARRILLO, D. Synthesis, spectral, electrochemical, crystal structures and nonlinear optical properties of unsymmetrical Ni(II) and Cu(II) Schiff base complexes. **Inorganica Chimica Acta**, v. 430, p. 82-90, 2015.
- CLAYDEN, J. **Organic Chemistry**. Oxford University Press, 2001.
- CLSI, C. A. L. S. I. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition -M07-A9**. 2002.
- COOPER, M. A.; SHLAES, D. Fix the antibiotics pipeline. **Nature**, v. 472, n. 7341, p. 32, 2011.
- COTTON, F. A. **Advanced Inorganic Chemistry**. Wiley, 1999.

- COZZI, P. G. Metal-Salen Schiff base complexes in catalysis: practical aspects. **Chemical Society Reviews**, v. 33, n. 7, p. 410-421, 2004.
- DA SILVA, C. M.; DA SILVA, D. L.; MODOLO, L. V.; ALVES, R. B.; DE RESENDE, M. A.; MARTINS, C. V. B.; DE FÁTIMA, Â. Schiff bases: A short review of their antimicrobial activities. **Journal of Advanced Research**, v. 2, n. 1, p. 1-8, 2011.
- DAS, P.; LINERT, W. Schiff base-derived homogeneous and heterogeneous palladium catalysts for the Suzuki–Miyaura reaction. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 311, p. 1-23, 2016.
- DASGUPTA, Q.; MADRAS, G.; CHATTERJEE, K. Controlled release kinetics of p-aminosalicylic acid from biodegradable crosslinked polyesters for enhanced anti-mycobacterial activity. **Acta Biomaterialia**, v. 30, p. 168-176, 2016.
- DE MELO FRANCO, B. D. G.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. Atheneu, 1996.
- DE TOLEDO, T. A.; DA COSTA, R. C.; DA SILVA, L. E.; TEIXEIRA, A. M. R.; LIMA, V. N.; SENA JR, D. M.; COUTINHO, H. D. M.; FREIRE, P. T. C.; PIZANI, P. S. Thermal and biological properties of the Schiff base N,N'-bis(salicylidene)-1,2-phenylenediamine, a potential adjuvant to antibiotic therapy. **Journal of Molecular Structure**, v. 1115, p. 105-108, 2016.
- DHANESHWAR, S. S.; CHAIL, M.; PATIL, M.; NAQVI, S.; VADNERKAR, G. Colon-specific mutual amide prodrugs of 4-aminosalicylic acid for their mitigating effect on experimental colitis in rats. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 1, p. 131-142, 2009.
- DIEKEMA, D. J.; PFALLER, M. A.; SCHMITZ, F. J.; SMAYEVSKY, J.; BELL, J.; JONES, R. N.; BEACH, M. Survey of infections due to Staphylococcus species: Frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, n. 10 SUPPL. 2, p. S114-S132, 2001.
- DONALD, P. R.; DIACON, A. H. Para-aminosalicylic acid: the return of an old friend. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 15, n. 9, p. 1091-1099, 2015.
- DRASAR, B. S.; SHINER, M. Studies on the intestinal flora : Part II Bacterial flora of the small intestine in patients with gastrointestinal disorders. **Gut**, v. 10, n. 10, p. 812-819, 1969.
- ECHEVARRIA, A. E.-S. A.; SANT'ANNA, C. M. R.; NASCIMENTO, M. D. G. Estudo Experimental Da Redução De Schiff Derivadas Da 3,3-Difenilpropilamina. **QUIMICA NOVA**, v. 27, n. 1, p. 72-75, 2004.
- EL-BINDARY, A. A.; SHOAIR, A. F.; EL-SONBATI, A. Z.; DIAB, M. A.; ABDO, E. E. Geometrical structure, molecular docking and potentiometric studies of Schiff base ligand. **Journal of Molecular Liquids**, v. 212, p. 576-584, 2015.
- ESTEVEZ-SOUZA, A.; ECHEVARRIA, A.; SANT'ANNA, C. M. R.; NASCIMENTO, M. D. G. Estudo experimental e teórico da redução de bases de Schiff derivadas da 3,3-difenilpropilamina. **Química Nova**, v. 27, p. 72-75, 2004.

- FORREST, S. R.; THOMPSON, M. E. Introduction: Organic Electronics and Optoelectronics. **Chemical Reviews**, v. 107, n. 4, p. 923-925, 2007.
- GABALLA, A. S.; ASKER, M. S.; BARAKAT, A. S.; TELEB, S. M. Synthesis, characterization and biological activity of some platinum(II) complexes with Schiff bases derived from salicylaldehyde, 2-furaldehyde and phenylenediamine. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 67, n. 1, p. 114-121, 2007.
- GALLARDO, H.; SANTOS, D.; BORTOLUZZI, A. J. 2-(4-Bromophenyl)-5-dodecyloxy-1,3-thiazole. **Acta Crystallographica Section E**, v. 66, n. 2365, 2010.
- GAO, C.; SHIN, W.; HAN, J.; HAN, D.; CHARI, A.; KIM, H.; AHN, K.-H. A Green Protocol for Asymmetric Epoxidation of Olefins Catalyzed by Carbon Dioxide Soluble Chiral Salen-Mn(III) Complexes in Supercritical CO₂. **Bull. Korean Chem. Soc.**, v. 30, n. 3, p. 541-542, 2009.
- GAUGLITZ, G.; MOORE, D. S. **Handbook of Spectroscopy, 4 Volume Set**. Wiley, 2014.
- GELATTI, L. C.; BONAMIGO, R. R.; BECKER, A. P.; D'AZEVEDO, P. A. Staphylococcus aureus resistentes à meticilina: disseminação emergente na comunidade. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, p. 501-506, 2009.
- GENTRY, D. R.; MCCLOSKEY, L.; GWYNN, M. N.; RITTENHOUSE, S. F.; SCANGARELLA, N.; SHAWAR, R.; HOLMES, D. J. Genetic characterization of Vga ABC proteins conferring reduced susceptibility to pleuromutilins in Staphylococcus aureus. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 12, p. 4507-4509, 2008.
- GIL, V. M. S.; DE GUSMÃO CAMPOS GERALDES, C. F. **Ressonância magnética nuclear: fundamentos, métodos e aplicações**. Fundação Calouste Gulbenkian, 2002.
- GOULD, I. M. Antibiotic resistance: the perfect storm. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 34, Supplement 3, p. S2-S5, 2009.
- GOULD, I. M.; VAN DER MEER, J. W. M. **Antibiotic Policies: Controlling Hospital Acquired Infection**. Springer New York, 2011.
- HO, K. Y.; TSAI, C. C.; HUANG, J. S.; CHEN, C. P.; LIN, T. C.; LIN, C. C. Antimicrobial activity of tannin components from Vaccinium vitis-idaea L. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 53, n. 2, p. 187-191, 2001.
- HORÁCIO LOPES, A. C. Terapêutica farmacológica da Colite Ulcerosa. **Jornal Português de Gastreenterologia**, v. 16, p. 140-141, 2009.
- HWANG, T. J.; POWERS, J. H.; CARPENTER, D.; KESSELHEIM, A. S. Accelerating innovation in rapid diagnostics and targeted antibacterials. **Nature Biotechnology**, v. 33, n. 6, p. 589-590, 2015.
- JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. Artmed, 2005.
- JAY, J. M.; VILAS, J. M. T. **Microbiología moderna de los alimentos**. Acribia, 1981.
- JAYANDRAN, M.; MUHAMED, H. M.; BALASUBRAMANIAN, V. Synthesis, characterization and biological activities of turmeric curcumin schiff base complex.

- International Journal of Chemical and Natural Sciences**, v. 2, n. 5, p. 157-163, 2014.
- KAUR, P.; KAUR, M.; DEPOTTER, G.; VAN CLEUVENBERGEN, S.; ASSELBERGHS, I.; CLAYS, K.; SINGH, K. Thermally stable ferrocenyl "push-pull" chromophores with tailorable and switchable second-order non-linear optical response: synthesis and structure-property relationship. **Journal of Materials Chemistry**, v. 22, n. 21, p. 10597-10608, 2012.
- KAYSER, F. H. **Medical Microbiology**. Georg Thieme Verlag, 2005.
- KHADRA, K. A.; MIZYED, S.; MARJI, D.; HADDAD, S. F.; ASHRAM, M.; FOUDEH, A. Synthesis of novel p-tert-butylcalix[4]arene Schiff bases and their complexes with C60, potential HIV-Protease inhibitors. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 136, Part C, p. 1869-1874, 2015.
- KIBLEUR, Y.; BROCHART, H.; SCHAAF, H.; DIACON, A.; DONALD, P. Dose Regimen of Para-Aminosalicylic Acid Gastro-Resistant Formulation (PAS-GR) in Multidrug-Resistant Tuberculosis. **Clinical Drug Investigation**, v. 34, n. 4, p. 269-276, 2014.
- KIM, Y. H.; KIM, M. H.; KIM, B. J.; KIM, J. J.; CHANG, D. K.; SON, H. J.; RHEE, P. L.; RHEE, J. C. Inhibition of cell proliferation and invasion in a human colon cancer cell line by 5-aminosalicylic acid. **Digestive and Liver Disease**, v. 41, n. 5, p. 328-337, 2009.
- KIMURA, Y. et al. Antimicrobial susceptibility and molecular characteristics of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in a Japanese secondary care facility. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 22, n. 1, p. 14-18, 2016.
- KNUTTON, S.; BALDINI, M. M.; KAPER, J. B.; MCNEISH, A. S. Role of plasmid-encoded adherence factors in adhesion of enteropathogenic Escherichia coli to HEp-2 cells. **Infection and Immunity**, v. 55, n. 1, p. 78-85, 1987.
- KOEHN, F. E. New strategies and methods in the discovery of natural product anti-infective agents: The mannopeptimycins. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, n. 9, p. 2613-2617, 2008.
- KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. **Koneman. Diagnostico Microbiologico/ Microbiological diagnosis: Texto Y Atlas En Color/ Text and Color Atlas**. Editorial Medica Panamericana Sa de, 2008.
- KRISHNARAJ, S.; MUTHUKUMAR, M.; VISWANATHAMURTHI, P.; SIVAKUMAR, S. Studies on ruthenium(II) Schiff base complexes as catalysts for transfer hydrogenation reactions. **Transition Met Chem**, v. 33, p. 643-648, 2008.
- LAKOWICZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. Springer US, 2007.
- LAWRENCE, T.; GILROY, D. W. Chronic inflammation: a failure of resolution? **International Journal of Experimental Pathology**, v. 88, n. 2, p. 85-94, 2007.
- LECOUR, H. Infecção em cuidados de saúde: perspectiva actual. 2010.
- LEHMANN, J. PARA-AMINOSALICYLIC ACID IN THE TREATMENT OF TUBERCULOSIS. **The Lancet**, v. 247, n. 6384, p. 15-16, 1946.

LEHMANN, J. The treatment of tuberculosis in Sweden with para-aminosalicylic acid; a review. **Diseases of the chest**, v. 16, n. 6, p. 684-703, 1949.

LEHMANN, J. The role of the metabolism of p-aminosalicylic acid (PAS) in the treatment of tuberculosis. Interaction with the metabolism of isonicotinic acid hydrazide (INH) and the synthesis of cholesterol. **Scandinavian journal of respiratory diseases**, v. 50, n. 3, p. 169-185, 1969.

LEVY, C. E. **Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde**. Brasília - DF: Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2004.

LI, F.; WU, G.; ZHENG, H.; WANG, L.; ZHAO, Z. Synthesis, colon-targeted studies and pharmacological evaluation of an anti-ulcerative colitis drug 4-Aminosalicylic acid- β -O-glucoside. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 108, p. 486-494, 2016.

LI, X.; FANG, C.; ZONG, Z.; CUI, L.; BI, C.; FAN, Y. Synthesis, characterization and anticancer activity of two ternary copper(II) Schiff base complexes. **Inorganica Chimica Acta**, v. 432, p. 198-207, 2015.

LUNESTAD, B. T.; FRANTZEN, S.; SVANEVIK, C. S.; ROIHA, I. S.; DUINKER, A. Time trends in the prevalence of Escherichia coli and enterococci in bivalves harvested in Norway during 2007–2012. **Food Control**, v. 60, p. 289-295, 2016.

MA, T. S.; GUTTERSON, M. Organic elemental analysis. **Analytical Chemistry**, v. 46, n. 5, p. 437-451, 1974.

MACEDO, J.; RODRIGUES, M. T.; NASCIMENTO-CARVALHO, C. M. C. Perspectivas no controle da infecção hospitalar. **Jornal de Pediatria**, v. 79, p. 277-278, 2003.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Brock Biology of Microorganisms**. Prentice Hall, 2000.

MAHMOUD, W. H.; MAHMOUD, N. F.; MOHAMED, G. G.; EL-SONBATI, A. Z.; EL-BINDARY, A. A. Synthesis, spectroscopic, thermogravimetric and antimicrobial studies of mixed ligands complexes. **Journal of Molecular Structure**, v. 1095, p. 15-25, 2015.

MALONE, D. L.; GENUIT, T.; TRACY, J. K.; GANNON, C.; NAPOLITANO, L. M. Surgical Site Infections: Reanalysis of Risk Factors. **Journal of Surgical Research**, v. 103, n. 1, p. 89-95, 2002.

MAS-MOYA, J.; SINGHI, A. D. The gross pathology of inflammatory bowel disease. **Diagnostic Histopathology**, v. 21, n. 7, p. 261-266, 2015.

MATSUMOTO, S.; WATANABE, N.; IMAOKA, A.; OKABE, Y. Preventive Effects of *Bifidobacterium*- and *Lactobacillus*-Fermented Milk on the Development of Inflammatory Bowel Disease in Senescence-Accelerated Mouse P1/Yit Strain Mice. **Digestion**, v. 64, n. 2, p. 92-99, 2001.

MAXSON, T.; MITCHELL, D. A. Targeted treatment for bacterial infections: prospects for pathogen-specific antibiotics coupled with rapid diagnostics. **Tetrahedron**, 2015.

MCCRAY, E.; ONORATO, I. The interaction of human immunodeficiency virus and multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis. In: BASTIAN, I. e PORTAELS, F.

(Ed.). **Multidrug-resistant Tuberculosis**: Springer Netherlands, v.1, cap. 4, p.45-57, 2000.

MEDEIROS, A. D. C.; AIRES NETO, T.; DANTAS FILHO, A. M.; PINTO JR, F. E. L.; UCHÔA, R. A. C.; CARVALHO, M. R. D. Infecção hospitalar em pacientes cirúrgicos de Hospital Universitário. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 18, p. 15-18, 2003.

MERLO, A. A.; GALLARDO, H.; TAYLOR, T. R. CRISTAIS LÍQUIDOS FERROELÉTRICOS - CLF. UMA ABORDAGEM SINTÉTICA. **Química Nova**, v. 24, n. 3, p. 354-362, 2001.

MEYER, R. B.; LIEBERT, L.; STERZELECKI, L.; KELLER, P. Ferroelectric liquid crystals. **Journal de Physique Lettres**, v. 36, n. 3, p. 69-71, 1975.

MICHELIN, D. C.; MORESCHI, P. E.; LIMA, A. C.; NASCIMENTO, G. G. F.; PAGANELLI, M. O.; CHAUD, M. V. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 316-320, 2005.

MLADENOVA, R.; IGNATOVA, M.; MANOLOVA, N.; PETROVA, T.; RASHKOV, I. Preparation, characterization and biological activity of Schiff base compounds derived from 8-hydroxyquinoline-2-carboxaldehyde and Jeffamines ED ®. **European Polymer Journal**, v. 38, n. 5, p. 989-999, 2002.

MOHINI, Y.; PRASAD, R. B. N.; KARUNA, M. S. L.; POORNACHANDRA, Y.; GANESH KUMAR, C. Synthesis, antimicrobial and anti-biofilm activities of novel Schiff base analogues derived from methyl-12-aminooctadec-9-enoate. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, n. 22, p. 5224-5227, 2014.

MOLNÁR, Á. Efficient, Selective, and Recyclable Palladium Catalysts in Carbon–Carbon Coupling Reactions. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 3, p. 2251-2320, 2011.

MONIER, M. Adsorption of Hg²⁺, Cu²⁺ and Zn²⁺ ions from aqueous solution using formaldehyde cross-linked modified chitosan–thioglyceraldehyde Schiff's base. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, n. 3, p. 773-781, 2012.

MORRISON, R. T.; BOYD, R. N. **Química orgánica**. Pearson Educación, 1998.

MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M.; TENOVER, F.; YOLKEN, R. H.; MORGAN, D. R. Manual of Clinical Microbiology (6th edn). **Trends in Microbiology**, v. 3, n. 11, p. 449-449, 1995.

NAGHIPOUR, A.; FAKHRI, A. Heterogeneous Fe₃O₄@chitosan-Schiff base Pd nanocatalyst: Fabrication, characterization and application as highly efficient and magnetically-recoverable catalyst for Suzuki–Miyaura and Heck–Mizoroki C–C coupling reactions. **Catalysis Communications**, v. 73, p. 39-45, 2016.

NAMAN, S. A.; JASSIM, A. H.; ALIAS, M. F. Photodecomposition of molybdenum(II) and tungsten(II) carbonyl complexes with triazole, benz-imidazole, and oxadiazole acetylinic derivatives. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 150, n. 1–3, p. 41-48, 2002.

NETO, J. B. F.; KRZYZANOWSKI, F. C.; DA COSTA, N. P. **O teste de tetrazólio em sementes de soja**. Londrina - PR: EMPRAPA-CNPSO: 72 p. 1998.

NIU, F.; YAN, K.-X.; PANG, L.; QU, D.; ZHAO, X.; YOU, Z. Synthesis and structural characterization of Schiff base copper(II) complexes with *Helicobacter pylori* urease inhibitory activities. **Inorganica Chimica Acta**, v. 435, p. 299-304, 2015.

OLIVEIRA, A. C. D.; KOVNER, C. T.; SILVA, R. S. D. Nosocomial Infection in an Intensive Care Unit in a Brazilian University Hospital. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 18, p. 233-239, 2010.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 301-307, 2008.

OWEN, T. **Fundamentals of UV-visible Spectroscopy: A Primer**. Hewlett Packard, 1996.

PAL, S. K.; KRISHNAN, A.; DAS, P. K.; SAMUELSON, A. G. Schiff base linked ferrocenyl complexes for second-order nonlinear optics. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 604, n. 2, p. 248-259, 2000.

PANDEYA, S. N.; SRIRAM, D.; NATH, G.; DE CLERCQ, E. Synthesis and antimicrobial activity of Schiff and Mannich bases of isatin and its derivatives with pyrimidine. **Il Farmaco**, v. 54, n. 9, p. 624-628, 1999.

PANNEERSELVAM, P.; NAIR, R. R.; VIJAYALAKSHMI, G.; SUBRAMANIAN, E. H.; SRIDHAR, S. K. Synthesis of Schiff bases of 4-(4-aminophenyl)-morpholine as potential antimicrobial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 40, n. 2, p. 225-229, 2005.

PATOLE, J.; SHINGNAPURKAR, D.; PADHYE, S.; RATLEDGE, C. Schiff base conjugates of p-aminosalicylic acid as antimycobacterial agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, n. 6, p. 1514-1517, 2006.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **INTRODUÇÃO A ESPECTROSCOPIA**. CENGAGE, 2010.

PELEG, A. Y.; HOOPER, M. D. Hospital-Acquired Infections Due to Gram-Negative Bacteria. **The New England Journal of Medicine**, v. 362, n. 19, p. 1804-1813, 2010.

PENNA, C.; MARINO, S.; VIVOT, E.; CRUAÑES, M. C.; DE D. MUÑOZ, J.; CRUAÑES, J.; FERRARO, G.; GUTKIND, G.; MARTINO, V. Antimicrobial activity of Argentine plants used in the treatment of infectious diseases. Isolation of active compounds from *Sebastiania brasiliensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, n. 1, p. 37-40, 2001.

PHAM, D.-D.; FATTAL, E.; TSAPIS, N. Pulmonary drug delivery systems for tuberculosis treatment. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 478, n. 2, p. 517-529, 2015.

PODOLSKY, D. K. Inflammatory Bowel Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 347, n. 6, p. 417-429, 2002.

PRIYADHARSHINI, N.; IYYAMPILLAI, S.; JOEL, C.; BENNIE, B. R.; SUBRAMANIAN, S.; VENKATESH, P. SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF Cu (II), Ni (II) AND Zn (II) COMPLEXES WITH

CURCUMIN AND METHYL SALICYLALDEHYDE. **Indo American Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 2, n. 11, 2015.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Artmed Editora, 2005.

RAJU, K. R. S. et al. 5-Aminosalicylic Acid attenuates allergen-induced airway inflammation and oxidative stress in asthma. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, v. 29, n. 2, p. 209-216, 2014.

RATLEDGE, C. Iron, mycobacteria and tuberculosis. **Tuberculosis**, v. 84, n. 1-2, p. 110-130, 2004.

RIEDEL, G. **Controle sanitário dos alimentos**. Atheneu, 2005.

ROCHA, D. P.; PINTO, G. F.; RUGGIERO, R.; OLIVEIRA, C. A. D.; GUERRA, W.; FONTES, A. P. S.; TAVARES, T. T.; MARZANO, I. M.; PEREIRA-MAIA, E. C. Coordenação de metais e antibióticos como uma estratégia de combate à resistência bacteriana. **Química Nova**, v. 34, p. 111-118, 2011.

ROSENSHINE, I.; DONNENBERG, M. S.; KAPER, J. B.; FINLAY, B. B. Signal transduction between enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) and epithelial cells: EPEC induces tyrosine phosphorylation of host cell proteins to initiate cytoskeletal rearrangement and bacterial uptake. **The EMBO Journal**, v. 11, n. 10, p. 3551-3560, 1992.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, p. 1-16, 2006.

SABOL, K.; PATTERSON, J. E.; LEWIS, I. J. S.; OWENS, A.; CADENA, J.; JORGENSEN, J. H. Emergence of daptomycin resistance in Enterococcus faecium during daptomycin therapy [3]. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 4, p. 1664-1665, 2005.

SAKUMA, A.; WEISER, M.-S.; FUJITA, T. Living Olefin Polymerization and Block Copolymer Formation with FI Catalysts. **Polym. J**, v. 39, n. 3, p. 193-207, 2007.

SANDBORN, W.; FAUBION, W. Clinical pharmacology of inflammatory bowel disease therapies. **Current Gastroenterology Reports**, v. 2, n. 6, p. 440-445, 2000.

SANTOS, A. L. D.; SANTOS, D. O.; FREITAS, C. C. D.; FERREIRA, B. L. A.; AFONSO, I. F.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C. Staphylococcus aureus: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, p. 413-423, 2007.

SHEIKHSHOAIE, I.; FABIAN, W. M. F. Quantum chemical study on the electronic structure and second-order nonlinear optical properties of salen-type Schiff bases. **Dyes and Pigments**, v. 70, n. 2, p. 91-98, 2006.

SHLAES, D. M. Research and Development of Antibiotics: The Next Battleground. **ACS Infectious Diseases**, v. 1, n. 6, p. 232-233, 2015.

SHLAES, D. M.; SAHM, D.; OPIELA, C.; SPELLBERG, B. The FDA reboot of antibiotic development. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 10, p. 4605-4607, 2013.

SHRIVER, D. F.; ATKINS, P. W. **Química inorgânica**. Bookman, 2008.

SILVA, J. G. D.; SOUZA, I. A.; HIGINO, J. S.; SIQUEIRA-JUNIOR, J. P.; PEREIRA, J. V.; PEREIRA, M. D. S. V. Atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentale* Linn. em amostras multiresistentes de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 572-577, 2007.

SILVA, M. A. R.; HIGINO, J. S.; PEREIRA, J. V.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P.; PEREIRA, M. S. V. Antibiotic activity of the extract of *Punica granatum* Linn. over bovine strains of *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 209-212, 2008.

SILVA, N. D.; SILVEIRA, N. F. D. A.; YOKOYA, F.; OKAZAKI, M. M. Ocorrência de *Escherichia coli* 0157:H7 em vegetais e resistência aos agentes de desinfecção de verduras. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 23, p. 167-173, 2003.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 10^a. LTC, 2012.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A.; CARACELLI, I. **Princípios de análise instrumental**. Bookman, 2002.

SORENSEN, J. R. J. Copper complexes for therapy of cancer and autoimmune diseases. In: RAINSFORD, K. D.; MILANINO, R., *et al* (Ed.). **Copper and Zinc in Inflammatory and Degenerative Diseases**. Dordrecht: Springer Netherlands. p.113-124, 1998.

SPELLBERG, B.; GUIDOS, R.; GILBERT, D.; BRADLEY, J.; BOUCHER, H. W.; SCHELD, W. M.; BARTLETT, J. G.; EDWARDS JR, J. The epidemic of antibiotic-resistant infections: A call to action for the medical community from the infectious diseases society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, n. 2, p. 155-164, 2008.

SRIDHAR, S. K.; SARAVANAN, M.; RAMESH, A. Synthesis and antibacterial screening of hydrazones, Schiff and Mannich bases of isatin derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 36, n. 7-8, p. 615-625, 2001.

STUART, B. H. **Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications**. Wiley, 2004.

TABATABAEI, S. M.; BEHMANESH POUR, F.; OSMANI, S. Epidemiology of Hospital-Acquired Infections and Related Anti-Microbial Resistance Patterns in a Tertiary-Care Teaching Hospital in Zahedan, Southeast Iran. **Int J Infect**, v. 2, n. 4, p. e29079, 2015.

TH, E.; BETTELHEIM, K. S. The Intestinal Bacteria of the Neonate and Breast-Fed Infant. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 11, n. 2, p. 352-356, 1989.

THOMPSON, M. **CHNS Elemental Analysers**: The Royal Society of Chemistry. 29 2008.

TRZESOWSKA-KRUSZYNSKA, A. Copper complex of glycine Schiff base: In situ ligand synthesis, structure, spectral, and thermal properties. **Journal of Molecular Structure**, v. 1017, p. 72-78, 2012.

VARNAM, A. H.; EVANS, M. G. **Foodborne Pathogens: An Illustrated Text**. Wolfe, 1991.

- VAZ, E. K. Resistência antimicrobiana: como surge e o que representa para a suinocultura. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 37, p. 147-150, 2009.
- VOGEL, M.; SCHMITZ, R. P. H.; HAGEL, S.; PLETZ, M. W.; GAGELMANN, N.; SCHERAG, A.; SCHLATTMANN, P.; BRUNKHORST, F. M. Infectious disease consultation for *Staphylococcus aureus* bacteremia – A systematic review and meta-analysis. **Journal of Infection**, v. 72, n. 1, p. 19-28, 2016.
- VOLTARELLI, J. C. Febre e Inflamação. **Medicina, Ribeirão Preto**, v. 27, p. 7-48, 1994.
- WALSH, O. M.; MEEGAN, M. J.; PRENDERGAST, R. M.; AL NAKIB, T. Synthesis of 3-acetoxiazetidín-2-ones and 3-hydroxiazetidín-2-ones with antifungal and antibacterial activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 31, n. 12, p. 989-1000, 1996.
- WEST, D.; PADHYE, S.; SONAWANE, P. Structural and physical correlations in the biological properties of transition metal heterocyclic thiosemicarbazone and S-alkyldithiocarbazate complexes. In: (Ed.). **Complex Chemistry**: Springer Berlin Heidelberg, v.76, cap. 1, p.1-50, 1991.
- WHITE, M. Mediators of inflammation and the inflammatory process. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 103, n. 3, Supplement, p. S378-S381, 1999.
- WRIGHT, G. Antibiotics: An irresistible newcomer. **Nature**, v. 517, n. 7535, p. 442-444, 2015.
- XU, M.; SUN, M.; QIAO, H.; PING, Q.; ELAMIN, E. S. Preparation and evaluation of colon adhesive pellets of 5-aminosalicylic acid. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 468, n. 1–2, p. 165-171, 2014.

APÊNDICE: Espectros Adicionais

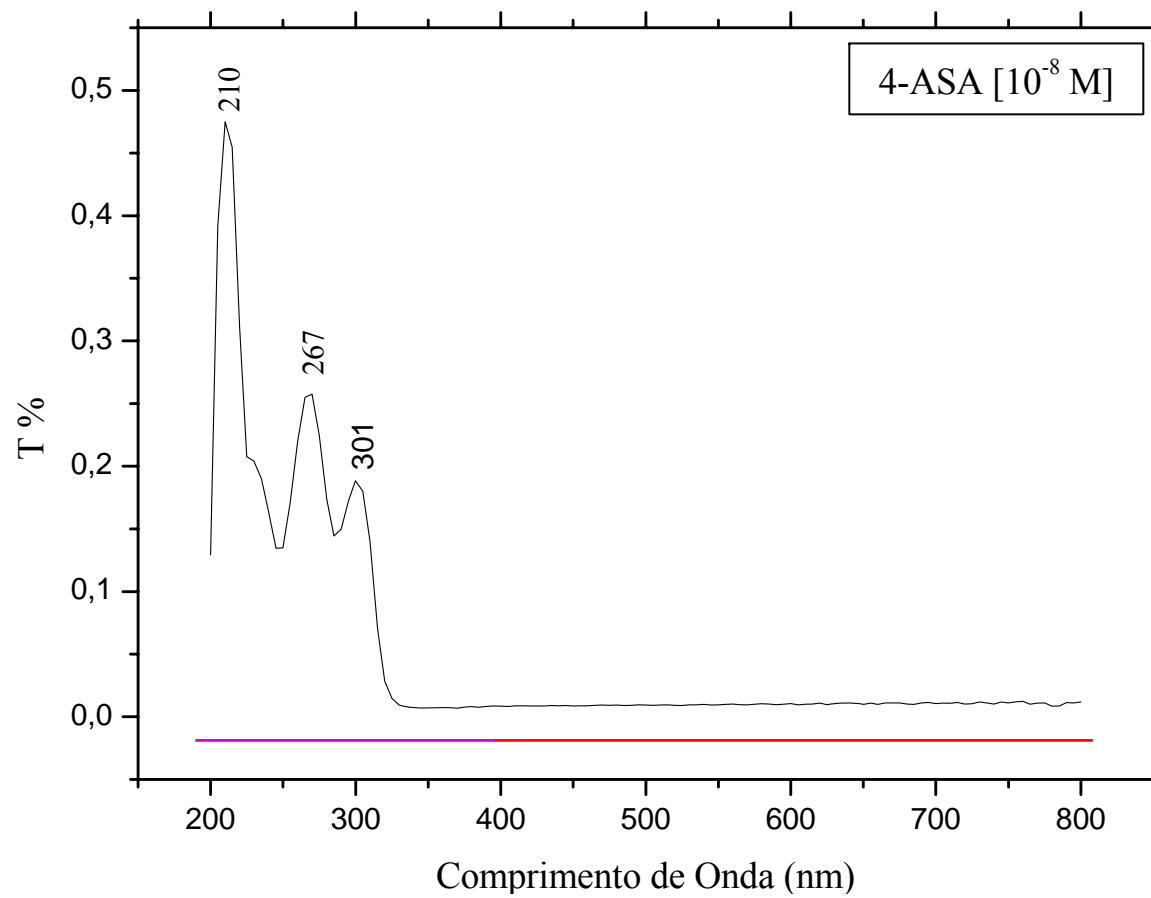


Figura A.1. Espectro Eletrônica na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) do precursor 4-ASA em metanol.

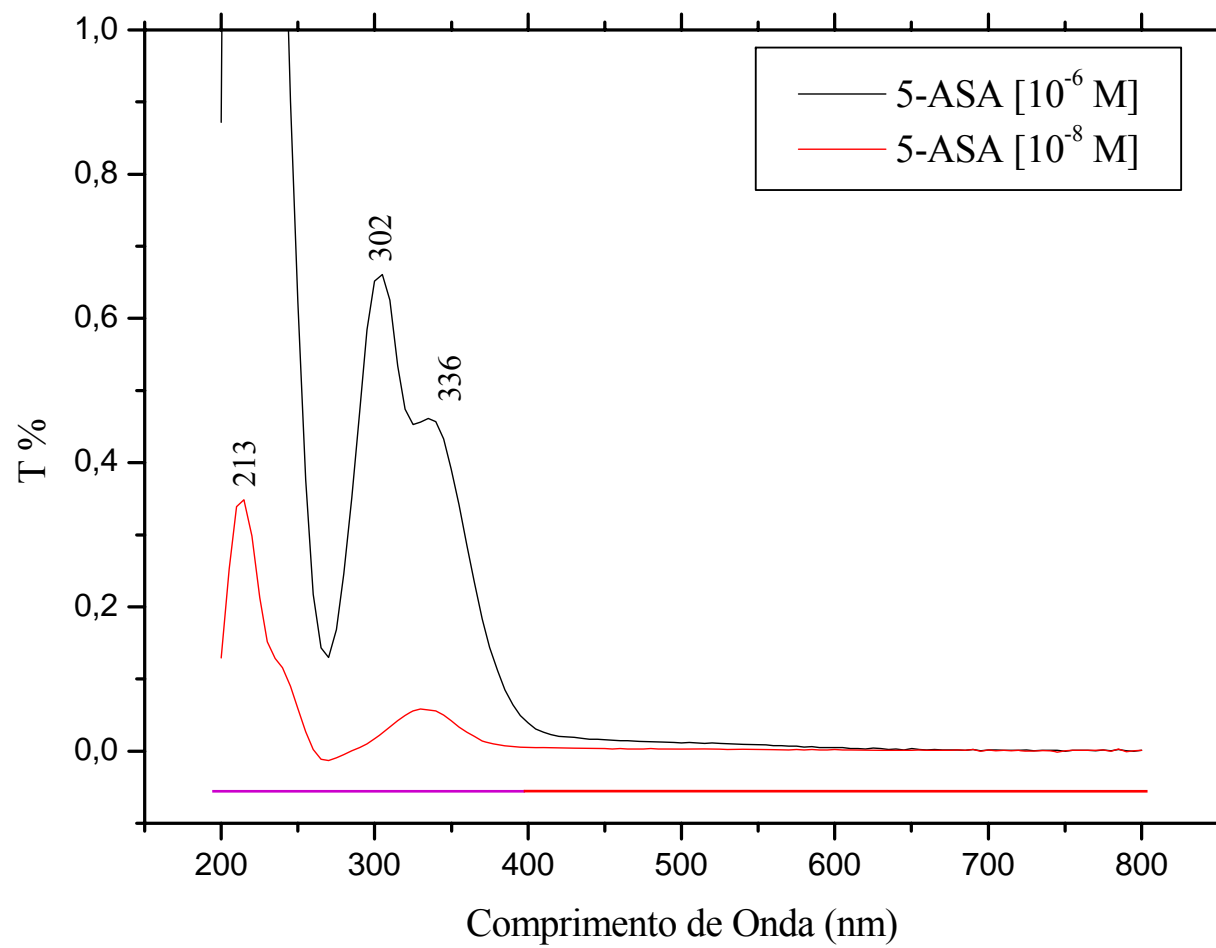


Figura A.2. Espectro Eletrônica na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) do precursor 5-ASA em metanol.

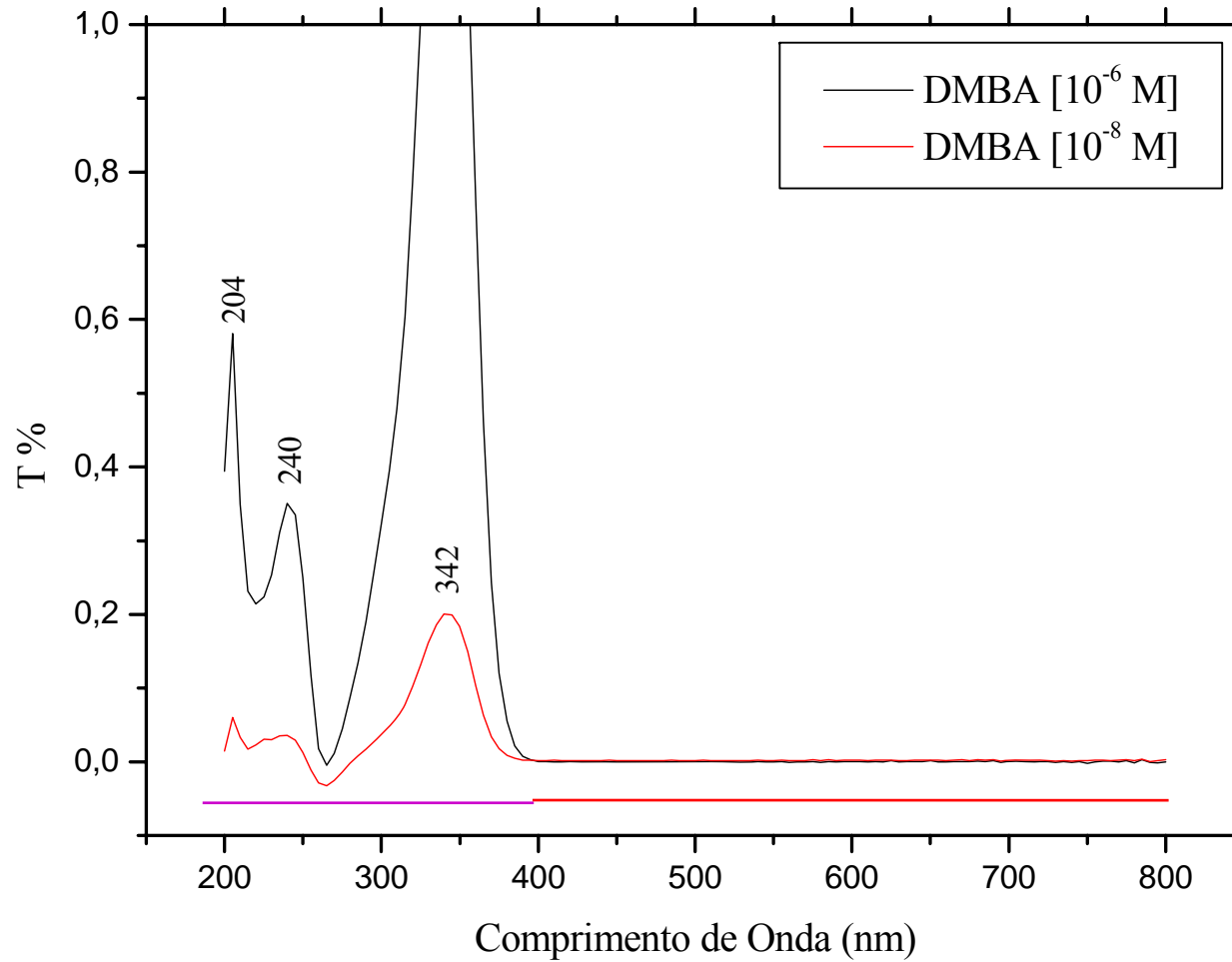


Figura A.3. Espectro Eletrônica na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) do precursor DMBA em metanol.

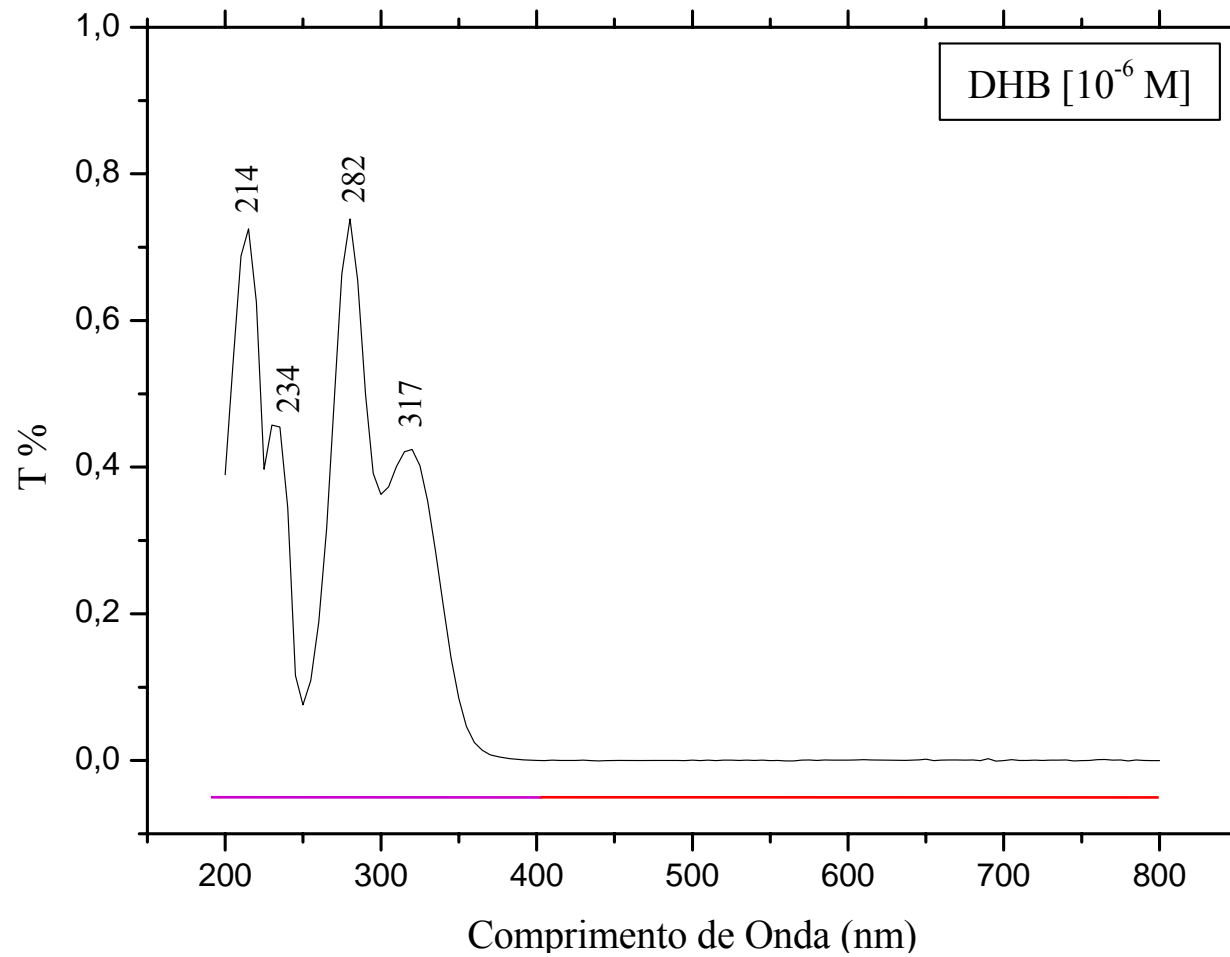


Figura A.4. Espectro Eletrônica na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) do precursor DHB em metanol.

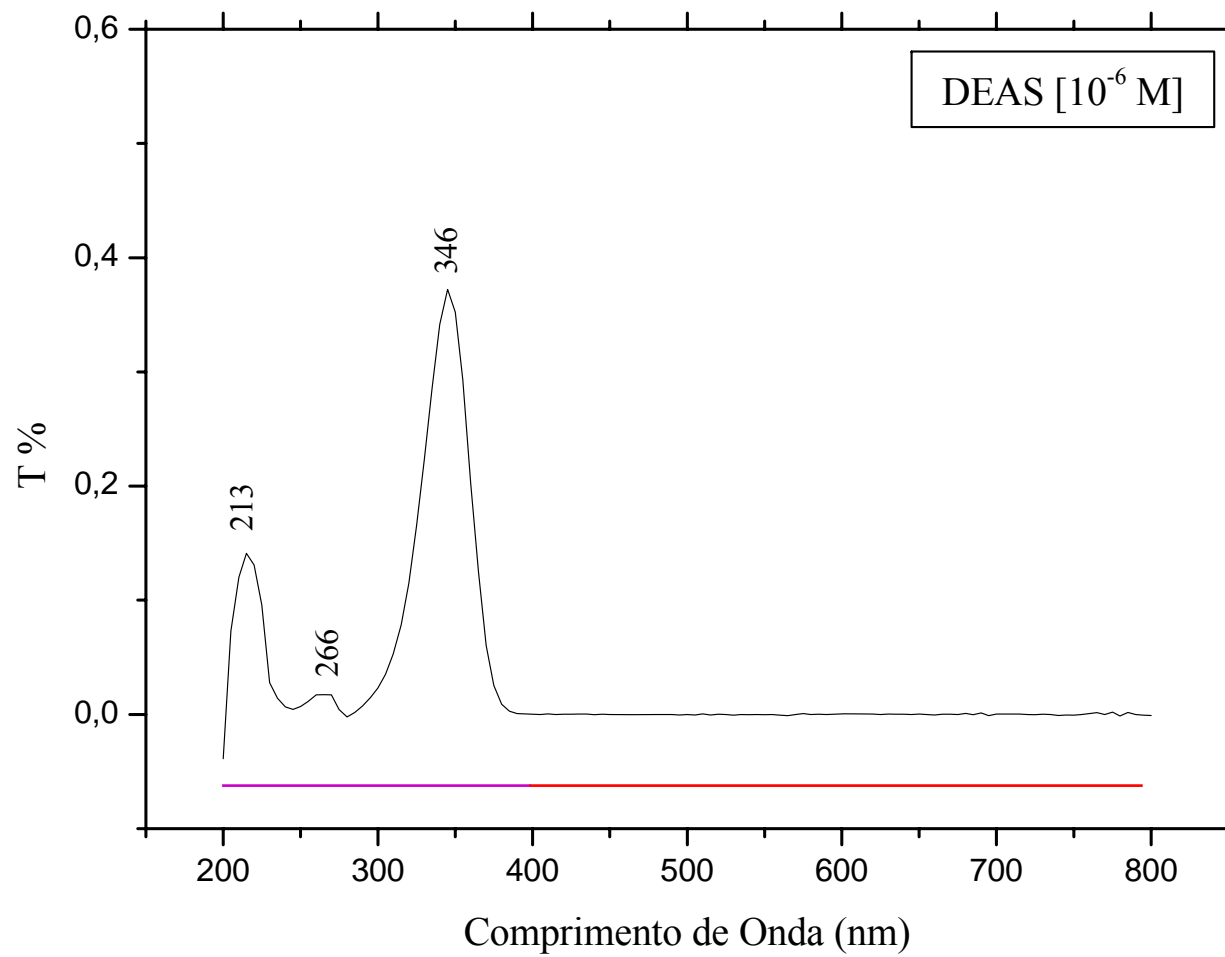


Figura A.5. Espectro Eletrônica na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) do precursor DEAS em metanol.