

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
INORGÂNICA

Investigação da Atividade de Complexos
Inorgânicos Inibidores da trans-2-Enoil
Redutase

Francisco Adilson Matos Sales

Fortaleza - CE

2008

Investigação da Atividade de complexos Inorgânicos Inibidores da *trans*-2-Enoil Redutase



Francisco Adilson Matos Sales

Dr. Ícaro de Sousa Moreira (In memoriam)

*Viva verdadeiramente uma
vida digna e honrada. Para que
no futuro tu sejas lembrado
pelas coisas boas que fizeste.*

Sales, F. A. M

Sumário

AGRADECIMENTOS E RECONHECIMENTOS	3
RESUMO	4
ABSTRACT	5
LISTA DE FIGURAS	6
LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE ABREVIATURAS	12
NOMENCLATURAS E ESTRUTURAS	13
CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO	15
1.1. Tuberculose	16
1.2. Casos de Tuberculose no Mundo	17
1.3. Fisiologia Bacteriana - <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	20
CAPÍTULO 2: JUSTIFICATIVAS E OBJETIVO	26
CAPÍTULO 3: PARTE EXPERIMENTAL	31
3.1 EQUIPAMENTOS E TÉCNICAS EXPERIMENTAIS	32
3.1.1 Espectroscopia Eletrônica de Absorção na Região do UV-visível	32
3.1.2 Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho (FTIR)	32
3.1.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	32
3.1.4 Medidas Eletroquímicas	32
3.2 PROCEDIMENTO SINTÉTICO	33
3.2.1 Reagentes e Soluções	33
3.2.2 Sínteses Orgânicas	35
3.2.3 Sínteses Inorgânicas	41
3.3 METODOLOGIA E TRATAMENTO DOS DADOS EXPERIMENTAIS	44
3.3.1 Espectros Eletrônicos	45
3.3.2 Espectros Vibracionais	45
3.3.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	45
3.3.4 Cálculos Teóricos	45
3.3.5 Determinação dos Parâmetros Eletroquímicos	46
3.3.6 Ensaio enzimático da 2-trans-Enoil Redutase (InhA de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>)	46
3.3.7 Ensaios de Toxicidade	48
CAPÍTULO 4: RESULTADOS E DISCUSSÃO	49

4.1	Espectroscopia Eletrônica na Região do UV-Visível	50
4.2	Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho.....	58
4.2.1	Dos compostos orgânicos.....	59
4.2.2	Dos Complexos.....	61
4.3	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear	64
4.3.1	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ¹ H	65
4.3.2	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ¹³ C	66
4.4	Eletroquímica.....	67
4.5	Ensaio de inibição enzimática da <i>trans</i> -2-enoil redutase.....	69
4.6	Ensaio preliminares de toxicidade.....	73
4.7	Cálculos teóricos.....	74
	CAPÍTULO 5: CONCLUSÃO	81
	PERSPECTIVAS	83
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
	ANEXOS	93

AGRADECIMENTOS E RECONHECIMENTOS

Agradeço ao Dr. Ícaro de Sousa Moreira, pela amizade e convívio de quase sete anos do qual sou extremamente grato por minha formação. Seus ensinamentos e seus desejos sempre serão eternos.

Aos meus pais pelo apoio, educação e consideração.

Ao professor Dr. Edilberto Rocha da Silveira do CENAUREMN, por oferecer a oportunidade de operar um aparelho de RMN de onde obtive bons resultados e mais experiência.

Ao professor Dr. Luiz Gonzaga de França Lopes por estar sempre presente nos momentos importantes e necessários.

Aos professores Doutores Marcelo Oliveira Santiago, Eduardo Henrique Silva de Sousa e Jackson Rodrigues de Sousa pela amizade e dedicação ao professor Ícaro.

Às professoras Dra. Izaura Cirino Nogueira Diógenes, Dra. Elisane Longhinotti e Dra. Idalina Maria Carvalho Moreira sempre preservando a organização do grupo.

Aos professores Doutores Luiz Augusto Basso, Diógenes Santiago Santos e Walter Filgueira de Azevedo Jr. do Centro de Pesquisa de Biologia Molecular e Funcional da PUC-RS, pela contribuição e colaboração nos ensaios de inibição enzimática.

Aos meus colegas de pós-graduação do laboratório de Bioinorgânica, pelas discussões científicas, Fernando, Jefferson, Thiago, Arquimedes, Pedro, Ordelei, Tércio e Sérgio e é claro as meninas que fazem a alegria do laboratório, Elis, Socorro, Aparecida, Solange e a todos os alunos de iniciação científica que serão o futuro do laboratório.

A CAPES pela bolsa concedida.

Por último, mas não menos importante, à minha mulher Vanessa, e minhas encantadoras filhas Thaís e Yasmim, pelos momentos agradáveis.

RESUMO

A tuberculose tem sido uma das principais causas de morte no Mundo. Infelizmente, não existem ainda novas drogas disponíveis, o que tem desestimulado a investigação neste campo. Neste trabalho, preparou-se novos metalo-compostos baseado no sistema $\text{Na}_3[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{L}]\cdot\text{H}_2\text{O}$, sendo L = oxadiazóis, hidrazonas ou derivados, que são drogas estudadas no tratamento para tuberculose. Esses compostos foram sintetizados e totalmente caracterizados por técnicas espectroscópicas e eletroquímicas. Em relação à espectroscopia eletrônica, foi mostrada a intensidade relativa das interações de retrodoação - π entre os compostos utilizando a força do oscilador. Este resultado foi reforçado por outras técnicas espectroscópicas, tal como espectroscopia na região do infravermelho, onde uma mudança no estiramento CN^- (cianeto) para mais altas frequências indica maior interação de retrodoação - π ($\text{Fe}^{\text{II}} \rightarrow \text{L}$). Além disso, resultados de RMN e eletroquímicos reforça a coordenação do ligante ao centro metálico. Os resultados de RMN mostraram que estes compostos foram igualmente coordenados através do átomo de nitrogênio do anel piridínico, ao mesmo tempo a voltametria cíclica mostrou que o ferro foi estabilizado na sua forma reduzida ($2+$). Foram realizados cálculos teóricos para avaliar a distribuição de carga desses compostos e também correlacionou com as interações de retrodoação - π . A relevância deste estudo reside na constatação de que vários inibidores interagem de forma direta com a enzima alvo. Estes compostos foram preparados com o objetivo de inibir a enzima InhA, que é responsável pela a biossíntese da parede celular da micobactéria, conhecendo o efeito da distribuição de carga do complexo na inibição da enzima podemos fornecer informações adicionais para desenhar uma melhor droga. Este resultado foi importante para estabelecer um mapa de reatividade. Estudos bioquímicos foram realizados para avaliar a inibição da enzima enoil redutase (InhA) tipo selvagem e mutante (S94A). Os complexos derivados de oxadiazóis foram muito eficientes na inibição da enzima selvagem, incluindo a enzima resistente às drogas convencionais. Testes de toxicidade mostraram que estes compostos apresentaram baixa toxicidade. Um interessante mapa de reatividade foi apresentado, onde foi correlacionado a distribuição de carga e o potencial eletroquímico do metal para investigar a eficiência de inibição. Isso pode levar a uma melhor concepção racional de outras metalodrogas anti-tuberculose.

ABSTRACT

Tuberculosis has been one of the major causes of death in the World. Unfortunately, there is still a lack of new drugs available, which has stimulated research in this field. Here, it was prepared a spectrum of new metallo-compounds based on $\text{Na}_3[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{L}]\cdot\text{H}_2\text{O}$, where L is hydrazones or oxadiazols derivatives, which are metallodrug candidates for tuberculosis treatment. These compounds were fully characterized by spectroscopic and electrochemical techniques. Regarding to the electronic spectroscopy, it was showed the relative intensity of the π -backbonding effect among these compounds using the oscillator strength. This result was further supported by other techniques such as infrared spectroscopy, where a shift on the CN- (cyanide) stretching to higher frequency indicates stronger backbonding Fe(II) to L. Additionally, NMR and electrochemical results reinforced the back-bonding effect previously assigned in these compounds. NMR results showed these compounds were also coordinated through the nitrogen atom of the pyridine ring, while cyclic voltammetry showed the iron was made more stable in the reduced form (2+). Theoretical calculations were done to evaluate the charge distribution of these compounds and also correlate them with the backbonding effect. The relevance of this study lies on the observation that several inhibitors interact with the proteic target through intermolecular forces. These compounds were prepared aiming to inhibit the InhA enzyme, which is responsible for the biosynthesis of the mycobacterial cell-wall, by knowing the effect of charge distribution on enzyme inhibition it provides extra information to design better drugs. This result was important to draw a reactivity map. Biochemical investigations were carried out to evaluate the inhibition of the wild-type and mutant of the enzyme enoyl reductase (InhA). The complexes of oxadiazol derivatives were very efficient enzyme inhibitor, including toward strains resistant to conventional drugs. Toxicity tests showed these compounds presented low toxicity. An interesting map of reactivity was drawn, where charge distribution and electrochemical potential were correlated to the efficiency to inhibit InhA. This can lead to a better rational design of other anti-tuberculosis metallodrugs.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa com os 22 países que são responsáveis por 80% dos casos de tuberculose no mundo.....	18
Figura 2. Mapa de casos de TBMR confirmados nos países em 2007.....	19
Figura 3. Mecanismo de biosíntese da parede celular da micobacteria.....	21
Figura 4. Proposta simplificada para o mecanismo de ação da Isoniazida e Etionamida.....	28
Figura 5. Pró-drogas utilizadas no tratamento da tuberculose.....	28
Figura 6. Espectro de RMN ¹ H para o composto IA4H, em DMSO, 500MHz.....	94
Figura 7. Espectro de RMN ¹ H para o composto NA4H, em DMSO, 500MHz.....	94
Figura 8. Espectro de RMN ¹³ C para o composto IA4H, em DMSO, 500MHz.....	95
Figura 9. Espectro de RMN ¹³ C para o composto NA4H, em DMSO, 500MHz.....	95
Figura 10. Espectro de RMN ¹ H para o composto IA4F, em DMSO, 500MHz.....	96
Figura 11. Diagrama de contorno de RMN bidimensional de correlação homonuclear para o composto IA4F, em DMSO, 500MHz.....	97
Figura 12. Diagrama de contorno de RMN bidimensional de correlação heteronuclear a longa distância para o composto IA4F, em DMSO, 500MHz.....	98
Figura 13. Espectro de RMN ¹ H para o composto NA4F, em DMSO, 500MHz.....	99
Figura 14. Espectro de RMN ¹³ C para o composto IA4F, em DMSO, 500MHz.....	99
Figura 15. Espectro de RMN ¹³ C para o composto NA4F, em DMSO, 500MHz.....	100
Figura 16. Espectro de RMN ¹ H para o composto IA4OMet, em DMSO, 500MHz.....	100
Figura 17. Espectro de RMN ¹ H para o composto NA4OMet, em DMSO, 500MHz.....	101
Figura 18. Espectro de RMN ¹³ C para o composto IA4OMet, em DMSO, 500MHz.....	101
Figura 19. Diagrama de contorno de RMN bidimensional de correlação heteronuclear a longa distância para o composto IA4OMet, em DMSO, 500MHz.....	102
Figura 20. Espectro de RMN ¹³ C para o composto NA4OMet, em DMSO, 500MHz.....	103
Figura 21. Diagrama de contorno de RMN bidimensional de correlação homonuclear para o composto NA4OMet, em DMSO, 500MHz.....	104
Figura 22. Diagrama de contorno de RMN bidimensional de correlação heteronuclear para o íon complexo NA4OMet, em DMSO, 500MHz.....	105
Figura 23. Diagrama de contorno de RMN bidimensional de correlação heteronuclear a longa distância para o composto NA4OMet, em DMSO, 500MHz.....	106
Figura 24. Espectro de RMN ¹ H para o composto IO3H, em DMSO, 500MHz.....	107
Figura 25. Espectro de RMN ¹ H para o composto IO3H, em DMSO, 500MHz.....	108
Figura 26. Espectro de RMN ¹ H para o composto IO3S, em DMSO, 500MHz.....	109
Figura 27. Espectro de RMN ¹³ C para o composto IO3S, em DMSO, 500MHz.....	109
Figura 28. Espectro de RMN ¹ H para o composto IO3Met, em CDCl ₃ , 500MHz.....	110
Figura 29. Espectro de RMN ¹³ C para o composto IO3Met, em CDCl ₃ , 500MHz.....	110
Figura 30. Espectro de RMN ¹ H para o composto IO3SMet, em DMSO, 500MHz.....	111
Figura 31. Espectro de RMN ¹³ C para o composto IO3SMet, em DMSO-d ₆ , 500MHz.....	111
Figura 32. Diagrama de contorno de RMN bidimensional de correlação heteronuclear a longa distância para o composto IO3SMet, em DMSO, 500 MHz.....	112
Figura 33. Espectro de RMN ¹ H para o composto [Fe(CN) ₅ (IA4H)] ³⁻ , em D ₂ O, 500 MHz.....	113
Figura 34. Espectro de RMN ¹ H para o composto [Fe(CN) ₅ (IA4OMet)] ³⁻ , em D ₂ O, 500 MHz.....	113
Figura 35. Espectro de RMN ¹ H para o composto [Fe(CN) ₅ (IA4F)] ³⁻ , em D ₂ O, 500 MHz.....	114

Figura 36. Espectro de RMN ^1H para o composto $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NA4H})]^{3-}$, em D_2O , 500 MHz.	115
Figura 37. Diagrama de contorno de RMN bidimensional de correlação homonuclear para o composto $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NA4H})]^{3-}$, em D_2O , 500 MHz.	116
Figura 38. Espectro de RMN ^1H para o composto $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NA4OMet})]^{3-}$, em D_2O , 500 MHz. .	117
Figura 39. Diagrama de contorno de RMN bidimensional de correlação homonuclear para o íon complexo $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NA4OMet})]^{3-}$, em D_2O , 500 MHz.	118
Figura 40. Espectro de RMN ^1H para o composto $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NA4F})]^{3-}$, em D_2O , 500 MHz.	119
Figura 41. Espectro de RMN ^1H para o composto $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IO3H})]^{3-}$, em D_2O , 500 MHz.	119
Figura 42. Espectro de RMN ^1H para o composto $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IO3S})]^{3-}$, em D_2O , 500 MHz.	120
Figura 43. Espectro de RMN ^1H para o composto $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IO3Met})]^{3-}$, em D_2O , 500 MHz.	120
Figura 44. Diagrama de contorno de RMN bidimensional de correlação homonuclear para o íon complexo $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IO3Met})]^{3-}$, em D_2O , 500 MHz.	121
Figura 45. Espectro de RMN ^1H para o composto $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IO3SMet})]^{3-}$, em D_2O , 500 MHz.	122
Figura 46. Espectro de RMN ^{13}C para o composto $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IA4H})]^{3-}$, em D_2O , 500 MHz.	122
Figura 47. Diagrama de contorno de RMN bidimensional de correlação heteronuclear para o íon complexo $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IA4H})]^{3-}$, em D_2O , 500 MHz.	123
Figura 48. Espectro de RMN ^{13}C para o composto $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NA4H})]^{3-}$, em D_2O , 500 MHz.	124
Figura 49. Espectro de RMN ^{13}C para o composto $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IA4OMet})]^{3-}$, em D_2O , 500 MHz. ...	124
Figura 50. Diagrama de contorno de RMN bidimensional HETCOR para o íon complexo $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IA4OMet})]^{3-}$, em D_2O , 500 MHz.	125
Figura 51. Espectro de RMN ^{13}C para o composto $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NA4OMet})]^{3-}$, em D_2O , 500 MHz.	126
Figura 52. Diagrama de contorno de RMN bidimensional de correlação heteronuclear para o íon complexo $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NA4OMet})]^{3-}$, em D_2O , 500 MHz.	127
Figura 53. Diagrama de contorno de RMN bidimensional de correlação heteronuclear a longa distância para o íon complexo $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NA4OMet})]^{3-}$, em D_2O , 500 MHz.	128
Figura 54. Espectro de RMN ^{13}C para o composto $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IA4F})]^{3-}$, em D_2O , 500 MHz.	129
Figura 55. Espectro de RMN ^{13}C para o composto $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NA4F})]^{3-}$, em D_2O , 500 MHz.	129
Figura 56. Diagrama de contorno de RMN bidimensional de correlação heteronuclear a longa distância para o íon complexo $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NA4F})]^{3-}$, em D_2O , 500 MHz.	130
Figura 57. Espectro de RMN ^{13}C para o composto $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IO3H})]^{3-}$, em D_2O , 500 MHz.	131
Figura 58. Espectro de RMN ^{13}C para o composto $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IO3S})]^{3-}$, em D_2O , 500 MHz.	131
Figura 59. Diagrama de contorno de RMN bidimensional de correlação heteronuclear a longa distância para o íon complexo $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IO3S})]^{3-}$, em D_2O , 500 MHz.	132
Figura 60. Espectro de RMN ^{13}C para o composto $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IO3Met})]^{3-}$, em D_2O , 500 MHz.	133
Figura 61. Espectro de RMN ^{13}C para o composto $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IO3SMet})]^{3-}$, em D_2O , 500 MHz. ...	133
Figura 62. Procedimento para medir a atividade enzimática da enzima.	47
Figura 63. Resumo dos níveis eletrônicos para compostos orgânicos.	51
Figura 64. Espectro eletrônico em meio aquoso dos ligantes hidrazonas derivados do ácido nicotínico, pH = 6,8.	134
Figura 65. Espectro eletrônico em meio aquoso dos ligantes hidrazonas derivados do ácido nicotínico, pH = 6,8.	134
Figura 66. Espectro eletrônico em meio aquoso dos ligantes oxadiazóis.	135
Figura 67. Espectro eletrônico em meio aquoso do íon complexo $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IA4H})]^{3-}$	135
Figura 68. Espectro eletrônico em meio aquoso do íon complexo $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IA4OMet})]^{3-}$	136
Figura 69. Espectro eletrônico em meio aquoso do íon complexo $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IA4F})]^{3-}$	136
Figura 70. Espectro eletrônico em meio aquoso do íon complexo $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NA4H})]^{3-}$	137

Figura 71. Espectro eletrônico em meio aquoso do íon complexo $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NA4OMet})]^{3-}$	137
Figura 72. Espectro eletrônico em meio aquoso do íon complexo $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NA4F})]^{3-}$	138
Figura 73. Espectro eletrônico em meio aquoso do íon complexo $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IO3H})]^{3-}$	138
Figura 74. Espectro eletrônico em meio aquoso do íon complexo $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IO3Met})]^{3-}$	139
Figura 75. Espectro eletrônico em meio aquoso do íon complexo $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IO3S})]^{3-}$	139
Figura 76. Espectro eletrônico em meio aquoso do íon complexo $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IO3SMet})]^{3-}$	140
Figura 77. Variação da absorbância da banda de TC na presença de 30 vezes de excesso de DMSO.	57
Figura 78. Espectro vibracional na região do infravermelho para o composto IA4H, em pastinha de KBr.	140
Figura 79. Espectro vibracional na região do infravermelho para o composto IA4OMet, em pastinha de KBr.	141
Figura 80. Espectro vibracional na região do infravermelho para o composto IA4F, em pastinha de KBr.	141
Figura 81. Espectro vibracional na região do infravermelho para o composto NA4H, em pastinha de KBr.	142
Figura 82. Espectro vibracional na região do infravermelho para o composto NA4OMet, em pastinha de KBr.	142
Figura 83. Espectro vibracional na região do infravermelho para o composto NA4F, em pastinha de KBr.	143
Figura 84. Espectro vibracional na região do infravermelho para o composto IO3H, em pastinha de KBr.	143
Figura 85. Espectro vibracional na região do infravermelho para o composto IO3S, em pastinha de KBr.	144
Figura 86. Espectro vibracional na região do infravermelho para o composto IO3Met, em pastinha de KBr.	144
Figura 87. Espectro vibracional na região do infravermelho para o composto IO3SMet, em pastinha de KBr.	145
Figura 88. Espectro vibracional na região do infravermelho para o complexo $\text{Na}_3[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IA4H})].x\text{H}_2\text{O}$, em pastinha de KBr.....	145
Figura 89. Espectro vibracional na região do infravermelho para o complexo $\text{Na}_3[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IA4OMet})].x\text{H}_2\text{O}$, em pastinha de KBr.	146
Figura 90. Espectro vibracional na região do infravermelho para o complexo $\text{Na}_3[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IA4F})].x\text{H}_2\text{O}$, em pastinha de KBr.	146
Figura 91. Espectro vibracional na região do infravermelho para o complexo $\text{Na}_3[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NA4H})].x\text{H}_2\text{O}$, em pastinha de KBr.	147
Figura 92. Espectro vibracional na região do infravermelho para o complexo $\text{Na}_3[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NA4OMet})].x\text{H}_2\text{O}$, em pastinha de KBr.....	147
Figura 93. Espectro vibracional na região do infravermelho para o complexo $\text{Na}_3[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NA4F})].x\text{H}_2\text{O}$, em pastinha de KBr.....	148
Figura 94. Espectro vibracional na região do infravermelho para o complexo $\text{Na}_3[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IO3H})].x\text{H}_2\text{O}$, em pastinha de KBr.....	148
Figura 95. Espectro vibracional na região do infravermelho para o complexo $\text{Na}_3[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IO3S})].x\text{H}_2\text{O}$, em pastinha de KBr.	149
Figura 96. Espectro vibracional na região do infravermelho para o complexo $\text{Na}_3[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IO3Met})].x\text{H}_2\text{O}$, em pastinha de KBr.	149

Figura 97. Espectro vibracional na região do infravermelho para o complexo $\text{Na}_3[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IO3SMet})] \cdot x\text{H}_2\text{O}$, em pastinha de KBr.....	150
Figura 98. Formas tautoméricas do ligante IO3S; (a) tiol e (b) tiona.....	64
Figura 99. Mecanismo de formação dos isômeros (Z) e (E). Onde $\text{X}^* = \text{H}$, O-Met ou F.	65
Figura 100. Valores de deslocamento químico de dois isômeros de iminas.	66
Figura 101. Voltamograma cíclico do eletrodo de carbono vítreo em solução aquosa (NaTFA 0,1 mol.L ⁻¹ , pH = 6,8) contendo o íon complexo $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IA4H})]^{3-}$, $v = 100\text{mV/s}$	150
Figura 102. Voltamograma cíclico do eletrodo de carbono vítreo em solução aquosa (NaTFA 0,1 mol.L ⁻¹ , pH = 6,8) contendo o íon complexo $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IA4OMet})]^{3-}$, $v = 100\text{mV/s}$	151
Figura 103. Voltamograma cíclico do eletrodo de carbono vítreo em solução aquosa (NaTFA 0,1 mol.L ⁻¹ , pH = 6,8) contendo o íon complexo $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IA4F})]^{3-}$, $v = 100\text{mV/s}$	151
Figura 104. Voltamograma cíclico do eletrodo de carbono vítreo em solução aquosa (NaTFA 0,1 mol.L ⁻¹ , pH = 6,8) contendo o íon complexo $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NA4H})]^{3-}$, $v = 100\text{mV/s}$	152
Figura 105. Voltamograma cíclico do eletrodo de carbono vítreo em solução aquosa (NaTFA 0,1 mol.L ⁻¹ , pH = 6,8) contendo o íon complexo $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NA4OMet})]^{3-}$, $v = 100\text{mV/s}$	152
Figura 106. Voltamograma cíclico do eletrodo de carbono vítreo em solução aquosa (NaTFA 0,1 mol.L ⁻¹ , pH = 6,8) contendo o íon complexo $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NA4F})]^{3-}$, $v = 100\text{mV/s}$	153
Figura 107. Voltamograma cíclico do eletrodo de carbono vítreo em solução aquosa (NaTFA 0,1 mol.L ⁻¹ , pH = 6,8) contendo o íon complexo $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IO3H})]^{3-}$, $v = 100\text{mV/s}$	153
Figura 108. Voltamograma cíclico do eletrodo de carbono vítreo em solução aquosa (NaTFA 0,1 mol.L ⁻¹ , pH = 6,8) contendo o íon complexo $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IO3Met})]^{3-}$, $v = 100\text{mV/s}$	154
Figura 109. Voltamograma cíclico do eletrodo de carbono vítreo em solução aquosa (NaTFA 0,1 mol.L ⁻¹ , pH = 6,8) contendo o íon complexo $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IO3S})]^{3-}$, $v = 100\text{mV/s}$	154
Figura 110. Voltamograma cíclico do eletrodo de carbono vítreo em solução aquosa (NaTFA 0,1 mol.L ⁻¹ , pH = 6,8) contendo o íon complexo $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IO3SMet})]^{3-}$, $v = 100\text{mV/s}$	155
Figura 111. Gráfico de Atividade Residual (%AR) da enzima InhA inibida com o íon $[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{L}]^{3-}$, onde L = (a) NA4H; (b) IA4H; (c) NA4OMet; (d) IA4OMet; (e) NA4F; (f) IA4F; (g) IO3H; (h) IO3S; (i) IO3SMet; (j) IO3Met. (■ = Wt InhA selvagem + complexo na presença de 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de NADH; ▼ = S94A InhA + complexo na presença de 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de NADH; ◆ = Wt InhA + complexo na presença de 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de NADH; ◀ = S94A InhA + complexo na presença de 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de NADH).	157
Figura 112. Estrutura otimizada para os ligantes hidrazonas e sua densidade eletrônica molecular total com gradiente de potencial eletrotático. Estruturas otimizadas: (a) NA4H; (c) NA4F; (e) NA4OMet; (g) IA4H; (i) IA4F; (k) IA4OMet. Gradiente de potencial eletrostático: (b) NA4H; (d) NA4F; (f) NA4OMet; (h) IA4H; (j) IA4F; (l) IA4OMet.....	159
Figura 113. Estrutura otimizada contornada pelo potencial eletrostático para os ligantes oxadiazóis e sua densidade eletrônica molecular total com gradiente de potencial eletrotático. Estruturas otimizadas: (a) IO3S; (c) IO3H; (e) IO3SMet; (g) IO3Met. Gradiente de potencial eletrostático: (b) IO3S; (d) IO3H; (f) IO3SMet; (h) IO3Met.....	161
Figura 114. Estrutura otimizada para os complexos e sua densidade eletrônica molecular total com gradiente de potencial eletrostático; Estruturas otimizadas do tipo $[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{L}]^{3-}$, onde L= (a) NA4H; (c) NA4F; (e) NA4OMet; (g) IA4H; (i) IA4F; (k) IA4OMet; (m) IO3S; (o) IO3H; (q) IO3SMet; (s) IO3Met. Gradiente de potencial eletrostático dos complexos do tipo $[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{L}]^{3-}$, onde L= (b) NA4H; (d) NA4F; (f) NA4OMet; (h) IA4H; (j) IA4F; (l) IA4OMet; (n) IO3S; (p) IO3H; (r) IO3SMet; (t) IO3Met.....	164

Figura 115. Orbitais de fronteira para os complexos; Orbitais LUMO para estruturas otimizadas do tipo $[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{L}]^{3-}$, onde L= (a) IO3H; (c) IO3S; (e) IO3Met; (g) IO3SMet; (i) IA4H; (k) IA4OMet; (m) IA4F; (o) NA4H; (q) NA4OMet; (s) NA4F. Orbitais HOMO-2; (b) IO3H; (d) IO3S; (f) IO3Met; (h) IO3SMet; Orbitais HOMO-1; (j) IA4H; (l) IA4OMet; (n) IA4F; (p) NA4H; (r) NA4OMet; (t) NA4F.	169
Figura 116. Densidade eletrônica molecular total com gradiente de potencial eletrostático dos complexos (a) Hexacianoferrato(II), (b) Hexacianoferrato(II) com ajuste de gradiente e (c) Hexacianoferrato(III) com ajuste de gradiente.	77
Figura 117. Densidade eletrônica molecular total com gradiente de potencial eletrostático dos complexos; (a) pentaciano(isoniazida)ferrato(II) e (b) pentaciano(isoniazida)rutenato(II).	169
Figura 118. (a) Estrutura otimizada do complexo pentaamin(isoniazida)rutenado(II) (b) Densidade eletrônica molecular total com gradiente de potencial eletrostático do complexo pentaamin(isoniazida)rutenado(II).	79
Figura 119. Gráfico do Potencial eletroquímico vs. distribuição de carga de: ○ complexo não inibidores e □ complexos inibidores.	81

LISTA DE TABELAS

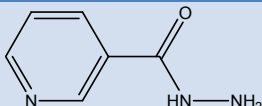
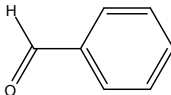
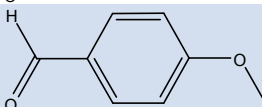
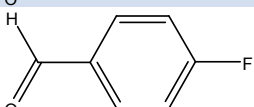
Tabela 1. Bandas de transições eletrônicas dos ligantes.....	53
Tabela 2. Bandas TCML dos complexos de pentacianoferrato(II) em água.	56
Tabela 3. Cinética de dissociação dos complexos de pentacianoferrato(II) frente DMSO; T = 25 °C..	58
Tabela 4. Dados de infravermelhos dos ligantes L, em pastilhas de KBr, em cm^{-1}	61
Tabela 5. Dados de infravermelho para os complexos pentacianoferrato(II) com ligantes L, em pastilhas de KBr (valores em cm^{-1}).....	63
Tabela 6. Potenciais de oxi-redução dos íons complexos em NaTFA 1M, pH = 6,8.	68
Tabela 7. Constantes de velocidade da cinética de inibição das enzimas selvagens e mutantes frente aos complexos sintetizados.....	70
Tabela 8. Valores de potenciais eletrostáticos dos ligantes e dos complexos.....	76

LISTA DE ABREVIATURAS

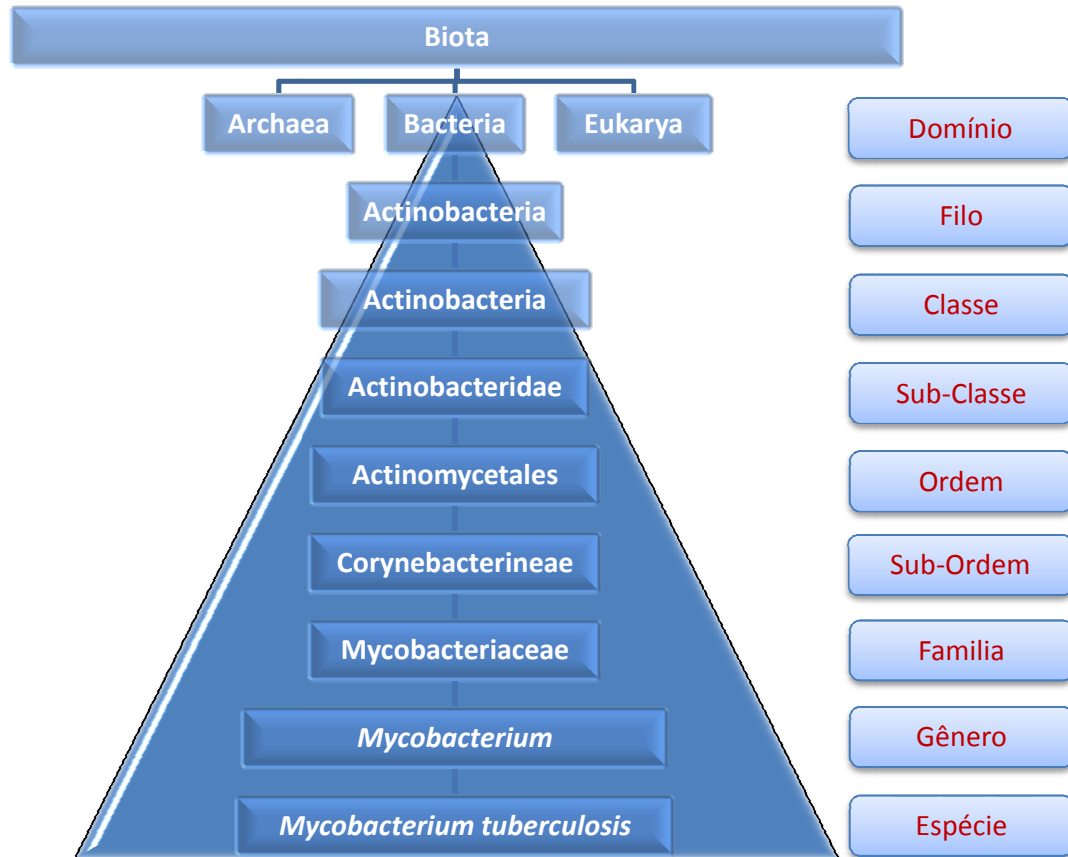
ACP – “acyl-carrier protein” - proteína carreadora de acil
AIDS – “acquired Immunodeficiency Syndrome” – síndrome da imunodeficiência adquirida
BCG - bacilo de Calmette-Guérin
BLYP - Becke-Lee-Yang-Parr
CoA - coenzima A
COSY – “correlation spectroscopy” – espectroscopia total de correlação homonuclear
DD-CoA - dodecedoil coenzima A
DFT – “density functional theory” – teoria do funcional da densidade
DL₅₀ - dose letal
DMSO - dimetil sulfóxido
DNP – “Double-numeric with polarization” – duplo numérico com polarização
DOTS – “directly observed treatment short-course” – tratamento curto diretamente observado
DSS - 2,2'-dimetil-2-silapentano-5-sulfonato de sódio
FTIR – “Fourier transform infrared spectroscopy” – espectroscopia infravermelho com transformada de Fourier
GGA – “generalized gradient approximation” – aproximação generalizada do gradiente
HETCOR – “Heteronuclear Correlation” – correlação heteronuclear
HIV – “Human Immunodeficiency Virus” - vírus da imunodeficiência humana
HMBC – “Heteronuclear Multiple Bond Correlation” - correlação heteronuclear de múltiplas ligações
HOMO – “High Occupied Molecular Orbital” – orbital molecular de mais alta energia ocupado
HSQC – “Heteronuclear Single Quantum Coherence” – coerência heteronuclear múltiplo quântica
ISO - ligantes isonicotínicos hidrazonas
LUMO - Lowest Unoccupied Molecular Orbital” – orbital molecular de mais baixa energia desocupado
mAGP – micolil-arabinogalacto-peptídeo glicona
MTB – *Mycobacterium tuberculosis*
NAD – nicotinamida adenina dinucleotídeo
NIC - ligantes nicotínicos hidrazonas
OMS - Organização Mundial de Saúde
OXA - ligantes oxadiazóis
PE - potencial eletrostático
RMN - ressonância magnética nuclear
S94A - serina substituída na posição 94 por adenina
TB - tuberculose
TBMR - tuberculose multiresistente
TCL - transição campo ligante
TCLM - transferência de carga do tipo ligante-metal
TCML - transferência de carga do tipo metal-ligante
TMS - tetrametilsilano
WT – “wild type” – tipo selvagem

NOMENCLATURAS E ESTRUTURAS

Abreviatura	Nomes	Estrutura
IA4H	(E)-N'-benzilidenoisonicotinohidrazida	
IA4OMet	(E)-N'-(4-metoxibenzilideno)piridina-4-carboxihidrazida	
IA4F	(E)-N'-(4-fluorobenzilideno)isonicotinohidrazida	
NA4H	(E)-N'-benzilidenonicotinohidrazida	
NA4OMet	(E)-N'-(4-metoxibenzilideno)nicotinohidrazida	
NA4F	(E)-N'-(4-fluorobenzilideno)nicotinohidrazida	
IO3H	4-(1,3,4-oxadiazol-2-il)piridina	
IO3Met	4-(5-metil-1,3,4-oxadiazol-2-il)piridina	
IO3S	5-(4-piridil)-1,3,4-oxadiazol-2(3H)-tiona	
IO3SH	5-(4-piridil)-1,3,4-oxadiazol-2-tiol	
IO3SMet	4-(5-(metiltio)-1,3,4-oxadiazol-2-il)piridina	
INH	Isoniazida	
4-tpy	4-(2H-tetrazol-5-il)piridina	
4-cpy	4-cianopiridina	

NZD	nicotinahidrazida	
Ben	benzaldeido	
BenOMet	4-metoxibenzaldeido	
BenF	4-fluorobenzaldeido	

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO



“Se tu conheces o inimigo e conheces-te a ti mesmo, não precisas temer o resultado de cem batalhas. Se tu te conheces, mas não conheces o inimigo, para cada vitória ganha sofrerás também uma derrota. Se tu não conheces nem o inimigo nem a ti mesmo, perderás todas as batalhas.”

Sun Tzu, A Arte da Guerra.

INTRODUÇÃO

1.1. Tuberculose



A tuberculose, TB, doença infecto-contagiosa causada pelo agente etiológico *Mycobacterium tuberculosis*, se dissemina quase exclusivamente por via aérea [1], podendo afetar diferentes órgãos do corpo, inclusive os ossos, mas quase sempre se instala nos pulmões [2].

Ao tossir, o portador de tuberculose pulmonar ativa emite pequenas gotículas contendo a bactéria, que podem permanecer suspensas no ar por um longo período [1]. Ao inalar estas gotículas, qualquer indivíduo saudável pode se infectar [2]. A ocorrência ou não da infecção dependerá da maior ou menor integridade do sistema imunológico. O bacilo pode permanecer latente sem produzir sintomas e sem se reproduzir dentro do macrófago, célula de defesa, o que torna difícil sua identificação, ou desenvolver sintomas. Nesta situação, o teste cutâneo (teste de mantoux) [2, 3] é extremamente útil para detectar a infecção, mas pode apresentar um resultado falso positivo pela presença da BCG, se administrada anos antes [1, 2, 4]. As infecções latentes podem se tornar ativas se o indivíduo tiver um mau funcionamento no seu sistema imunológico [5].

A partir de 1960, poucos antibióticos (agentes químicos obtidos a partir de microrganismos) foram acrescentados ao arsenal terapêutico, apesar do aparecimento de um grande número de compostos obtidos a partir de modificações químicas em laboratório, que originou drogas semi-sintéticas, como por exemplo, ampicilina, meticilina, derivadas da penicilina; amicacina, derivada do aminoglicosídeo canamicina; roxitromicina, derivado nitrogenado dos macrolídeos; minociclina, derivada da tetraciclina. Por outro lado, o desenvolvimento de drogas não originárias de microrganismos teve um avanço relativo com a introdução dos derivados fluorados do ácido nalidíxico (ciprofloxacino, norfloxacino) ou inibidores da via de biossíntese do tetraidrofolato (pirimetamina, trimetoprim). No entanto, muitos destes agentes tiveram o seu uso limitado por efeitos secundários adversos, seletividade incompleta e, mais comumente, pelo surgimento de

INTRODUÇÃO

mutantes resistentes que consistem nos dias atuais, no principal problema da quimioterapia antimicrobiana.

Para o controle eficaz da doença, é indispensável que, aos primeiros sinais dos sintomas de tuberculose ativa, seja providenciada a administração do tratamento recomendado pela Organização Mundial de Saúde, conhecido como DOTS (*directly observed treatment short-course*). De acordo com esse tratamento, o indivíduo com tuberculose ativa é submetido primeiramente ao isolamento e lhe é dado um coquetel de drogas (isoniazida, rifampicina, etambutol e pirazinamida), que devem ser administradas todos os dias por dois, meses seguidos, com o tratamento continuado com isoniazida e rifampicina, por mais quatro meses [2]. Apesar do bem sucedido uso destas drogas, algumas delas, utilizadas há mais de cinquenta anos, pouco se conhece sobre seus mecanismos de atuação [6-11]. Isto tem despertado grande interesse científico, posto que o desenvolvimento de resistências constitui-se em sérios problemas clínicos.

No início dos anos de 1990, surgiram relatos de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes às drogas convencionais. Isso causa uma grande preocupação pela comunidade médica e científica [6, 12]. A tuberculose multiresistente, TBMR, surgiu pelo uso inadequado das drogas durante o tratamento, ou seja, por pacientes que iniciam o tratamento e, após dois meses, por já se sentirem melhor o interrompem dando oportunidade de cepas resistentes à medicação de se reproduzir. Não existe um tratamento específico para combater a TBMR, os medicamentos utilizados são caros e sem nenhuma certeza da cura.

Dentre as prioridades para o combate à tuberculose, o desenvolvimento de novas drogas para substituírem aquelas comprometidas pela resistência é premente para o desenvolvimento de um tratamento quimioterápico eficaz [13]. O principal objetivo da quimioterapia é atacar um processo metabólico específico de um microrganismo que seja expresso durante sua interação patológica com células do hospedeiro mamífero, resultando desta forma em toxicidade seletiva.

1.2. Casos de Tuberculose no Mundo

A Organização Mundial de Saúde, OMS, estima que quase 2 bilhões de pessoas, ou seja, um terço da população do mundo tem tuberculose. Anualmente, 8 milhões de pessoas ficam doentes com tuberculose e 2 milhões de pessoas no mundo morrem de tuberculose[14].

INTRODUÇÃO

A tuberculose é a maior doença infecciosa do mundo, a que mais mata mulheres de idade reprodutiva e é a causa principal de morte entre pessoas com HIV / AIDS. Estudos anteriores relatam que as pessoas de cor branca têm mais resistência à infecção pela bactéria do que as pessoas de cor negra e que também os macrófagos dos negros exibem maior replicação bacilar que os macrófagos das pessoas de cor branca [15].

Os continentes, asiático e africano retêm a maior prevalência de tuberculose. Globalmente, havia 9,2 milhões de casos novos e 1,7 milhões de mortes de tuberculose em 2006, incluindo 0,7 milhões de casos e 0,2 milhões de mortes com pessoas com HIV positivo[14]. A Figura 1 mostra os 22 países são responsáveis por 80% dos casos de tuberculose no mundo, sendo o Brasil o 15º colocado no ranking segundo a OMS.

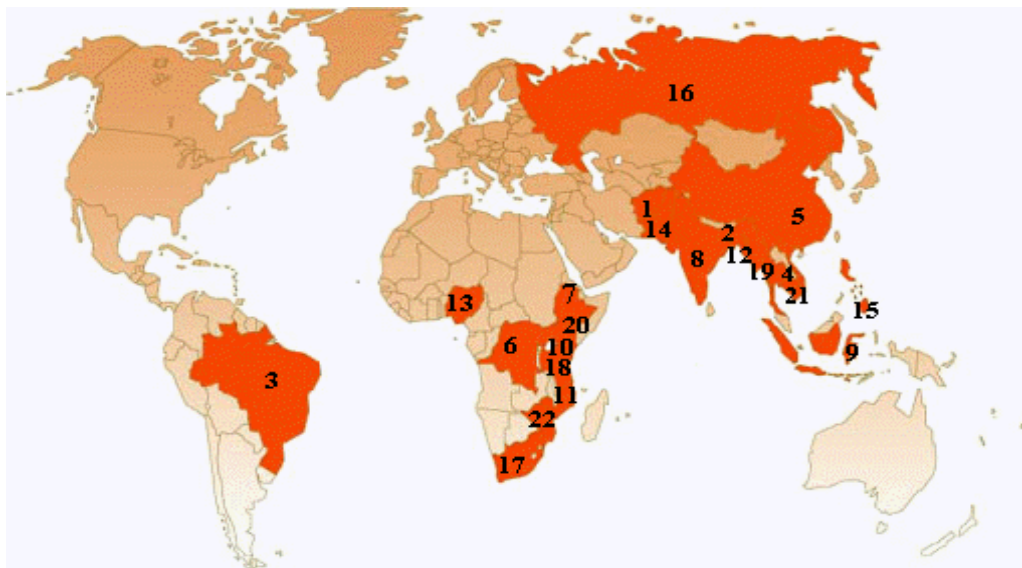


Figura 1. Mapa com os 22 países que são responsáveis por 80% dos casos de tuberculose no mundo.

A TB é erroneamente classificada como doença de países subdesenvolvidos, isso porque a distribuição de renda, a má informação e a má orientação sobre o tratamento leva a falta de controle sobre a epidemia. Em países desenvolvidos, a tuberculose é menos comum e é principalmente uma doença urbana. A incidência de doença varia de 40 por 100.000 habitantes em Londres para menos que 5 por 100.000 habitantes na zona rural, região sudoeste da Inglaterra [16]; a média nacional é 13 por 100.000. As taxas mais altas na Europa Ocidental estão em Portugal (42 por 100.000) e Espanha (20 por 100.000). Estas taxas se comparam com 113 por 100.000 na China e 64 por 100.000 no Brasil. Nos Estados Unidos, os casos de tuberculose eram 4.9 por 100.000 habitantes em 2004 [16].

INTRODUÇÃO

A incidência de TB varia com a idade. Na África, a TB afeta os adolescentes e os adultos jovens principalmente [17]. Porém, em países onde a TB foi de alta para baixa incidência, como nos Estados Unidos, a TB é principalmente uma doença de pessoas mais velhas [17, 18]. Há vários fatores conhecidos que tornam as pessoas mais suscetíveis para infecção de TB: mundialmente o mais importante destes é o HIV. Co-infecção com HIV é um problema particular na África Sub-Sahariana, devido à incidência alta de HIV nestes países [18]. Também pessoas que fumam mais de 20 cigarros por dia aumentam o risco de TB de dois para quatro vezes [19, 20].

O número de casos de TBMR a drogas convencionais ainda é baixo segundo o relatório da OMS [21], mas preocupante. A Figura 2 mostra casos de TBMR já registrados em 2007, onde observa-se que os países com baixa incidência de tuberculose apresentam casos de TBMR, marcados com círculos.

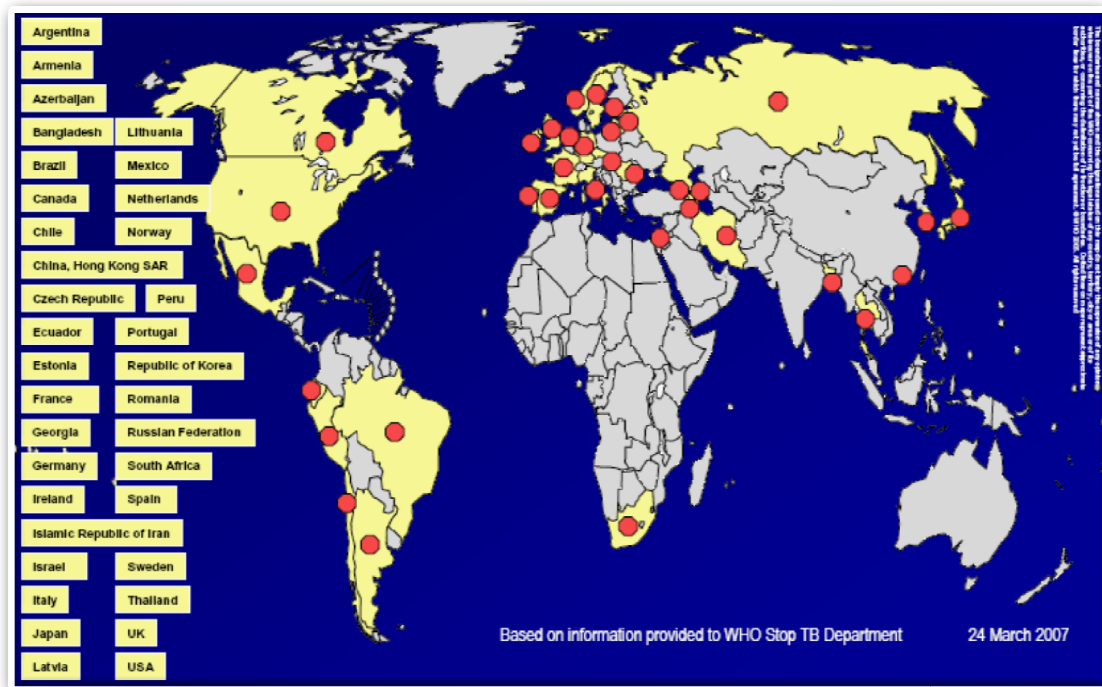


Figura 2. Mapa de casos de TBMR confirmados nos países em 2007.

Países que tinham condições de controlar e até mesmo erradicar a TB de sua região, agora vão ter que lidar com uma doença para a qual ainda não existe cura ou um tratamento específico.

1.3. Fisiologia Bacteriana - *Mycobacterium tuberculosis*

O *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) é o agente etiológico da tuberculose, também conhecido como bacilo de Koch, em homenagem a Robert Koch (*1843 - †1990), seu descobridor. É uma bactéria aeróbica, em forma de bastões (bacilo).

A parede celular da micobactéria é composta de três macromoléculas associadas covalentemente: o peptídeoglicano, arabinogalactan e ácidos micólicos, que frequentemente são descritos como *micolil-arabinogalactan-peptideoglican complex* (mAGP). Cerca de dois terços dos resíduos de arabinose na forma furanosídica pertencentes ao término não-redutor da macromolécula de arabinogalactan são associados covalentemente aos ácidos micólicos através de ligações ésteres. Estes são responsáveis pela sua resistência a ação de agentes químicos, grande seletividade e barreira biológica para entrada de fármacos na célula bacteriana [22].

Adicionalmente, sua parede celular tem a habilidade de modificar sua permeabilidade a diferentes compostos [15], acredita-se que a parede da bactéria tenha papel protetor, suprimindo radicais livres, e assim protegendo a célula de agentes oxidantes produzidos pelo seu hospedeiro, o macrófago, a primeira célula de defesa do corpo [22, 23].

Cerca de 60% do peso seco da bactéria corresponde aos ácidos micólicos, os quais conferem grande hidrofobicidade à bactéria [24]. Para se ter uma dimensão da importância da biossíntese de lipídios nessa bactéria, pode-se observar, por meio do genoma desse microorganismo, um número de 250 enzimas envolvidas no metabolismo de lipídios, enquanto a *Escherichia coli* dispõe de 50 enzimas [25, 26]. A Figura 3 mostra todo o mecanismo de biossíntese da parede celular.

INTRODUÇÃO

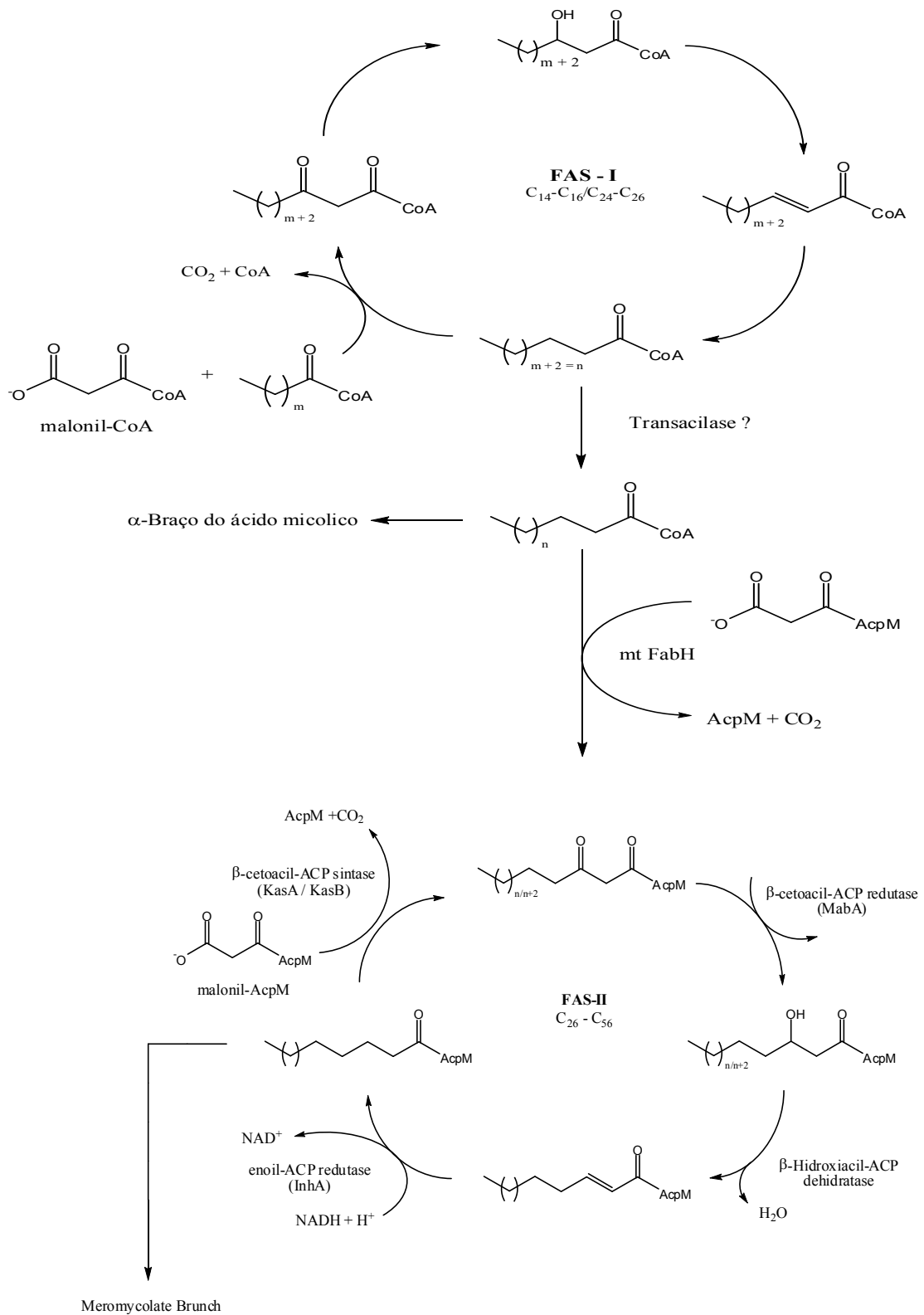
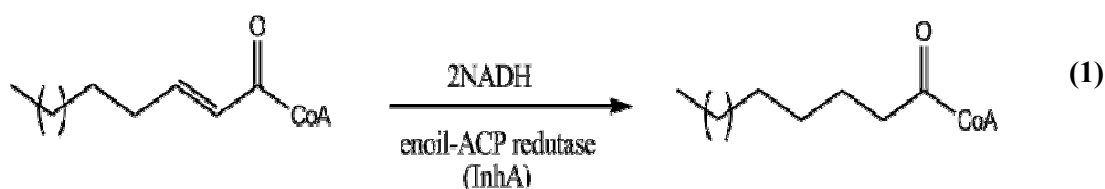


Figura 3. Mecanismo de biosíntese da parede celular da micobacteria [22].

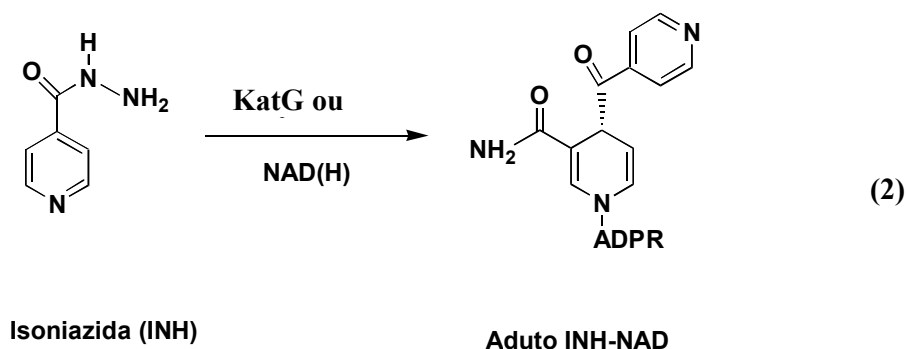
INTRODUÇÃO

O MTB é uma bactéria de crescimento lento, podendo levar até 24 horas para se dividir, o que é bastante lento comparado a outras bactérias cuja divisão se dá em minutos como a *escherichia coli* [26]. Nos testes de detecção, o MTB não tem classificação como gram positiva ou negativa, pois o método de coloração de gram não funciona; é usado o método de coloração de Ziehl-Neelsen [1, 22], feita com uma solução álcool-ácida para sua identificação, sendo assim classificada como uma bactéria ácido-álcool resistente. São resistentes a desinfetantes fracos e pode sobreviver ao ar por um curto período de tempo. Só consegue se reproduzir no organismo de um hospedeiro. São sensíveis a agentes físicos como o calor e a radiação ultravioleta [1].

A enzima enoil-ACP redutase (InhA) faz parte de uma etapa do ciclo responsável pelo alongamento da cadeia do ácido micólico [22], cuja reação é mostrada na FAS II da Figura 3 e a reação em destaque está ilustrada na Equação 1.



A isoniazida, ilustrada na Equação 2, hidrazida do ácido isonicotínico, INH, foi primeiramente reconhecida como um agente efetivo no tratamento de infecção com MTB em 1952 [27]. Tanto MTB como *Mycobacterium bovis* BCG são extremamente suscetíveis a esta droga em concentrações que variam de 0,02 a 0,2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ [28], enquanto que outras espécies de micobactéria são menos suscetíveis. A isoniazida é um bactericida e é tanto a pró-droga sintética mais antiga como a mais frequentemente prescrita para infecção e profilaxia contra tuberculose. No entanto, como mencionado anteriormente, o aparecimento de cepas de MTB resistentes a esta droga tem comprometido a utilização da mesma.



INTRODUÇÃO

A partir de uma abordagem genética, utilizando a seleção de mutações espontâneas que conferiam resistência à isoniazida, o alvo do mecanismo de ação da IZD foi demonstrado ser a enzima NADH-dependente 2-*trans* enoil-ACP redutase (ACP = proteína carreadora de acilas) que é codificada pelo gene *inhA* [29]. A enzima enoil-ACP redutase (InhA) catalisa a transferência de H⁺ de NADH para o substrato, resultando na saturação do mesmo. A porção não-lipídica do substrato pode ser tanto um ACP quanto a coenzima A (CoA). A InhA tem preferência por substratos enoil tioésteres de cadeia carbônica longa, sintetizando, desta forma, ácidos graxos saturados que seriam utilizados como precursores para a síntese de cadeias lipídicas mais longas e estas incorporadas em ácidos micólicos [30].

Consistente com esta proposta foram as evidências experimentais que demonstraram que a inativação do gene *inhA* de *MTB* e o tratamento com a isoniazida resultarão em mudanças morfológicas da parede celular micobacteriana similares, resultando na lise celular [31]. A isoniazida é uma pró-droga que é ativada pela enzima Catalase Peroxidase codificada pelo gene *katG*, ilustrado na Equação 2, na presença de íons manganês, NAD(H) e oxigênio [10, 32-34]. O fragmento acil-piridina da isoniazida, resultante da ação da enzima KatG, associa-se covalentemente ao carbono 4 da coenzima, formando um aduto, e este forma um complexo binário com a espécie selvagem da enzima InhA de *MTB* [35], com uma constante de dissociação com valor menor do que 0.4 nmol.L⁻¹ [36].

Recentemente, foi demonstrado que o aduto INH-NAD é um inibidor competitivo do tipo “*slow-onset tight-binding*” da enzima InhA de *MTB*, onde uma associação não-covalente é seguida por uma mudança conformacional que resulta no aumento da afinidade da enzima pelo inibidor [37].

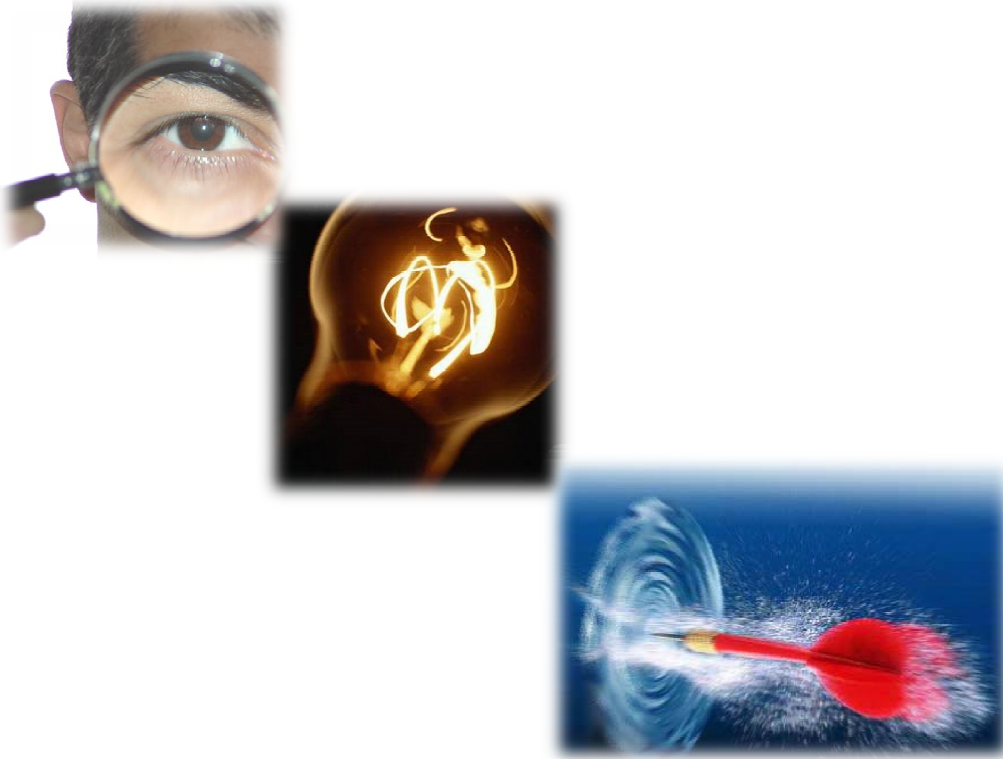
A demonstração de que as enzimas InhA clonadas e purificadas de isolados clínicos resistentes à isoniazida, com mutações no gene estrutural *inhA*, apresentam constantes de dissociação mais elevadas para o substrato NADH [38] reforça hipótese de que a enzima InhA seja o alvo da ação da isoniazida. Cerca de 50 % das cepas resistentes à isoniazida são devido a mutações no gene estrutural da Catalase Peroxidase, *katG*, a enzima ativadora da isoniazida, e aproximadamente 25 % das cepas resistentes apresentam mutações no gene estrutural da *inhA*, o alvo de ação da isoniazida ativada [39]. Mutações em três genes adicionais (*ahpC*, *kasA* e *ndh*) têm sido associados ao restante das cepas resistentes à INH. Desta forma, qualquer composto químico que atuasse diretamente sobre a atividade enzimática da InhA sem que houvesse a necessidade de ativação, portanto uma droga e não

INTRODUÇÃO

uma pró-droga, seria um agente antimicobacteriano efetivo para o tratamento de cerca de 50 % dos casos acometidos com cepas resistentes à INH.

As mutações nas enzimas KatG e/ou InhA bem como outras mutações tem sido o principal motivo da resistência da bactéria à isoniazida [40] e ressurgimento da tuberculose no mundo. A comunidade científica busca novas drogas [25, 41] ou novas vacinas para essa terrível enfermidade, mas para isso é necessário interesse e investimento dos laboratórios que produzem fármacos e do próprio governo. O ressurgimento dessa antiga doença é reflexo do descaso na saúde pública e um desastre na saúde mundial.

CAPÍTULO 2: JUSTIFICATIVAS E OBJETIVO



*“A percepção do desconhecido é a mais fascinante das experiências.
O homem que não tem os olhos abertos para o
misterioso passará pela vida sem ver nada.”*

Albert Einstein.

CAPÍTULO 2: JUSTIFICATIVAS E OBJETIVO

O conhecimento dos mecanismos moleculares de ação dos fármacos é de fundamental importância para o desenvolvimento de novas drogas menos tóxicas e mais eficazes, na inibição das rotas de resistências microbianas e virais [42-46]. Nos últimos anos, surgiram inúmeros relatos de cepas microbianas ultra-resistentes, o que tem causado grande preocupação da comunidade médico-científica.

As resistências desenvolvidas por vários microorganismos às drogas tradicionais são cada vez mais frequentes. Por exemplo, os microorganismos *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoea*, *Salmonella* e *Mycobacterium tuberculosis* [12] têm apresentado elevados índices de resistência a vários antibióticos. Em particular, a tuberculose tem despertado, nos últimos anos, grande preocupação por parte das autoridades sanitárias internacionais. A Organização Mundial da Saúde declarou, em 1993, ser a tuberculose uma emergência global [6, 26]. O surgimento de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* com ultra-resistência a diversos fármacos tem-se constituído em um problema adicional, já que são poucas as drogas efetivas disponíveis contra a tuberculose, e nenhuma delas é efetiva contra às espécies resistentes.

A literatura reporta diferentes propostas de mecanismos de ação da isoniazida e da etionamida, ETH [8, 11], as quais atuam inibindo enzimas que sintetizam a parede celular micobacteriana [6]. Isoniazida e etionamida são pró-drogas antituberculose que são convertidas enzimaticamente em espécies ativas, tal como descrito previamente, ilustrado na Figura 4. A ativação destas drogas envolve processos de transferência de elétrons promovidos por enzimas peroxidase-catalase (KatG) e flavoproteína (EtaA). Os intermediários envolvidos na ação farmacológica destes compostos não estão completamente bem definidos, nem mesmo a reatividade destas pró-drogas frente a determinados agentes oxidantes.

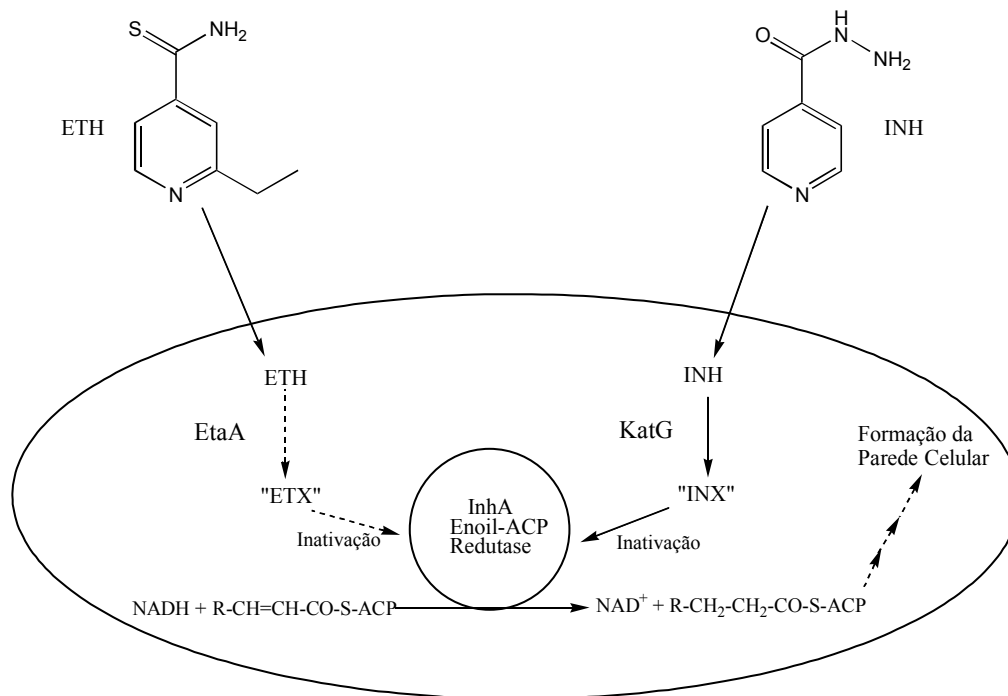


Figura 4. Proposta simplificada para o mecanismo de ação da Isoniazida e Etionamida [25].

A isoniazida é uma pró-droga que é ativada enzimaticamente pela ação da catalase-peroxidase micobacteriana conhecida como katG, originando um intermediário reativo que inibe a enzima InhA. Esta enzima é uma 2-*trans*-enoilredutase-NADH, responsável pela síntese de ácidos micólicos, constituintes da parede celular do *Mycobacterium* [6, 10, 11].

Os fármacos anti-tuberculose, ilustrados na Figura 5, isoniazida (INH) e etionamida (ETH), e seus similares menos eficientes, isotonicotinamida (ITIO) e tionicotinamida (TIO), que provavelmente compartilham mecanismos de ação semelhantes, são derivados piridínicos, com propriedades gerais bem definidas na literatura [28, 47-50].

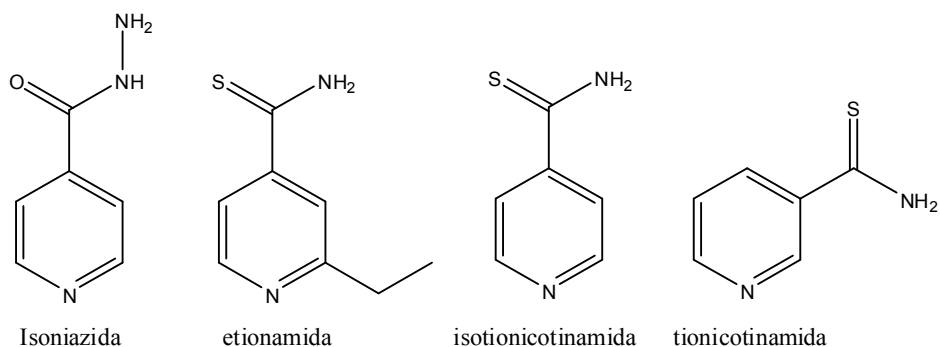


Figura 5. Pró-drogas utilizadas no tratamento da tuberculose.

Resultados recentes, obtidos em nossos laboratórios, mostraram que complexos de metais de transição são capazes de inibir a ação enzimática da *InhA* das espécies selvagem e multiresistente, na ausência da katG e/ou NADH [25, 51, 52]. Os estudos dos mecanismos das metalodrogas são de grande interesse por acrescentarem importantes informações às rotas de ativação destas drogas, facilitando o desenvolvimento de agentes terapêuticos inorgânicos mais eficientes.

Sistemas metálicos do tipo $[M(CN)_5(OH_2)]^{3-}$ exibem reatividades químicas frente aos derivados piridínicos [53-65], formando complexos termodinamicamente estáveis. O comportamento redox destes centros metálicos coordenados aos derivados piridínicos possibilita relacioná-los como sistemas adequados aos estudos de modelagem dos processos de transferência de elétrons [53, 54, 56, 66], os quais são responsáveis pela ativação destas drogas *in vivo*. Por consequência, os estudos de aplicação destes compostos como potenciais metalofármacos tornam-se bastante interessantes. Resultados, sobre a reatividade da tionicotinamida coordenada a centro metálicos M^{III} indicaram que a coordenação a este sítio favorece os processos oxidativos do ligante. Neste sistema, a tionicotinamida, reage preferencialmente através de mecanismo *intramolecular* de transferência de elétrons (TE) [57]. Adicionalmente, a cinética de transferência *intermolecular* de elétrons da tionicotinamida frente ao íon ferricianeto mostrou uma forte dependência do pH, reforçando a atribuição de que a coordenação a sítios ácidos favorece o processo oxidativo do ligante.

Além das esperadas contribuições ao conhecimento dos mecanismos de atuação destes ligantes, estes resultados fundamentam a possibilidade de preparação de drogas auto-ativáveis, utilizando-se os seus complexos com os metais no estado de oxidação M^{2+} . Tais sistemas são de suma importância, posto que a resistência microbiana frente a algumas drogas antituberculose se dá pela supressão de sistemas enzimáticos de ativação dos fármacos. Desta forma, as investigações dos mecanismos atuantes nestes sistemas poderão resultar em espécies com potencialidades farmacológicas. Destaca-se que sistemas semelhantes de “auto-ativação“, que usam oxigênio como iniciador do processo oxidativo, já são conhecidos na literatura [67, 68], como por exemplo, o complexo metálico natural de ferro-bleomicina.

Este trabalho tem como objetivo principal sintetizar e caracterizar complexos inorgânicos do tipo $Na_3[Fe(CN)_5L]$, onde L é um ligante derivado da isoniazida, capaz de

JUSTIFICATIVAS E OBJETIVO

inibir a ação enzimática da *2-trans-enoil redutase* (InhA) das espécies tipo selvagem (WT) e multiresistente (S94A), na ausência da KatG e/ou NADH.

O comportamento redox reversível destes centros metálicos coordenados aos derivados piridínicos possibilita elencá-los como sistemas adequados aos estudos de modelagem mecanística dos processos de transferência de elétrons, os quais são responsáveis pela ativação destas drogas *in vivo*. Por consequência, os estudos de aplicação destes compostos como potenciais metalofármacos tornam-se bastante interessantes.

CAPÍTULO 3: PARTE EXPERIMENTAL



*“O prudente aproveita a sua experiência.
O sábio aproveita a experiência dos outros.”*

John Collins (1848-1908), crítico e conferencista inglês.

CAPÍTULO 3: PARTE EXPERIMENTAL

3.1 EQUIPAMENTOS E TÉCNICAS EXPERIMENTAIS

3.1.1 Espectroscopia Eletrônica de Absorção na Região do UV-visível

Os espectros eletrônicos, nas regiões do visível e ultravioleta, foram obtidos em um espectrofotômetro Hewlett-Packard, modelo 8453 Diode Array. As amostras foram analisadas em solução utilizando célula de quartzo retangular de caminho ótico de 1,0 cm.

3.1.2 Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho (FTIR)

Os espectros vibracionais na região do infravermelho foram obtidos a partir de amostras dispersas em pastilhas de brometo de potássio (KBr), utilizando-se um espectrômetro FTLA 2000 series laboratory ABB Bomem, com janela espectral de 200 a 8000 cm^{-1} .

3.1.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os experimentos de ressonância magnética nuclear foram obtidos em um espectrômetro BRUKER modelo AVANCE DRX 500, 500MHz, utilizando como padrão interno em água o composto 2,2'-dimetil-2-silapentano-5-sulfonato de sódio (DSS) e para padrão interno nos solventes orgânicos utilizou-se tetrametilsilano (TMS)

3.1.4 Medidas Eletroquímicas

As medidas eletroquímicas foram realizadas em um sistema eletroquímico da Bioanalytical System Inc. modelo BAS100W, à temperatura ambiente, usando-se uma célula convencional de três eletrodos: platina, carbono vítreo e prata-cloreto de prata (KCl 3,5 mol.L^{-1} – BAS), como eletrodos auxiliar, trabalho e de referência, respectivamente.

3.2 PROCEDIMENTO SINTÉTICO

3.2.1 Reagentes e Soluções
Ácido Clorídrico (procedência Synth), utilizado no controle do pH das soluções.

Ácido Trifluoro Acético (procedência Aldrich), utilizado na preparação do eletrólito de suporte e no controle de pH das soluções.

Álcool Etilico (procedência Cromoline), utilizado na síntese dos compostos orgânicos.

Anidrido Acético (procedência Vetec), utilizado na síntese dos compostos orgânicos.

Azida de Sódio (procedência Merck), utilizado na síntese dos compostos orgânicos.

Benzil Bromo (procedência Vetec), utilizado na síntese dos compostos orgânicos.

Cloreto de Amônio (procedência Synth), utilizado na síntese dos compostos orgânicos.

Dimetilformamida (procedência Vetec), utilizado no estudo cinético.

Disulfeto de carbono (procedência Vetec), utilizado na síntese dos compostos orgânicos.

Éter Etilico (procedência Synth), utilizado na síntese dos compostos orgânicos.

Hexano (procedência Synth), utilizado na síntese dos compostos orgânicos.

Hidróxido de Amônio (procedência Synth), utilizado na preparação do complexo de partida $\text{Na}_3[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NH}_3] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$.

Hidróxido de Potássio (procedência Vetec), utilizado no tratamento de purificação da água e na síntese dos compostos orgânicos.

Hidróxido de Sódio (procedência Reagen), utilizado para gerar $\text{NH}_3(\text{g})$ por meio da reação durante a síntese do complexo de partida $\text{Na}_3[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NH}_3] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ e no controle do pH das soluções empregadas nos experimentos eletroquímicos.

Iodeto de Sódio (procedência Vetec), utilizado em solução alcoólica saturada para precipitação dos complexos do tipo $\text{Na}_3[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{L}] \cdot x\text{H}_2\text{O}$

Iodometano (procedência Aldrich), utilizado na síntese dos compostos orgânicos.

Permanganato de Potássio (procedência Synth), utilizado no tratamento da água.

Trietilamina (procedência Synth), utilizado na síntese dos compostos orgânicos.

Trietoximetano (procedência Synth), utilizado na síntese dos compostos orgânicos.

Tossilato de sódio (procedência Synth), utilizado na síntese dos compostos orgânicos.

Tolueno (procedência Vetec), utilizado na síntese dos compostos orgânicos.

Solventes Deuterados (procedência Aldrich), óxido de deutério 99,8% de pureza, DMSO- d_6 deuterado 99 % e CDCl_3 deuterado 99% utilizada como solvente dos complexos e dos ligantes, nos experimentos espectroscópicos de ressonância magnética nuclear.

PARTE EXPERIMENTAL

Na₂[Fe(CN)₅NO] · 2H₂O (nitroprussiato de sódio) M.M = 297,95 g.mol⁻¹ (procedência Merck), utilizado, sem purificação prévia, na síntese do complexo de partida
Na₃[Fe(CN)₅(NH₃)] · 3H₂O M.M. = 325,98 g.mol⁻¹.

C₈H₈O₂ (4-metoxibenzaldeído) (procedência Merck) M.M. = 136,2 g.mol⁻¹

C₆H₇N₃O (isonicotinohidrazida) (procedência Aldrich) M.M. = 179,2 g.mol⁻¹

C₆H₇N₃O (nicotinohidrazida) (procedência Aldrich) M.M. = 179,2 g.mol⁻¹

C₆H₇N₃O (isoniazida) (procedência Aldrich) M.M. = 179,2 g.mol⁻¹

C₆H₄N₂ (4-cianopiridina) (procedência Aldrich) M.M. = 104,1 g.mol⁻¹

C₇H₆O (benzaldeído) (procedência Aldrich) M.M. = 106,1 g.mol⁻¹

C₇H₅FO (4-fluorobenzaldeído) (procedência Aldrich) M.M. = 124,11 g.mol⁻¹

Água Bidestilada, preparada com 0,4 g de KMnO₄ e 15,0 g de KOH para cada litro de água a ser destilada, utilizada na preparação do eletrólito de suporte.

3.2.2 Sínteses Orgânicas

As sínteses orgânicas foram feitas de acordo com o procedimento da literatura com pequenas modificações [49, 69-73].

SÍNTESE DO N'-BENZILIDENOISONICOTINOHIDRAZIDA (IA4H) E DO N'-BENZILIDENONICOTINOHIDRAZIDA (NA4H); M.M. = 225,25 g.mol⁻¹

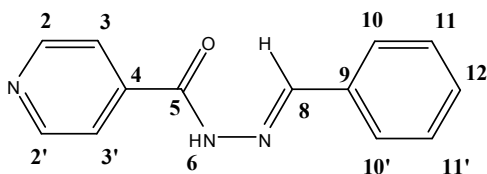
Em um balão de 0,250 L contendo 0,015 L de etanol adicionou-se 0,600g (5,6 mmol) do benzaldeído. Após sua completa dissolução adicionou-se 0,786g (5,6 mmol) da hidrazida (Isoniazida para a síntese do IA4H ou Nicotinahidrazida para a síntese do NA4H). A solução foi colocada sob refluxo por 2h. Após esse tempo a mesma foi resfriada a temperatura ambiente e adicionou-se água resultando na precipitação de um sólido branco, que foi filtrado e lavado com água gelada. A recristalização foi feita dissolvendo-se o sólido em uma mistura etanol/água 50% e re-precipitando por evaporação lenta. Rendimento do produto da síntese 83% para IA4H e 72% para NA4H. Dados de RMN de ¹H em DMSO-d₆: Valores de deslocamento químico em δ e constante de acoplamento em Hz: **IA4H**: H_{2,2'} (8,74 dd, 4,5 e 1,6), H_{3,3'} (7,83 dd; 4,5 e 1,6), H₆ (12,08 s), H₈ (8,48 s), H_{10,10'} (7,76 dd; 6,9 e 1,7), H_{11,11'} (7,49 dd; 6,9 e 1,7), H₁₂ (7,48 dd; 6,9 e 1,7), ilustrado na Figura 6.

NA4H: H₂ (9,06 d; 1,5), H₄ (8,25 dd; 4,7 e 1,5), H₅ (7,57 t; 4,7), H₆ (8,76 dd; 4,7 e 1,5), H₈ (12,05 s), H₁₀ (8,44 s), H_{12,12'} (7,76 d; 5,5), H_{13,13'} (7,44 t; 5,5), H₁₄ (7,47 d; 5,5), ilustrado na Figura 7.

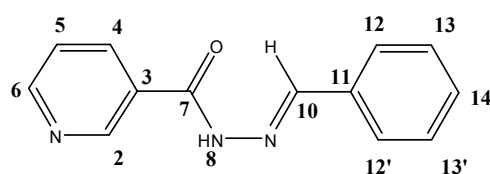
Dados de RMN de ¹³C em DMSO-d₆: **IA4H**: ¹³C: C_{2,2'} (150,3), C_{3,3'} (121,5), C₄ (140,6), C₅ (161,6), C₈ (149,0), C₉ (134,0), C_{10, 10'} (127,3), C_{11, 11'} (128,9), C₁₂ (130,4), ilustrado na Figura 8.

NA4H: ¹³C: C₂ (149,0), C₃ (134,5), C₄ (136,0), C₅ (124,0), C₆ (152,8), C₇ (162,3), C₁₀ (148,0), C₁₁ (129,6), C_{12, 12'} (127,7), C_{13, 13'} (129,4), C₁₄ (130,8), ilustrado na Figura 9.

IA4H



NA4H



**SÍNTESE DO N'-(4-FLUOROBENZILIDENO)ISONICOTINOHIDRAZIDA (IA4F)
E N'-(4-FLUOROBENZILIDENO)NICOTINOHIDRAZIDA (NA4F);**

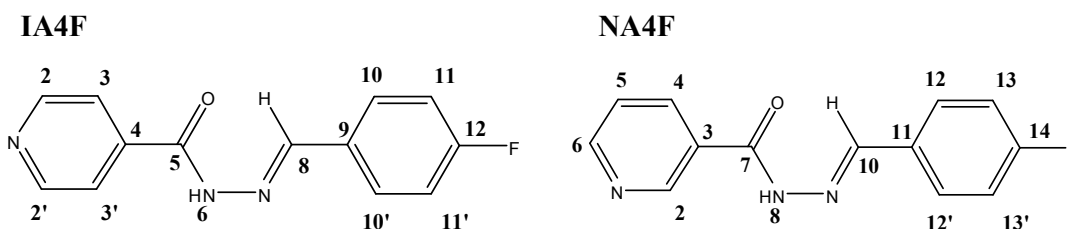
M.M. = 243,24 g.mol⁻¹

Em um balão de 0,250 L contendo 0,015 L de etanol adicionou-se 1,241 g (10 mmol) do 4-fluorobenzaldeído. Após sua completa dissolução adicionou-se 1,792 g (10 mmol) da hidrazida (isoniazida para a síntese do IA4F ou nicotinahidrazida para a síntese do NA4F). A solução foi colocada sob refluxo por 2h. Após esse tempo a mesma foi resfriada a temperatura ambiente e adicionou-se água resultando na precipitação de um sólido branco, que foi filtrado e lavado com água gelada. A recristalização foi feita dissolvendo-se o sólido em uma mistura etanol/água 50% e re-precipitando por evaporação lenta. Rendimento do produto da síntese 84% para IA4F e 82% para NA4F. Dados de RMN de ¹H em DMSO-d₆: Valores de deslocamento químico em δ e constante de acoplamento em Hz: **IA4F**: ¹H: H_{2,2'} (8,78 dd, 4,3 e 1,4), H_{3,3'} (7,82 dd, 4,3 e 1,4), H₆ (12,08 s), H₈ (8,47 s), H_{10,10'} (7,80 d; 8,8), H_{11,11'} (7,31 t; 8,8), ilustrado na Figura 10; COSY, Figura 11; HMBCgs, Figura 12.

NA4F: ¹H: H₂ (9,06 d; 1,5), H₄ (8,25 d; 4,7), H₅ (7,57 d; 4,7), H₆ (8,76 dd; 4,7), H₈ (12,00 s), H₁₀ (8,45 s), H_{12,12'} (7,81 d; 8,3), H_{13,13'} (7,31 t; 8,3), ilustrado na Figura 13.

Dados de RMN de ¹³C em DMSO-d₆: **IA4F**: ¹³C: C_{2,2'} (150,3), C_{3,3'} (121,5), C₄ (140,4), C₅ (161,6), C₈ (147,9), C₉ (130,6), C_{10, 10'} (129,4), C_{11, 11'} (116,9), C₁₂ (163,3 d; 985), ilustrado na Figura 14.

NA4F: ¹³C: C₂ (148,5), C₃ (129,1), C₄ (135,4), C₅ (123,6), C₆ (152,3), C₇ (164,2), C₁₀ (147,3), C₁₁ (130,7), C_{12, 12'} (129,3), C_{13, 13'} (115,9 d; 85), C₁₄ (161,9 d; 975), ilustrado na Figura 15.



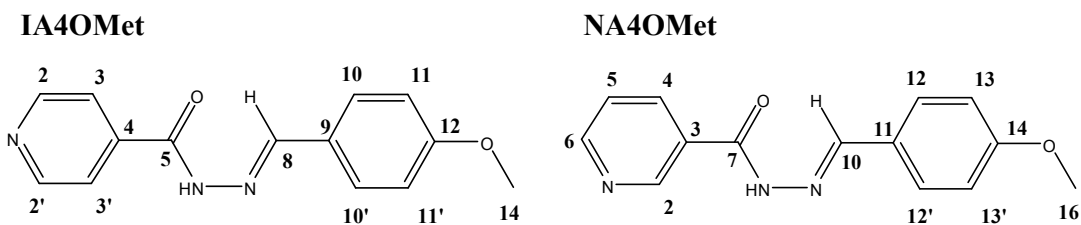
SÍNTESE DO (E)-N'-(4-METOXIBENZILIDENO)ISONICOTINOHIDRAZIDA (IA4OMet) E (E)-N'-(4-METOXIBENZILIDENO)NICOTINOHIDRAZIDA (NA4OMet); M.M. = 255,27 g.mol⁻¹

Em um balão de 0,250 L contendo 0,015 L de etanol adicionou-se 1,362 g (10 mmol) do 4-metoxibenzaldeído. Após sua completa dissolução, adicionou-se 1,792 g (10 mmol) da hidrazida (isoniazida para a síntese do IA4OMet ou nicotinahidrazida para a síntese do NA4OMet). A solução foi colocada sob refluxo por 2h. Após esse tempo, a mesma foi resfriada a temperatura ambiente e adicionou-se água resultando na precipitação de um sólido branco, que foi filtrado e lavado com água gelada. A recristalização foi feita dissolvendo-se o sólido em uma mistura etanol/água 50% e re-precipitando por evaporação lenta. Rendimento do produto da síntese 92% para IA4OMet e 89% para NA4OMet. Dados de RMN de ¹H em DMSO-d₆: Valores de deslocamento químico em δ e constante de acoplamento em Hz: **IA4OMet**: ¹H: H_{2,2'} (**8,78** dd, 6,0 e 1,6), H_{3,3'} (**7,81** dd; 6,0 e 1,6), H₆ (**11,94** s), H₈ (**8,41** s), H_{10,10'} (**7,70** dd; 8,2), H_{11,11'} (**7,03** dd; 8,2), H₁₄ (**3,81** s), ilustrado na Figura 16.

NA4OMet: ¹H: H₂ (**9,07** s), H₄ (**8,25** d; 7,9), H₅ (**7,56** d; 7,9), H₆ (**8,74** dd; 7,9), H₈ (**11,90** s), H₁₀ (**8,39** s), H_{12,12'} (**7,69** d; 8,7), H_{13,13'} (**7,01** d; 8,7), H₁₆ (**3,79** s), ilustrado na Figura 17.

Dados de RMN de ¹³C em DMSO-d₆: **IA4OMet**: ¹³C: C_{2,2'} (**150,9**), C_{3,3'} (**122,1**), C₄ (**141,3**), C₅ (**162,0**), C₈ (**149,6**), C₉ (**127,2**), C_{10, 10'} (**129,6**), C_{11, 11'} (**115,0**), C₁₂ (**161,7**), C₁₄ (**56,0**), ilustrado na Figura 18, HMBCgs; Figura 19.

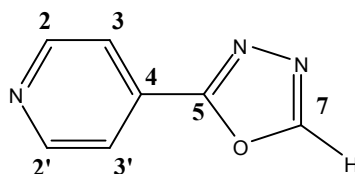
NA4OMet: ¹³C: C₂ (**148,6**), C₃ (**129,3**), C₄ (**135,4**), C₅ (**123,6**), C₆ (**152,2**), C₇ (**161,6**), C₁₀ (**148,4**), C₁₁ (**126,7**), C_{12, 12'} (**128,9**), C_{13, 13'} (**114,4**), C₁₄ (**161,1**), C₁₆ (**55,3**), ilustrado na Figura 20. COSYgs; Figura 21, HSQCgs; Figura 22, HMBCgs; Figura 23.



SÍNTESE DO 4-(1,3,4-OXADIAZOL-2-IL)PIRIDINA (IO3H);

M.M. = 147,13 g.mol⁻¹

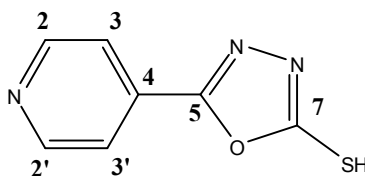
Uma mistura de isoniazida (10 mmol) e CH(OEt)₃ (0,020 L) e Tossilato (5 mg) em tolueno (0,010 L) foi refluxada por 2h. A mistura foi resfriada à temperatura ambiente e levada ao freezer, o que resultou na precipitação de um sólido. A recristalização foi feita dissolvendo-se o sólido em uma mistura acetato de etila/hexano e re-precipitando por evaporação lenta na forma de um sólido cristalino laranja. O Rendimento do produto formado foi de 75%. Dados de RMN de ¹H em DMSO-d₆: Valores de deslocamento químico em δ e constante de acoplamento em Hz: **IO3H**: ¹H: H_{2,2'} (**8,84** d, 5,25), H_{3,3'} (**7,96** d; 5,25), H₇ (**9,48** s), ilustrado na Figura 24. Dados de RMN de ¹³C em DMSO-d₆: C_{2,2'} (**151,5**), C_{3,3'} (**120,8**), C₄ (**130,9**), C₅ (**162,7**), C₇ (**155,8**), ilustrado na Figura 25.



SÍNTESE DO 5-(4-PIRIDIL)-1,3,4-OXADIAZOL-2-TIOL (IO3SH);

M.M. = 179,2 g.mol⁻¹

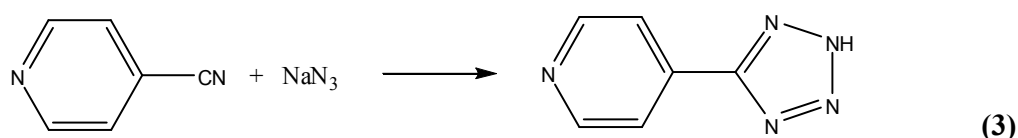
Em um balão de 0,250 L contendo 0,150 L de etanol, adicionou-se 6,857g (50 mmol) de isoniazida a esta solução adicionou-se KOH 2 mol.L⁻¹ até a completa dissolução do sólido. Em seguida, adicionou-se cuidadosamente o 0,004 L de CS₂ (disulfeto de carbono), o que levou a formação de uma solução fortemente amarela. A mistura foi levada a refluxo por 4h. A mistura foi resfriada o solvente removido por rotoevaporação sob pressão reduzida e o resíduo dissolvido em 100 g de água/gelo. Foi feita uma acidificação com HCl 1 mol.L⁻¹ até pH 4, resultando na formação de um sólido levemente amarelo, que foi filtrado, e lavado com H₂O e seco em dessecador. Rendimento do produto da síntese 92%. Dados de RMN de ¹H em DMSO-d₆: Valores de deslocamento químico em δ e constante de acoplamento em Hz: **IO3SH**: ¹H: H_{2,2'} (**8,69** d, 6,3), H_{3,3'} (**7,99** d; 6,25), ilustrado na Figura 26. Dados de RMN de ¹³C em DMSO-d₆: C_{2,2'} (**150,8**), C_{3,3'} (**119,6**), C₄ (**129,8**), C₅ (**158,4**), C₇ (**177,8**), ilustrado na Figura 27.



SÍNTESE DO 4-(5-METIL-1,3,4-OXADIAZOL-2-IL)PIRIDINA (IO3Met);

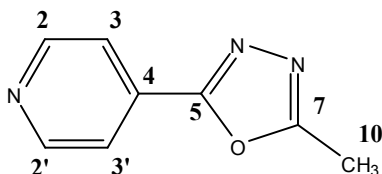
M.M. = 161,16 g.mol⁻¹

Em um balão de 0,250 L contendo 0,060 L de DMF adicionou-se 10,41 g (0,10 mol) do composto 4-cianopiridina, 8,45 g (0,13 mol) de NaN₃ e 6,9 g (0,13 mol) de NH₄Cl, a mistura foi refluxada a uma temperatura de 120 °C por 24h. Após esse período adicionou-se HCl até pH 3, observou-se a formação de um precipitado branco esta solução foi levada ao freezer o sólido foi filtrado e lavado com água destilada. A res cristalização foi feita em etanol com evaporação lenta do solvente [74]. O Rendimento do produto tetrazolpiridina formado foi de 82%.



Em um balão de 0,500 L contendo 0,300 L de anidrido acético adicionou-se 5 g do tetrazolpiridina, a mistura foi refluxada a uma temperatura de 160 °C por 8 h. Após esse período a solução foi rotoevaporada para reduzir a quantidade de solvente e depois deixada em repouso para cristalização o sólido amarelo foi filtrado e lavado com éter etílico. O Rendimento da síntese foi de 66%. Dados de RMN de ¹H em CDCl₃: Valores de deslocamento químico em δ e constante de acoplamento em Hz:

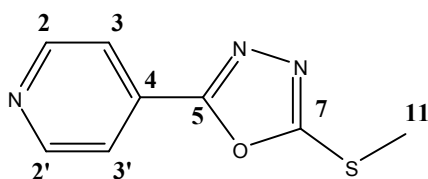
IO3Met: ¹H: H_{2,2'} (**8,81** d, 4,5), H_{3,3'} (**7,92** d, 4,5), H₁₀ (**2,66** s), ilustrado na Figura 28. Dados de RMN de ¹³C em CDCl₃: C_{2,2'} (**151,5**), C_{3,3'} (**120,8**), C₄ (**130,9**), C₅ (**162,7**), C₇ (**155,8**), C₁₀ (**11,8**), ilustrado na Figura 29.



**SÍNTESE DO 4-(5-(METILTIO)-1,3,4-OXADIAZOL-2-IL)PIRIDINA (IO3SMet);
M.M. = 225,25 g.mol⁻¹**

Em uma solução de IO3SMet (3 mmol) e Et₃N (3 mmol) em etanol (0,010 L) à temperatura ambiente, adicionou-se CH₃I (3 mmol). A mistura foi agitada à temperatura ambiente por 6 h. Em seguida adicionou-se mais 3 mmol de CH₃I, mantendo-se agitação por mais 4h. A mistura foi vertida em H₂O (0,020 L) e levada à geladeira, o que resultou na precipitação de um sólido branco cristalino. O Rendimento do produto da síntese foi de 83%. Dados de RMN de ¹H em DMSO-d₆: Valores de deslocamento químico em δ e constante de acoplamento em Hz:

IO3SMet: ¹H: H_{2,2'} (8,80 d, 6,0), H_{3,3'} (7,89 d, 6,0), H₁₁ (2,79 s), ilustrado na Figura 30. Dados de RMN de ¹³C em DMSO-d₆: C_{2,2'} (150,9), C_{3,3'} (119,9), C₄ (130,9), C₅ (163,5), C₇ (166,1), C₁₁ (14,3), ilustrado na Figura 31, HMBCgs; Figura 32.



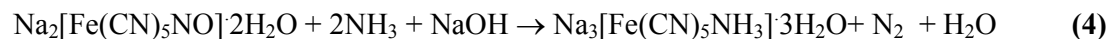
3.2.3 Sínteses Inorgânicas

SÍNTESE DO COMPLEXO $\text{Na}_3[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NH}_3)] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$; M.M. = 325,98 g.mol⁻¹

O complexo aminpentacianoferrato(II) de sódio, foi obtido a partir do pentacianonitrosilferrato(II) de sódio, $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, segundo o procedimento descrito por Brauer [75].

15,0 g (46 mmol) de $\text{Na}_3[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ foram dissolvidos em 0,06 L de uma solução 6 mol.L⁻¹ em NH_3 , sob agitação e em banho de gelo. A solução foi transferida para um recipiente de reação e saturada com amônia, mediante borbulhamento contínuo de $\text{NH}_3(\text{g})$, proveniente de um frasco gerador, contendo $\text{NH}_4\text{OH}(\text{aq})$ com a adição sucessiva de pastilhas de NaOH para produzir NH_3 . Após seis horas de reação, observou-se a formação de um sólido de cor amarelada nas paredes do recipiente. Deixou-se que a reação prosseguisse por um período de 10 horas, efetuando-se, então, a separação do sólido formado, por filtração em funil de placa porosa. Em seguida, lavou-se o sólido com etanol absoluto, para eliminar-se o excesso de NH_3 . Ao filtrado, adicionou-se cerca de 20 g de iodeto de sódio, agitando-se a mistura até completa dissolução, e adicionou-se etanol, lentamente, até que todo o produto precipitasse na forma de um sólido amarelo.

O produto foi re-dissolvido numa quantidade mínima de uma solução 3 mol.L⁻¹ em NH_3 até sua dissolução, para eliminar possíveis traços do pentacianonitrosilferrato(II) de sódio e novamente precipitado por tratamento com iodeto de sódio e adição de etanol, a frio. As operações desta etapa foram realizadas com a solução permanecendo em banho de gelo, e na ausência da luz. A mistura foi filtrada através de um funil de placa porosa, isolando-se o produto desejado e lavando-o com solução 1:4 água-etanol e, em seguida, com etanol absoluto. O sólido obtido foi estocado em dessecador sob vácuo e protegido da luz.



SÍNTESE DO COMPLEXO $\text{Na}_3[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{L})]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$; sendo que L = NA4OMet, IA4OMet, NA4F, IA4F, NA4H, IA4H, IO3H, IO3S, IO3Met e IO3SMet

$\text{Na}_3[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NA4OMet})]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$; M.M. = 564,22 g.mol⁻¹

$\text{Na}_3[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IA4OMet})]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$; M.M. = 564,22 g.mol⁻¹

$\text{Na}_3[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IA4H})]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$; M.M. = 534,04 g.mol⁻¹

$\text{Na}_3[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NA4H})]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$; M.M. = 534,04 g.mol⁻¹

$\text{Na}_3[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NA4F})]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$; M.M. = 572,03 g.mol⁻¹

$\text{Na}_3[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NA4F})]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$; M.M. = 572,03 g.mol⁻¹

$\text{Na}_3[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IO3S})]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$; M.M. = 488,15 g.mol⁻¹

$\text{Na}_3[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IO3H})]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$; M.M. = 456,08 g.mol⁻¹

$\text{Na}_3[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IO3Met})]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$; M.M. = 470,11 g.mol⁻¹

$\text{Na}_3[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IO3SMet})]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$; M.M. = 501,98 g.mol⁻¹

A 3 mL de solução aquosa contendo 0,100 g (307 μmol) de $\text{Na}_3[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NH}_3)]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$, adicionou-se 921 μmol do ligante L previamente dissolvido em 5 mL de água. Deixou-se a mistura reagir por 4h sob agitação e na ausência de luz. Em seguida, efetuou-se sua precipitação adicionando-se, lentamente, em uma solução saturada de NaI em etanol absoluto. O precipitado foi coletado através de filtração em funil de placa porosa, lavado com etanol e estocado em dessecador sob vácuo. Rendimento das sínteses foi em torno de 80%. Dados de RMN de ¹H em D₂O: Valores de deslocamento químico em δ e constante de acoplamento em Hz:

$\text{Na}_3[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IA4H})]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$: H_{2,2'} (9,12 d, 5,25), H_{3,3'} (7,41 d; 5,25), H₈ (8,31 s), H_{10,10'} (7,74 d; 7,3), H_{11,11'} (7,43 dd; 7,3), H₁₂ (7,48 d; 7,3), Figura 33.

$\text{Na}_3[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IA4OMet})]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$: H_{2,2'} (9,18 d, 6,4), H_{3,3'} (7,48 d; 6,4), H₈ (8,19 s), H_{10,10'} (7,75 d; 8,6), H_{11,11'} (6,99 d; 8,6), H₁₄ (3,74 s), Figura 34.

$\text{Na}_3[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IA4F})]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$: H_{2,2'} (9,19 d, 6,5), H_{3,3'} (7,53 d; 6,5), H₈ (8,34 s), H_{10,10'} (7,83 d; 8,7), H_{11,11'} (7,24 dd; 8,7), Figura 35.

$\text{Na}_3[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NA4H})]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$: H₂ (9,30 s), H₄ (7,89 d; 7,7), H₅ (7,26 t; 7,7), H₆ (9,13 d; 7,7), H₁₀ (8,28 s), H_{12,12'} (7,71 t; 6,2), H_{13,13'} (7,40 t; 6,2), H₁₄ (7,41 d; 6,2), Figura 36. COSYgs; Figura 37.

$\text{Na}_3[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NA4OMet})]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$: H₂ (9,29 s), H₄ (7,86 d; 7,0), H₅ (7,29 t; 7,0), H₆ (9,14 d; 7,0), H₁₀ (8,21 s), H_{12,12'} (7,69 d; 8,2), H_{13,13'} (6,91 d; 8,2), H₁₆ (3,79 s), Figura 38, COSYgs; Figura 39.

PARTE EXPERIMENTAL

Na₃[Fe(CN)₅(NA4F)].3H₂O: H₂ (9,29 s), H₄ (7,83 d; 4,8), H₅ (7,24 t; 4,8), H₆ (9,11 d; 4,8), H₁₀ (8,27 s), H_{12,12'} (7,70 d; 8,3), H_{13,13'} (7,09 t; 8,3), Figura 40.

Na₃[Fe(CN)₅(IO3H)].3H₂O: H_{2,2'} (9,28 s), H_{3,3'} (7,61 s), H₇ (9,28 s), Figura 41.

Na₃[Fe(CN)₅(IO3S)].3H₂O: H_{2,2'} (9,19 d; 6,7), H_{3,3'} (7,68 d; 6,7), Figura 42.

Na₃[Fe(CN)₅(IO3Met)].3H₂O: H_{2,2'} (9,21 d; 5,2), H_{3,3'} (7,68 d; 5,2), H₁₀ (2,65 s), Figura 43; COSYgs, Figura 44.

Na₃[Fe(CN)₅(IO3SMet)].3H₂O: H_{2,2'} (9,21 d; 5,6), H_{3,3'} (7,68 d; 5,6), H₁₁ (2,77 s), Figura 45.

Dados de RMN de ¹³C em DMSO-d₆:

Na₃[Fe(CN)₅(IA4H)].3H₂O: C_{equatorial} (179,6), C_{axial} (175,3), C_{2,2'} (157,4), C_{3,3'} (120,5), C₄ (138,1), C₅ (164,7), C₈ (152,7), C₉ (132,8), C_{10, 10'} (127,9), C_{11, 11'} (129,2), C₁₂ (131,9), Figura 46; HSQCgs, Figura 47.

Na₃[Fe(CN)₅(NA4H)].3H₂O: C_{equatorial} (179,9), C_{axial} (175,4), C₂ (154,8), C₃ (132,8), C₄ (135,2), C₅ (123,5), C₆ (159,7), C₇ (164,2), C₁₀ (152,4), C₁₁ (127,7), C_{12, 12'} (128,0), C_{13, 13'} (129,2), C₁₄ (131,5), Figura 48.

Na₃[Fe(CN)₅(IA4OMet)].3H₂O: C_{equatorial} (179,5), C_{axial} (175,1), C_{2,2'} (157,4), C_{3,3'} (120,4), C₄ (138,3), C₅ (164,2), C₈ (152,2), C₉ (125,8), C_{10, 10'} (129,8), C_{11, 11'} (114,5), C₁₂ (161,4), C₁₄ (55,6), Figura 49; HSQCgs, Figura 50.

Na₃[Fe(CN)₅(NA4OMet)].3H₂O: C_{equatorial} (179,8), C_{axial} (175,4), C₂ (154,7), C₃ (127,6), C₄ (135,2), C₅ (123,4), C₆ (159,6), C₇ (163,6), C₁₀ (152,1), C₁₁ (125,9), C_{12, 12'} (129,9), C_{13, 13'} (114,6), C₁₄ (161,3), C₁₆ (55,7), Figura 51; HSQCgs, Figura 52; HMBCgs, Figura 53.

Na₃[Fe(CN)₅(IA4F)].3H₂O: C_{equatorial} (179,7), C_{axial} (175,1), C_{2,2'} (157,6), C_{3,3'} (120,6), C₄ (138,4), C₅ (163,0), C₈ (151,8), C₉ (129,4), C_{10, 10'} (130,2), C_{11, 11'} (116,0), C₁₂ (164,0 d, 950), Figura 54.

Na₃[Fe(CN)₅(NA4F)].3H₂O: C_{equatorial} (179,8), C_{axial} (175,5), C₂ (154,7), C₃ (127,4), C₄ (135,1), C₅ (123,5), C₆ (159,7), C₇ (164,2), C₁₀ (151,2), C₁₁ (129,2), C_{12, 12'} (130,1), C_{13, 13'} (116,2 d; 85), C₁₄ (164,5 d, 995), Figura 55; HMBCgs, Figura 56.

Na₃[Fe(CN)₅(IO3H)].3H₂O: C_{2,2'} (158,0), C_{3,3'} (119,7), C₄ (129,2), C₅ (163,5), C₇ (155,5), Figura 57.

Na₃[Fe(CN)₅(IO3S)].3H₂O: C_{equatorial} (179,6), C_{axial} (175,1), C_{2,2'} (157,6), C_{3,3'} (118,9), C₄ (130,1), C₅ (162,3), C₇ (178,0), Figura 58; HMBCgs, Figura 59.

PARTE EXPERIMENTAL

Na₃[Fe(CN)₅(IO3Met)].3H₂O: C_{equatorial} (179,4), C_{axial} (175,0), C_{2,2'} (157,9), C_{3,3'} (119,4), C₄ (129,3), C₅ (163,4), C₇ (166,7), C₁₀ (11,35), Figura 60.

Na₃[Fe(CN)₅(IO3SMet)].3H₂O: C_{equatorial} (179,5), C_{axial} (174,9), C_{2,2'} (157,9), C_{3,3'} (119,2), C₄ (129,1), C₅ (164,4), C₇ (163,7), C₁₁ (14,3), Figura 61.

3.3 METODOLOGIA E TRATAMENTO DOS DADOS EXPERIMENTAIS

3.3.1 Espectros Eletrônicos

Os máximos de absorção e larguras de bandas foram obtidos pela leitura direta dos espectros eletrônicos, fazendo as devidas correções pelas respectivas linhas de base, nas mesmas condições utilizadas para as amostras. Os valores dos coeficientes de absorvidade molar foram calculados com base na lei de Lambert-Beer, por medidas das absorbâncias de diversas amostras em diferentes concentrações, medidas feitas em triplicatas.

O estudo da cinética de dissociação foi realizado em triplicata mantendo a temperatura constante de 25 °C, adicionou-se 0,2 ml de uma solução de DMSO com 30 vezes de excesso diretamente na cubeta e iniciou-se as medidas no espectrofotômetro a cada 2 segundos, obtendo assim vários espectros eletrônicos de onde montou-se um gráfico de pseudo-primeira ordem, absorbância vs. tempo. Tendo o valor da constante de velocidade podemos calcular o tempo de meio vida, $t_{1/2} = \ln 2/k$.

3.3.2 Espectros Vibracionais

Os valores das frequências foram obtidos pela leitura direta nos espectros vibracionais, fazendo-se as devidas correções das linhas de base.

3.3.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

O deslocamento químico dos sinais de RMN foi retirado diretamente do espectro nos experimentos unidimensionais com a caracterização dos sinais sendo feitas através de técnicas bidimensionais de RMN: utilizado o COSY observa-se o acoplamento homonuclear $^1\text{H} - ^1\text{H}$ a três ligações, com o HSQC observa-se o acoplamento heteronuclear $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ a uma ligação e com o HMBC observa-se o acoplamento heteronuclear $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ a mais de uma ligação.

3.3.4 Cálculos Teóricos

Os cálculos teóricos foram feitos utilizando o programa MS Modeling com o modo DMol³ versão 4.1 (baseado na teoria do funcional da densidade – density functional theory - DFT), utilizando-se os funcionais GGA-BLYP com um sistema de bases DNP que corresponde 6-31G** para otimização de estrutura e cálculo de propriedades dos complexos

3.3.5 Determinação dos Parâmetros Eletroquímicos

Os parâmetros eletroquímicos foram determinados pela leitura direta dos voltamogramas cíclicos, os quais apresentam linhas de base anódica e catódica bem definidas. As correntes de picos anódico (i_{pa}) e catódico (i_{pc}) foram determinadas por extrapolação das respectivas linhas de base até a interseção das alturas máximas das correntes. Os potenciais de picos anódico (E_{pa}) e catódico (E_{pc}) foram determinados pelas projeções verticais dos máximos de correntes sobre os eixos dos potenciais. Os valores dos potenciais de meia onda foram obtidos pela média aritmética dos potenciais de picos anódico e catódico.

3.3.6 Ensaio enzimático da 2-trans-Enoil Redutase (InhA de *Mycobacterium tuberculosis*)

O ensaio enzimático foi realizado em colaboração com pesquisadores do Laboratório de Biologia Molecular da PUCRS, utilizando-se um espectrofotômetro UV-Vis Shimadzu modelo RF5301, a 25 °C, utilizando-se cubetas de quartzo, de volume total 500 µL. O procedimento segue de acordo com o esquema mostrado na Figura 62.

PARTE EXPERIMENTAL

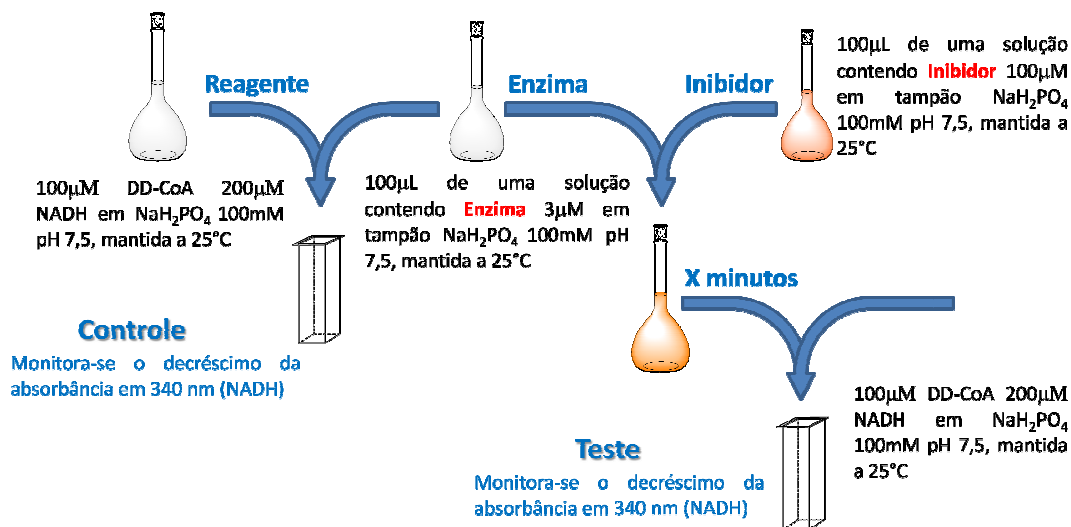


Figura 62. Procedimento para medir a atividade enzimática da enzima.

A solução final continha os seguintes componentes: 100 µmol.L⁻¹ DD-CoA, 200 µmol.L⁻¹ NADH, 3 µmol.L⁻¹ da enzima proveniente da mistura de incubação, em tampão NaH₂PO₄ 100 mmol.L⁻¹ pH 7,5. Monitora-se o decréscimo de absorbância a 340 nm (NADH) durante 1 minuto.

Misturas de incubação

1. Controle: 100 µL de uma solução contendo Wt InhA 3 µ mol.L⁻¹ em tampão NaH₂PO₄ 100 mmol.L⁻¹ pH 7,5, mantida a 25⁰C.
2. Enzima + Inibidor: 100 µL de uma solução contendo Wt InhA 3µmol.L⁻¹ e do complexo Na₃[Fe(CN)₅(L)].3H₂O 100 µmol.L⁻¹, em tampão NaH₂PO₄ 100 mmol.L⁻¹ pH 7,5.

Após determinar-se a atividade da enzima na ausência do inibidor (Controle), retiram-se alíquotas da mistura enzima+inibidor em determinados intervalos de tempo e verifica-se a atividade da enzima, medido a absorbância do NADH. Aplica-se a equação 5 para se determinar a atividade remanescente, AR% [34, 38].

$$\text{Atividade Enzimática} = \frac{\text{Variação da Abs. em 340 nm por minuto}}{\text{Coef. Abs. (NADH) x caminho ótico}} \quad (5)$$

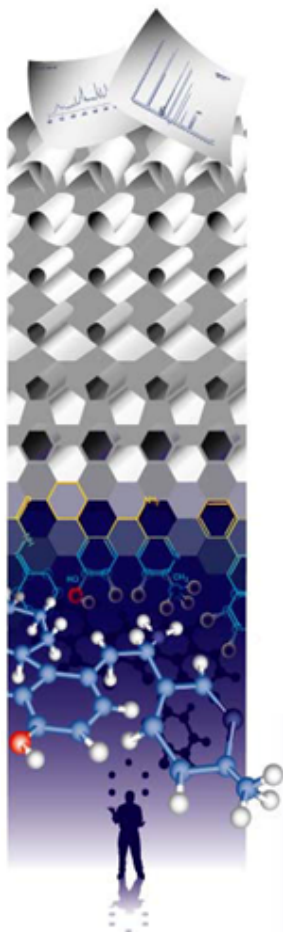
PARTE EXPERIMENTAL

Os dados de atividade remanescente contra o tempo foram ajustados a uma equação de decaimento exponencial simples, de dois parâmetros ($y = a \cdot e^{-x \cdot t}$) sendo o parâmetro x o valor da constante de velocidade aparente de pseudo-primeira ordem para a inativação da enzima. O tempo de meia-vida foi calculado conforme a seguinte equação: $t_{1/2} = \ln 2/k$.

3.3.7 Ensaio de Toxicidade

Os ensaios de toxicidade foram realizados em animais machos da linhagem Swiss. A DL_{50} foi calculada pelo programa Graf Pad. Estes experimentos foram realizados em colaboração com os pesquisadores do grupo de Biologia Molecular da PUCRS.

CAPÍTULO 4: RESULTADOS E DISCUSSÃO



“Dêem-me uma alavanca e um ponto de apoio e eu moverei o mundo.”

Arquimedes de Siracusa, princípio da alavanca.

CAPÍTULO 4: RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Espectroscopia Eletrônica na Região do UV-Visível

A absorvância molecular nas regiões do espectro do ultravioleta (UV) e do visível depende da estrutura eletrônica da molécula. A absorção da energia desta radiação eletromagnética é quantificada e provoca a transferência de elétrons de orbitais de energia mais baixa, correspondentes ao estado fundamental, para orbitais de energia mais elevada, correspondentes a um estado excitado. A região do UV de interesse prático para maioria dos compostos orgânicos situa-se na região de comprimento de onda entre 200 e 400 nm e, a do visível estende-se de 400 nm até 700 nm. Estas regiões correspondem a níveis de energia característicos da excitação de elétrons com orbitais de simetria π e de elétrons não ligantes n e, na prática, limitam-se a sistemas conjugados.

Os orbitais atômicos dos dois centros se combinam gerando um orbital molecular ligante, de energia mais baixa, e um orbital molecular antiligante, de energia mais alta. No estado fundamental, os elétrons de uma molécula ocupam o orbital de mais baixa energia.

As energias dos vários tipos de orbitais moleculares diferem significativamente. Quase sempre o nível de energia de um elétron não ligante, situa-se entre os níveis de energia dos orbitais σ e/ou π ligantes e antiligantes.

A facilidade relativa com a qual as várias transições podem ocorrer está resumida na Figura 63. Embora as diferenças de energia não estejam em escala, pode-se verificar que uma transição $\pi^* \leftarrow n$, por exemplo, requer menos energia do que uma transição $\pi^* \leftarrow \pi$ ou $\sigma^* \leftarrow \sigma$ [76].

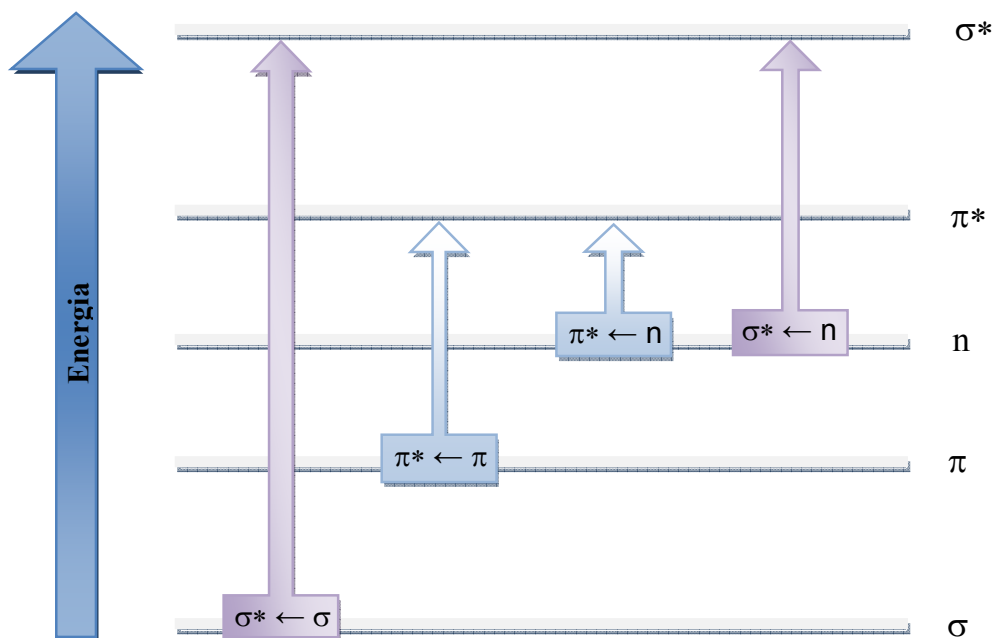


Figura 63. Resumo dos níveis eletrônicos para compostos orgânicos.

As transições do tipo $\sigma^* \leftarrow \sigma$ são de alta energia, correspondendo a frequências na região ultravioleta de vácuo. As absorções dessas transições nunca são observadas na região ultravioleta acessível normalmente.

As transições do tipo $\sigma^* \leftarrow n$ em geral são transições que exigem menos energia que a transições $\sigma^* \leftarrow \sigma$ e são características de compostos saturados com átomos que possuem elétrons não compartilhados, elétrons não ligantes. As absorvidades molares dessas transições são normalmente pequenas, mas podem chegar até $3.000 \text{ L.cm}^{-1}.\text{mol}^{-1}$.

As transições do tipo $\pi^* \leftarrow \pi$ e $\pi^* \leftarrow n$, são observáveis na região entre 200 e 800 nm. Ambas as transições são provenientes de um grupo funcional insaturado para fornecer os orbitais de simetria π . As absorvidades molares dessas transições $\pi^* \leftarrow n$ são pequenas e variam de 10 a $100 \text{ L.cm}^{-1}.\text{mol}^{-1}$; e para transições $\pi^* \leftarrow \pi$, por outro lado, são bem maiores e ocorrem na região de absorvidade molar entre 1.000 e $10.000 \text{ L.cm}^{-1}.\text{mol}^{-1}$ (transições permitidas) [76]. Outra característica intrínseca seria o deslocamento do comprimento de onda máximo associado às essas bandas com o aumento da polaridade do solvente, no qual o composto é dissolvido, normalmente um deslocamento menor que 5 nm.

4.1.1. Deslocamentos com o aumento da polaridade do solvente

Ao se escolher um solvente, deve-se ter em consideração a sua transparência na zona de comprimentos de onda em estudo e também os efeitos que pode produzir no sistema absorvente. Geralmente solventes polares, como água, alcoóis, ésteres e cetonas, tendem a fazer desaparecer a estrutura fina devido a efeitos vibracionais, ao contrário dos solventes não polares, como os hidrocarbonetos. O próprio comprimento de onda do máximo de absorção também depende do solvente, visto que a mudança do solvente promove interações diferentes entre as moléculas, fazendo com que a diferença de energia dos níveis das transições mude, conseqüentemente, o máximo de absorção. Quando se comparam espectros de adsorção, deve-se usar o mesmo solvente ou, pelo menos com polaridade semelhante.

– Transições $\pi^* \leftarrow n$

Transições do tipo $\pi^* \leftarrow n$ são características de bandas que sofrem deslocamento hipsocrômico (deslocamento para o azul), com o aumento da polaridade do solvente. Devido à maior solvatação do par de elétrons não ligante e abaixamento da energia do orbital não ligante, enquanto o estado excitado π^* não é afetado. Esse deslocamento tem maiores efeitos em solventes hidroxilados, pois tem a possibilidade de fazer ligações de hidrogênio [76].

– Transições $\pi^* \leftarrow \pi$

Transições do tipo $\pi^* \leftarrow \pi$ são características de bandas que sofrem deslocamento batocrômico (deslocamento para o vermelho), com o aumento da polaridade do solvente. As forças de atração de polarização tendem a abaixar os dois estados, sendo mais efetivo para o estado excitado, provocando menor diferença de energia [76].

4.1.2. Dos Ligantes

Os espectros eletrônicos, nas regiões do UV-visível, dos ligantes exibiram bandas na região 200 a 330 nm de alta intensidade conforme ilustrados na Tabela 1. A maior parte

RESULTADOS E DISCUSSÃO

dos grupos cromóforos, tais com C=C, C=O, C=S além de transições do sistema π do anel piridinico [76], apresentam transições do tipo $\pi^* \leftarrow \pi$, e $\pi^* \leftarrow n$. Essa ultima encoberta pela primeira devido sua baixa absorvidade molar.

Tabela 1. Bandas de transições eletrônicas dos ligantes do tipo $\pi^* \leftarrow \pi$.

Ligantes	λ , nm		Figuras
	Solvente H ₂ O	Solvente CH ₃ CH ₂ OH	
	$\mu = 1,85$ $\epsilon = 78,5$	$\mu = 1,69$ $\epsilon = 24,5$	
IA4H	301	299	Figura 64
IA4OMet	315	312	
IA4F	301	298	
NA4H	290	288	Figura 65
NA4OMet	310	307	
NA4F	298	296	
IO3H	240	238	Figura 66
IO3Met	249	247	
IO3S	322	318	
IO3SMet	282	279	

μ = momento de dipolo; ϵ = constante dielétrica

4.1.3. Dos Íons Complexos

O estudo espectroscópico das transições eletrônicas em complexos metálicos é fundamental para correlações como força de interação e avaliação do poder receptor- π e doador- σ do ligante e do metal. Os complexos de pentacianoferrato(II) formados com ligantes piridinicos apresentam, em geral, três tipos característicos de bandas [77-80]:

(a) bandas de transição eletrônica do tipo “d - d” (transição de campo ligante, TCL). Tais bandas são transições proibidas por simetria, de baixa intensidade (geralmente $\epsilon < 100 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$) e freqüentemente são sobrepostas por bandas de transferência de carga, quando estas se mostram presentes;

(b) bandas de transferência de carga do tipo metal-ligante (TCML), representativa do efeito de interação de retrodoação π , ou tipo transferência de carga ligante-metal (TCLM), sendo frequentemente de elevada intensidade (geralmente, $\epsilon > 1000 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$). Normalmente bandas de transferência de carga mostram dependência quanto à natureza do solvente no qual o espectro é obtido;

(c) bandas de transições eletrônicas internas dos ligantes, geralmente provenientes das transições $\pi^* \leftarrow \pi$ e $\pi^* \leftarrow n$, que se apresentam nos ligantes livres de coordenação.

As transições de campo ligante, d-d, em complexos de pentacianoferrato não são de fácil visualização, sendo encobertas pelas intensas bandas de TCML. Algumas correlações têm sido apresentadas na literatura na busca as obtenções de medidas indiretas da energia de transição eletrônica d-d e, conseqüentemente, a energia de desdobramento do campo ligante [25].

O íon complexo $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ exibe simetria O_h dando origem ao desdobramento característico dos orbitais “d” degenerados do metal em “ t_{2g} ” e “ e_g ”. Já os complexos do tipo $[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{L}]^n$ exibem uma redução de simetria, quando L é diferente do íon cianeto, apresentando micro-simetria C_{4v} , que origina desdobramento nos orbitais “ t_{2g} ” em “e” e “ b_2 ” e nos orbitais “ e_g ” em “ a_1 ” e “ b_1 ” ou simetria C_{2v} , caso se leve em consideração derivados piridínicos que originem desdobramentos nos orbitais “ t_{2g} ” em $b_1(d_{xz})$, $a_2(d_{xy})$ e $b_2(d_{yz})$ e nos orbitais “ e_g ” em $a_2(d_x^2 - y^2)$ e $a_1(d_z^2)$ [64].

As transições de transferência de carga ocorrem quando existe orbital de simetria apropriada no ligante e no metal, cujas energias não sejam muito diferentes e o grau de recobrimento seja diferente de zero. As energias das bandas de transferência de carga para os complexos em estudo estão apresentadas na Tabela 2. Elas são diretamente proporcionais às energias dos orbitais $\pi\pi^*$ dos ligantes, sugerindo que a intensidade de interação retrodoação π segue a mesma tendência [81]. Quanto mais próximos em energia estiverem os orbitais envolvidos nas interações retrodoação π , mais favorecidas serão as sobreposições entre os orbitais de simetria apropriada para a formação dos orbitais moleculares, conseqüentemente ligação mais forte [82].

Segundo Lever [83], os processos de transferência de carga ocorrem no final da região azul do espectro visível, ou na região ultravioleta. No entanto, se o metal é facilmente oxidável e o ligante é facilmente redutível, ou vice-versa, estas transições podem ocorrer em regiões de menores energias no espectro, até mesmo no infravermelho

próximo. Estas transições são, em geral, bastante intensas e freqüentemente obscurece as fracas transições de campo ligante que, ocasionalmente, ocorram na mesma região.

As bandas de transferência de carga mostram dependência quanto à natureza do solvente. No estado fundamental, o solvente é organizado com seu dipolo orientado para interagir com o dipolo do estado fundamental do complexo. O dipolo do estado de transferência de carga excitado é marcadamente diferente, em direção ou magnitude, do dipolo do estado fundamental. Pelo princípio de Franck-Condon, o solvente não será favoravelmente orientado no estado excitado. Isto é, o tempo requerido para uma nova orientação dos dipolos não é compatível com o da transição. Portanto, dependendo da natureza do solvente, e da mudança do dipolo, o estado excitado pode ser estabilizado ou desestabilizado. Em ambos os casos, a energia da transição de transferência de carga dependerá do solvente, particularmente de sua polaridade [78].

Segundo Shepherd [84], qualitativamente, dois fatores irão influenciar no grau de misturas dos orbitais e na energia de estabilização da interação de retrodoação: a extensão radial do orbital d envolvido, e a diferença de energia entre o orbital d do metal e o orbital π^* do ligante.

Alguns autores [78, 83] correlacionaram o aumento da força do oscilador calculada para as bandas TCML, com o aumento da intensidade da interação retrodoação π . Segundo Lever [83], as intensidades das interações das bandas TCML são melhores expressas pelas avaliações da força do oscilador, que podem ser calculadas de forma simplificada pela equação 6:

$$f_{osc} = 4,315 \times 10^{-9} \int \epsilon_{m\acute{a}x} dv \cong 4,6 \times 10^{-9} \cdot \epsilon_{m\acute{a}x} \cdot \Delta \bar{\nu}_{1/2} \quad (6)$$

onde a absorvidade molar no comprimento de onda máximo ($\epsilon_{m\acute{a}x}$) e a largura de banda em meia intensidade ($\Delta \bar{\nu}_{1/2}$) são dados em $\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ (ou $\text{cm}^2 \cdot 10^3 / \text{mol}$) e cm^{-1} , respectivamente. Efetivamente, f é a medida do somatório das intensidades sobre todos os componentes vibracionais [78].

A Tabela 2, mostra os valores de λ_{max} das bandas de transferência de cargas para os complexos aqui estudados, juntamente com absorvidade molar ($\epsilon_{m\acute{a}x}$) e força do oscilador (f_{osc}).

Tabela 2. Bandas TCML dos complexos de pentacianoferrato(II) em água.

Classes	[Fe(CN) ₅ L] ³⁻ ; L =	λ_{max} , nm	ϵ , mol ¹ .L.cm ⁻¹	f_{osc}	Espectro
Iso ¹	IA4H	457	4,4 x 10 ³	0,114	Figura 67
	IA4OMet	449	1,8 x 10 ³	0,047	Figura 68
	IA4F	458	2,3 x 10 ³	0,058	Figura 69
Nic ²	NA4H	386	3,0 x 10 ³	-	Figura 70
	NA4OMet	402	3,4 x 10 ³	-	Figura 71
	NA4F	383	2,9 x 10 ³	-	Figura 72
Oxa ³	IO3H	470	5,9 x 10 ³	0,135	Figura 73
	IO3Met	466	5,4 x 10 ³	0,126	Figura 74
	IO3S	458	5,5 x 10 ³	0,118	Figura 75
	IO3SMet	475	4,0 x 10 ³	0,087	Figura 76
Lit ⁴	Tionicotinamida ^a	390	1,4 x 10 ³	0,038	-
	Isotionicotinamida ^a	471	1,4 x 10 ³	0,046	-
	4-benzoilpiridina ^b	485	3,3 x 10 ³	0,095	-
	4-(4-clorobenzoil)piridina ^b	493	3,4 x 10 ³	0,101	-
	Piridina ^c	362	4,0 x 10 ³	0,085	-
	Pirazina ^c	458	4,9 x 10 ³	0,100	-
	Pirazinamida ^b	496	4,2 x 10 ³	0,167	-

1- Derivados isonicotínicos; 2- Derivados nicotínicos; 3- Derivados oxadiazois; 4- Compostos da literatura. ^a referência[25]; ^b – referência [52] ; ^c – referência[85]; (resolução ± 2nm).

O grupo de complexos com ligantes nicotinoil hidrazonas apresentam bandas de transferência de carga muito próximas as bandas intraligante tornando a medida de meia altura da banda difícil de ser calculada.

A Figura 77 mostra a variação espectral típica observada para a reação representada pela Equação 7. Observa-se que complexos com ligantes oxadiazois têm uma maior interação com o metal, observando o valor da força do oscilador, o que pode lhe conferir uma maior estabilidade metal-ligante. Quanto maior a interação metal ligante mais difícil o ligante dissociar-se do complexo isto é comprovado quando se realiza a cinética de dissociação desses complexos frente ao excesso de 30 vezes de DMSO. Valores de constantes de velocidades observadas e tempo de meia-vida estão ilustrados na Tabela 3.

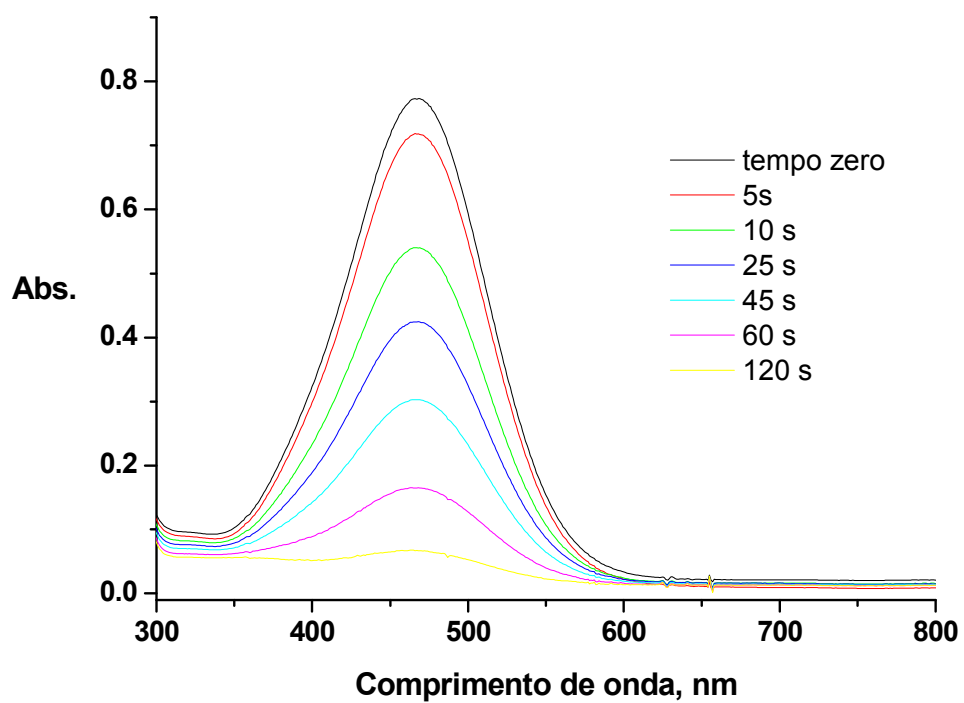
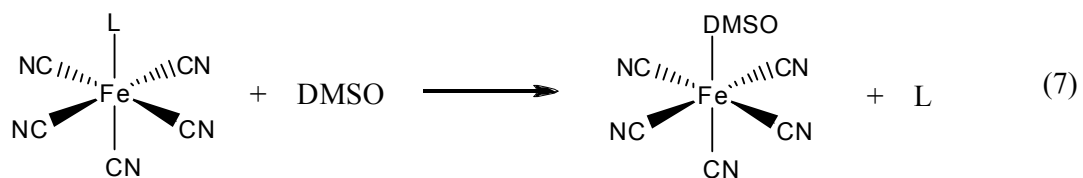


Figura 77. Variação da absorvância da banda de TC na presença de 30 vezes de excesso de DMSO.

Tabela 3. Cinética de dissociação dos complexos de pentacianoferrato(II) frente DMSO; T = 25 °C.

Classe	[Fe(CN) ₅ L] ³⁻ ; L =	K _{obs} , s ⁻¹	k, min ⁻¹	t _{1/2} , min
Iso ¹	IA4H	9,99 x 10 ⁻⁴	0,0599	11,57
	IA4OMet	1,36 x 10 ⁻³	0,0816	8,49
	IA4F	1,35 x 10 ⁻³	0,0810	8,56
Nic ²	NA4H	1,52 x 10 ⁻³	0,0912	7,60
	NA4OMet	1,34 x 10 ⁻³	0,0804	8,62
	NA4F	1,27 x 10 ⁻³	0,0762	9,10
Oxa ³	IO3H	1,09 x 10 ⁻³	0,0654	10,59
	IO3Met	8,67 x 10 ⁻⁴	0,0520	13,33
	IO3S	1,10 x 10 ⁻³	0,0659	10,52
	IO3SMet	1,41 x 10 ⁻³	0,0846	8,19

1- Derivados isonicotínicos; 2- Derivados nicotínicos; 3- Derivados oxadiazóis

Observa-se que os complexos pentacianos com ligantes oxadiazóis, em geral, tem uma constante de velocidade (k_{obs}) menor com relação aos outros complexos pentacianoferrato(II) estudados, o que é satisfatório para o uso como fármaco.

Os efeitos de retrodoação π, por aumentarem a densidade eletrônica no ligante podem conferir melhores propriedades para metalodrogas, tais como na facilidade de ativação por processo redox ou maior estabilização de intermediários importantes em sua atuação. No caso dos complexos em estudo, as interações retrodoação π para o grupo de ligantes oxadiazóis são mais intensas em comparação com os demais.

4.2 Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho

Os espectros de absorção na região do infravermelho dos complexos de pentacianoferrato(II) são constituídos essencialmente pelos estiramentos associados aos grupos νCN, νFe-C e, quando coordenados a ligantes N-heterocíclicos apresentam bandas características do anel piridínico além do νFe-N (heterocíclico). Enquanto os estiramentos νCN e νFe-C têm sido extensamente estudados [86-88], relativamente pouco se conhece sobre os estiramentos νFe-N-heterocíclico.

As atribuições das diversas bandas observadas nos espectros dos compostos descritos neste trabalho foram feitas por comparação com compostos semelhantes já estudados e descritos na literatura [86, 88-92].

4.2.1 Dos compostos orgânicos

Região entre 4000 e 2000 cm^{-1}

As amidas secundárias mostram múltiplas frequências de deformação axial de N–H que absorvem na região entre 3330 a 3060 cm^{-1} [86]. No caso de ligantes hidrazonas, estes apresentam estiramentos N–H de intensidade média e largas, observadas na mesma região, além de estiramentos C–H de carbonos saturados na região de 3050 a 2800 cm^{-1} para os ligantes IA4OMet, Na4OMet, IO3Met e IO3SMet [93]. Os compostos IA4H, IA4OMet, IA4F, NA4H, NA4OMet e NA4F apresentam deformações N–H nas regiões citadas como um conjunto de deformações axiais entre 3300 a 2840 cm^{-1} , além de deformações axiais C–H na região de 3050 a 2800 cm^{-1} como os valores ilustrados na Tabela 4.

O estiramento S–H é muito fraco e é encontrado com dificuldade no espectro de soluções diluídas ou em filme líquido. Como, entretanto, poucos grupos apresentam absorção nesta região, de 2600 a 2500 cm^{-1} , ela é útil na detecção de grupos S–H. Entretanto, no espectro do ligante IO3S observa-se uma banda de deformação axial S–H em 2550 cm^{-1} , a qual é um indicativo da forma tiol [86].

Região entre 2000 e 1200 cm^{-1}

Na região entre 2000 e 1660 cm^{-1} pode aparecer deformações de fraca intensidade chamadas deformação de combinação ou harmônicas. O aparecimento das frequências referentes a essas deformações nessa região é característico dos modos vibracionais de substituição do anel [94]. Observa-se ainda, picos na região próxima a 1660 cm^{-1} característicos do estiramento C=O de amidas [86].

A frequência de estiramento para o grupo C=S, o qual é menos polar do que o grupo C=O, ocorre em geral como uma banda de intensidade fraca na região de 1250 a

1050 cm^{-1} . A identificação é freqüentemente difícil e incerta, devido a sobreposição com as bandas referentes as deformações axiais de C–O e C–N, que ocorrem na mesma região [86].

Os estiramentos $\nu\text{C}=\text{C}$ e $\nu\text{C}=\text{N}$ do anel aromático, variam nas faixas de absorção entre 1615 a 1585 cm^{-1} [95] e de 1540 a 1300 cm^{-1} , respectivamente. Piridinas substituídas na posição 4 têm estiramentos próximos a 1603, 1561, 1520, 1480 e 1415 cm^{-1} [86, 89]. Os compostos sintetizados apresentam várias bandas nesta região, sendo de difícil atribuição.

As amidas aromáticas produzem uma forte absorção com deformação axial C – N entre 1345 e 1260 cm^{-1} . Nos espectros dos compostos IA4H, IA4OMet, IA4F, NA4H, NA4OMet e NA4F observam-se bandas de deformação axial C – N em 1285, 1315, 1303, 1302, 1296 e 1303 cm^{-1} , respectivamente.

Região entre 1200 e 400 cm^{-1}

Estiramentos de hidrazonas $\nu\text{N}-\text{N}$ podem variar de 1080 a 1020 cm^{-1} [93, 96] podendo ter valores mais elevados em um anel oxadiazol. Nos espectros dos compostos IA4H, IA4OMet, IA4F, NA4H, NA4OMet e NA4F observam-se bandas de estiramentos nessa região, ilustradas na Tabela 4.

Deformações axiais do anel aromático no plano C–H são esperadas nas regiões de 1225 a 950 cm^{-1} [95] e deformações axiais do anel aromático fora do plano ocorrem nas regiões de 900 a 670 cm^{-1} [95]. Deformações angulares do anel aromáticos são esperadas nas regiões entre 550 a 400 cm^{-1} [97]. Nos espectros dos compostos estudados observam-se várias absorções nesta região, portanto, dificultando suas atribuições.

Tabela 4. Dados de infravermelhos dos ligantes L, em pastilhas de KBr, em cm^{-1} .

Ligantes	$\nu\text{N-H}$	$\nu\text{C-H}$	$\nu\text{N-N}$	$\nu\text{C=O}$	$\nu\text{C=N}$	Figuras
IA4H	3198	2834	1060	1690	1540	Figura 78
IA4OMet	3205	2848	1059	1659	1538	Figura 79
IA4F	3186	2840	1070	1687	1511	Figura 80
NA4H	3190	2836	1064	1660	1539	Figura 81
NA4OMet	3215	2842	1068	1680	1515	Figura 82
NA4F	3182	2842	1070	1679	1513	Figura 83
IO3H	-	2981	1115	-	1509, 1491	Figura 84
IO3S	-	3026	1078	-	1496	Figura 85
IO3Met	-	3049	1098	-	1500, 1498	Figura 86
IO3SMet	-	2928	1081	-	1507, 1495	Figura 87

- = Ausência de estiramento

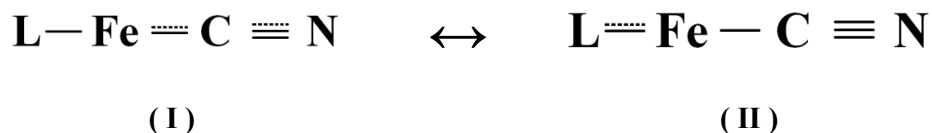
(resolução $\pm 2 \text{ cm}^{-1}$)

4.2.2 Dos Complexos

Os complexos pentacianoferratos podem ser facilmente identificados por FTIR. Os mesmos apresentam bandas finas e intensas referentes às frequências de estiramento vibracional do cianeto, $\nu\text{C}\equiv\text{N}$, na região entre 2200 a 2000 cm^{-1} . O valor de $\nu\text{C}\equiv\text{N}$ do cianeto livre é 2080 cm^{-1} , em solução aquosa [88]. Após coordenação a um centro metálico, tal estiramento é deslocado para maiores valores de frequência. Segundo Nakamoto [88], o íon CN^- atua como σ doador, deslocando densidade eletrônica para o metal, e π receptor, recebendo densidade eletrônica do metal via orbitais de simetria π . A doação σ tende a elevar a frequência de estiramento CN^- , uma vez que elétrons são “removidos” dos orbitais moleculares 5σ , os quais apresentam natureza fracamente antiligante. Já a retrodoação π tende a reduzir o modo vibracional, $\nu\text{C}\equiv\text{N}$, uma vez que densidade eletrônica proveniente dos orbitais do metal populam os orbitais de natureza π^* do cianeto. Em geral, o íon CN^- é um σ doador mais eficiente que π receptor comparativamente ao ligante CO. Desta forma, o $\nu\text{C}\equiv\text{N}$ em complexos metálicos apresentam geralmente mais elevados valores de frequência quando comparados ao cianeto livre, enquanto o oposto tem sido observado para complexos com CO [88].

Segundo El-Sayed e Sheline [98], o $\nu_{C\equiv N}$ em complexos metálicos é governado por três fatores relativos ao metal: eletronegatividade do ligante, estado de oxidação do metal e o número de coordenação. Tais fatores estão associados com maior ou a menor eficiência do poder σ doador, já que uma maior eletronegatividade sugere maior doação σ e, conseqüentemente, maior valor de $\nu_{C\equiv N}$. Seguindo o mesmo comportamento para os estados de oxidação elevados, sendo seu efeito bastante expressivo. Já o efeito do número de coordenação no $\nu_{C\equiv N}$ pode ser racionalizado da seguinte maneira: um aumento no número de coordenação reduz a carga positiva do metal, o que, por conseqüência, enfraquece a ligação σ , diminuindo o $\nu_{C\equiv N}$.

Geralmente, tais complexos apresentam as bandas de ligantes coordenados com fraca e média intensidade com análises nem sempre úteis na elucidação de suas propriedades moleculares [77]. Os estiramentos $\nu_{C\equiv N}$ e ν_{Fe-C} podem ser empregados como ferramentas na elucidação da natureza redox do centro metálico de ferro e na avaliação de sua capacidade particular de interação de retrodoação π , quando na forma de Fe(II), bem como os modos de coordenação do ligante [77, 79]. Para tais complexos capazes de deslocalizar densidade eletrônica para os orbitais $p\pi^*$ dos cianetos, pode-se observar uma redução nas frequências de estiramento $C\equiv N$ quando comparadas com Fe(III), o qual apresenta pouca ou nenhuma interação de retrodoação π com o ligante. Este fenômeno origina um enfraquecimento na ordem de ligação $C\equiv N$ por meio de aumento de densidade eletrônica em orbitais de natureza antiligantes. A análise das estruturas de ressonância a seguir descreve uma melhor explicação dos efeitos por retrodoação π nos estiramentos $C\equiv N$:



Complexos de pentacianoferrato(II) investigados por espectroscopia na região do infravermelho apresentam interessantes informações quanto ao sexto ligante na esfera de coordenação, por meio das absorções referentes aos cianetos previamente discutidas.

A estrutura (I) é favorecida quando o ligante L é um composto que não tem orbitais com energia e nem simetria para fazer retrodoação π . Quando o ligante L tem

RESULTADOS E DISCUSSÃO

orbitais de simetria e energia apropriada para que ocorra a transferência de densidade eletrônica do metal para o ligante, a estrutura (II) é favorecida, o que gera um fortalecimento da ligação C≡N e, conseqüentemente um aumento no número de onda referente a este estiramento. Indiretamente, os efeitos de interações de retrodoação π no ligante L são refletidos nos estiramentos C≡N. Tal observação pode ser explicada pelo fato da diminuição de densidade eletrônica nos orbitais de caráter antiligantes do C≡N, devido à transferência de densidade eletrônica do metal para o ligante.

Tabela 5. Dados de infravermelho para os complexos pentacianoferrato(II) com ligantes L, em pastilhas de KBr (valores em cm^{-1}).

Classe	$[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{L}]^{3-}$; L =	$\nu\text{C}\equiv\text{N}_{\text{eq.}}$	$\nu\text{Fe-C}$	$\nu\text{N-N}$	$\nu\text{C=N}$	$\nu\text{C=O}$	Figuras
Iso ¹	IA4H	2052	568	1054	1515	1664	Figura 88
	IA4OMet	2048	571	1064	1508	1655	Figura 89
	IA4F	2050	570	1068	1507	1657	Figura 90
Nic ²	NA4H	2051	568	1063	1542	1655	Figura 91
	NA4OMet	2050	572	1070	1515	1667	Figura 92
	NA4F	2045	573	1071	1508	1675	Figura 93
Oxa ³	IO3H	2048	571	1508	1508	-	Figura 94
	IO3Met	2050	570	1493	1493	-	Figura 95
	IO3S	2050	571	1487	1487	-	Figura 96
	IO3SMet	2045	572	1495	1495	-	Figura 97
Lit ⁴	Tionicotinamida ^a	2052	572	-	-	-	-
	Isotionicotinamida ^a	2046	571	-	-	-	-
	Pirazinamida ^b	2061	559	-	-	-	-
	Piridina ^c	2048	572	-	-	-	-
	Isoniazida ^d	2044	569	-	-	-	-
	4-benzoilpiridina ^b	2052	571	-	-	-	-
	Amônia ^c	2040	570	-	-	-	-

1- Derivados isonicotínicos; 2- Derivados nicotínicos; 3- Derivados oxadiazóis; 4- Compostos da literatura. a – referência [25]; b – referência [52]; c – referência [77]; d – referência [87]; - = Ausência de estiramento; (resolução $\pm 2 \text{ cm}^{-1}$)

De acordo com os valores do número de onda dos $\nu_{C\equiv N}$ nos complexos pentacianoferratos aqui apresentados, o metal apresenta-se no estado de oxidação 2+. O estado de oxidação 3+ é caracterizado pelo $\nu_{C\equiv N}$ com valores superiores a 2100 cm^{-1} . Estes resultados estão de acordo com os dados de espectroscopia eletrônica onde se observa bandas de transferência de carga metal-ligante para os complexos, as quais foram discutidas anteriormente.

O ligante IO3S apresenta duas formas tautoméricas, conforme ilustradas na Figura 98.

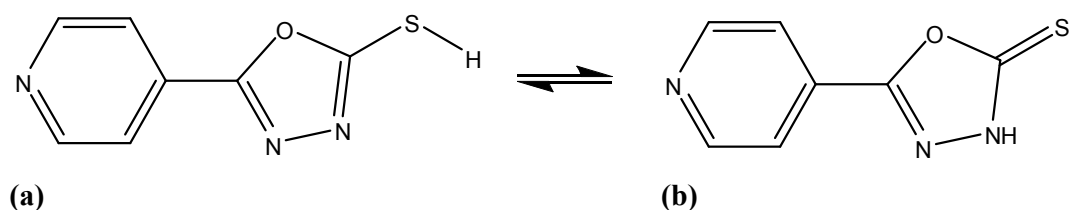


Figura 98. Formas tautoméricas do ligante IO3S (a) tiol e (b) tiona

O ligante livre apresenta-se na forma tiol e quando coordenado ao centro metálico a forma tiona. Esta atribuição é reforçada pelo aparecimento de uma banda na região de 1206 cm^{-1} (Figura 95) que é característico do $\nu_{C=S}$ com o concomitante desaparecimento da banda na região de 2420 cm^{-1} , o qual é característico do ν_{S-H} [86, 91].

4.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Diversos trabalhos na literatura [79, 99-101], envolvendo complexos pentacianoferrato destacam o uso da técnica de RMN sob o ponto de vista estrutural e para avaliar as propriedades eletrônicas do complexo. Estudos com complexos de derivados piridínicos correlacionam os efeitos de coordenação, tal como a capacidade de retrodoação π , aos sinais de hidrogênio e carbono [63, 77-79, 102-105]. Segundo Lavalee e Fleischer [63], os deslocamentos químicos dos hidrogênios de uma espécie coordenada devem ser interpretados, levando-se em consideração diversos fatores, tais como: paramagnetismo induzido do íon metálico, efeitos anisotrópicos da vizinhança e variações na proteção diamagnética, decorrentes dos efeitos indutivos e mesoméricos [63, 104, 105].

Um espectro de RMN unidimensional exibe grande soma de informações e é bastante complicado se muitos prótons estiverem presentes, pois as estruturas finas dos diferentes grupos de linhas podem se superpor. A complexidade poderia ser reduzida se fossem usados dois eixos para registrar os dados, com as ressonâncias pertinentes a grupos diferentes localizadas em pontos diferentes no segundo eixo. Esta separação é a que se faz na RMN bidimensional (RMN-2D) [94, 106]. Dentre as técnicas de RMN-2D mais utilizadas se destacam: (a) COSY: que observa o acoplamento entre hidrogênios até três ligações; (b) HSQC ou HETCOR: que observa o acoplamento hidrogênio-carbono a uma ligação e (c) HMBC: que observa o acoplamento hidrogênio-carbono a mais de uma ligação.

4.3.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H

O espectro de RMN ^1H de todos os compostos orgânicos estudados confirmou as estruturas propostas, visto que a síntese dos ligantes se encontra facilmente na literatura [107]. A reação dos compostos derivados da isoniazida com os derivados de aldeídos forma hidrazonas, na qual podem formar uma mistura de dois isômeros, (E) ou (Z). A forma de como os isômeros são formados durante a reação esta ilustrado na Figura 99.

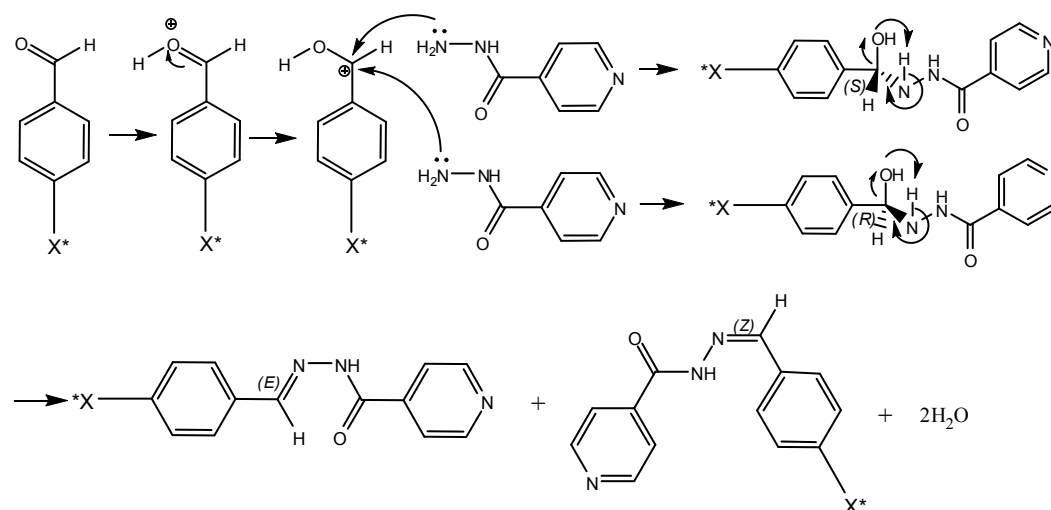


Figura 99. Mecanismo de formação dos isômeros (Z) e (E). Onde X* = H, O-Met ou F.

A distinção entre qual isômero é predominante pode ser feita observando o deslocamento químico do sinal hidrogênio próximo à imina. A literatura reporta [108] que o $\delta H_{a, \text{sin}} > \delta H_{a, \text{anti}}$, (Figura 100).

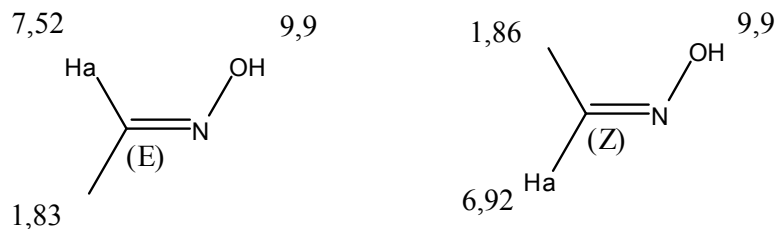


Figura 100. Valores de deslocamento químico de dois isômeros de iminas.

Os espectros de hidrogênio de todas as hidrazonas apresentam-se como isômeros (E). O sinal característico do hidrogênio ligado ao grupo imina, ilustrado no espectro de hidrogênio das hidrazonas em anexo, mostra-se mais intenso para o hidrogênio mais desprotegido característico do isômero (E).

O surgimento do tripleto referente ao sinal $H_{11, 11'}$ 8,85 e 8,30 do composto IA4F e NA4F é devido ao acoplamento $^1H - ^{19}F$, visto que o núcleo de ^{19}F é bem abundante na natureza quase 100% e possui uma razão giro magnética próxima à do hidrogênio ($\gamma = 25,16 \times 10^7 \text{ rad.s}^{-1}.\text{T}^{-1}$), ou seja, o flúor é bem ativo na ressonância, tanto quanto o hidrogênio.

Os valores dos sinais de 1H sugerem que a coordenação dos ligantes Hidrazonas ou oxadiazóis ao centro metálico ocorre pelo nitrogênio piridinico, devido ao maior deslocamento químico nos H_2 e H_2' . Isto é uma consequência da desproteção anisotrópica causada pelos cianetos do pentacianoferrato e proteção dos H_3 e H_3' devido as interações de retrodoação π para os ligantes IA4H, IA4OMet, IA4F, IO3H, IO3S, IO3S e IO3SMet. Para os ligantes NA4H, NA4OMet e NA4F ocorreu uma desproteção anisotrópica para os H_2 e H_6 por motivos já comentados e proteção nos hidrogênios situados na posição 5. Essa teoria é reforçada pela literatura [77]. Sistemas metálicos no qual apresentam ligantes π inocentes, como é o caso das pentaaminas, não apresentam esse tipo de comportamento para hidrogênios [77].

4.3.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C

Os carbonos C_{12} e C_{14} dos ligantes IA4F e NA4F, respectivamente, apresentam sinais desdobrados devido ao acoplamento $^{13}C - ^{19}F$. Em geral os espectros de carbono - 13 são desacoplados do 1H por uma seqüência de pulso específica para que o sinal de carbono seja único, mas o carbono-13 não é desacoplado do ^{19}F . Por essa razão a existência do

desdobramento para C₁₂ e C₁₄ dos ligantes IA4F e NA4F, respectivamente, conforme ilustrados nas Figuras 36 e 41.

Os espectros de RMN ¹³C dos ligantes estão de acordo com as estruturas propostas e também confirmam a coordenação dos ligantes ao centro metálico pelo nitrogênio piridínico. Com a coordenação, parte da densidade eletrônica do ligante é deslocada para formar a ligação, os carbonos próximos ao nitrogênio que faz a coordenação ao centro metálico são desprotegidos mais do que os outros, o que torna indicativo do ponto de coordenação.

4.4 Eletroquímica

Voltametria Cíclica

A determinação dos potenciais formais de redução (E⁰) dos complexos metálicos pode ser feita por medidas potenciométricas, no caso de espécies relativamente inertes em solução. Entretanto, a voltametria cíclica para a medição destes potenciais formais tem sido mais amplamente empregada [87, 109]. A Equação 8 relaciona o potencial formal de redução com o potencial de meia onda (E_{1/2}), envolvendo os coeficientes de difusão do par redox.

$$E_{1/2} = E^0 + 0,0592 \cdot n^{-1} \cdot \log(D_{\text{red}}/D_{\text{oxid}})^{1/2} \quad (8)$$

Onde n é o número de elétrons envolvido no processo, D_{red} e D_{oxid} são os coeficientes de difusão das espécies na forma reduzida e oxidada, respectivamente, os quais para os cianoferratos, geralmente, são comparáveis. Desta forma, o potencial de meia onda tem sido igualado aos potenciais formais de redução nestes complexos [110].

As medidas eletroquímicas possivelmente representam de forma direta as interações de retrodoação π, que são responsáveis pela estabilização do metal na forma reduzida, uma vez que tal técnica está sujeita também a outros fatores que podem estabilizar um particular estado redox, tal como as interações com o solvente, contra-íons e presença de reações secundárias. De forma genérica, um aumento no potencial formal do complexo sugere uma mais intensa interação de retrodoação π, porque neste fenômeno a

RESULTADOS E DISCUSSÃO

densidade eletrônica do metal o torna menos redutor e, conseqüentemente, mais difícil de ser oxidado.

Os voltamogramas cíclicos para os íons complexos do tipo $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{L})]^{3-}$, exibiram potências de meia onda em torno de 300 mV (*vs* Ag|AgCl|Cl). Os complexos aqui estudados apresentaram potencial redox mais positivo com relação ao complexo de partida, $[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NH}_3]^{3-}$ ($E_{1/2} = 123$ mV), nas mesmas condições experimentais, indicando uma maior estabilização do centro metálico no estado reduzido. Esta observação é compatível com as características π -receptoras dos ligantes L, em comparação com a NH_3 conforme já discutido anteriormente. Os valores de potenciais de $E_{1/2}$, ΔE e $|I_a/I_c|$ estão inseridos na Tabela 6.

Tabela 6. Potenciais de oxi-redução dos íons complexos em NaTFA 1M, pH = 6,8.

Classe	$[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{L}]^{3-}; \text{L} =$	$E_{1/2}$, mV	$\Delta E (E_a - E_c)$ mV	$ I_a/I_c $	Figuras
Iso ¹	IA4H	300	95	0,98	Figura 101
	IA4OMet	302	111	0,98	Figura 102
	IA4F	305	57	0,98	Figura 103
Nic ²	NA4H	299	61	0,99	Figura 104
	NA4OMet	294	110	0,97	Figura 105
	NA4F	280	69	0,98	Figura 106
Oxa ³	IO3H	280	70	0,98	Figura 107
	IO3S	305	123	0,97	Figura 108
	IO3Met	280	104	0,99	Figura 109
	IO3SMet	277	99	0,99	Figura 110
Lit ⁴	$[\text{Ru}(\text{CN})_5(\text{isoniazida})]^{3-}$	780	102	0,98	-
	$[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5(\text{isoniazida})]^{2+}$	356	120	0,96	-
	$[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NH}_3)]^{3-}$	123	125	0,95	-

1- Derivados isonicotínicos; 2- Derivados nicotínicos; 3- Derivados oxadiazóis;
4- Outros sistemas metálicos [25, 87].

Estudos de inibição da enzima InhA com o íon complexo $[\text{Ru}(\text{CN})_5(\text{izd})]^{3-}$ mostraram que o mesmo não apresentou inibição considerável [25]. Uma explicação para este fato é que o potencial redox $\text{Ru}^{\text{III/II}}$ (780 mV *vs.* Ag|AgCl|Cl) para este sistema é muito alto,

sendo de difícil acesso no meio. Por outro lado, como os valores de $E_{1/2}$ para os íons complexos aqui apresentados são próximos aquele apresentado pelo íon complexo $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{izd})]^{3-}$ (305 mV, onde izd = isoniazida) [25], o qual apresenta inibição da InhA, os mesmos apresentam-se como bons candidatos para essa finalidade.

4.5 Ensaio de inibição enzimática da *trans*-2-enoil redutase

A busca de novas drogas anti-tuberculose tem como objetivo principal a seletividade de ação no alvo específico, além de baixa toxicidade e um amplo espectro de ação.

As descobertas de rotas mecanísticas de ação das drogas são de extrema importância para elaboração de novos fármacos. Já que a complexidade do sistema biológico pode dar origem a certa diversidade de possibilidades, tal como a inibição de enzimas chaves através de reconhecimento molecular de um complexo no sítio ativo de uma proteína. Uma previsão mais precisa dos possíveis processos enfrentados por tais compostos é extremamente complexa para ser realizada por ensaios químicos. Desta forma, iniciaram-se, em colaboração com o centro de pesquisas em biologia molecular e funcional da PUC, os ensaios bioquímicos destes complexos metálicos e similares, selecionando-se a enzima InhA, alvo primário destas drogas livres, uma vez que a presença de cepas multiresistentes tem sido um problema alarmante. O “design” de drogas que possam superar tais rotas de resistência é de grande interesse. Como os estudos químicos dos compostos aqui apresentados conduzem a possibilidade de ação dos mesmos nessas rotas, reforçou-se o interesse neste tipo de experimento e o uso de InhA mutante e S94A (serina substituída na posição 94 por alanina), resistente a isoniazida.

As condições experimentais utilizadas para os ensaios de inativação estão descritas na literatura [34]. Os dados de inativação da enzima InhA, espécie selvagem, foram utilizados para calcular a porcentagem de atividade enzimática residual em função do tempo. O valor de 100 % corresponde à atividade enzimática na ausência do complexo metálico inibidor.

Foram realizados três testes de inibição com os complexos sintetizados, descritos abaixo:

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1º Inibidor (complexo) + Enzima (selvagem ou mutante): teste utilizado para saber se o complexo inibiu as enzimas alvos sem a necessidade de ativação por outras enzimas. A constante de velocidade de inibição foi calculada em condições de pseudo-primeira ordem.

2º Inibidor (complexo) + Enzima (selvagem ou mutante) + 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de NADH: A literatura reporta que esta é a concentração de NADH presente in vivo durante a biossíntese da parede celular da bactéria.

3º Inibidor + Enzima (selvagem ou mutante) + 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de NADH: A concentração de 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de NADH faria com que todos os sítios ativos da enzima fossem ocupados pelo NADH dificultando a inibição e/ou inutilizando o inibidor.

As curvas de inibição para os 10 complexos estão ilustradas na Figura 111 e os dados estão resumidos na Tabela 7, juntamente com os valores de constante de inibição e tempo de meia-vida, $t_{1/2}$.

Os resultados de inibição nos levam a propor um possível perfil de mecanismo de inibição, baseado na ação direta dos complexos com a enzima InhA, em um sítio ativo diferente da isoniazida. Já que os complexos também inibem a InhA mutante, para a qual a isoniazida é pouco eficiente. Poderíamos propor que a interação dos complexos com a enzima se faça através de alguma rota de reconhecimento molecular, que poderia incluir como etapa determinante a interação eletrostática e uma possível reação redox entre o complexo e a enzima visto que o íon complexo $[\text{Ru}(\text{CN})_5(\text{izd})]^{3-}$, o qual possui elevado potencial redox, não inibe a atividade da enzima.

Tabela 7. Constantes de velocidade da cinética de inibição das enzimas selvagens e mutantes frente aos complexos sintetizados.

Grupo	Ensaio	k, min^{-1}	$t_{1/2}, \text{min}$	Figuras
Isonicotinóil Hidrazonas	S94AInhA + $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IA4H})]^{3-}$	$643 \pm 26 \times 10^{-3}$	1,08	Figura 111a
	S94AInhA + $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IA4H})]^{3-}$ + 10 $\mu\text{mol.L}$ de NADH	$393 \pm 19 \times 10^{-3}$	1,76	
	WTInhA + $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IA4H})]^{3-}$	$307 \pm 21 \times 10^{-3}$	2,25	
	WTInhA + $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IA4H})]^{3-}$ + 10 $\mu\text{mol.L}$ de NADH	$147 \pm 7 \times 10^{-3}$	4,7	
	S94AInhA + $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IA4H})]^{3-}$ + 100 $\mu\text{mol.L}$ de NADH	$140 \pm 4 \times 10^{-3}$	4,9	
	WTInhA + $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IA4H})]^{3-}$ + 100 $\mu\text{mol.L}$ de NADH	$72 \pm 4,7 \times 10^{-3}$	9,6	
	S94AInhA + $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IA4OMet})]^{3-}$	$477 \pm 40 \times 10^{-3}$	1,45	Figura 111b

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nicotinoil Hidrazonas	WTInha + $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IA4OMet})]^{3-}$	$410 \pm 40 \times 10^{-3}$	1,69	
	S94AInhA + $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IA4OMet})]^{3-}$ + 10 $\mu\text{mol.L}$ de NADH	$277 \pm 29 \times 10^{-3}$	2,5	
	WTInha + $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IA4OMet})]^{3-}$ + 10 $\mu\text{mol.L}$ de NADH	$143 \pm 16 \times 10^{-3}$	4,85	
	S94AInhA + $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IA4OMet})]^{3-}$ + 100 $\mu\text{mol.L}$ de NADH	$92 \pm 3 \times 10^{-3}$	7,5	
	WTInha + $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IA4OMet})]^{3-}$ + 100 $\mu\text{mol.L}$ de NADH	$69 \pm 3 \times 10^{-3}$	10,0	
	Figura 111c			
	WTInha + $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IA4F})]^{3-}$	$488 \pm 22 \times 10^{-3}$	1,42	
	S94AInhA + $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IA4F})]^{3-}$	$421 \pm 34 \times 10^{-3}$	1,65	
	S94AInhA + $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IA4F})]^{3-}$ + 10 $\mu\text{mol.L}$ de NADH	$310 \pm 21 \times 10^{-3}$	2,23	
	WTInha + $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IA4F})]^{3-}$ + 10 $\mu\text{mol.L}$ de NADH	$158 \pm 7 \times 10^{-3}$	4,39	
	S94AInhA + $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IA4F})]^{3-}$ + 100 $\mu\text{mol.L}$ de NADH	$146 \pm 9 \times 10^{-3}$	4,7	
	WTInha + $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IA4F})]^{3-}$ + 100 $\mu\text{mol.L}$ de NADH	$79 \pm 2 \times 10^{-3}$	8,8	
	Figura 111d			
	S94AInhA + $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NA4H})]^{3-}$ + 10 $\mu\text{mol.L}$ de NADH	$307 \pm 21 \times 10^{-3}$	2,26	
	S94AInhA + $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NA4H})]^{3-}$	$301 \pm 20 \times 10^{-3}$	2,3	
	WTInha + $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NA4H})]^{3-}$	$305 \pm 26 \times 10^{-3}$	2,3	
	WTInha + $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NA4H})]^{3-}$ + 10 $\mu\text{mol.L}$ de NADH	$122 \pm 4 \times 10^{-3}$	5,7	
	S94AInhA + $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NA4H})]^{3-}$ + 100 $\mu\text{mol.L}$ de NADH	$62 \pm 25 \times 10^{-3}$	11,2	
WTInha + $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NA4H})]^{3-}$ + 100 $\mu\text{mol.L}$ de NADH	$55 \pm 21 \times 10^{-3}$	12,6		
Figura 111e				
S94AInhA + $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NA4OMet})]^{3-}$	$522 \pm 26 \times 10^{-3}$	1,33		
S94AInhA + $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NA4OMet})]^{3-}$ + 10 $\mu\text{mol.L}$ de NADH	$386 \pm 31 \times 10^{-3}$	1,8		
WTInha + $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NA4OMet})]^{3-}$	$382 \pm 17 \times 10^{-3}$	1,8		
WTInha + $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NA4OMet})]^{3-}$ + 10 $\mu\text{mol.L}$ de NADH	$143 \pm 11 \times 10^{-3}$	4,8		
WTInha + $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NA4OMet})]^{3-}$ + 100 $\mu\text{mol.L}$ de NADH	$103 \pm 6 \times 10^{-3}$	6,7		
S94AInhA + $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NA4OMet})]^{3-}$ + 100 $\mu\text{mol.L}$ de NADH	$78 \pm 6,3 \times 10^{-3}$	8,88		

RESULTADOS E DISCUSSÃO

NADH				
WTInha + [Fe(CN) ₅ (NA4F)] ³⁻			380 ± 30 x 10 ⁻³ 1,82	
S94AInhA + [Fe(CN) ₅ (NA4F)] ³⁻			313 ± 31 x 10 ⁻³ 2,2	
S94AInhA + [Fe(CN) ₅ (NA4F)] ³⁻ + 10μmol.L de NADH			245 ± 22 x 10 ⁻³ 2,83	
S94AInhA + [Fe(CN) ₅ (NA4F)] ³⁻ + 100μmol.L de NADH			98 ± 6,4 x 10 ⁻³ 7,07	
WTInha + [Fe(CN) ₅ (NA4F)] ³⁻ + 10μmol.L de NADH			96 ± 4,7 x 10 ⁻³ 7,2	
WTInha + [Fe(CN) ₅ (NA4F)] ³⁻ + 100μmol.L de NADH			56 ± 5,2 x 10 ⁻³ 12,4	
Oxadiazol	S94AInhA + [Fe(CN) ₅ (IO3H)] ³⁻			359 ± 7 x 10 ⁻³ 1,93
	S94AInhA + [Fe(CN) ₅ (IO3H)] ³⁻ + 10μmol.L de NADH			345 ± 16 x 10 ⁻³ 2,0
	WTInha + [Fe(CN) ₅ (IO3H)] ³⁻			266 ± 21 x 10 ⁻³ 2,6
	WTInha + [Fe(CN) ₅ (IO3H)] ³⁻ + 10μmol.L de NADH			104 ± 4 x 10 ⁻³ 6,6
	S94AInhA + [Fe(CN) ₅ (IO3H)] ³⁻ + 100μmol.L de NADH			59 ± 1,9 x 10 ⁻³ 11,74
	WTInha + [Fe(CN) ₅ (IO3H)] ³⁻ + 100μmol.L de NADH			54 ± 2,2 x 10 ⁻³ 12,8
	S94AInhA + [Fe(CN) ₅ (IO3S)] ³⁻			274 ± x 10 ⁻³ 2,53
	WTInha + [Fe(CN) ₅ (IO3S)] ³⁻			235 ± 20 x 10 ⁻³ 2,95
	S94AInhA + [Fe(CN) ₅ (IO3S)] ³⁻ + 10μmol.L de NADH			223 ± 14,5 x 10 ⁻³ 3,11
	WTInha + [Fe(CN) ₅ (IO3S)] ³⁻ + 10μmol.L de NADH			157 ± 15 x 10 ⁻³ 4,41
	WTInha + [Fe(CN) ₅ (IO3S)] ³⁻ + 100μmol.L de NADH			65 ± 2,2 x 10 ⁻³ 10,6
	S94AInhA + [Fe(CN) ₅ (IO3S)] ³⁻ + 100μmol.L de NADH			55 ± 3,8 x 10 ⁻³ 12,6
	S94AInhA + [Fe(CN) ₅ (IO3SMet)] ³⁻			600 ± 24 x 10 ⁻³ 1,15
	WTInha + [Fe(CN) ₅ (IO3SMet)] ³⁻			454 ± 22 x 10 ⁻³ 1,53
S94AInhA + [Fe(CN) ₅ (IO3SMet)] ³⁻ + 10μmol.L de NADH			392 ± 28 x 10 ⁻³ 1,77	
WTInha + [Fe(CN) ₅ (IO3SMet)] ³⁻ + 10μmol.L de NADH			138 ± 9 x 10 ⁻³ 5,02	
S94AInhA + [Fe(CN) ₅ (IO3SMet)] ³⁻ + 100μmol.L de NADH			85 ± 5,3 x 10 ⁻³ 8,15	
WTInha + [Fe(CN) ₅ (IO3SMet)] ³⁻ + 100μmol.L de NADH			68 ± 4 x 10 ⁻³ 10,2	

**Figura
111f**

**Figura
111g**

**Figura
111h**

**Figura
111i**

RESULTADOS E DISCUSSÃO

S94AInhA + [Fe(CN) ₅ (IO ₃ Met)] ³⁻	713 ± 46,7 x 10 ⁻³	0,97	Figura 111j
WTInha + [Fe(CN) ₅ (IO ₃ Met)] ³⁻	507 ± 30 x 10 ⁻³	1,37	
S94AInhA + [Fe(CN) ₅ (IO ₃ Met)] ³⁻ + 10µmol.L de NADH	495 ± 32 x 10 ⁻³	1,4	
WTInha + [Fe(CN) ₅ (IO ₃ Met)] ³⁻ + 10µmol.L de NADH	179 ± 14 x 10 ⁻³	3,87	
S94AInhA + [Fe(CN) ₅ (IO ₃ Met)] ³⁻ + 100µmol.L de NADH	143 ± 10,5 x 10 ⁻³	4,85	
WTInha + [Fe(CN) ₅ (IO ₃ Met)] ³⁻ + 100µmol.L de NADH	75 ± 43 x 10 ⁻³	9,24	

4.6 Ensaios preliminares de toxicidade

Os ensaios de toxicidade exigem uma quantidade apreciável de complexo, para os mesmos foram sintetizados 5 g do complexo Na₃[Fe(CN)₅(isoniazida)]·3H₂O. Esse complexo foi a primeira metalodroga que apresentou atividade antituberculose.

Os animais utilizados nos testes permaneceram em gaiolas metabólicas por 24 horas. Após a administração da droga ou placebo, para avaliação do consumo alimentar, água e diurese, realizou-se coleta de sangue para a avaliação bioquímica e hematológica. Os animais foram observados durante 14 dias, para que fossem avaliados os efeitos da droga em manifestação de nocicepção. No décimo quarto dia os animais voltaram por mais 24 horas em gaiolas metabólica para observação de consumo alimentar, água e diurese. Depois foram sacrificados e os órgãos encaminhados para análise histopatológica. Em seguida, coletou-se o sangue para nova avaliação bioquímica e hematológica. Os animais foram pesados no primeiro e no décimo quarto dia.

Utilizaram-se dados da literatura [111] sobre a droga isoniazida para calcular as doses de drogas a serem usadas nos ensaios de toxicidade, partiu-se de uma dose de 66,666 mg/Kg (G1), 300 mg/Kg (G2), 600 mg/Kg (G3), 1200 mg/Kg (G4) e ainda 2400 mg/Kg (G5), além de um grupo controle o qual recebeu apenas veículo de diluição da droga. A droga foi administrada por gavagem (via oral). A metodologia se cumpriu apenas para os grupos controle, G1, G2, G3, pois os grupos G4 e G5 apresentaram mortalidade nas primeiras 24 horas. As observações macroscópicas para os grupos G4 e G5 indicam, hematuria, oliguria, sangramento nasal além de começarem a morrer 4 horas após administração da droga. Já os grupos controle, G1 e G2 não apresentaram sinais de

toxicidade nos 14 dias os quais foram observados. Quanto ao grupo G3, inicialmente foi observado animais com pelo erissado e alguns animais paralisados, nas primeiras 24 horas houve um óbito e dentro das próximas 48 horas mais 1 óbito, dando um total de 4 sobreviventes que não apresentaram sinais de nocicepção após 24-48 horas até o décimo quarto dia.

A DL_{50} foi calculada pelo programa Graf pad através de curva dose resposta, dando um valor de 884,5 mg/Kg. Em comparação com a isoniazida, pró-droga mais utilizada no combate contra a tuberculose, que tem a DL_{50} igual a 151 mg/Kg via intraperitonal e 149 mg/Kg via intravenosa o complexo apresentou-se menos tóxico o que é importante pois podemos administrar uma quantidade maior da droga com o intuito de reduzir assim o tempo de tratamento.

4.7 Cálculos teóricos

A utilização do computador em pesquisa nas áreas de ciências exatas é indispensável. Diversos artigos [112-116] na área de química apresentam resultados computacionais para dar mais suporte ao embasamento teórico.

O estudo de DFT (density functional theory – teoria do funcional da densidade) foi dividido em várias etapas: Inicialmente, realizou-se uma otimização da geometria dos ligantes partindo de diferentes conformeros, já que a estrutura inicial do composto é importante para reduzir o custo computacional e chega a uma estrutura final de menor energia e conseqüentemente mais estável. Após a escolha do conformero mais estável (de menor energia), fez-se o cálculo e análise de suas propriedades químicas teóricas. Calculou-se a densidade eletrônica e o potencial eletrostático. Para os complexos, procedeu-se da mesma maneira.

Potencial Eletrostático Molecular

Superfícies moleculares definidas pelas densidades moleculares eletrônicas ou em critérios simplesmente geométricos oferecem até o presente momento o melhor método de interpretação de reatividade química. Isso se dá principalmente através do potencial eletrostático molecular.

O potencial eletrostático (PE) em um ponto qualquer do espaço r , denominado $\phi(r)$, é definido como o trabalho realizado para trazer uma carga positiva do infinito até o ponto r mencionado. A energia eletrostática de interação entre uma carga pontual q localizada em r e a molécula, é dada pela expressão $q\phi(r)$ [117]. Esse potencial eletrostático é resultado da soma das contribuições tanto do núcleo quanto dos elétrons da molécula. O potencial eletrostático de um núcleo de peso atômico M é dado pela equação:

$$\varphi_{\text{núcleo}}(r) = \sum_{A=1}^M \frac{Z_A}{|r-R_A|} \quad (9)$$

Já a contribuição eletrônica é obtida através da integração da densidade eletrônica:

$$\varphi_{\text{elétron}}(r) = - \int \frac{dr'p(r)}{|r'-r|} \quad (10)$$

Sendo, portanto, o potencial eletrostático dado pela expressão.

$$q\varphi(r) = \varphi_{\text{elétron}}(r) + \varphi_{\text{núcleo}}(r) \quad (11)$$

O cálculo do potencial eletrostático é bastante útil e importante para a compreensão das interações entre moléculas e bem como nos processos de reconhecimento molecular. Isso se deve ao fato de que as forças eletrostáticas serem as mais básicas na interação de longa distância entre moléculas [117].

O potencial eletrostático negativo (em vermelho) corresponde a uma atração de um próton por uma densidade de elétrons concentrada na molécula. O potencial eletrostático positivo (em azul) corresponde a uma repulsão de um próton pelo núcleo atômico nas regiões onde existe uma baixa densidade eletrônica e a carga nuclear está incompleta.

O PE negativo se localiza claramente em torno dos átomos de nitrogênio do anel piridínico e sobre o oxigênio carbonílico para os ligantes hidrazonas, indicando assim dois possíveis pontos de coordenação ao centro metálico, como ilustra a Figura 112. Já os ligantes oxadiazóis mostram que os nitrogênios hidrazínicos são favoráveis à coordenação juntamente com o nitrogênio piridínico, ilustrado na Figura 113. A Figura 114 ilustra a estrutura otimizada para os complexos.

Esses resultados sugerem que a coordenação do ligante ao ferro se dá através do átomo de nitrogênio piridínico ou oxigênio carbonílico, onde o potencial negativo do

RESULTADOS E DISCUSSÃO

ligante é atraído pelo potencial positivo do metal. Por meio de técnicas espectroscópicas, tais com RMN, Infravermelho e Uv-Vísivel, constatou-se que a coordenação do ligante ao centro metálico se faz através do nitrogênio piridínico.

Contudo, é importante lembrar que muitas reatividades químicas clássicas dependem da interação de receptores e doadores de dois elétrons que não pode ser observada pelo PE. Tais propriedades são mais bem observadas através da função de Fukui [118]. As propriedades calculadas através dessa função se diferem daquelas do PE, pois não são observáveis físicos, mas informam sobre regio- ou estereo-seletividade de reações.

Observa-se uma semelhança na distribuição de cargas nos complexos, com grande parte da densidade de cargas negativas localizada sobre os cianetos. O estudo do potencial eletrostático pode ajudar a entender melhor como se dá a interação do complexo com a enzima e no design de novos metalo-fármacos com melhor interação.

A Tabela 8 mostra os valores dos potenciais eletrostáticos máximos negativos, $P_{\text{max.Neg.}}$, potenciais eletrostáticos máximos positivos, $P_{\text{max.Pos.}}$, e a diferença de distribuição de cargas entre os potenciais para um valor de *isosurface* 0,04. Pode-se observar que nos complexos a variação de distribuição de carga, em termos de potenciais eletrostáticos, é bem maior que a variação de distribuição de carga do ligante livre, dando indícios de que a distribuição eletrônica no complexo é facilitada, tanto em termos de potencial eletrostático como em termos de orbitais de fronteira.

Tabela 8. Valores de potenciais eletrostáticos dos ligantes e dos complexos.

Ligantes, L=	Valores referentes aos Ligantes			Valores referentes aos Complexos [Fe(CN) ₅ L] ³⁻		
	$P_{\text{max. Neg.}}$	$P_{\text{max. Pos.}}$	$ \Delta P $	$P_{\text{max. Neg.}}$	$P_{\text{max. Pos.}}$	$ \Delta P $
NA4H	-0,0600	0,0966	0,1566	-0,3696	-0,1426	0,2270
NA4F	-0,0584	0,0995	0,1579	-0,3670	-0,1362	0,2313
NA4OMet	-0,0674	0,1001	0,1675	-0,3711	-0,1024	0,2687
IA4H	-0,0638	0,1039	0,1677	-0,3619	-0,1330	0,2289
IA4F	-0,0625	0,1068	0,1693	-0,3600	-0,1288	0,2312
IA4OMet	-0,0652	0,1000	0,1693	-0,3636	-0,0946	0,2690
IO3S	-0,0610	0,1243	0,1853	-0,3895	-0,0936	0,2959
IO3H	-0,0608	0,0820	0,1428	-0,4017	-0,0942	0,3074
IO3SMet	-0,0656	0,0603	0,1259	-0,3875	-0,1227	0,2648
IO3Met	-0,0642	0,0559	0,1201	-0,3986	-0,1403	0,2583

O orbital LUMO distribuído por todo o complexo pode facilitar as interações *de* retrodoação π para o ligante e, conseqüentemente facilitaria as interações complexo-enzima e possíveis reações redox entre o complexo e a enzima.

Observa-se que o orbital LUMO esta localizado predominantemente no ligante, Figura 115. O que é esperado, já que é o orbital que faz as interações de retrodoação π com o metal, através do HOMO-1 para as hidrazonas e HOMO-2 para os oxadiazóis. Outra observação importante é que os orbitais de fronteira, os quais são responsáveis por processo redox do complexo estão distribuídos tanto no metal quanto nos ligantes. Os ligantes oxadiazóis exibem melhor interação metal ligante em termos de orbitais de fronteira, visto que o orbital LUMO se distribui tanto no metal quanto no ligante.

Na tentativa de se estabelecer uma correlação entre o potencial eletrostático do complexo e sua atividade contra a enzima InhA, calculou-se o potencial eletrostático do íon complexo hexacianoferrato(II) e hexacianoferrato(III), os quais não apresentam atividade frente a essa enzima, conforme já mencionado anteriormente. Observou-se que a distribuição de carga nos hexacianoferratos encontra-se densamente negativo isso com relação à faixa de distribuição de carga dos complexos pentacianoferratos (potencial máximo negativo igual -0,4 e potencial máximo positivo igual a -0,09 com *isosurface* - 0,04), ilustrado na Figura 116a. A faixa de distribuição de carga dos hexacianoferratos mostraram-se de -0,49 a -0,57 com o *isosurface* igual a 0,04 para o hexacianoferrato (III) e de -0,38 a -0,41 com o *isosurface* igual a 0,04 para o hexacianoferrato (II). As Figuras 116b e 116c, mostra melhor a distribuição de cargas mais negativa e mais positiva nos complexos hexacianoferrato (II) e (III) respectivamente. Observa-se que a região mais negativa do complexo é uma região mais externa nos nitrogênio que são os vértices do octaédrico, enquanto que a região mais positiva seria o centro metálico.

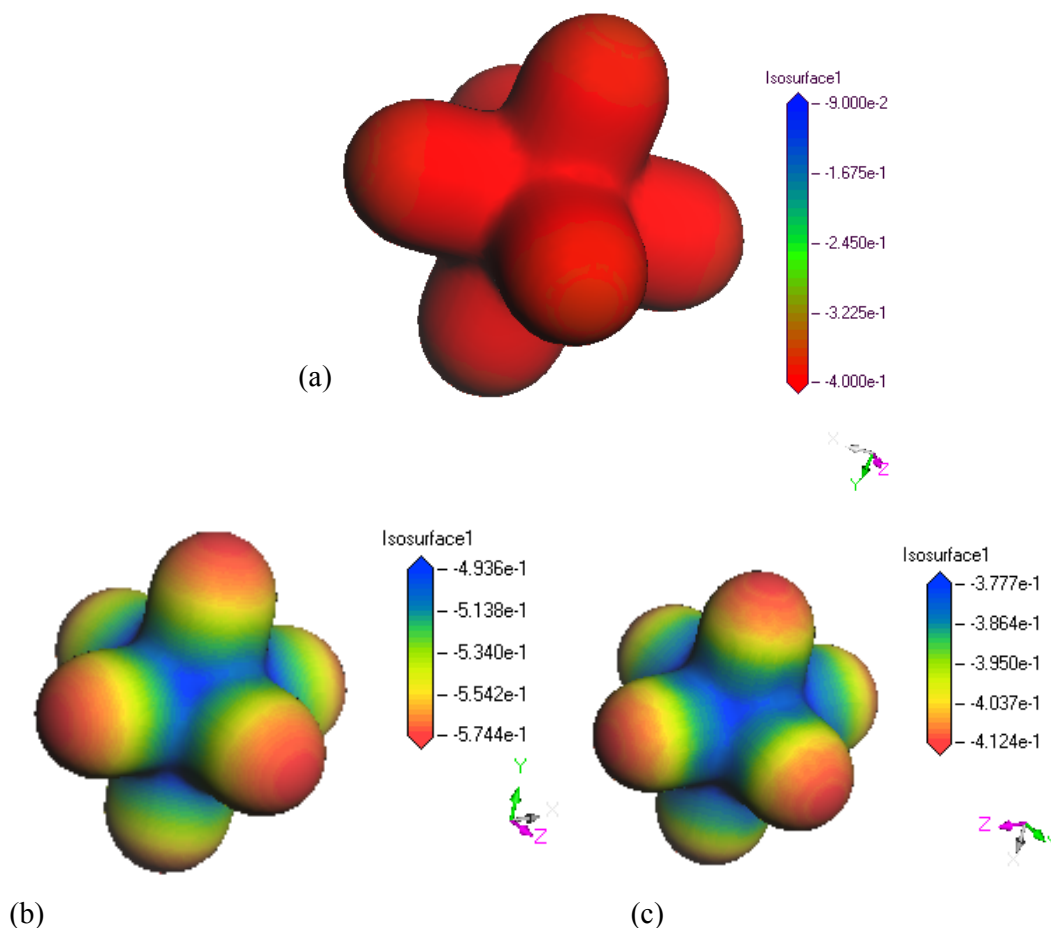


Figura 116. Densidade eletrônica molecular total com gradiente de potencial eletrostático dos complexos (a) Hexacianoferrato (II), (b) Hexacianoferrato (II) com ajuste de gradiente e (c) Hexacianoferrato (III) com ajuste de gradiente.

Outro cálculo interessante foi feito com o íon complexo pentaciano(isoniazida)rutenato (II), o qual não inibe a enzima possivelmente por seu elevado potencial redox. A Figura 117 mostra a distribuição de carga para este íon complexo. Observa-se que a distribuição de carga do íon complexo pentaciano(isoniazida)rutenato (II) é semelhante à do íon complexo pentaciano(isoniazida)ferrato (II). No entanto, o complexo de rutênio tem a energia do orbital HOMO menor do que o complexo de Ferro. Isso explica seu elevado potencial redox com $E_{1/2}$ aproximadamente de 770 mV vs. Ag/AgCl, enquanto que os valores de $E_{1/2}$ dos complexos em estudo apresentam-se em torno de 300 mV vs. Ag/AgCl. Através do cálculo das energias dos orbitais de fronteira pode-se ter uma idéia das energias de orbitais

HOMO e por correlação prever se o íon complexo proposto tem potencial para inibir ou não a enzima.

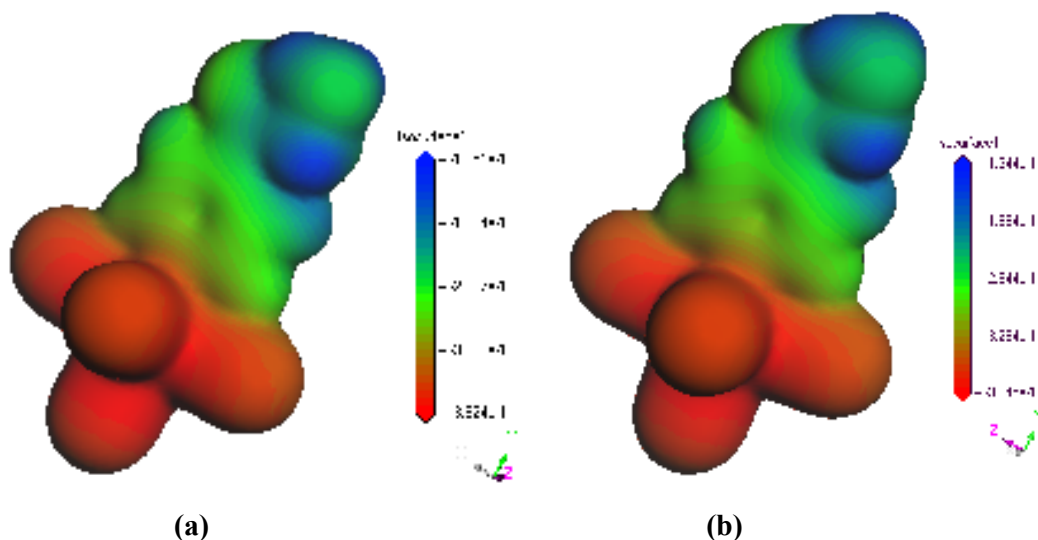


Figura 117. Densidade eletrônica molecular total com gradiente de potencial eletrostático dos complexos; (a) pentaciano(isoniazida)ferrato (II) e (b) pentaciano(isoniazida)rutenato(II).

Outro sistema interessante para o estudo do design de metalo-farmacos contra a tuberculose foi feito com o íon complexo pentaamin(isoniazida)rutenato(II), ilustrado na Figura 118. Esse complexo não inibe a enzima, mas mata o bacilo. O mesmo possui um potencial redox com $E_{1/2}$ igual a 356 mV vs. Ag/AgCl [25]. Este valor é bastante semelhante aos apresentados pelos complexos pentacianoferratos, mas possui carga líquida positiva igual a 2+, o que muda radicalmente a distribuição de cargas no íon complexo. Estes resultados sugerem que a enzima tem preferência por uma região no complexo densamente negativa que é o caso de complexo cianoferratos.

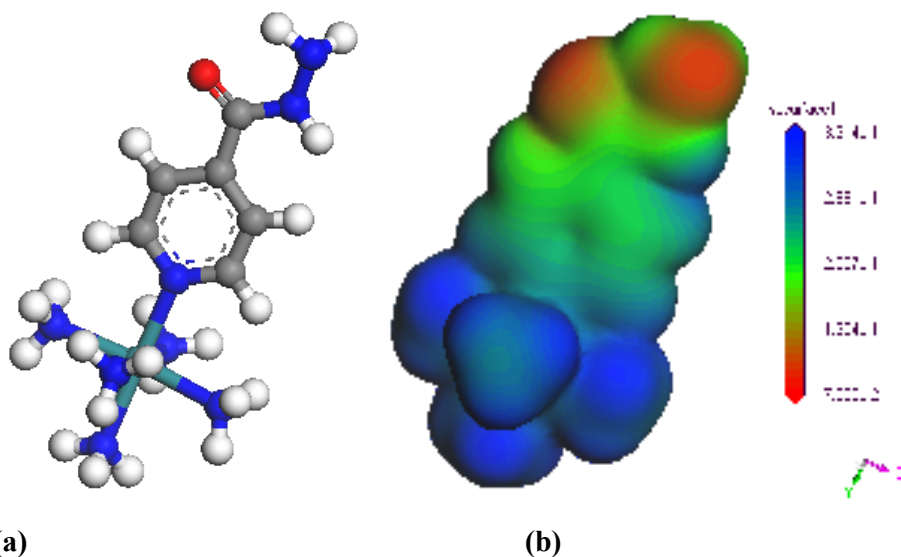
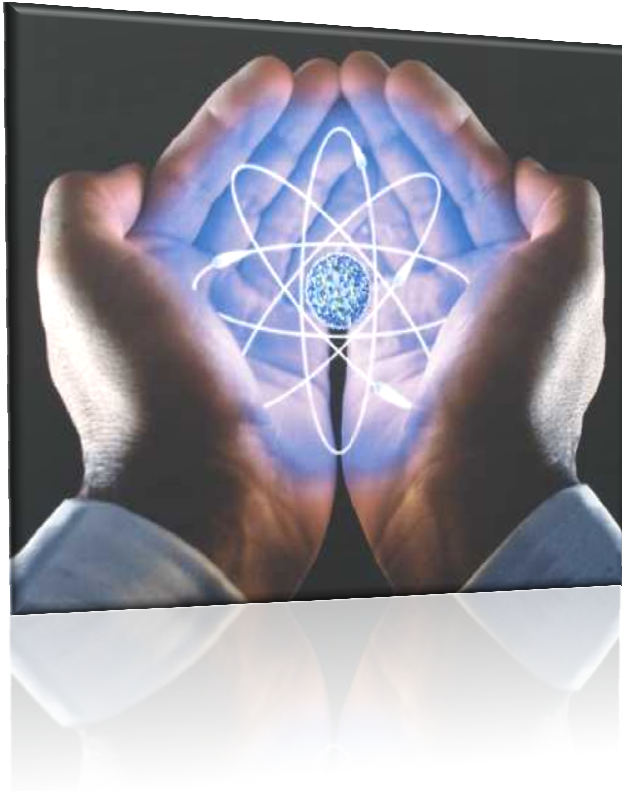


Figura 118. (a) Estrutura otimizada do complexo pentaamin(isoniazida)rutenado (II)
 (b) Densidade eletrônica molecular total com gradiente de potencial eletrostático do complexo pentaamin(isoniazida)rutenado (II).

Podemos propor um possível mecanismo de inibição baseado numa maior interação do complexo com a enzima com relação aos substratos de forma que o potencial redox é importante para que ocorra a processos redox entre enzima-inibidor.

CAPÍTULO 5: CONCLUSÃO

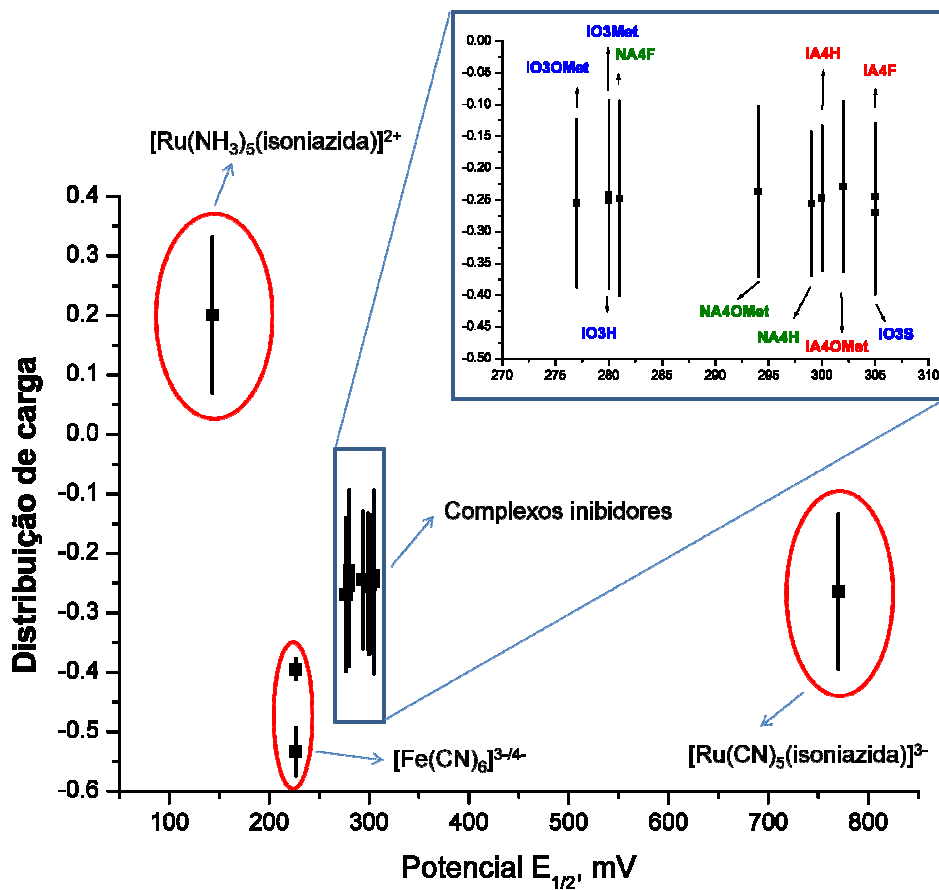


“A tuberculose foi um dos maiores desafios da saúde no início do século XX. Nós não podemos permitir que a TBMR torne-se o maior problema de saúde no século XXI.”

Pesquisador Michael Iseman, da Universidade de Colorado e do National Jewish Medical and Research Center.

CAPÍTULO 5: CONCLUSÃO

Os ligantes em estudo coordenados ao sistema pentacianoferrato exibiram propriedades inibitórias frente às enzimas tipo selvagem (WT InhA) e mutante (S94A InhA). Esta inibição é dependente de pelo menos dois fatores importantes, o potencial redox das espécies e a distribuição de carga do complexo, ilustrado na Figura 119.



31

Figura 119. Gráfico do Potencial eletroquímico vs. distribuição de carga de: ○ complexos não inibidores e □ complexos inibidores.

Observa-se que os complexos inibidores devem ter certas propriedades eletrônicas e eletroquímicas para que ocorra o *docking* e a transferência de elétrons para que ocorra a inibição.

PERSPECTIVAS



“Trate seus soldados como seus filhos e eles o seguirão aos vales mais profundos; trate-os como filhos queridos e o defenderão com o próprio corpo até a morte.”

Sun Tzu, A Arte da Guerra.

PERSPECTIVAS

O desenvolvimento dessa tese visa à investigação da atuação de complexos inorgânicos que inibem a ação enzimática da 2-trans-enoil redutase, o que foi alcançado com sucesso. No entanto, é necessária a realização de novas pesquisas baseadas na investigação do potencial redox de outros complexos, bem como o estudo de *docking* dos mesmos frente à enzima, levando em conta os parâmetros de Hammett associados aos potenciais redox dos complexos e a posterior realização de testes biológicos *in vivo*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



“É sábio olhar para trás, pois é avaliando a tortuosidade de nossas pegadas que poderemos garantir um caminho reto para o futuro.”

Autor Desconhecido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1]. Davis, B. D., Dulbecco, R., Eisen, H. N., Ginsberg, H. S. and W. Barry Wood, J., *Microbiologia: Infecções bacterianas e micóticas*, EDART-São Paulo: **1973**.
- [2]. Ait-Khaled, N. and Enarson, D. A., *TUBERCULOSIS: A Manual for Medical Students*, World Health Organization: **2003**.
- [3]. OMS, *Targeted Tuberculin Testing and Treatment of Latent Tuberculosis Infection*, Am. J. Respir. Crit. Care Med, 161 221S-247S, **2000**.
- [4]. Huebner RE, S. M., Bass JB Jr., *The tuberculin skin test*, Clin Infect Dis., 17 968-975, **1993**.
- [5]. Jerant, A. F., Bannon, M. and Rittenhouse, S., *Identification and management of tuberculosis*, American Family Physician, 61 (9), 2667-2678, **2000**.
- [6]. Blanchard, J. S., *Molecular mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis*, Annual Review of Biochemistry, 65 215-239, **1996**.
- [7]. Rattan, A., Kalia, A. and Ahmad, N., *Multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis: Molecular perspectives*, Emerging Infectious Diseases, 4 (2), 195-209, **1998**.
- [8]. Wengenack, N. L., Hoard, H. M. and Rusnak, F., *Isoniazid oxidation by Mycobacterium tuberculosis KatG: A role for superoxide which correlates with isoniazid susceptibility*, Journal of the American Chemical Society, 121 (41), 9748-9749, **1999**.
- [9]. Wilming, M. and Johnsson, K., *Spontaneous formation of the bioactive form of the tuberculosis drug isoniazid*, Angewandte Chemie-International Edition, 38 (17), 2588-2590, **1999**.
- [10]. Zabinski, R. F. and Blanchard, J. S., *The requirement for manganese and oxygen in the isoniazid-dependent inactivation of Mycobacterium tuberculosis enoyl reductase*, Journal of the American Chemical Society, 119 (9), 2331-2332, **1997**.
- [11]. Wang, J. Y., Burger, R. M. and Drlica, K., *Role of superoxide in catalase-peroxidase-mediated isoniazid action against mycobacteria*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 42 (3), 709-711, **1998**.
- [12]. Rouse, D. A. and Morris, S. L., *Molecular Mechanisms of Isoniazid Resistance in Mycobacterium-Tuberculosis and Mycobacterium-Bovis*, Infection and Immunity, 63 (4), 1427-1433, **1995**.
- [13]. McKinney, J. D., Jacobs, W. R. J. and Bloom, B. R., *Emerging infections* Krause: NYC, EUA., 51-146, **1998**.
- [14]. www.who.org, *Global Tuberculosis Control: Surveillance Planning, Financing*; http://www.who.int/entity/tb/publications/global_report/2008/pdf/fullreport.pdf acessado em 17 de abril de 2008
- [15]. Campos, H. S., *Mycobacterium Tuberculosis resistente: de onde vem a resistência?*, Boletim de Pneumologia Sanitária, 7 (1), 51-64, **1999**.
- [16]. www.cdc.gov, *Trends in Tuberculosis - United States, 2005*; <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5511a3.htm> acessado 21 de abril de 2007
- [17]. www.statistics.gov.uk, *Notification rates of tuberculosis: by NHS Regional Office area, 1990-2001: Regional Trends 37*; <http://www.statistics.gov.uk/StatBase/ssdataset.asp?vlnk=5963&Pos=4&ColRank=1&Rank=144> acessado 23 de janeiro de 2006
- [18]. www.who.org, *Global Tuberculosis Control Surveillance, Planning, Financing*; http://www.who.int/tb/publications/global_report/2006/pdf/full_report_correctedversion.pdf acessado 23 de maio 2008

-
- [19]. Davies, P. D. O., Yew, W. W., Ganguly, D., Davidow, A. L., Reichman, L. B., Dheda, K. and Rook, G. A., *Smoking and tuberculosis: the epidemiological association and pathogenesis*, Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 100 (4), 291–298, **2005**.
- [20]. Gupta, K. B. and Gupta, R., *Association between smoking and tuberculosis*, Indian Journal of Tuberculosis, 50 (5), **2003**.
- [21]. OMS, *According to the World Health Organization (WHO), nearly 2 billion people, one-third of the world's population, have TB*; **2006**
- [22]. Schroeder, E. K., de Souza, N., Santos, D. S., Blanchard, J. S. and Basso, L. A., *Drugs that inhibit mycolic acid biosynthesis in Mycobacterium tuberculosis*, Current Pharmaceutical Biotechnology, 3 (3), 197-225, **2002**.
- [23]. Ehrt, S., Shiloh, M. U., Ruan, J., Choi, M., Gunzburg, S., Nathan, C., Xie, Q. and Riley, L. W., *A novel antioxidant gene from Mycobacterium tuberculosis*, Journal of Experimental Medicine, 186 (11), 1885-1896, **1997**.
- [24]. Ratledge, C. and Stanford, J., *The biology of the Mycobacteria*, Academic Press: London, **1982**.
- [25]. Sousa, E. H. S. d., *Reatividade de compostos inorgânicos que inibem a 2-trans-enoil-ACP (CoA) redutase, um alvo anti-tuberculose*, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará: Fortaleza-CE, 224, **2003**.
- [26]. Cole, S. T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S. V., Elglemeler, K., Gas, S., Barry III, C. E., Tekaia, F., Badcock, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R., Devlin, K., Feltwell, Gentles, S., Hamlin, N., Holroyd, S., T., Jagels, K. and Barrell, B. G., *Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence.*, Nature, 393 (6685), 537-44, **1998**.
- [27]. Middlebrook, G., *Sterilization of tubercle bacilli by isonicotinic acid hydrazid and the incidence of variants resistant to the drug in vitro*, American Review of Tuberculosis, 65 765-767, **1952**.
- [28]. Bernstein, J., Lott, W. A., Steinberg, B. A. and Yale, H. L., *Chemotherapy of experimental tuberculosis. — V. Isonicotinic acid hydrazide (nydrazid) and related compounds*, American Review of Tuberculosis, 65 357-364, **1952**.
- [29]. Banerjee, A., Dubnau, E., Quémar, A., Balasubramanian, V., Um, K. S., Wilson, T., Collins, D., de Lisle, G. and Jacobs, W. R. J., *inhA, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in Mycobacterium tuberculosis*; 263; **1994**.
- [30]. Quémar, A., Sacchetti, J. C., Dessen, A., Vilcheze, C., Bittman, R., Jacobs, W. R. J. and Blanchard, J. S., *Enzymatic characterization of the target for isoniazid in Mycobacterium tuberculosis*, Biochemistry, 34 (26), 8235-8241, **1995**.
- [31]. Vilchère, C., Morbidoni, H. R., Weisbrod, T. R., Iwamoto, H., Sacchetti, J. C. and Jacobs, W. R. J., *Inactivation of the inhA-Encoded Fatty Acid Synthase II (FASII) Enoyl-Acyl Carrier Protein Reductase Induces the Accumulation of the FASI End Products and Cell Lysis of Mycobacterium smegmatis*, Journal of Bacteriology, 182 4059-4067, **2000**.
- [32]. Johnsson, K. and Schultz, P. G., *Mechanistic studies of the oxidation of isoniazid by the catalase-peroxidase from Mycobacterium tuberculosis*, Journal of the American Chemical Society, 116 7425-7426, **1994**.
- [33]. Johnsson, K., King, D. S. and Schultz, P. G., *Studies on the mechanism of action of isoniazid and ethionamide in the chemotherapy of tuberculosis*, Journal of the American Chemical Society, 117 5009-5010, **1995**.
- [34]. Basso, L. A., Zheng, R. and Blanchard, J. S., *Kinetics of inactivation of WT and C243S mutant of Mycobacterium Enoyl Reductase by activated isoniazid*, Journal of the American Chemical Society, 118 11301-11302, **1996**.

-
- [35]. Rozwarski, D. A., Grant, G. A., Barton, D. H. R., Jacobs, W. R. J. and Sacchettini, J. C., *Modification of the NADH of the Isoniazid Target (InhA) from Mycobacterium tuberculosis*, Science, 279 98-102, **1998**.
- [36]. Lei, B., Wei, C.-J. and Tu, S.-C., Journal of Biological Chemistry, 275 2520, **2000**.
- [37]. Rawat, R., Whitty, A. and Tonge, P. J., *The Isoniazid-NAD Adduct is a Slow, Tight-Binding Inhibitor of InhA, the Mycobacterium Tuberculosis Enoyl Reductase; Adduct Affinity and Drug Resistance*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 100 13881-13886, **2003**.
- [38]. Basso, L. A., Zheng, R., Musser, J. M., Jacobs, W. R. J. and Blanchard, J. S., *Mechanisms of isoniazid resistance in Mycobacterium tuberculosis: enzymatic characterization of Enoyl Reductase mutants identified in isoniazid-resistant clinical isolates*, The Journal of Infectious Diseases, 178 769-775, **1998**.
- [39]. Glickman, M. S. and Jacobs, W. R. J., *Microbial pathogenesis of Mycobacterium tuberculosis: dawn of a discipline*, Cell, 104 477-485, **2001**.
- [40]. Jaim S. Oliveira, E. H. S. d. S., Osmar N. de Souza, p, Ícaro S. Moreira, Diógenes S. and Santos, L. A. B., *Slow-Onset Inhibition of 2-trans-Enoyl-ACP (CoA) Reductase from Mycobacterium tuberculosis by an Inorganic Complex*, Current Pharmaceutical Design, 12 **2006**.
- [41]. Sandrine Gaurrand, S. D., Christophe Meyer, Pascal Bonnet, Jean-Michel Argouillon, Hassan Oulyadi Jérôme Guillemont, *Conformational analysis of R207910, a new drug candidate for the treatment of tuberculosis, by a combined NMR and molecular modeling approach*, Chem Biol Drug Des, 68 77-84, **2006**.
- [42]. Sharma, V. and Piwnicka-Worms, D., *Metal complexes for therapy and diagnosis of drug resistance*, Chemical Reviews, 99 (9), 2545-2560, **1999**.
- [43]. Wong, E. and Giandomenico, C. M., *Current status of platinum-based antitumor drugs*, Chemical Reviews, 99 (9), 2451-2466, **1999**.
- [44]. Domarle, O., Blampain, G., Agnani, H., Nzadiyabi, T., Lebibi, J., Brocard, J., Maciejewski, L., Biot, C., Georges, A. J. and Millet, P., *In Vitro Antimalarial Activity of a New Organometallic Analog, Ferrocene-Chloroquine*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 42 (3), 540, **1998**.
- [45]. Sadler, P. J. and Guo, Z. J., *Metal complexes in medicine: Design and mechanism of action*, Pure and Applied Chemistry, 70 (4), 863-871, **1998**.
- [46]. Mansuy, D., Battioni, P. and Battioni, J. P., *Chemical-Model Systems for Drug-Metabolizing Cytochrome-P-450-Dependent Monooxygenases*, European Journal of Biochemistry, 184 (2), 267-285, **1989**.
- [47]. Mellado, J. M. R., Angulo, M. and Gálvin, R. M., *Electrochemical oxidation of niazid and isoniazid at mercury electrodes. Influence of the adsorption of the reaction product on the polarographic and voltammetric curves*, Journal of Electroanalytical Chemistry 352 253, **1993**.
- [48]. Raper, E. S., *Copper complexes of heterocyclic thioamides and related ligands*, Coordination Chemistry Reviews, 129 91-156, **1994**.
- [49]. Mamolo, M. G., Zampieri, D., Vio, L., Fermeglia, M., Ferrone, M., Pricl, S., Scialinoc, G. and Banfic, E., *Antimycobacterial activity of new 3-substituted 5-(pyridin-4-yl)-3H-1,3,4-oxadiazol-2-one and 2-thione derivatives. Preliminary molecular modeling investigations*, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 13 3797-3809, **2005**.
- [50]. Yale, H. L., Losee, K., Martins, J., Holsing, M., Perry, F. M. and Bernstein, J., *Chemotherapy of Experimental Tuberculosis. VIII. The Synthesis of Acid Hydrazides, their Derivatives and Related Compounds*, Journal of the American Chemical Society, 1933-1942, **1953**.

-
- [51]. 4GBKS, p., Moreira, I. S., Basso, L. A. and Santos, D. S., *Aplicação de Complexos Inorgânicos de metais de Transição para Tratamento de Tuberculose*; INPI: Registro no PI0300770-7;
- [52]. Sales, F. A. M., *Investigação de Compostos Inorgânicos Inibidores da trans-2-Enoil Redutase*, Universidade Federal do Ceará: Fortaleza, 95, **2005**.
- [53]. Moreira, I. S. and Franco, D. W., *Ruthenium(II) and Iron(II) Complexes of 4,4-Dithiodipyridine. Synthesis, Characterization, and Reactivity Studies*, Inorganic Chemistry, 33 1607-1613, **1994**.
- [54]. Ogawa, M. Y., Moreira, I. d. S., Wishart, J. F. and Isied, S. S., *Long range electron transfer in helical polyproline II oligopeptides*, Chemical Physics, 15 (2-3), 589-600, **1993**.
- [55]. Moreira, I. S. and Franco, D. W., *Binuclear Complexes Of Ruthenium Ammines With 4,4'-Dithiodipyridine Bridging Ligand*, Journal of the Chemical Society-Chemical Communications, 5 450-453, **1992**.
- [56]. Moreira, I. S. and Franco, D. W., *Advances Series 253, Electron Transfer*; 255-266, **1997**.
- [57]. Sousa, E. H. S., Pontes, D. L., Diógenes, I. C. N., Oliveira, J., Basso, L. A., Lopes, L. G. F., Santos, D. S. and Moreira, I. S., *Electron Transfer Kinetics and Mechanistic Study of the Thionicotinamide Coordinated to the Pentacyanoferrate(II) / (III) Complexes: a Model System for the in vitro Activation of thioamides anti-tuberculosis drugs*, Journal of Inorganic Biochemistry, 99 (2), 368-375, **2005**.
- [58]. Moreira, I. S., Sousa, E. H. S. D., Santos, D. S., Oliveira, J., Dietze, R. and Palaci, M., *An Inorganic Complex that Inhibits Wild-Type and na Isoniazide-Resistant Mutant 2-trans-enoil-ACP (CoA) Reductase from Mycobacterium Tuberculosis*, Chemical Communications, 312-313, **2004**.
- [59]. Oliveira, J., Sousa, E. H. S. D., Souza, O. N., Moreira, I. S., Santos, D. S. and Basso, L. A., *Slow-onset inhibition of 2-trans-enoyl-ACP (CoA) reductase from Mycobacterium tuberculosis by an inorganic complex.*, Current pharmaceutical design, 12 2409-2424, **2006**.
- [60]. Oliveira, J., Moreira, I. S., Santos, D. S. and Basso, L. A., *Enoyl reductases as targets for the development of anti-tubercular and anti-malarial agents*, Current Drug Targets, 8 399-411, **2007**.
- [61]. Basso, L. A., Meyer, E., Moreira, I. S., Sales, F. A. M. and Santos, D. S., *The Mode of Inhibition of Mycobacterium tuberculosis Wild-Type and Isoniazid-Resistant 2-Trans-Enoyl-ACP(CoA) Reductase Enzymes by An Inorganic Complex.*, Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry, 7 50-62, **2008**.
- [62]. Toma, H. E. and Malin, J. M., *Properties and reactivity of some pentacyanoferrate(II) complexes of aromatic nitrogen heterocycles*, Inorganic Chemistry, 12 1039 - 1045, **1973**.
- [63]. Lavalley, D. K. and Fleischer, E. B., *Charge Delocalization in Pentaammineruthenium(II) Complexes. I. Spectral Properties, Basicities, and Charge Densities by Nuclear Resonance Spectroscopy*, Journal of the American Chemical Society, 94 (8), 2583-2599, **1972**.
- [64]. Ford, P. C., Rudd, D. P., Gaunder, R. and Taube, H., *Synthesis and properties of pentaamminepyridineruthenium(II) and related pentaammineruthenium complexes of aromatic nitrogen heterocycles*, Journal of the American Chemical Society, 90 1187 - 1194, **1968**.
- [65]. Chan, P. K. and Poon, C. K., *Structural And Mechanistic Studies Of Coordination-Compounds . Part 12. Syntheses And Characterization Of Some Dianiono(1,4,8,11-Tetra-Azacyclotetradecane)-Manganese(III), (1,4,8,11-Tetra-Azacyclotetradecane)-Iron(III) And*

-
- (1,4,8,11-Tetra-Azacyclotetradecane)-Nickel(III) Salts, *Journal of the Chemical Society-Dalton Transactions*, 10 858-862, **1976**.
- [66]. Leal, J. M., Garcia, B. and Domingo, P. L., *Outer-sphere hexacyanoferrate(III) oxidation of organic substrates*, *Coordination Chemistry Reviews*, 173 79-131, **1998**.
- [67]. Claussen, C. A. and Long, E. C., *Nucleic acid recognition by metal complexes of bleomycin*, *Chemical Reviews*, 99 (9), 2797-2816, **1999**.
- [68]. Bertini, I., Gray, H. B., Lippard, S. J. and Valentine, J. S., *Bioinorganic Chemistry*, University Science Books: **1994**.
- [69]. Raj, B. N. B. and Kurup, M. R. P., *N-2-Hydroxy-4-methoxyacetophenone-N'-4-nitrobenzoyl hydrazine: Synthesis and structural characterization*, *Spectrochimica Acta Part A*, 66 898-903, **2007**.
- [70]. Bediaa, K.-K., Elçina, O., Sedaa, U., Fatmab, K., Nathaly, S., Sevima, R. and Dimogloc, A., *Synthesis and characterization of novel hydrazide-hydrazones and the study of their structure-antituberculosis activity*, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 41 1253-1261, **2006**.
- [71]. Yamada, N., Kataoka, Y., Nagami, T., Hong, S., Kawait, S. and Kuwano, E., *5-Aryl-1,3,4-oxadiazole-2-thiols as a New Series of trans-Cinnamate 4-Hydroxylase Inhibitors*, *Journal of Pesticide Science*, 29 (3), 205-208,
- [72]. Sahin, G., Palaska, E., Ekizoglu, M. and Ozalp, M., *Synthesis and antimicrobial activity of some 1,3,4-oxadiazole derivatives*, *Il Farmaco*, 57 539-542, **2002**.
- [73]. Mautner, F. A., Gspan, C., Gatterer, K., Goher, M. A. S., Abu-Youssef, M. A. M., Bucher, E. and Sitte, W., *Synthesis and characterization of three 5-(4-pyridyl)tetrazolato complexes obtained by reaction of 4-cyanopyridine with metal azides from aqueous solutions*, *Polyhedron*, 23 1217-1224, **2004**.
- [74]. Detert, H. and Schollmeier, D., *(E)-1,2-Bis(5-aryl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)ethenes*, *Synthesis*, 6 999-1004, **1999**.
- [75]. Bauer, G., *Handbook of Preparative Inorganic Chemistry*, **1965**.
- [76]. Silverstein, R. M., Basler, G. C. and Morrill, T. C., *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*, Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, **1994**.
- [77]. Toma, H. E., *CIANOFERRATOS : Correlações de Estrutura, Reatividade e Intervalência*, in *Instituto de Química*, Instituto de Química de São Paulo, Universidade de São Paulo: São Paulo, 207, **1979**.
- [78]. Moreira, I. S., *Complexos Mononucleares e Binucleares de Rutênio e Ferro com a 4,4'-Ditiopiridina: Sínteses, Caracterizações e Estudo de Transferência de Elétrons*, Instituto de Física e Química de São Carlos, Universidade de São Paulo: São Carlos-SP, 304, **1990**.
- [79]. Macartney, D. H., *Properties and Reactions of Substituted Pentacyanoferrate(II) Complexes*, *Review Inorganic Chemistry*, 9 (2-3), 101-151, **1988**.
- [80]. McCaffery, A. J., Dickinson, J. R. and Shatz, P. N., *Intensity as a Criterion in Assigning Electronic Transitions in Metal Complexes*, *Inorganic Chemistry*, 9 (6), 1563-1565, **1970**.
- [81]. Sandstrom, J., *The Electronic Spectra of Thioamide and Thiohydrazides, part I - LCAO-MO Treatment and Band Classification for Thiobenzamides*, *Acta Chem. scand*, 16 1616-1626, **1962**.
- [82]. McWeeny, R., *Coulson's Valence*, Oxford: Oxford Science Publications: **1979**.
- [83]. Lever, A. B. P., *Inorganic Electronic Spectroscopy*, Elsevier: Amsterdam, **1985**.
- [84]. Shepherd, R. E. and Johnson, C. R., *Metal-to-Ligand Charge-Transfer Spectra of Pentacyanoferrate(II) Complexes of Aromatic Nitrogen Heterocycles*, *Inorganic Chemistry*, 22 2439-2444, **1983**.

-
- [85]. Toma, H. E., *Influências das interações de transferência de elétrons no comportamento dos complexos de pentaaminrutênio(II) e de pentacianoferrato(II) com ligantes insaturados*, Instituto de Química de São Paulo, Universidade de São Paulo: São Paulo, 287, **1974**.
- [86]. Colthup, N. B., Daly, L. H. and Wiberley, S. E., *Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy*, Academic Press: New York, 523, **1975**.
- [87]. Sousa, E. H. S. d., *Estudos de reatividade dos ligantes tionicotinamida e isoniazida com cianoferratos*, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará: Fortaleza-CE, 226, **2000**.
- [88]. Nakamoto, K., *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*, John Wiley & Sons, Inc.: New York, **1997**.
- [89]. Shu, C. F. and Wrighon, M. S., *Infrared/Visible/Ultraviolet Spectroscopic Detection of On-Electron- and two-Electron- Reduction products of facClRe(CO)₃(4bzpy)₂ (4bzpy = 4-benzoylpyridine)*, Inorganic Chemistry, 27 4326-4329, **1988**.
- [90]. Bellamy, L. J., *Advances in Infrared Group Frequencies*, **1968**.
- [91]. Rao, C. N. R., *Chemical Applications of IR Spectroscopy*, Academic Press: **1963**.
- [92]. Katritzky, A. R. and Ambler, A. P., *Physical Methods in Heterocyclic Chemistry*, Academic Press: **1963**.
- [93]. Ramazan Gup, B. K., *Synthesis and spectroscopic studies of copper(II) and nickel(II) complexes containing hydrazonic ligands and heterocyclic coligand*, Spectrochimica Acta Part A, 62 1188-1195, **2005**.
- [94]. Silverstein, R. M. and Webster, F. X., *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*, College of Environmental Science e Forestry: New York, **2000**.
- [95]. Coates, J., *Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach*; 10815-10837, **2000**.
- [96]. Bao-Dui Wang, Z.-Y. Y., Ding-Wa Zhang, Yan Wang, *Synthesis, structure, infrared and fluorescence spectra of new rare earth complexes with 6-hydroxy chromone-3-carbaldehyde benzoyl hydrazone*, Spectrochimica Acta Part A, 63 213-219, **2006**.
- [97]. Bentley, F. F., Smithson, L. D. and Rozek, A. R., *Infrared Spectra and Characteristic Frequencies ~700-300cm⁻¹*, John Wiley & Sons, Inc: **1967**.
- [98]. El-Sayed, M. F. A. and Sheline, R. K., *The position of the CN stretching frequency in organic and inorganic molecules*, Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry, 6 187, **1958**.
- [99]. Taube, H., *From Electron Transfer Reactions to the Effect of Backbonding, in Electron Transfer Reactions: Inorganic, Organometallic, and Biological Applications*, American Chemical Society, 1-17, **1997**.
- [100]. Chryssou, K., Stergiopoulos, T. and Falaras, P., *Synthesis and spectroscopic properties of a new bipyridine-bipyrazoyl(pyridine)-thiocyanato-ruthenium(II) complex*, Polyhedron, 21 27-28, **2002**.
- [101]. Nikolaou, S., Uemi, M. and Toma, H. E., *Total assignment of H-1 and C-13 NMR spectra of a bridged triruthenium cluster-polypyridine dimer based on 2D (COSY, HMQC, and HMBC) techniques*, Spectroscopy Letters, 34 (3), 267-277, **2001**.
- [102]. Figard, J. E., Pauskstelis, J. V., Byrne, E. F. and Petersen, J. D., *Carbon-13 Chemical Shifts as a Measure of pi-Back-Bonding in Pentacyanoferrate(II) and -Cobaltate(III) Complexes of Substituted Pyridines*, Journal of the American Chemical Society, 96 (26), 8417-8425, **1977**.

-
- [103]. Malin, J. M., Schmidt, C. F. and Toma, H. E., *Carbon-13 and Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectra of Some Pentacyanoferrate(II) Complexes*, Inorganic Chemistry, 14 (12), 2924-2928., **1975**.
- [104]. Lavalley, D. K., Baughman, M. D. and Phillips, M. P., *Comparisons of Proton and Carbon NMR chemical Shifts for Low Spin d6 Complexes of Pyridine and Substituted Pyridines as Probes of pi-back-bonding*, Journal of the American Chemical Society, 99 (3), 718-724, **1977**.
- [105]. Foust, R. D. and Ford, P. C., *Nuclear magnetic resonance studies of organonitrile ligands coordinated to rhodium(III) and to ruthenium(II). Demonstration of metal pi-orbital electron density delocalization into unsaturated ligands having extended pi conjugation*, Journal of the American Chemical Society, 94 (16), 5686-5696, **1972**.
- [106]. Atkins, P. W., *Físico-Química*, LTC: Rio de Janeiro, 381, **1999**.
- [107]. B.N. Bessy Raj, M. R. P. K., *N-2-Hydroxy-4-methoxyacetophenone-N'-4-nitrobenzoyl hydrazine: Synthesis and structural characterization*, Spectrochimica Acta Part A, **2006**.
- [108]. Pretsch, E., Bühlmann, P. and Affolter, C., *Structure determination of organic compounds: tables of spectral data*, Springer: **2000**.
- [109]. Skoog, D. A., Holler, F. J. and Nieman, T. A., *Principles of Instrumental Analysis*, Brooks/Cole Thomson Learning: **1998**.
- [110]. Schleinitz, K. D. and Vonlowisofmenar, G., *Diffusion-Coefficients in Prussiates*, Zeitschrift Fur Chemie, 15 (12), **1975**.
- [111]. Jenney, E. H. and Pfeiffer, C. C., *The convulsant effect of hydrazides and the antidotal effect of anticonvulsants and metabolites*, Journal Pharmacology and Experimental Therapeutics, 122 (1), 110-123, **1958**.
- [112]. Sundaraganesana, N., Ayyappana, S., Umamaheswarib, H. and Joshuac, B. D., *FTIR, FT-Raman spectra and ab initio, DFT vibrational analysis of 2,4-dinitrophenylhydrazine*, Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 66 (1), 17-27, **2007**.
- [113]. Marti, M. A., Crespo, A., Capece, L., Boechi, L., Bikiel, D. E., Scherlis, D. A. and Estrin, D. A., *Dioxygen affinity in heme proteins investigated by computer simulation*, Journal of Inorganic Biochemistry, 100 (4), 761-770, **2006**.
- [114]. Ramalhoa, T. C., Cunhab, E. F. F. d. and Alencastrob, R. B. d., *A density functional study on the complexation of ethambutol with divalent cations*, Journal of Molecular Structure (Theochem), 676 149–153, **2004**.
- [115]. Liu, Z. D. and Hider, R. C., *Design of iron chelators with therapeutic application*, Coordination Chemistry Reviews, 232 151-171, **2002**.
- [116]. Peng, C.-C., Rushmore, T., Croucha, G. J. and Jones, J. P., *Modeling and synthesis of novel tight-binding inhibitors of cytochrome P450 2C9*, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 16 4064–4074, **2008**.
- [117]. Leach, A. R., *Molecular Modelling: Principles and Applications*, Pearson, Edinburgh: **2001**.
- [118]. Galembeck, S. E. and Caramori, G. F., *Qual o sítio de reação? Um experimento computacional* Química nova, 26 (6), **2003**.

ANEXOS



“As coisas, por si sós, não são interessantes, mas tornam-se interessante apenas se nos interessamos por elas.”

S. Ceccato, Ingegneria della Felicità.

ANEXOS

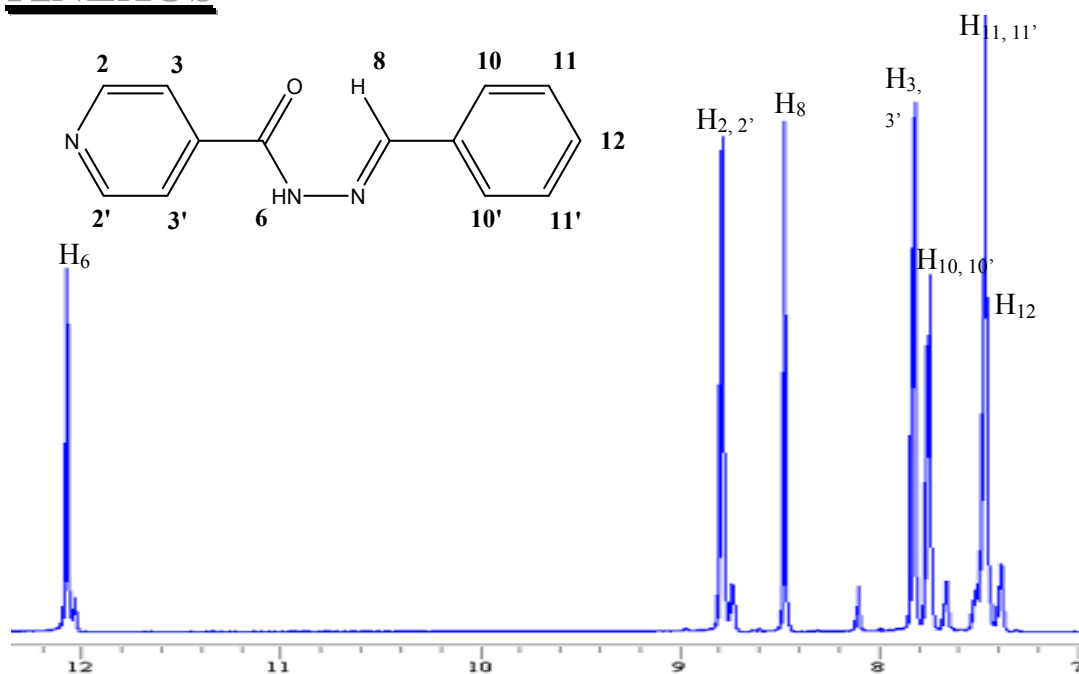


Figura 6. Espectro de RMN ^1H para o composto IA4H, em DMSO, 500MHz.

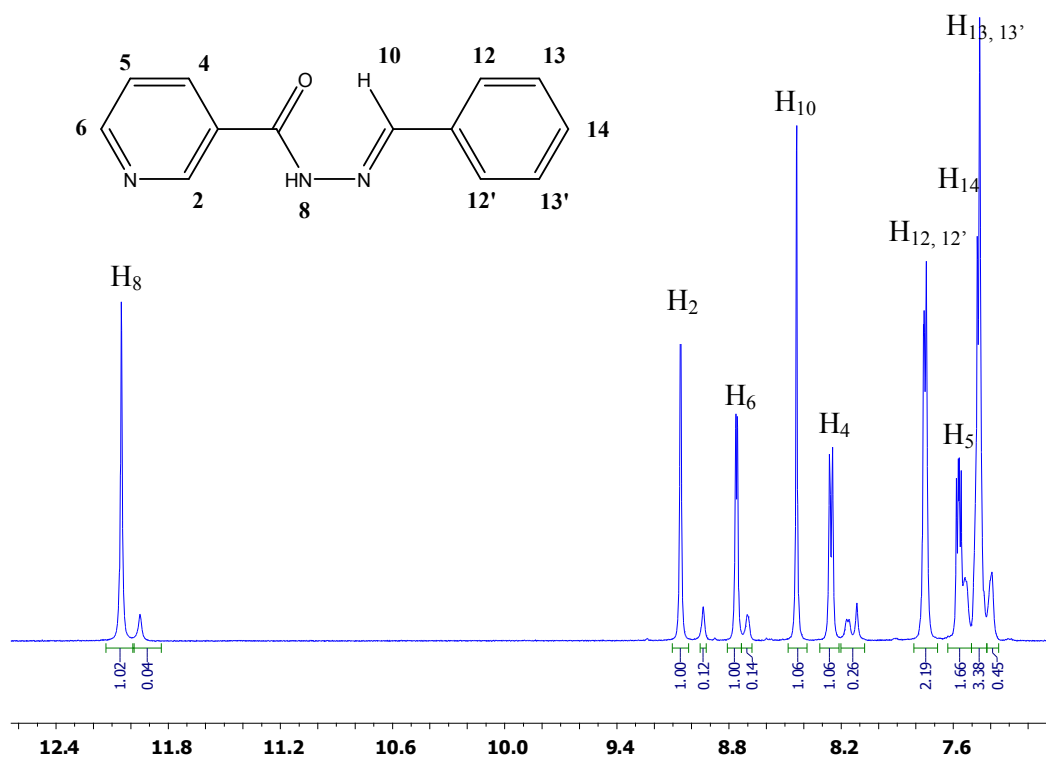


Figura 7. Espectro de RMN ^1H para o composto NA4H, em DMSO, 500MHz.

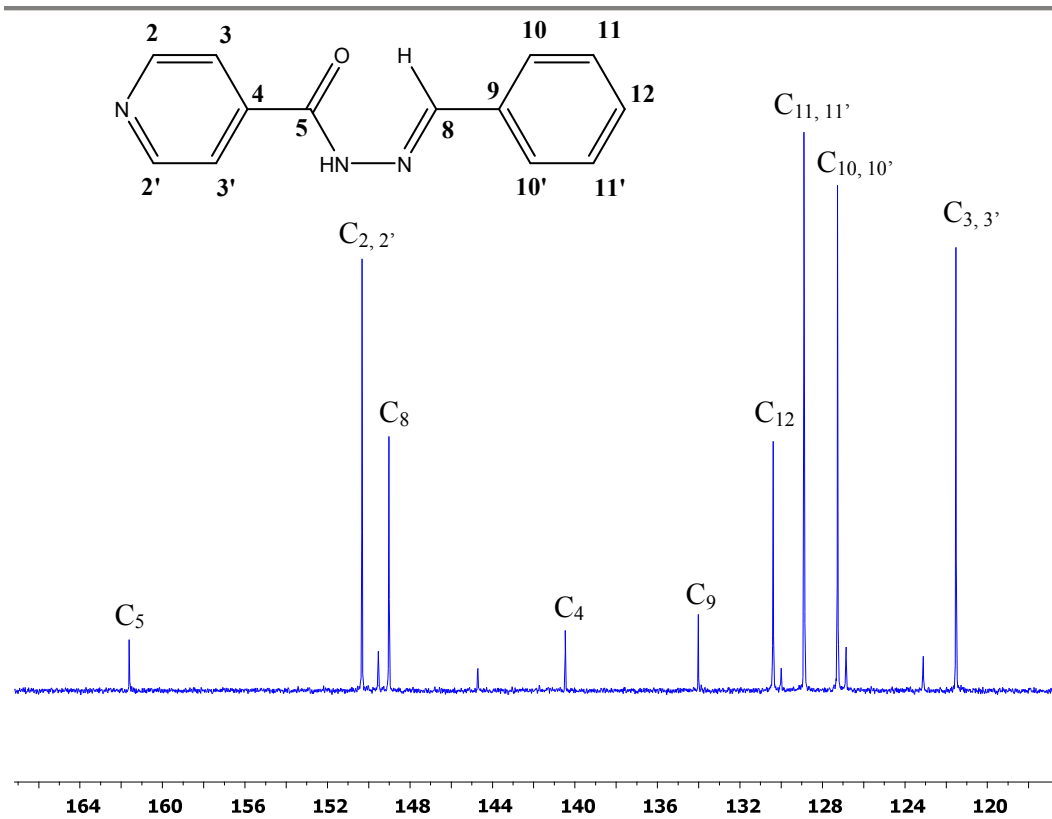


Figura 8. Espectro de RMN ¹³C para o composto IA4H, em DMSO, 500MHz.

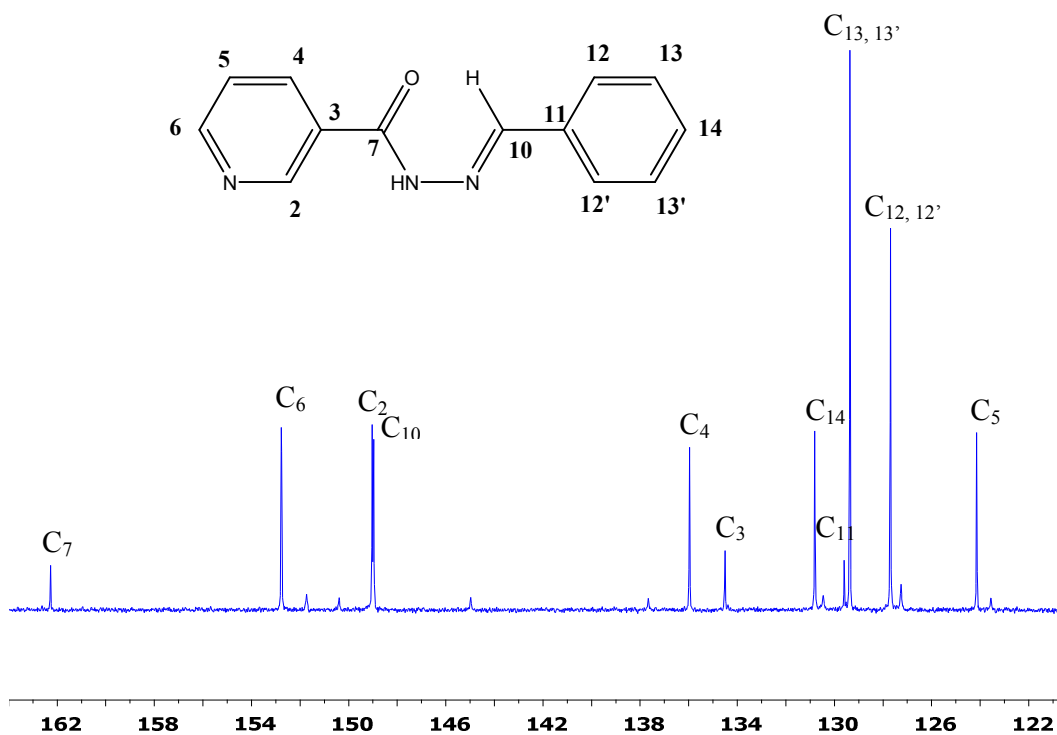


Figura 9. Espectro de RMN ¹³C para o composto NA4H, em DMSO, 500MHz.

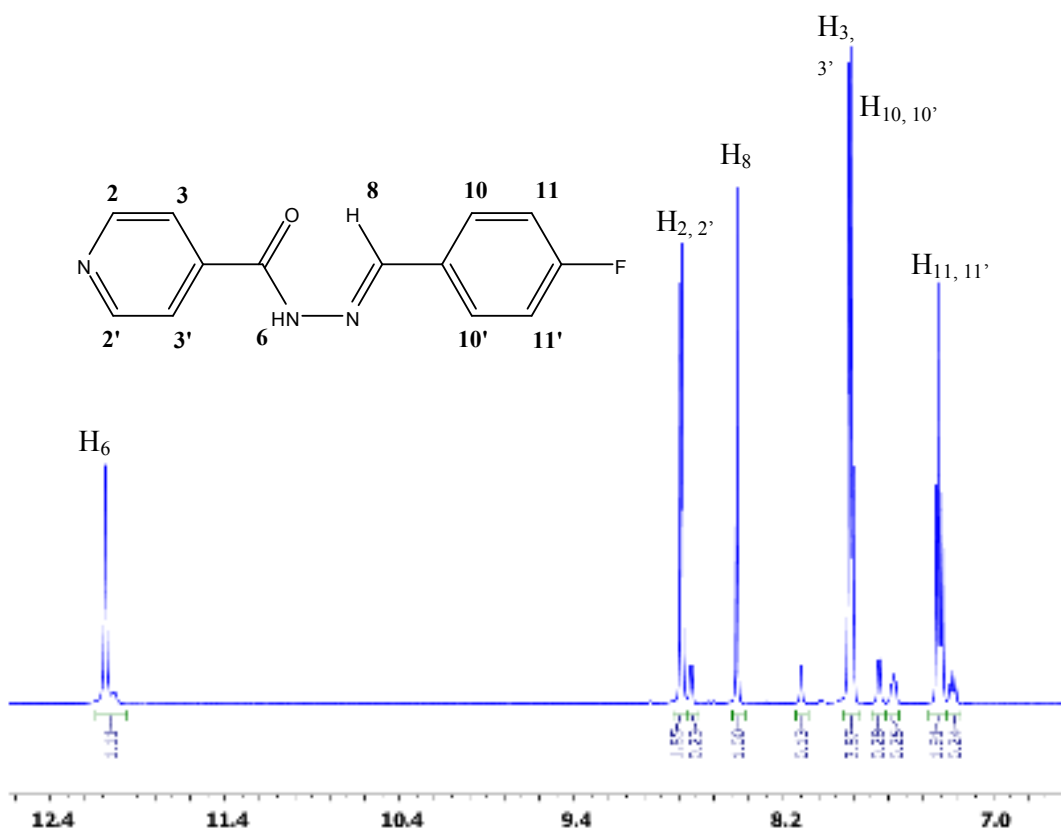


Figura 10. Espectro de RMN ^1H para o composto IA4F, em DMSO, 500MHz.

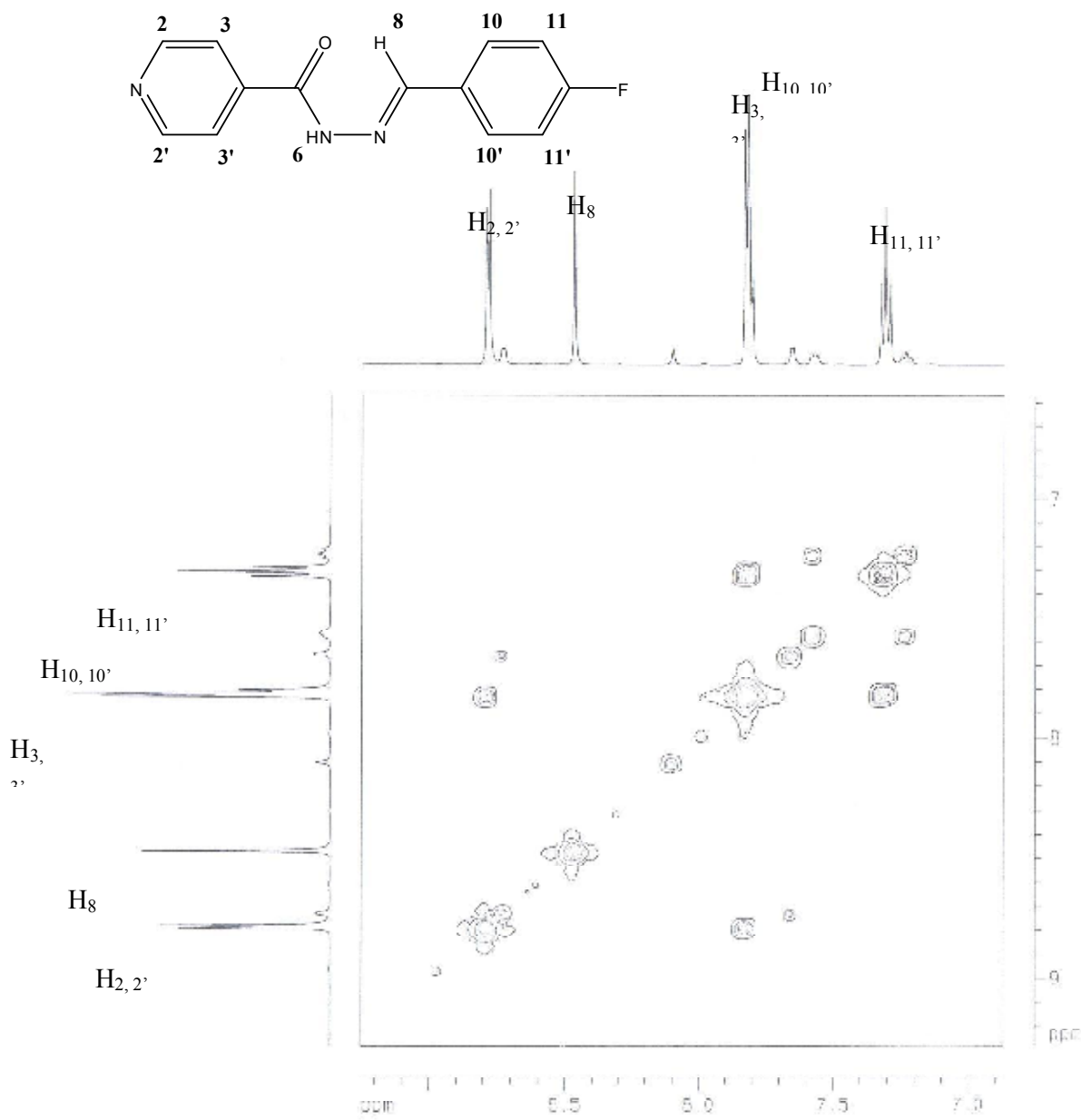


Figura 11. Diagrama de contorno de RMN bidimensional de correlação homonuclear para o composto IA4F, em DMSO, 500MHz.

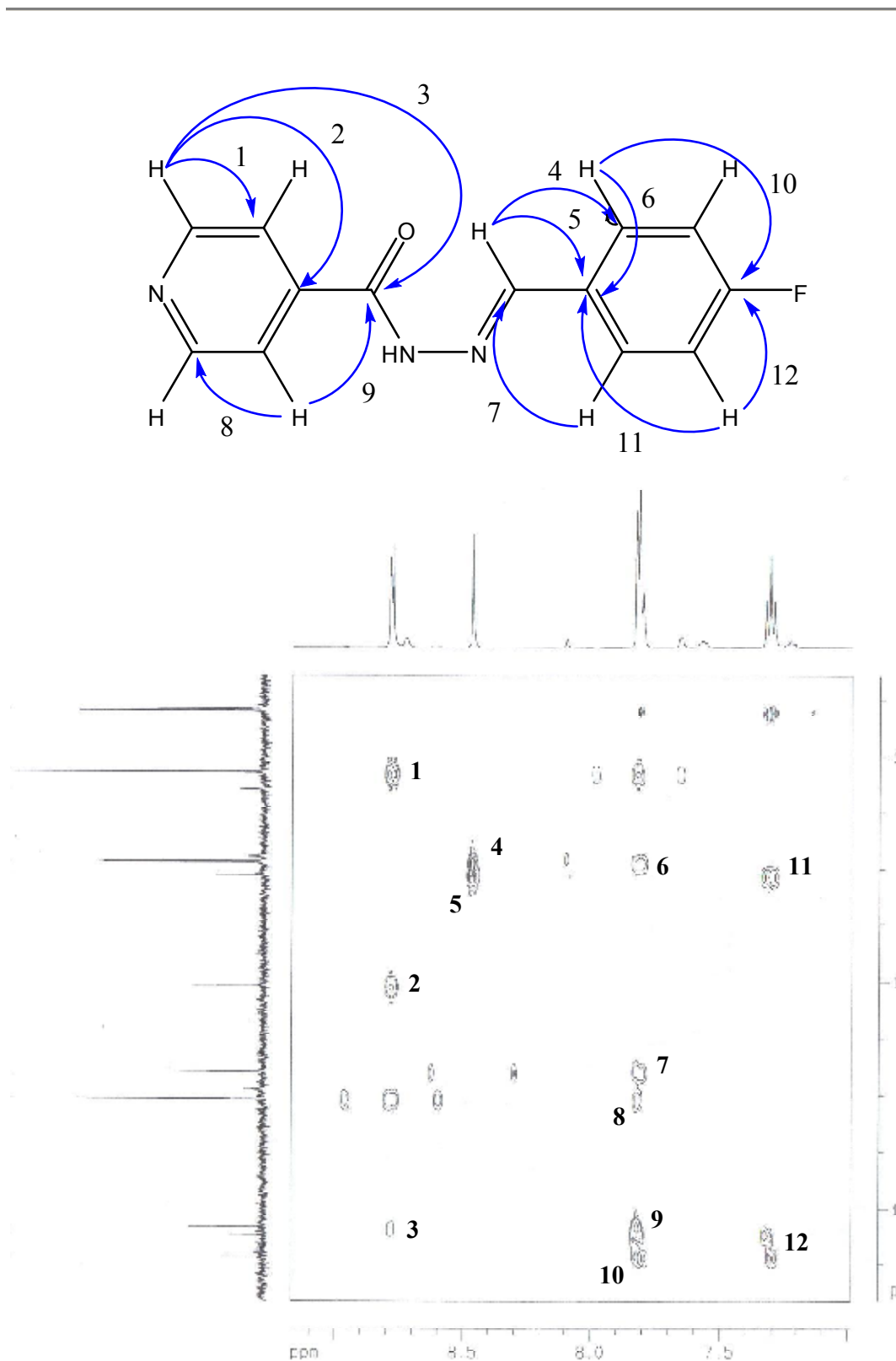


Figura 12. Diagrama de contorno de RMN bidimensional de correlação heteronuclear a longa distância para o composto IA4F, em DMSO, 500MHz.

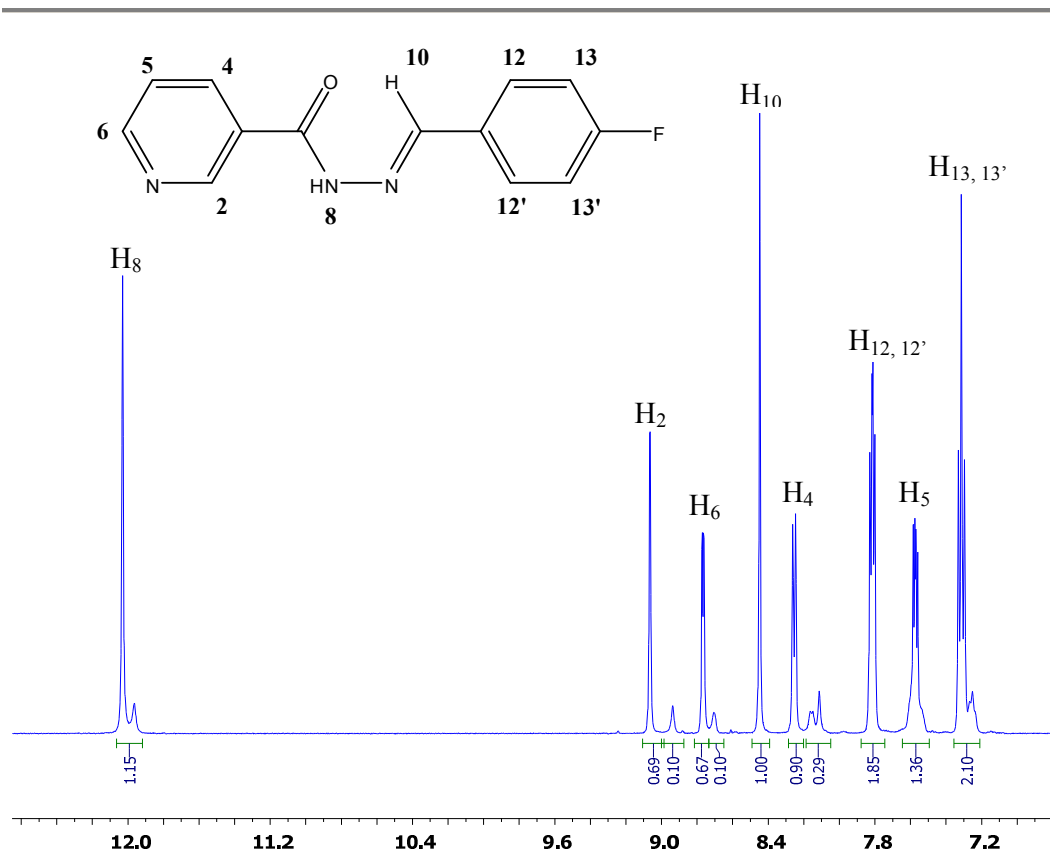


Figura 13. Espectro de RMN ^1H para o composto NA4F, em DMSO, 500MHz.

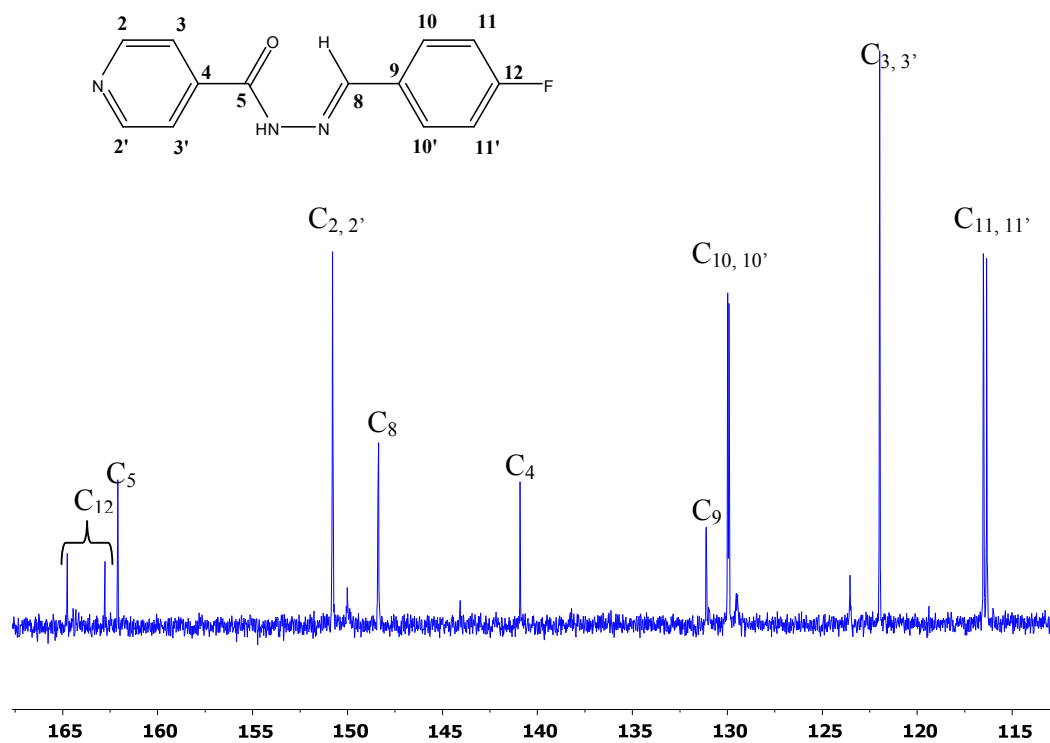


Figura 14. Espectro de RMN ^{13}C para o composto IA4F, em DMSO, 500MHz.

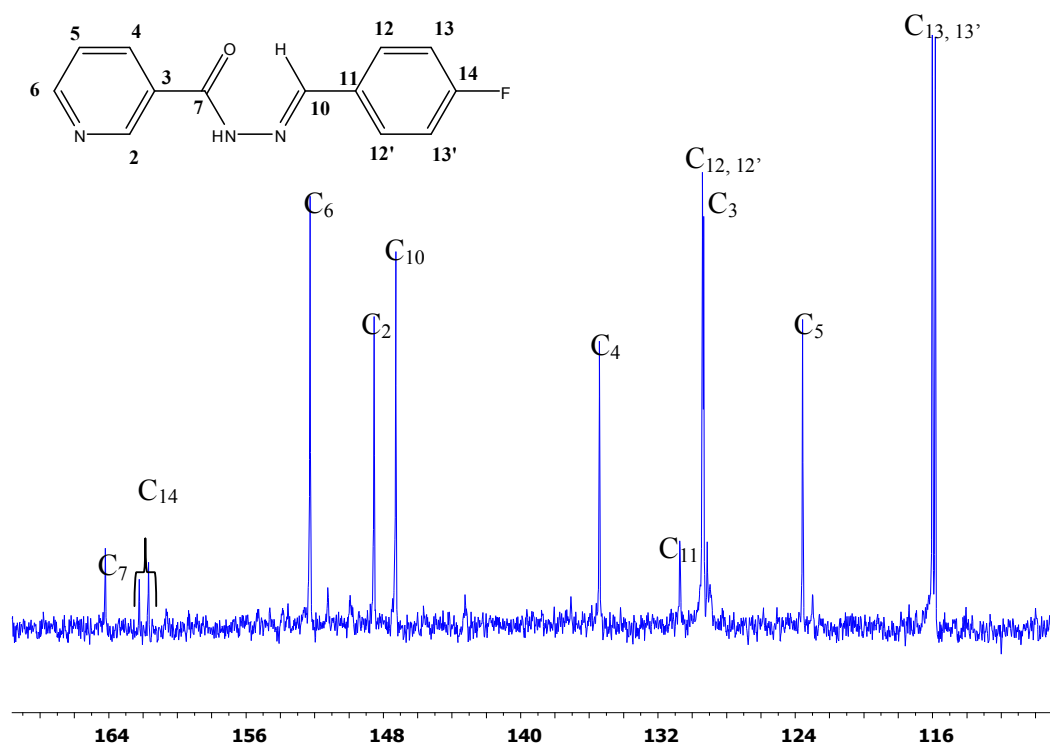


Figura 15. Espectro de RMN ^{13}C para o composto NA4F, em DMSO, 500MHz.

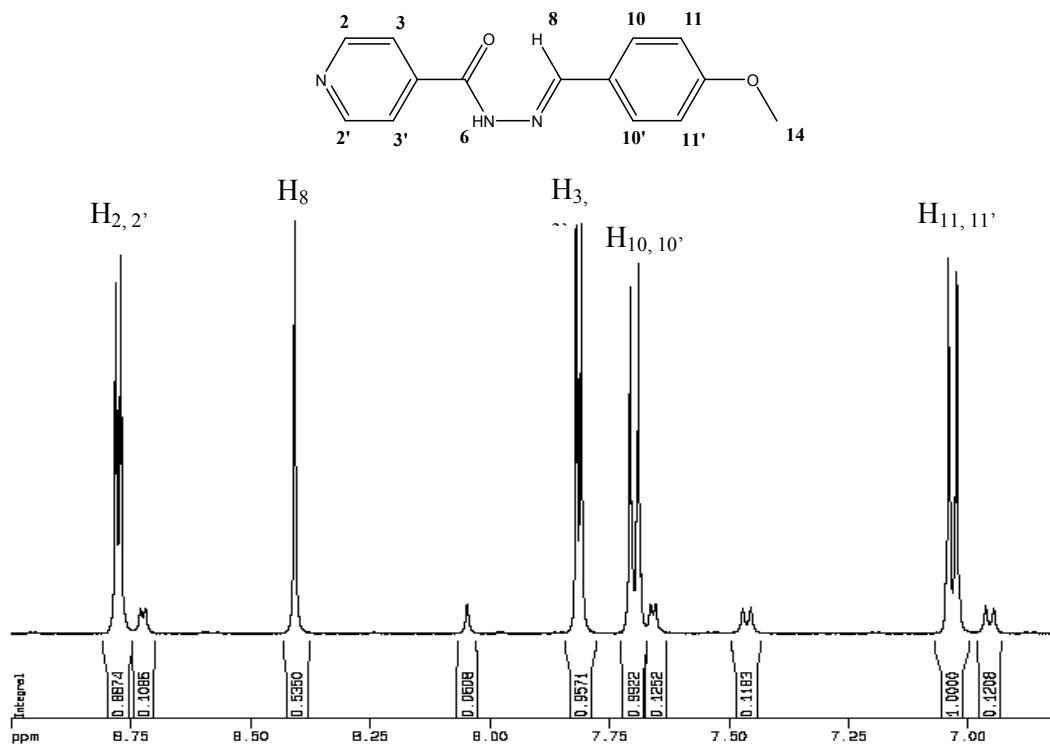


Figura 16. Espectro de RMN ^1H para o composto IA4OMet, em DMSO, 500MHz.

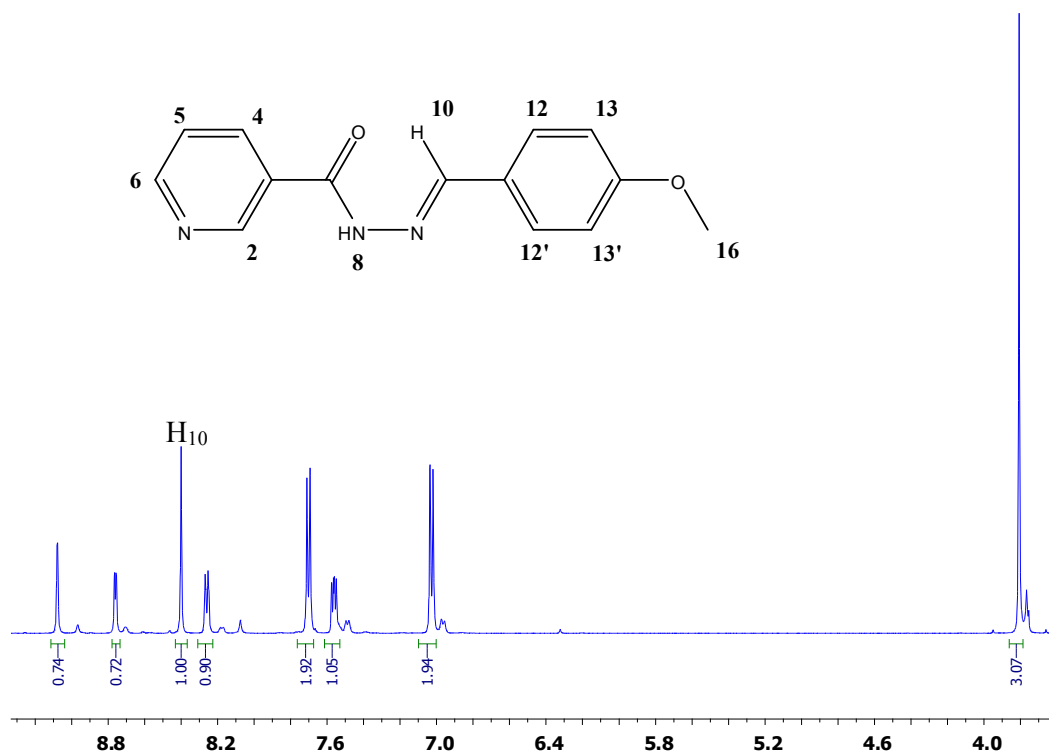


Figura 17. Espectro de RMN ^1H para o composto NA4OMet, em DMSO, 500MHz.

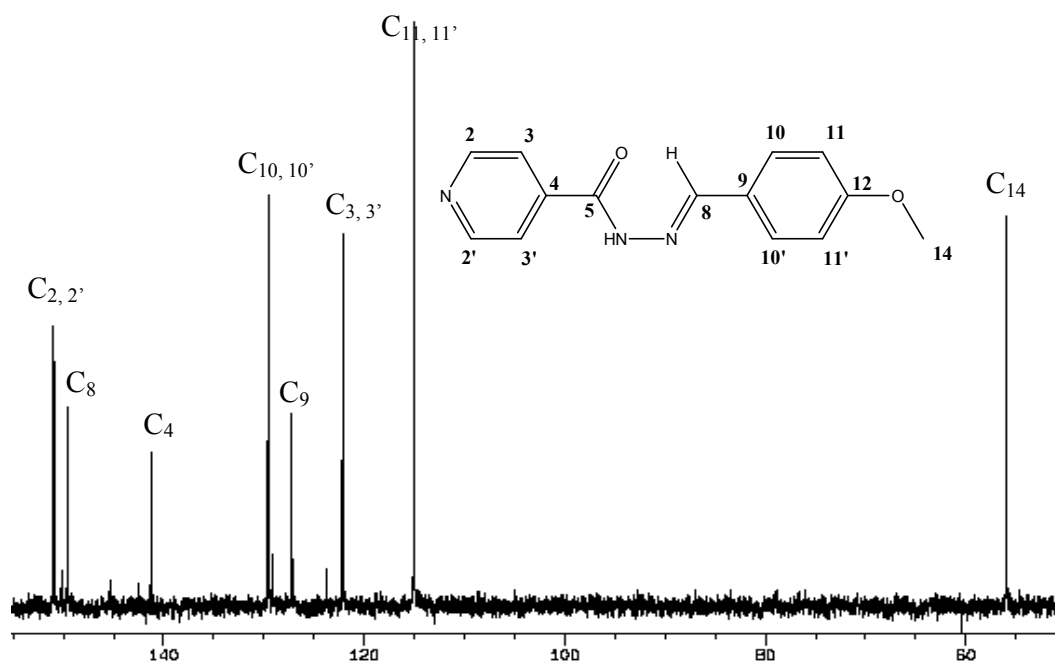


Figura 18. Espectro de RMN ^{13}C para o composto IA4OMet, em DMSO, 500MHz.

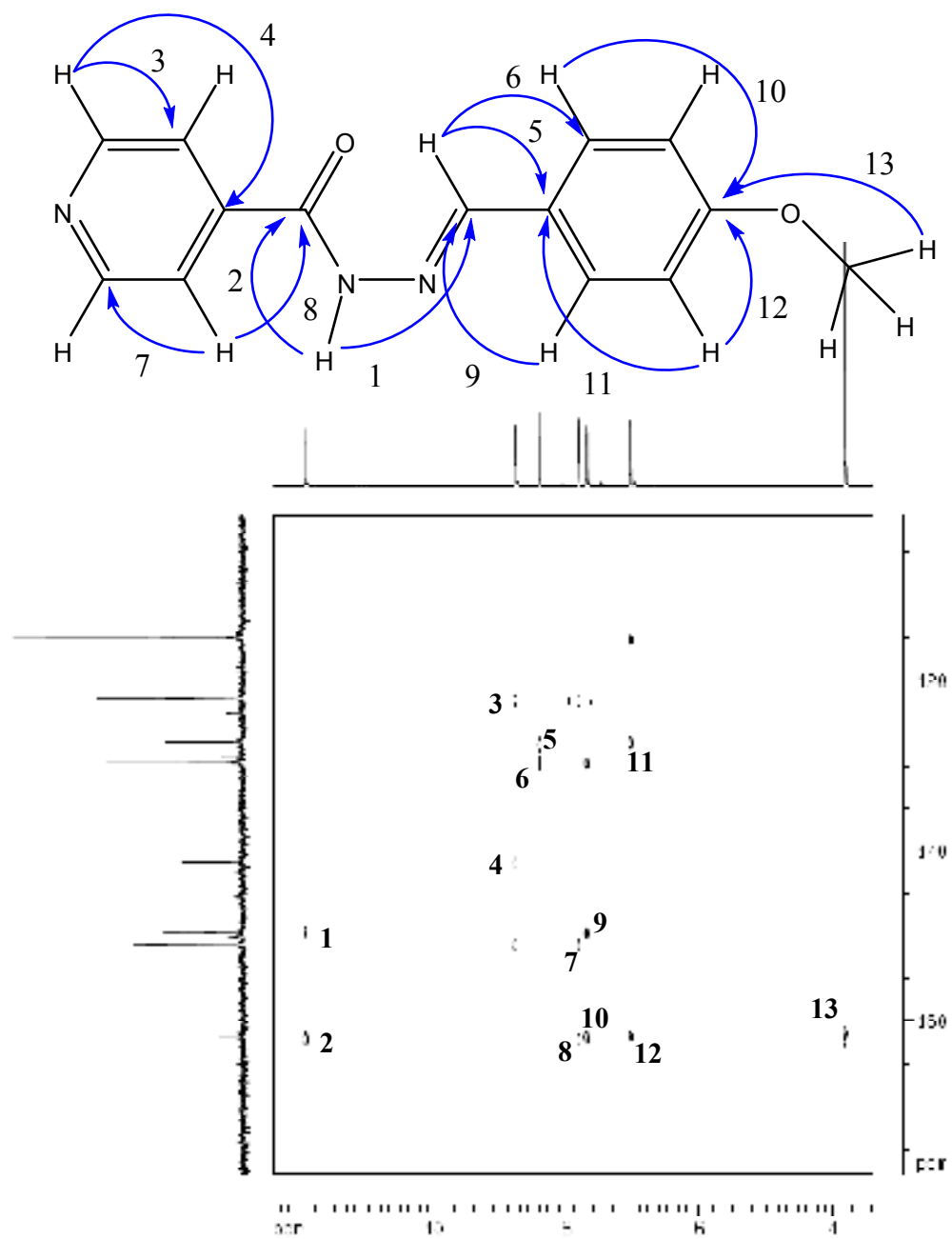


Figura 19. Diagrama de contorno de RMN bidimensional de correlação heteronuclear a longa distância para o composto IA4OMet, em DMSO, 500MHz.

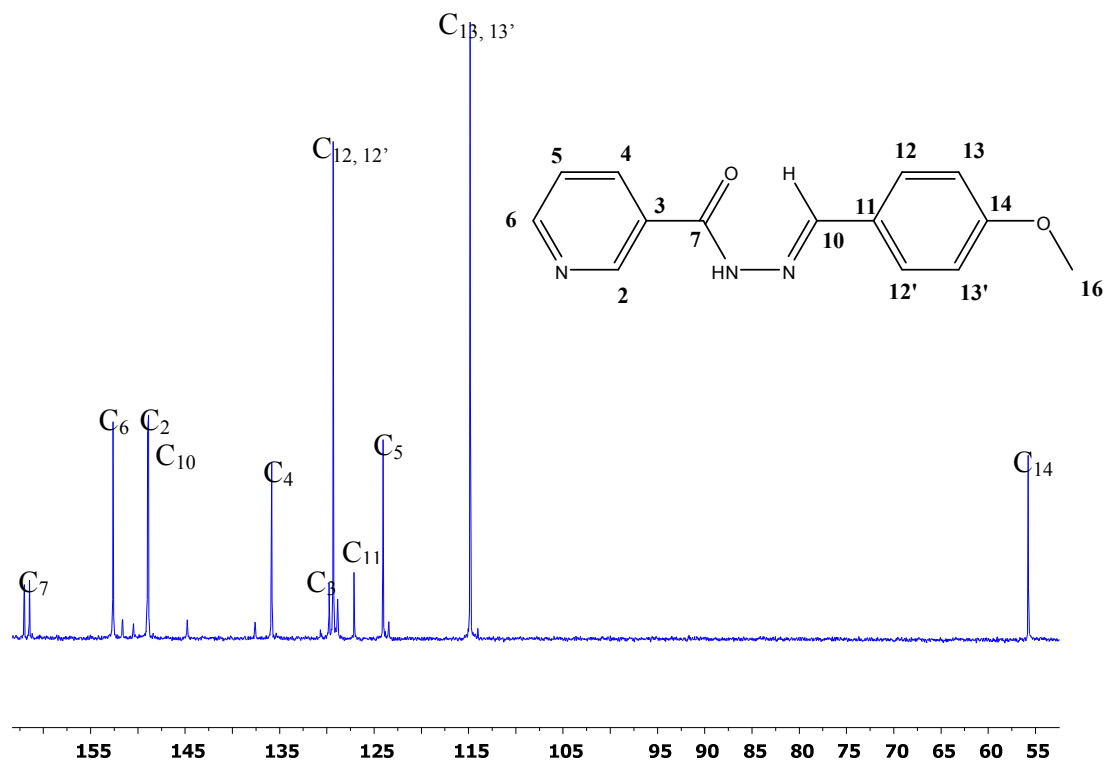


Figura 20. Espectro de RMN ^{13}C para o composto NA4OMet, em DMSO, 500MHz.

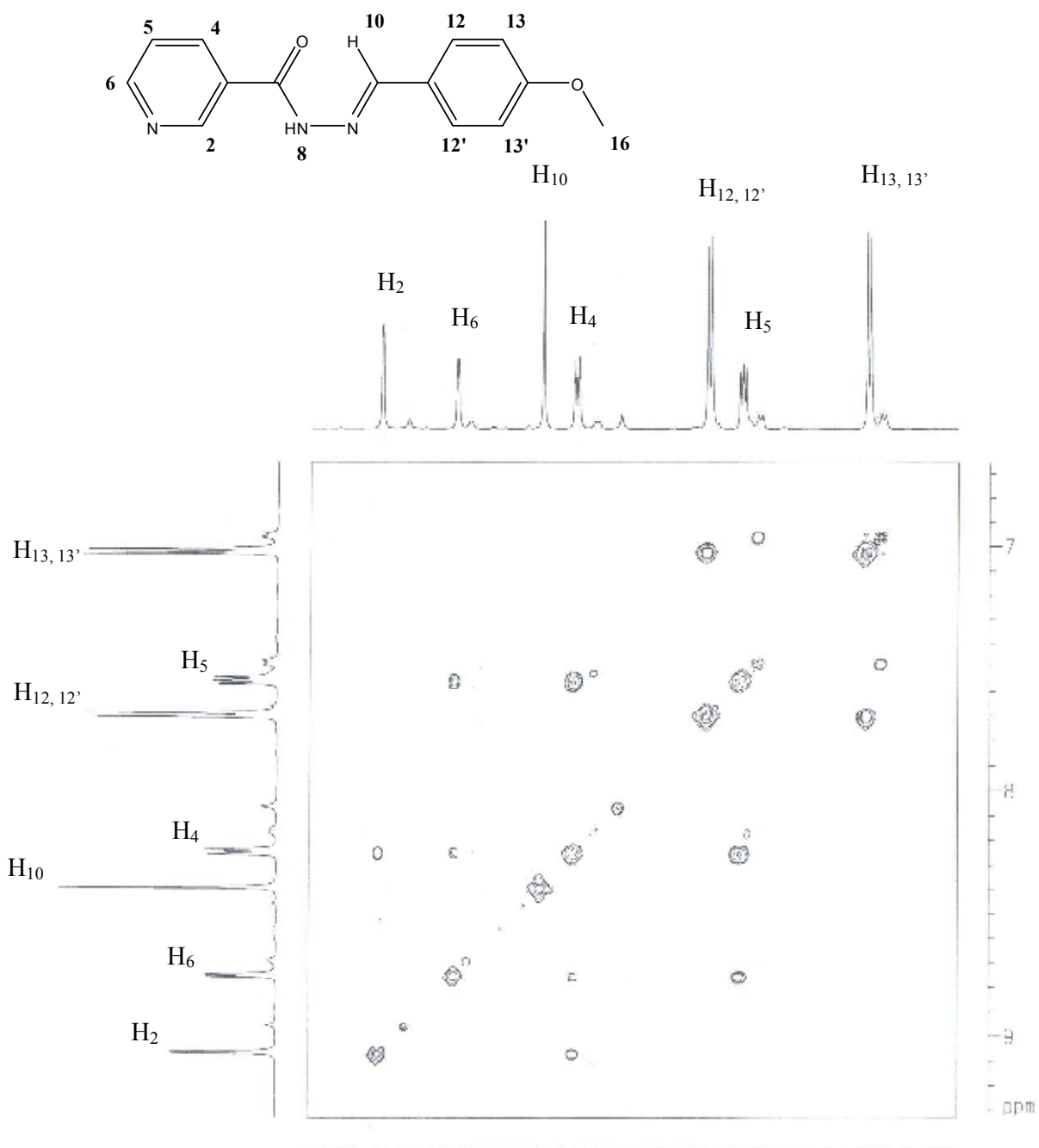


Figura 21. Diagrama de contorno de RMN bidimensional de correlação homonuclear para o composto NA4OMet, em DMSO, 500MHz.

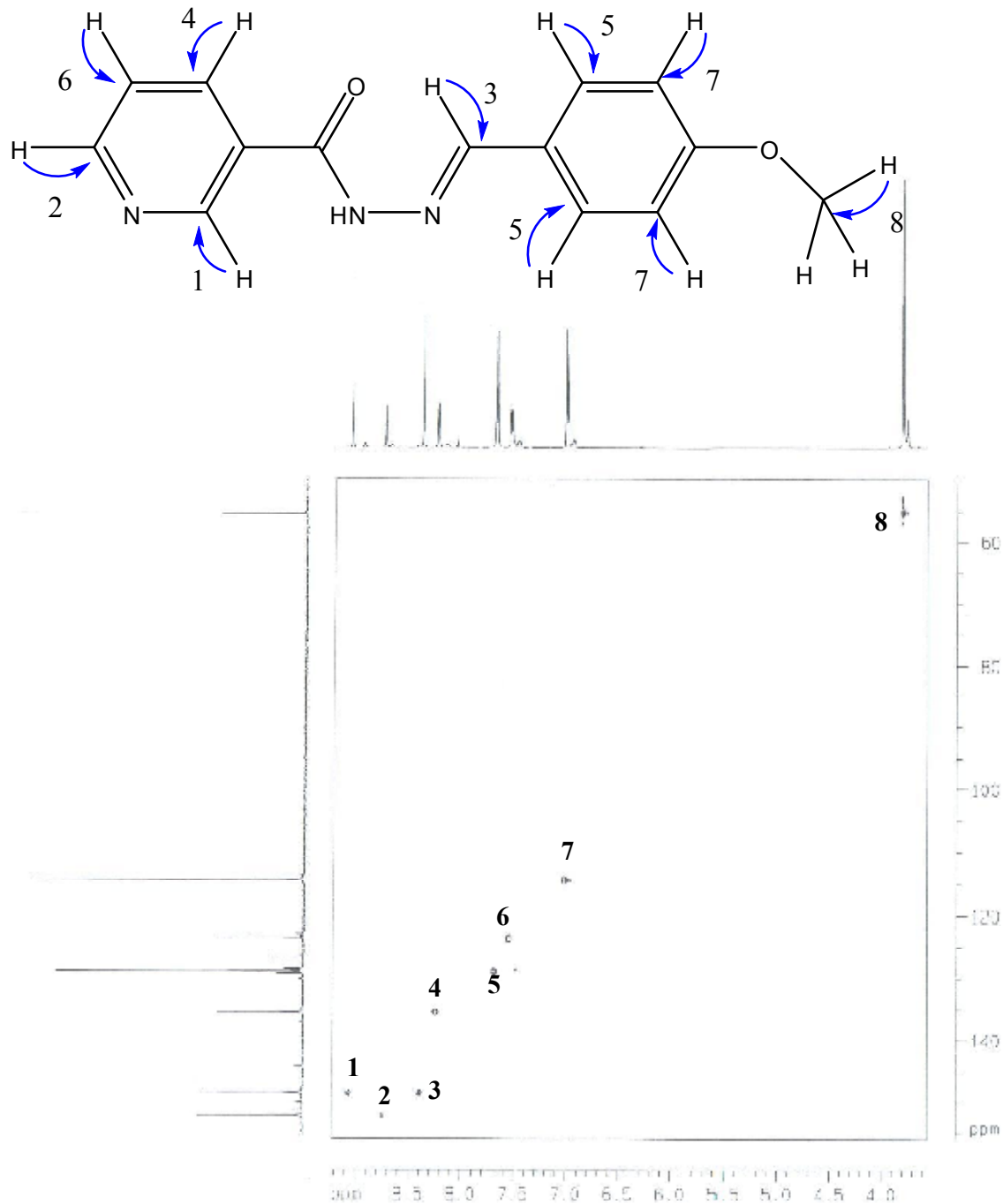


Figura 22. Diagrama de contorno de RMN bidimensional de correlação heteronuclear para o íon complexo NA4OMet, em DMSO, 500MHz.

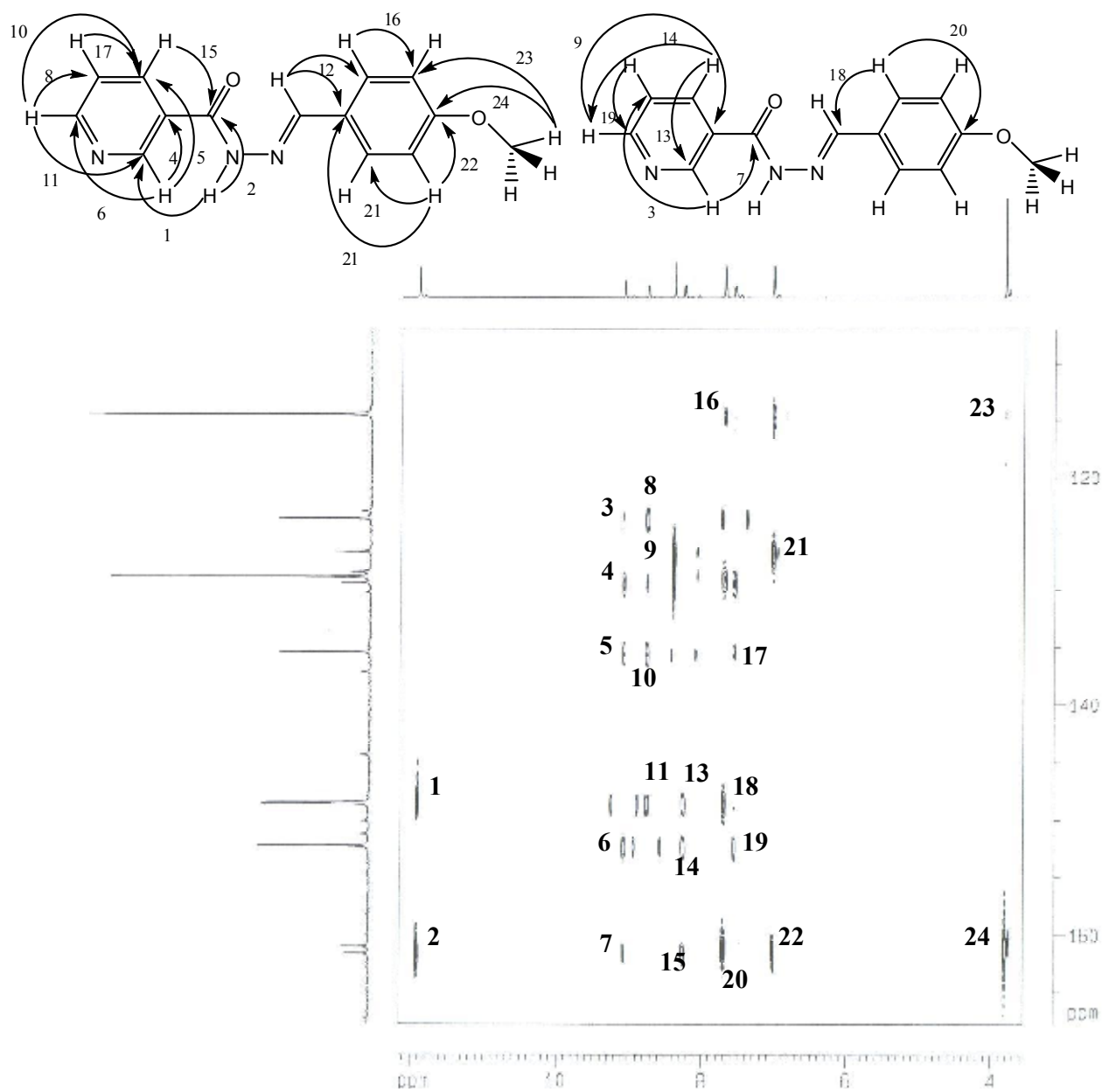


Figura 23. Diagrama de contorno de RMN bidimensional de correlação heteronuclear a longa distância para o composto NA4OMet, em DMSO, 500MHz.

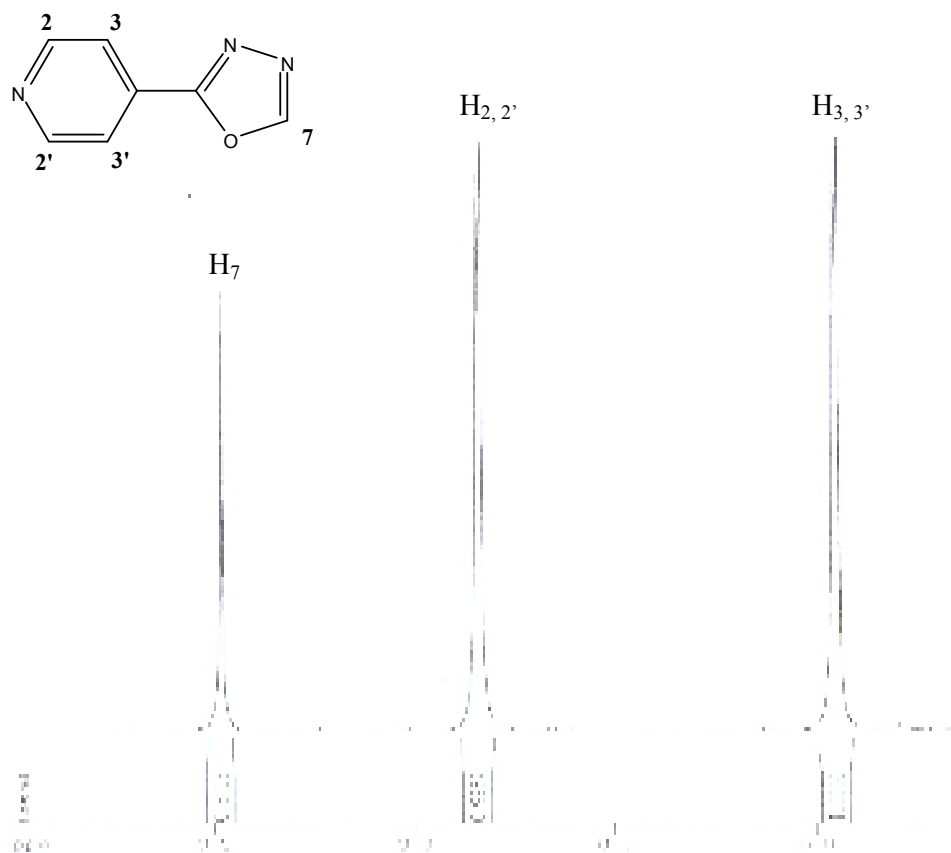


Figura 24. Espectro de RMN ^1H para o composto IO3H, em DMSO, 500MHz.

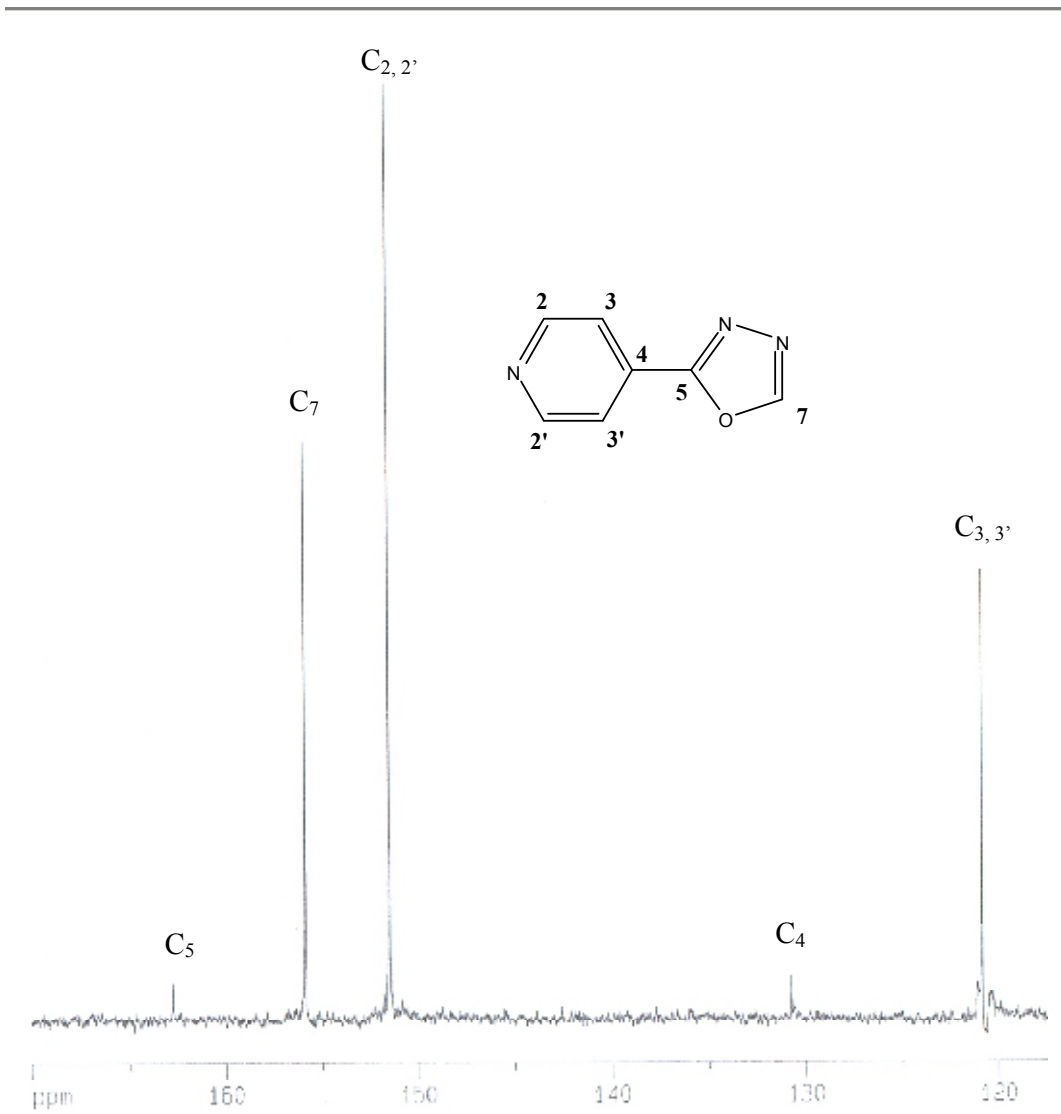


Figura 25. Espectro de RMN ^{13}C para o composto IO3H, em DMSO, 500MHz.

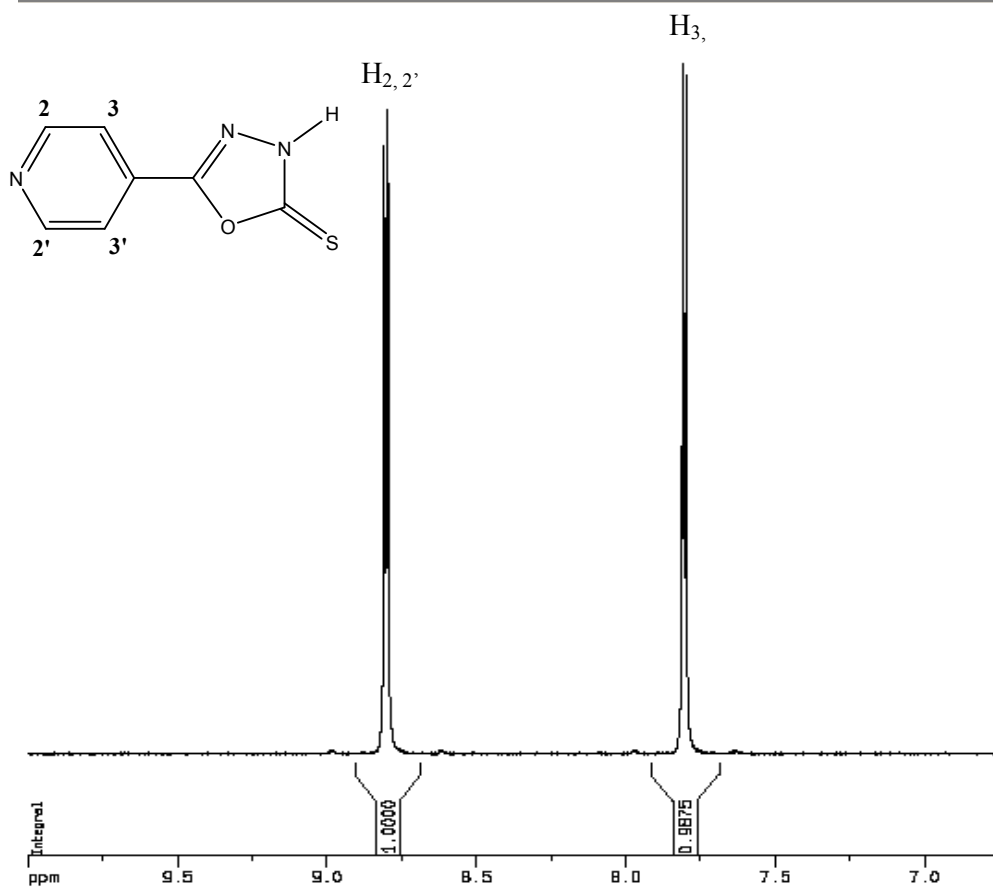


Figura 26. Espectro de RMN ^1H para o composto IO3S, em DMSO, 500MHz.

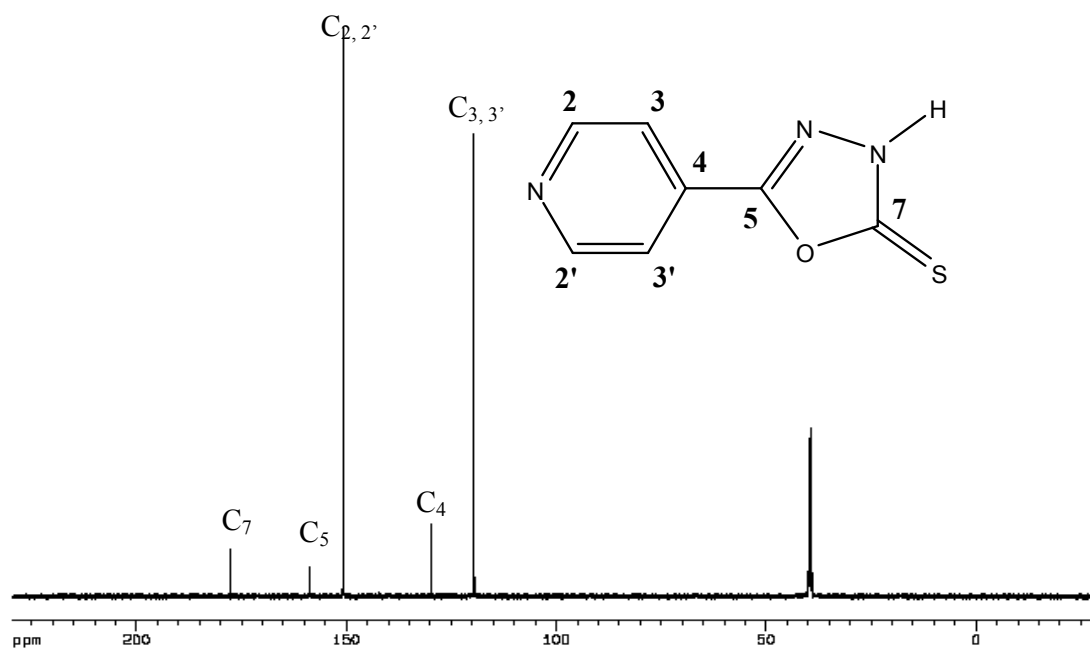


Figura 27. Espectro de RMN ^{13}C para o composto IO3S, em DMSO, 500MHz.

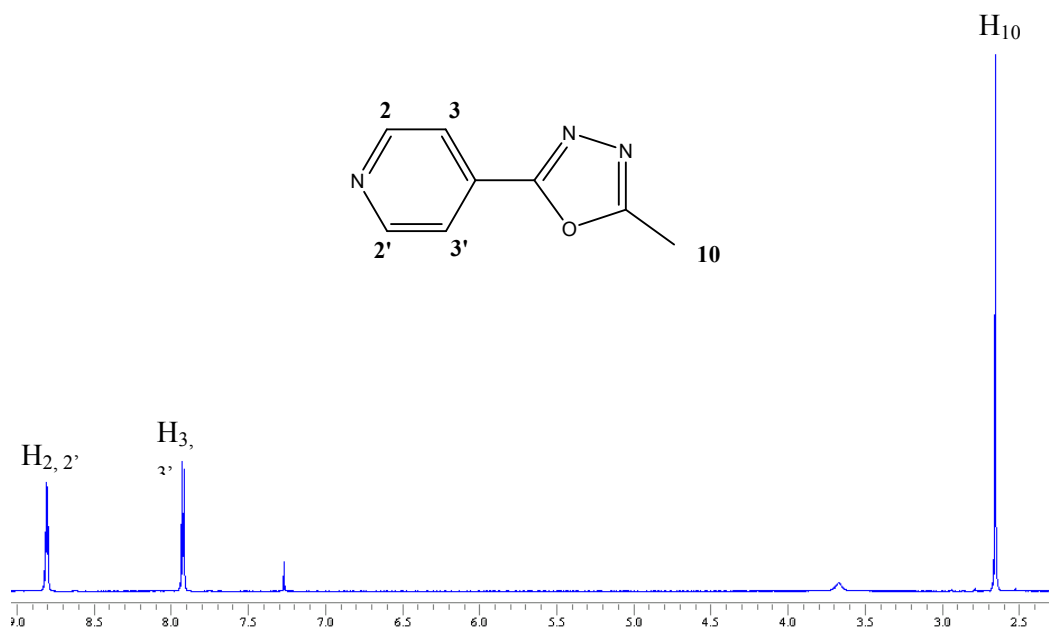


Figura 28. Espectro de RMN ^1H para o composto IO3Met, em CDCl_3 , 500MHz.

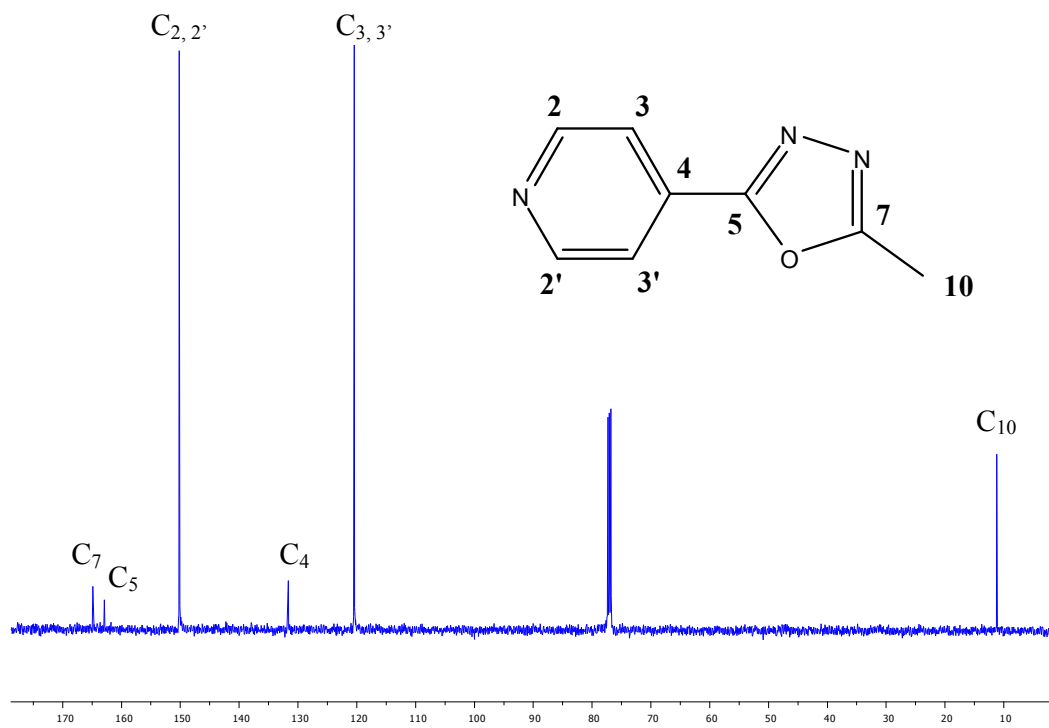


Figura 29. Espectro de RMN ^{13}C para o composto IO3Met, em CDCl_3 , 500MHz.

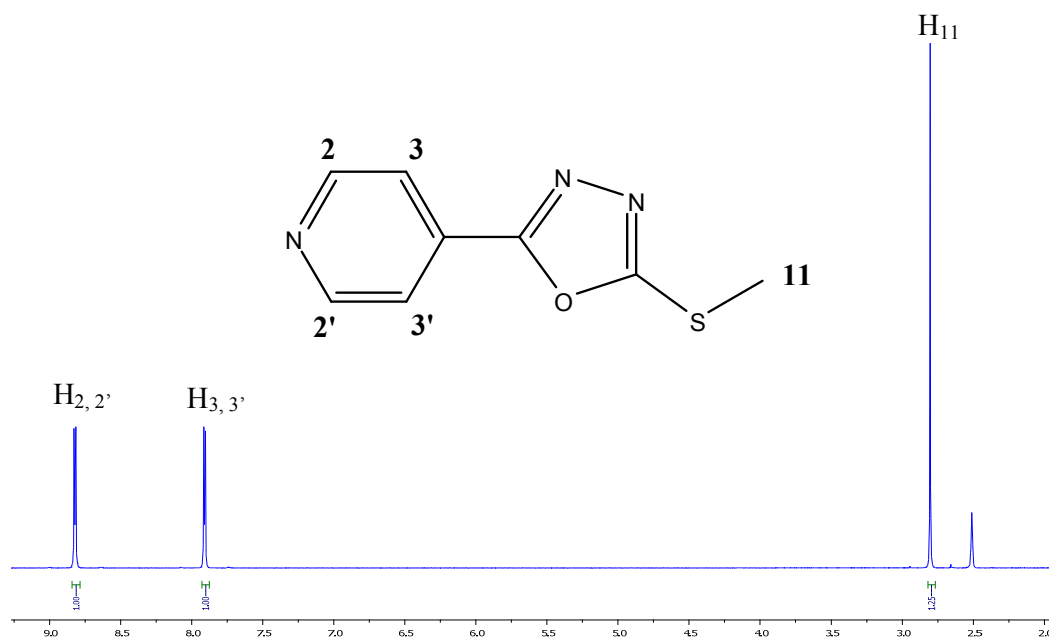


Figura 30. Espectro de RMN ^1H para o composto IO3SMet, em DMSO, 500MHz.

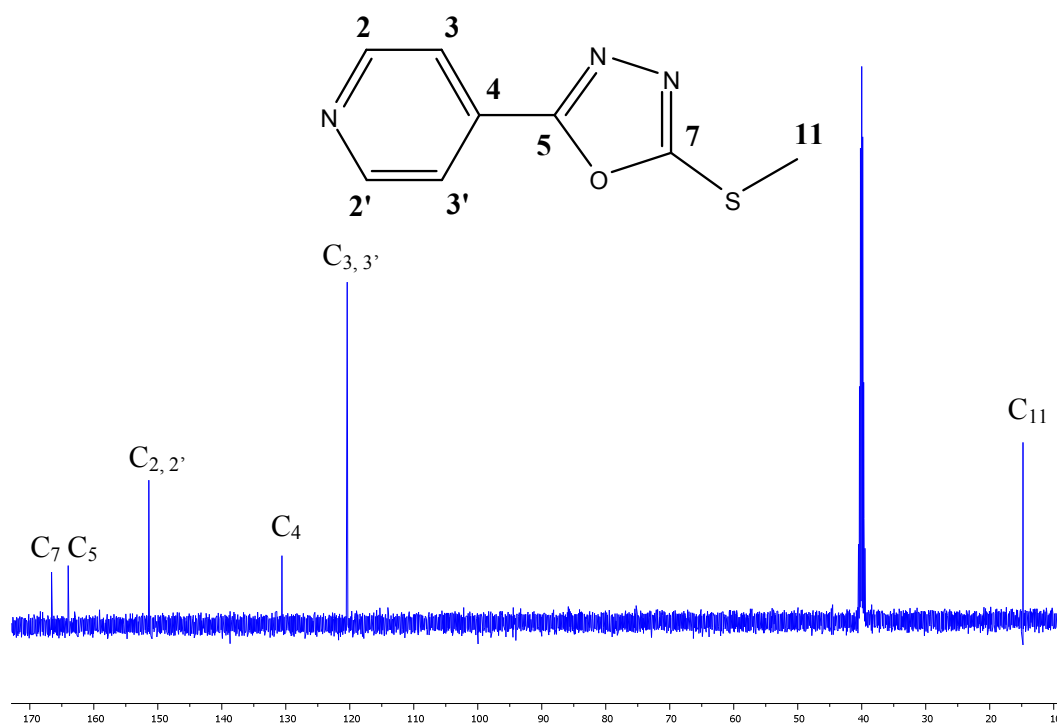


Figura 31. Espectro de RMN ^{13}C para o composto IO3SMet, em DMSO- d_6 , 500MHz.

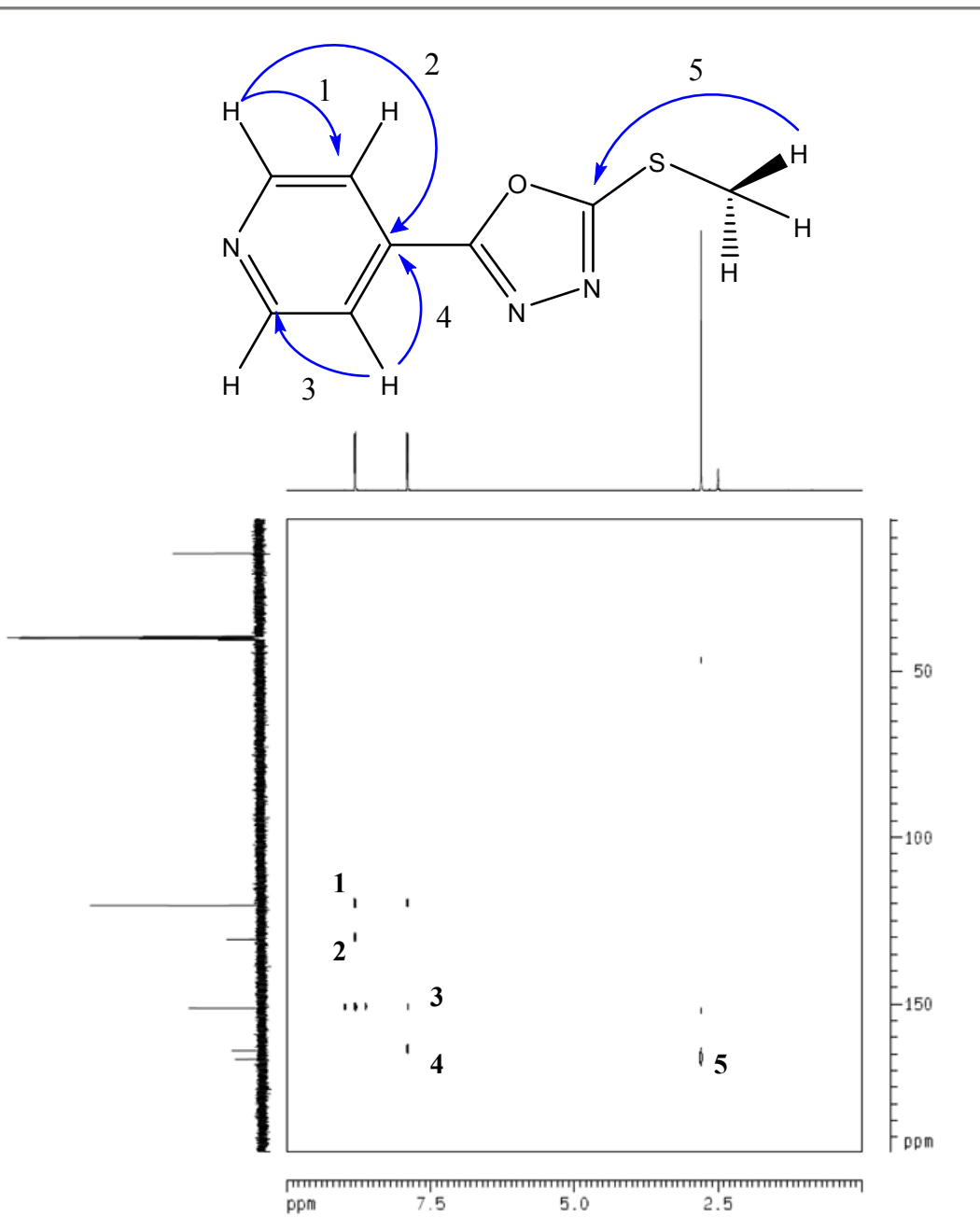


Figura 32. Diagrama de contorno de RMN bidimensional de correlação heteronuclear a longa distância para o composto IO3SMet, em DMSO, 500 MHz.

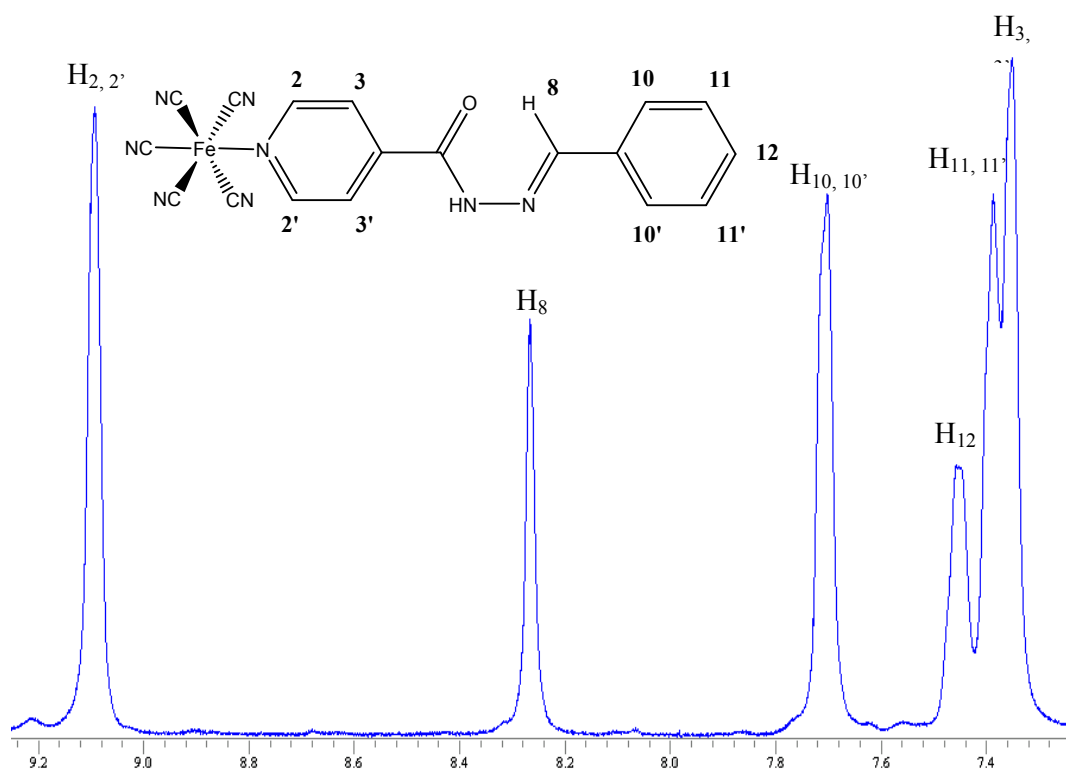


Figura 33. Espectro de RMN ^1H para o composto $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IA4H})]^{3-}$, em D_2O , 500 MHz.

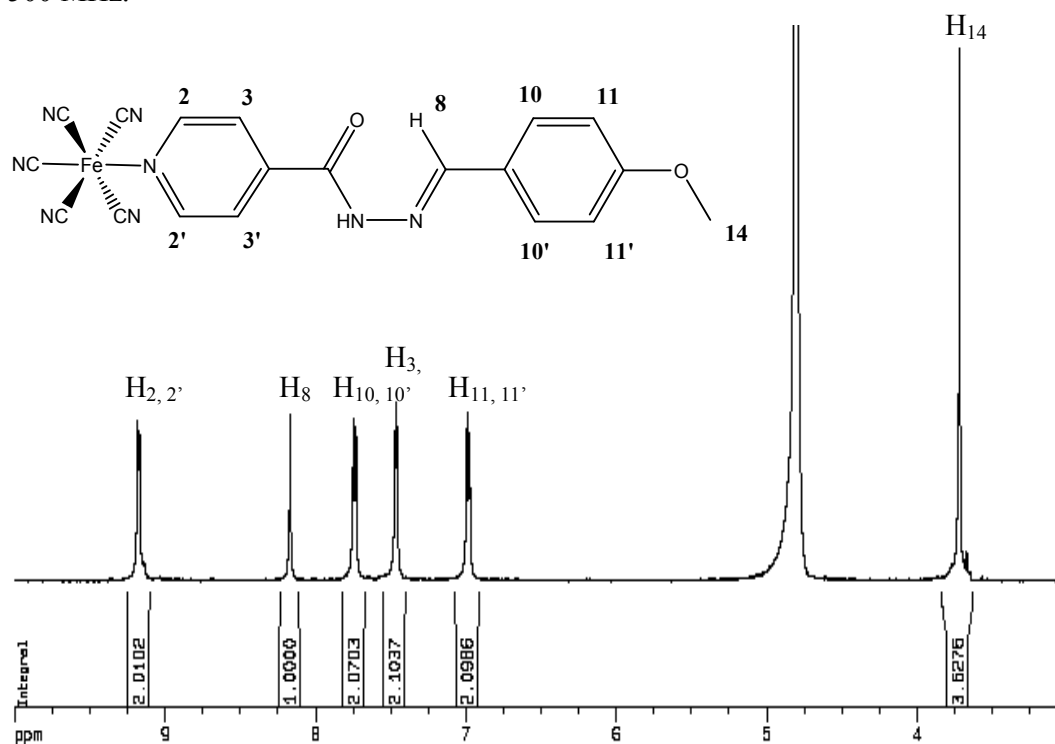


Figura 34. Espectro de RMN ^1H para o composto $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IA4OMet})]^{3-}$, em D_2O , 500 MHz.

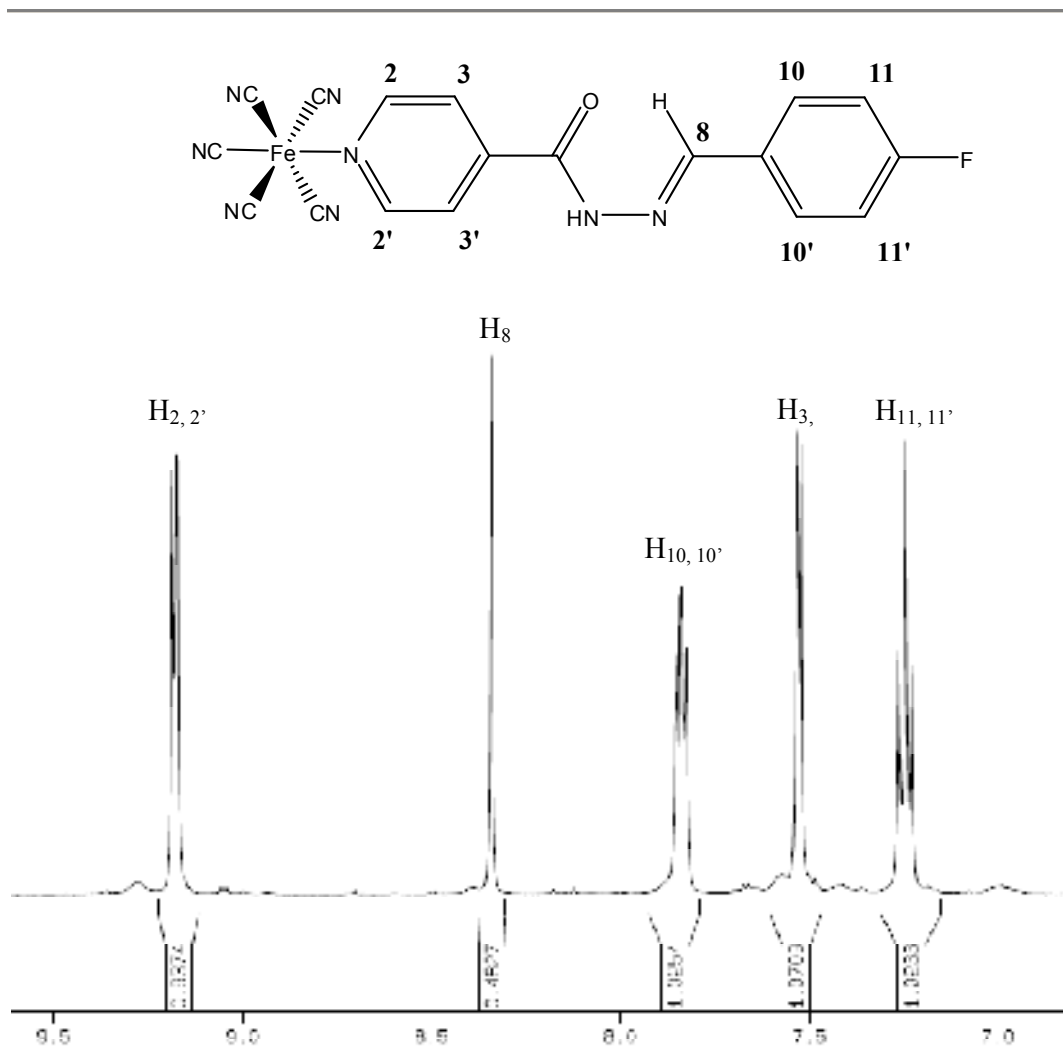


Figura 35. Espectro de RMN ^1H para o composto $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IA4F})]^{3-}$, em D_2O , 500 MHz.

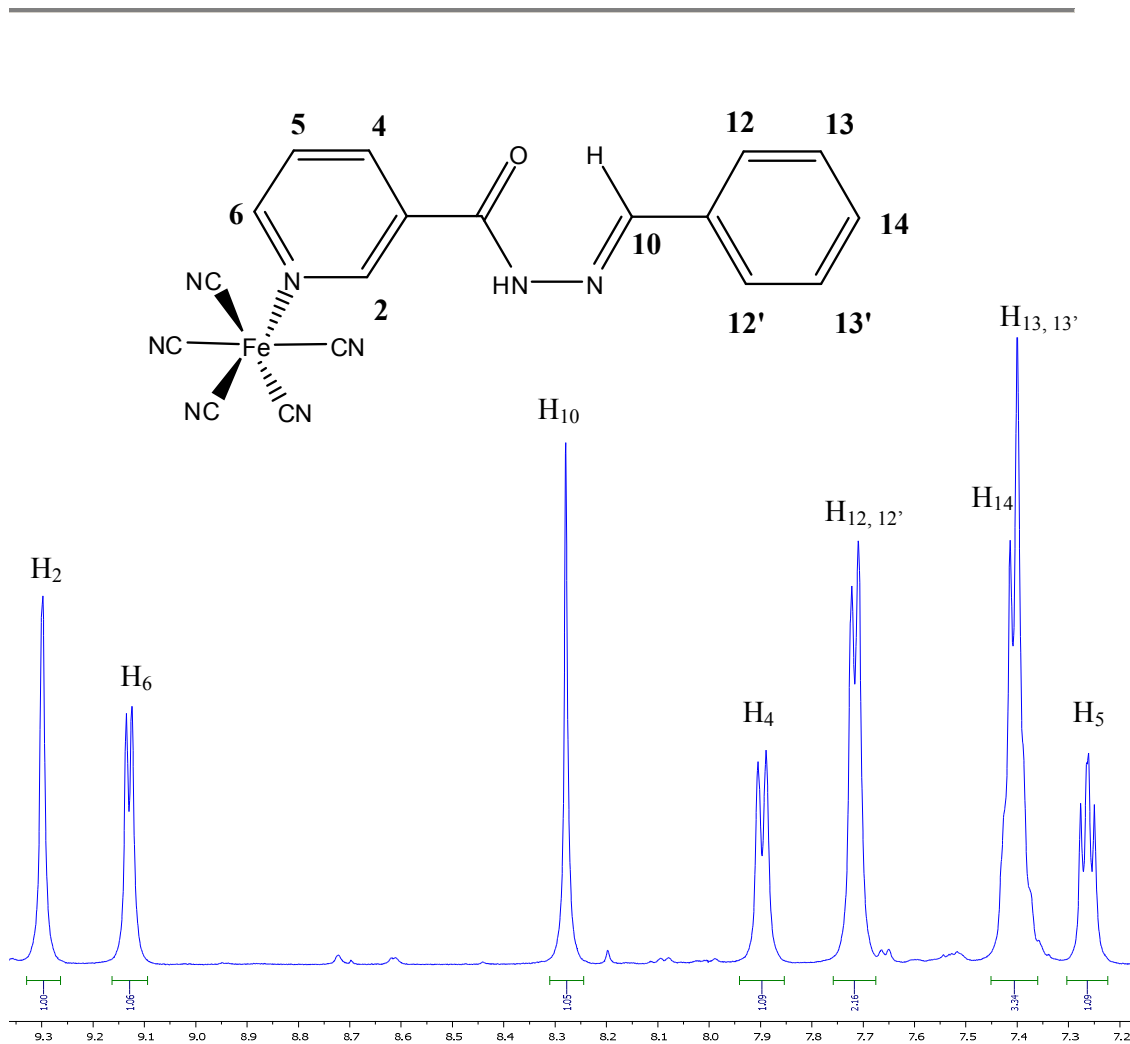


Figura 36. Espectro de RMN ^1H para o composto $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NA4H})]^{3-}$, em D_2O , 500 MHz.

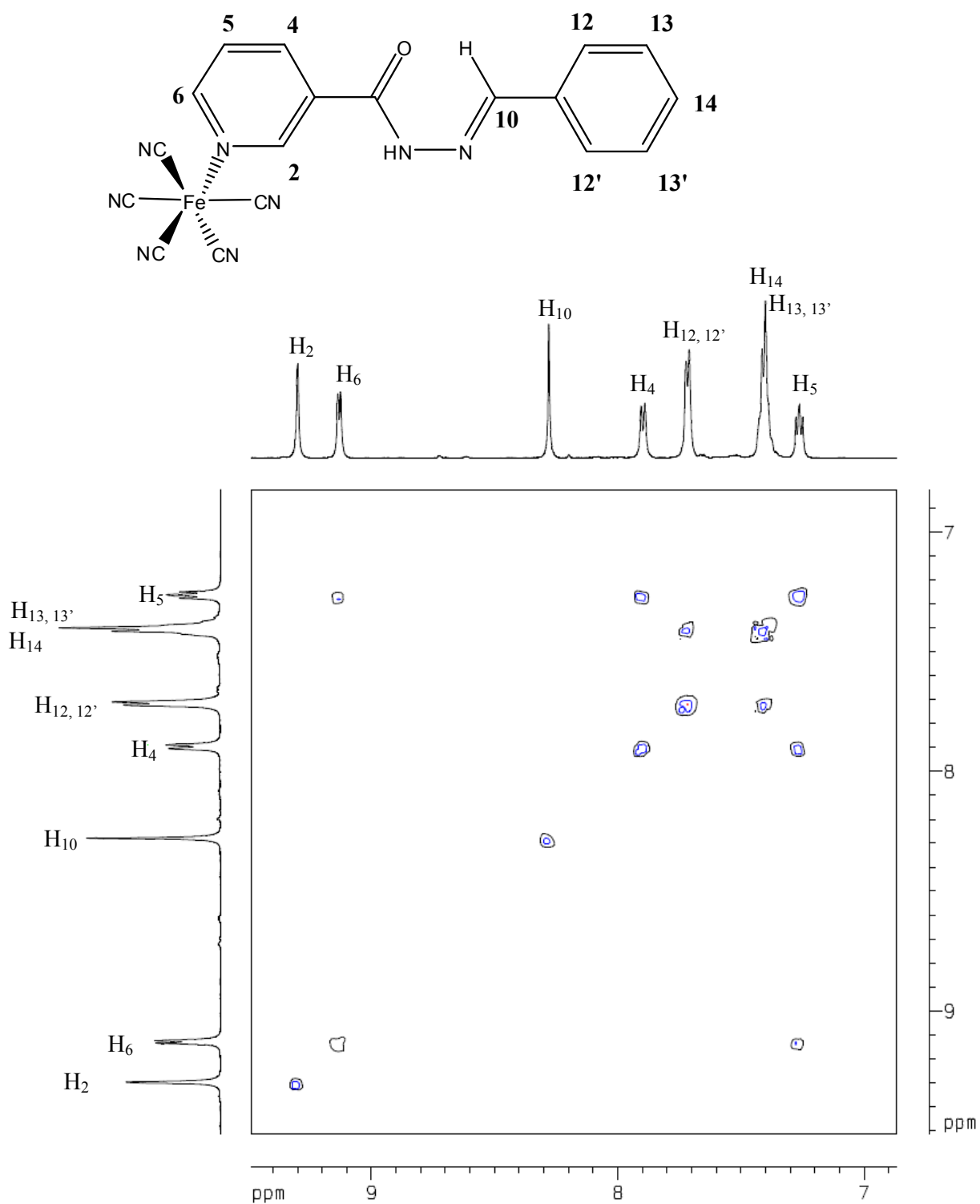


Figura 37. Diagrama de contorno de RMN bidimensional de correlação homonuclear para o composto $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NA4H})]^{3-}$, em D_2O , 500 MHz.

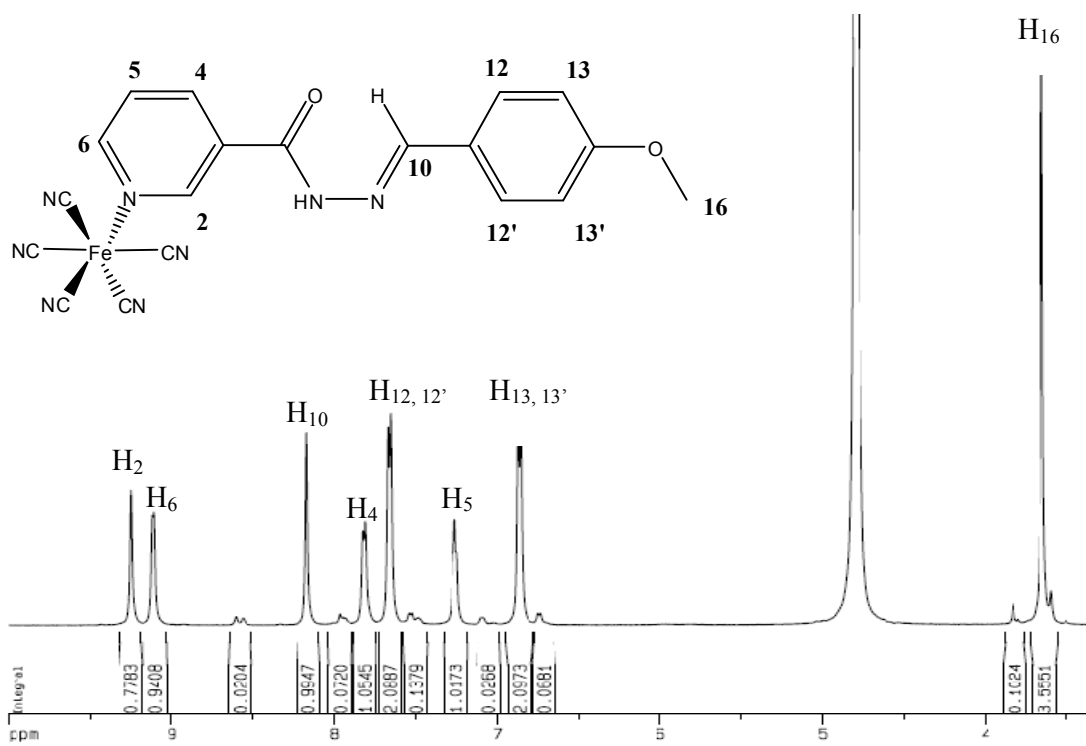


Figura 38. Espectro de RMN ^1H para o composto $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NA4OMet})]^{3-}$, em D_2O , 500 MHz.

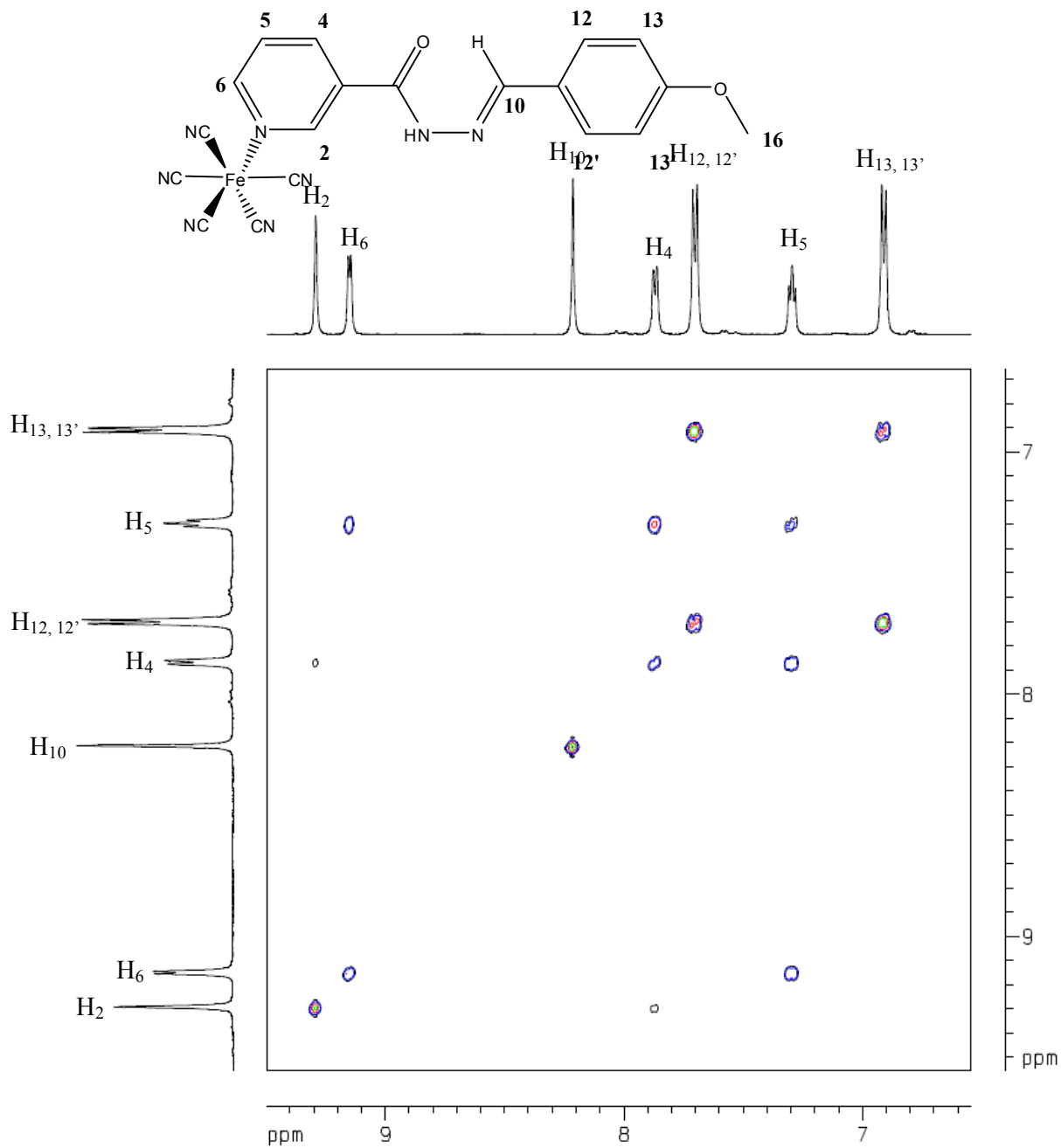


Figura 39. Diagrama de contorno de RMN bidimensional de correlação homonuclear para o íon complexo $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NA4OMet})]^{3-}$, em D_2O , 500 MHz.

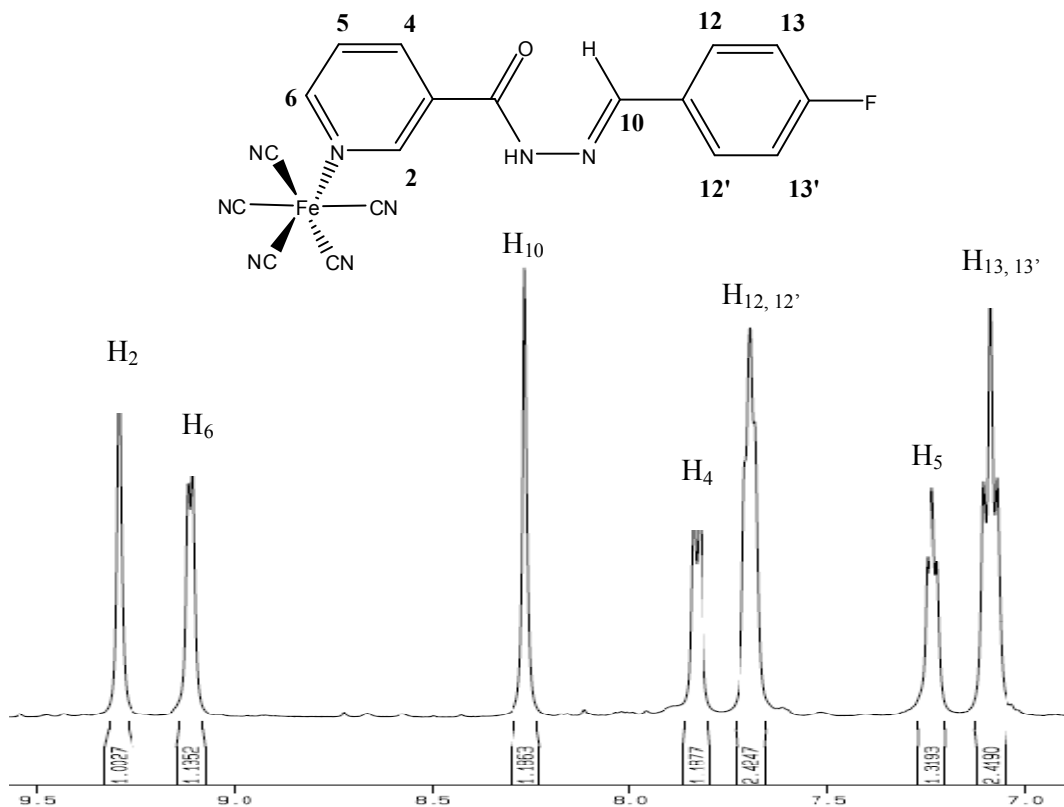


Figura 40. Espectro de RMN ^1H para o composto $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NA4F})]^{3-}$, em D_2O , 500 MHz.

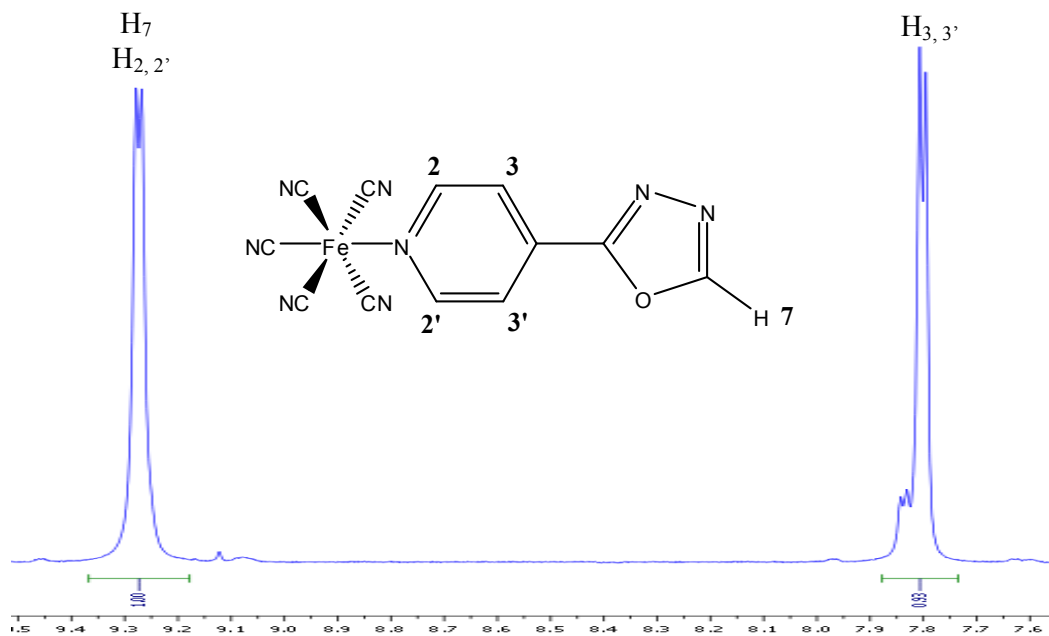


Figura 41. Espectro de RMN ^1H para o composto $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IO3H})]^{3-}$, em D_2O , 500 MHz.

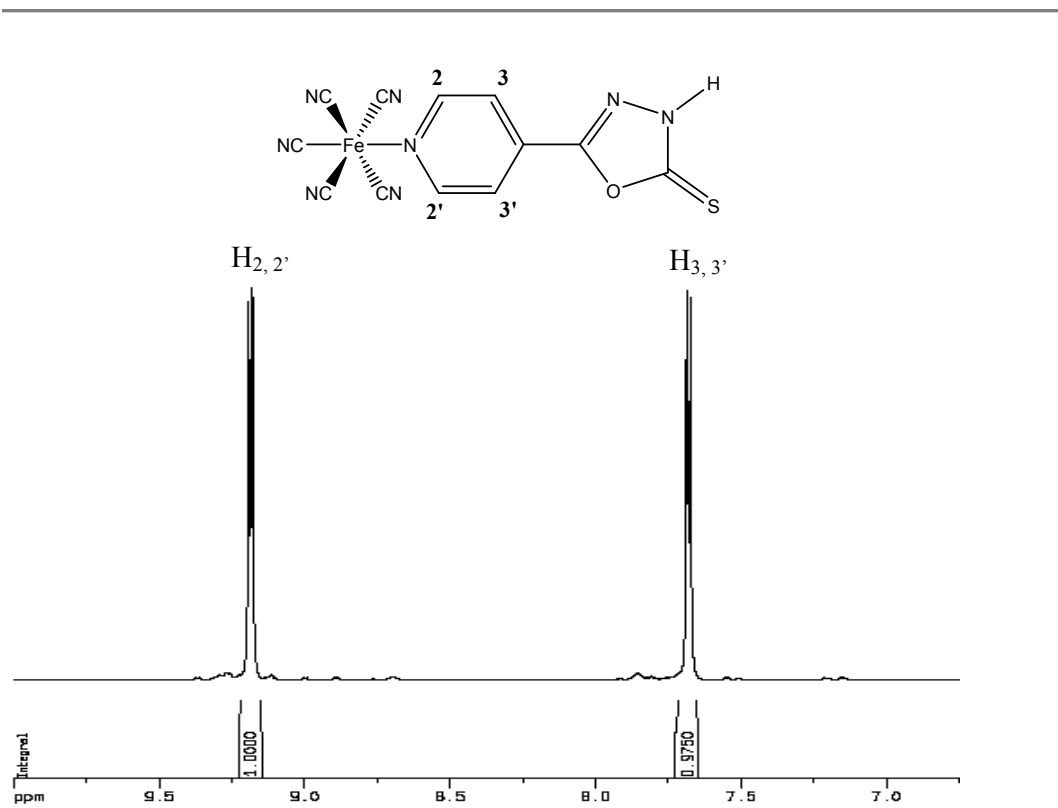


Figura 42. Espectro de RMN ^1H para o composto $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IO3S})]^{3-}$, em D_2O , 500 MHz.

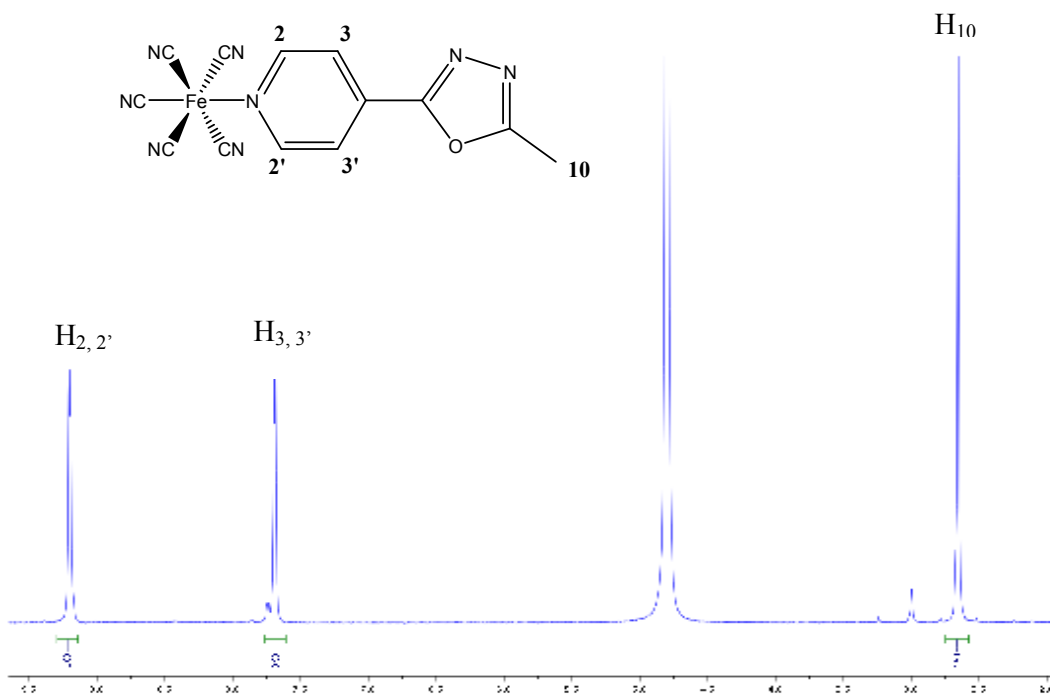


Figura 43. Espectro de RMN ^1H para o composto $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IO3Met})]^{3-}$, em D_2O , 500 MHz.

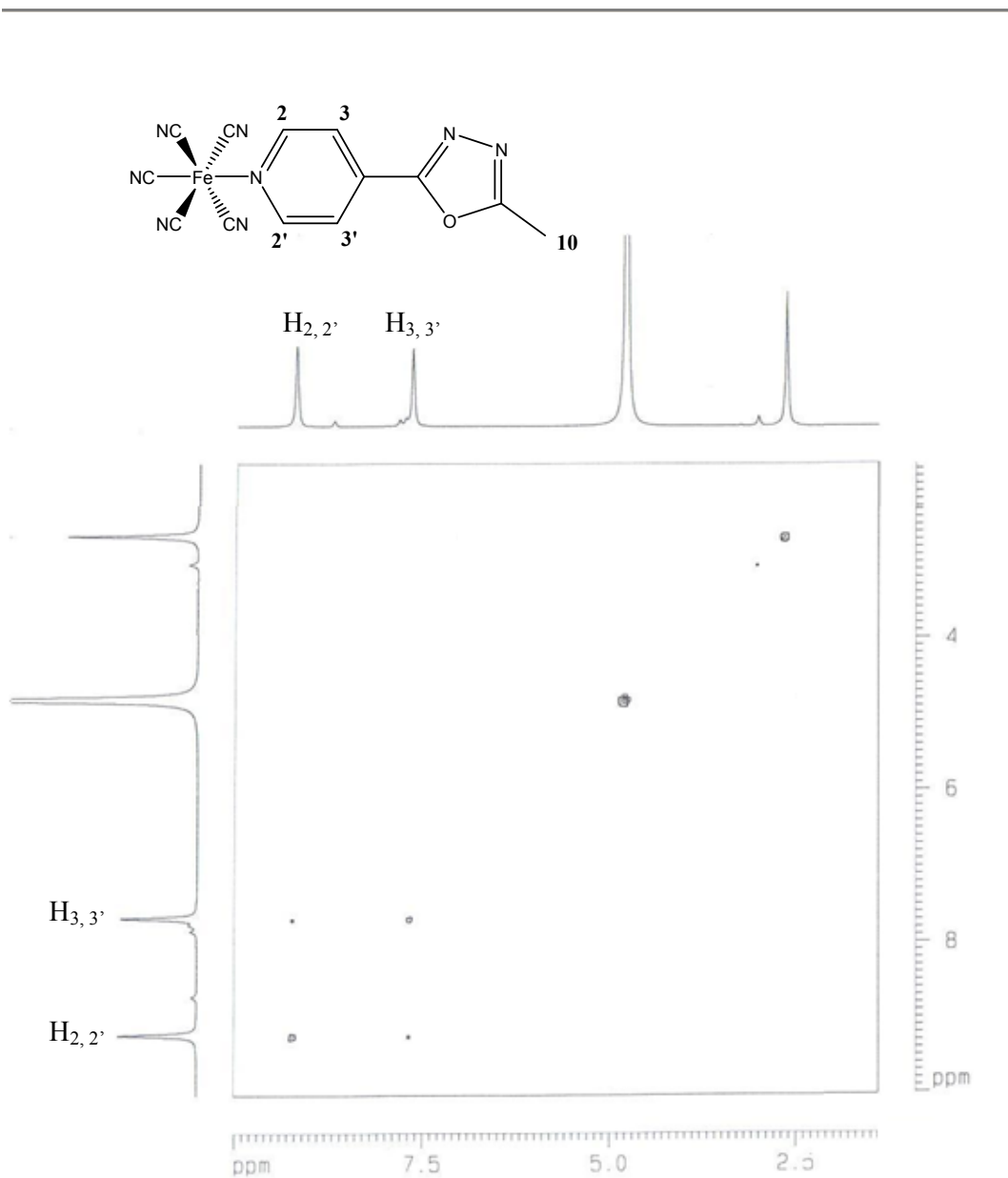


Figura 44. Diagrama de contorno de RMN bidimensional de correlação homonuclear para o íon complexo $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IO3Met})]^{3-}$, em D_2O , 500 MHz.

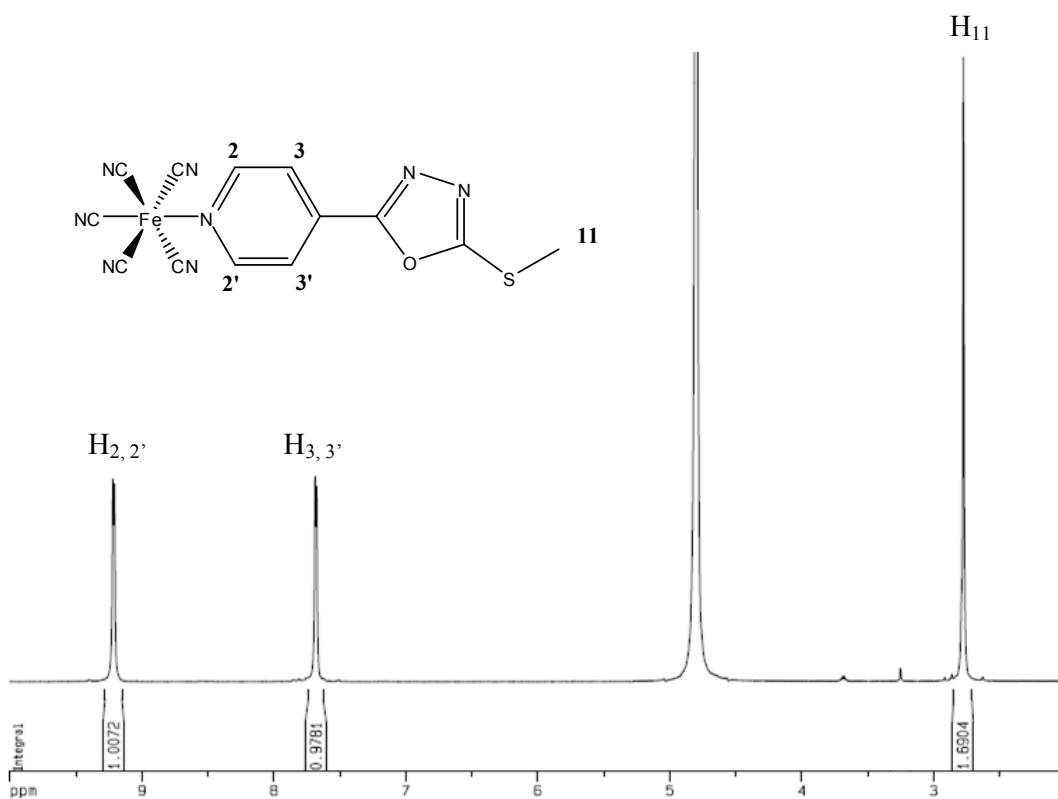


Figura 45. Espectro de RMN ^1H para o composto $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IO3SMet})]^{3-}$, em D_2O , 500 MHz.

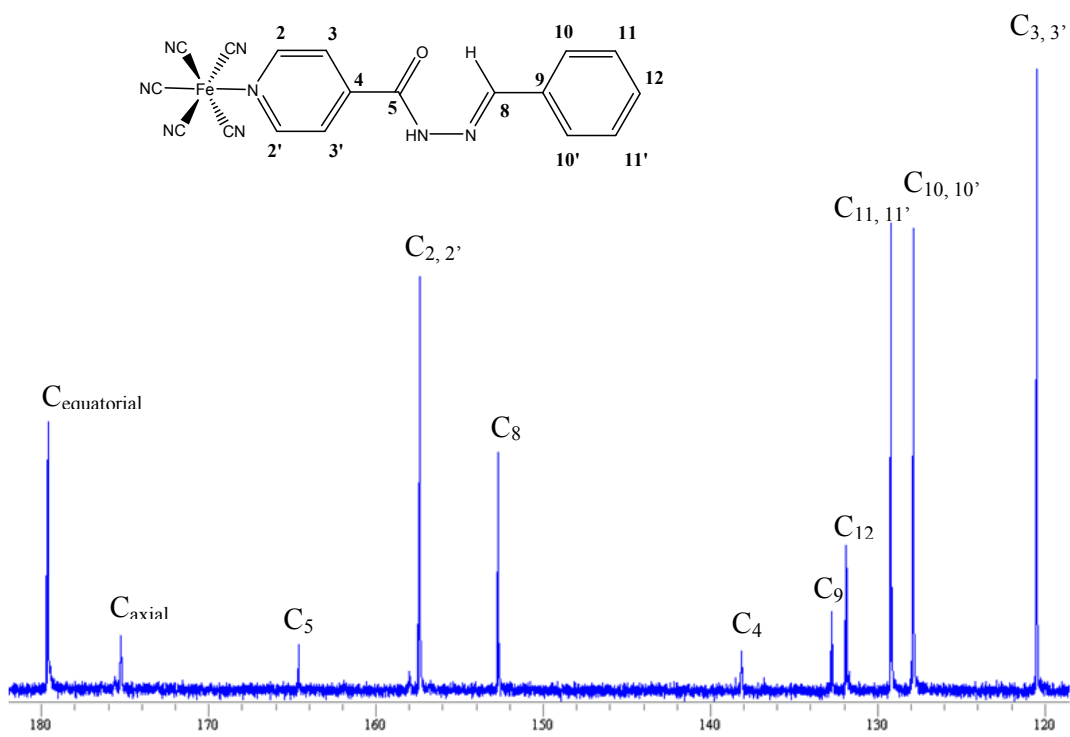


Figura 46. Espectro de RMN ^{13}C para o composto $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IA4H})]^{3-}$, em D_2O , 500 MHz.

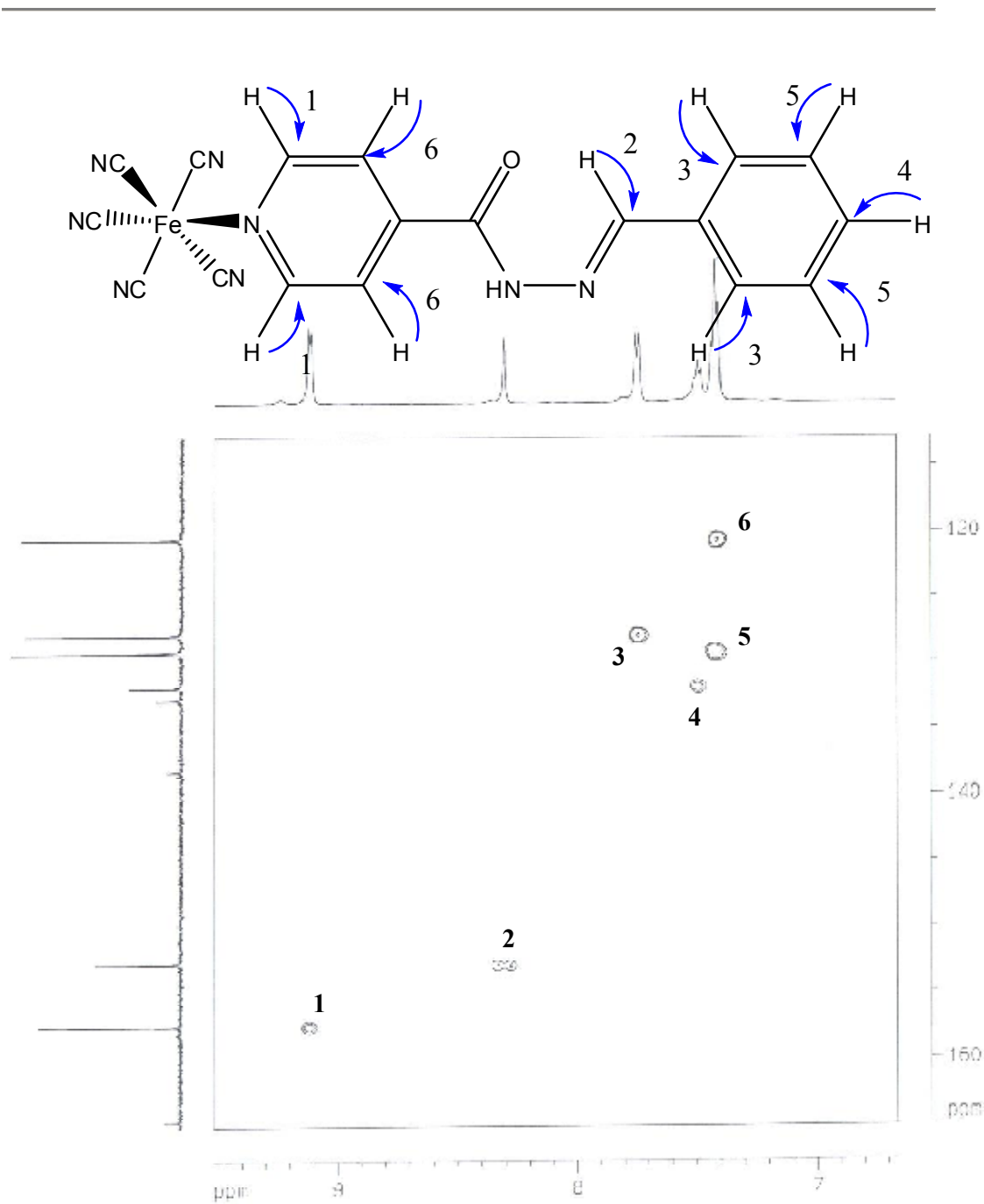


Figura 47. Diagrama de contorno de RMN bidimensional de correlação heteronuclear para o íon complexo $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IA4H})]^{3-}$, em D_2O , 500 MHz.

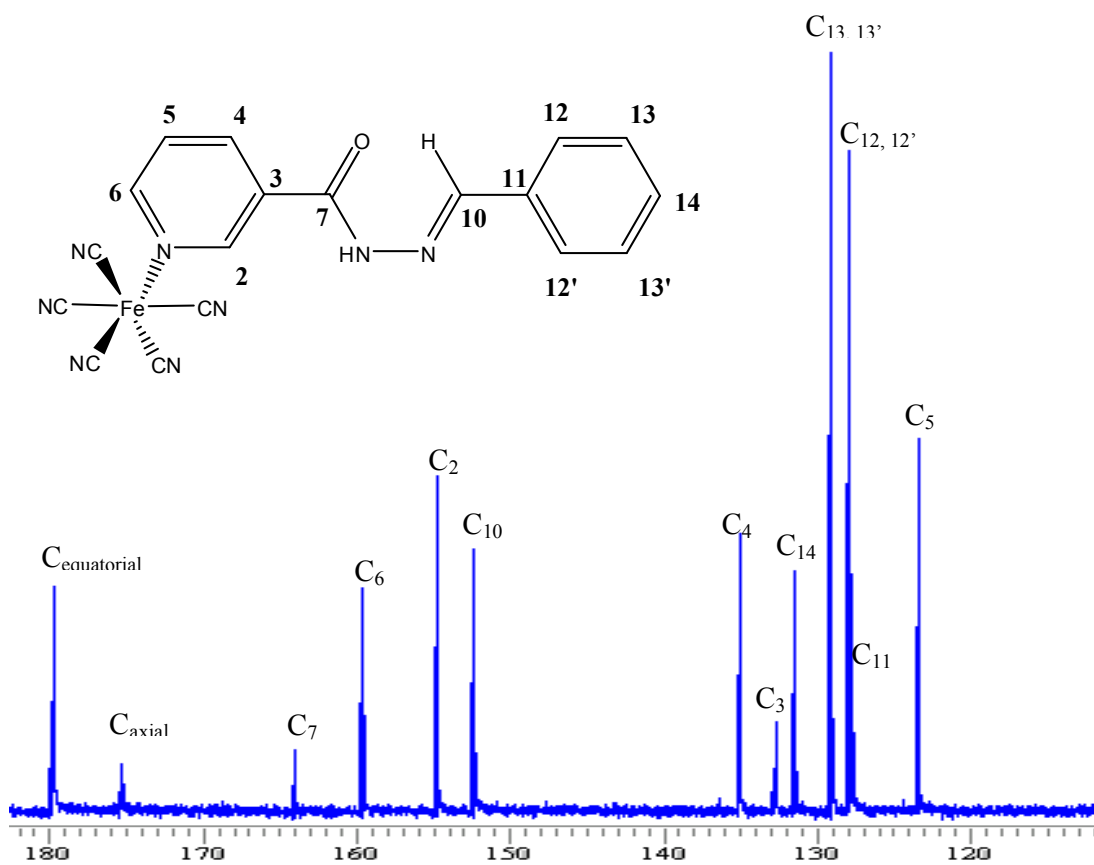


Figura 48. Espectro de RMN ^{13}C para o composto $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NA4H})]^{3-}$, em D_2O , 500 MHz.

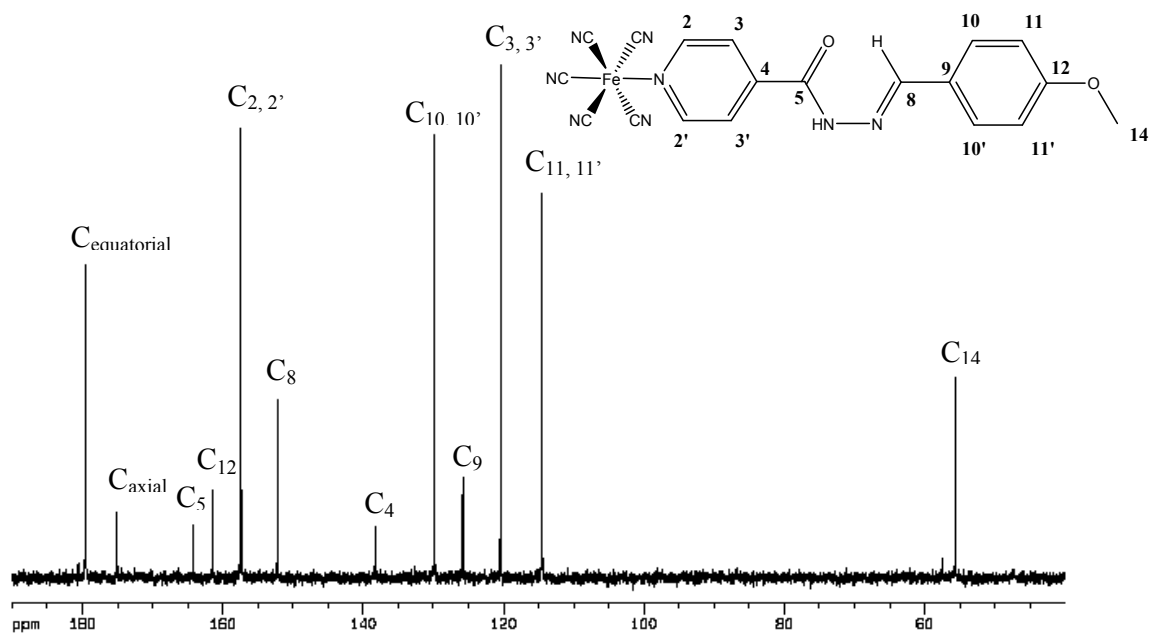


Figura 49. Espectro de RMN ^{13}C para o composto $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IA4OMet})]^{3-}$, em D_2O , 500 MHz.

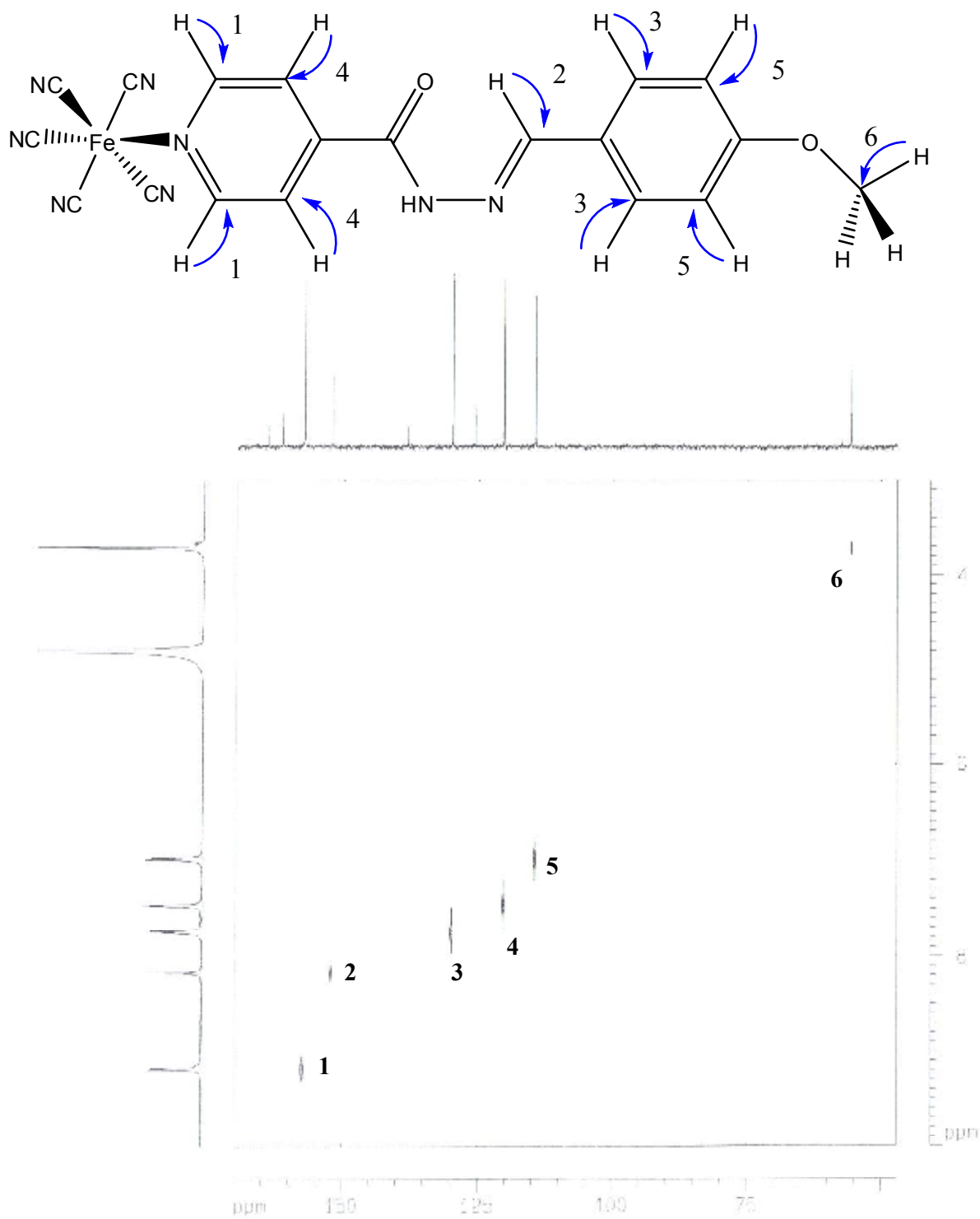


Figura 50. Diagrama de contorno de RMN bidimensional HETCOR para o íon complexo $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IA4OMet})]^{3-}$, em D_2O , 500 MHz.

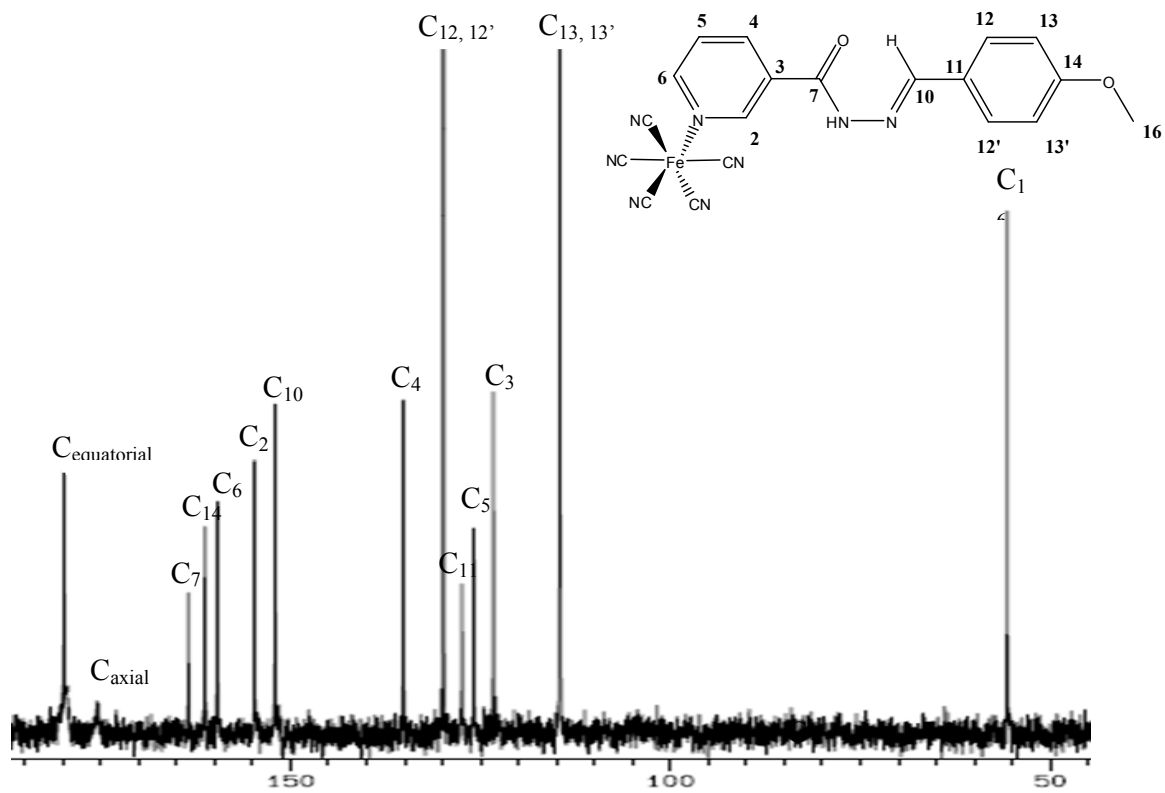


Figura 51. Espectro de RMN ^{13}C para o composto $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NA4OMet})]^{3-}$, em D_2O , 500 MHz.

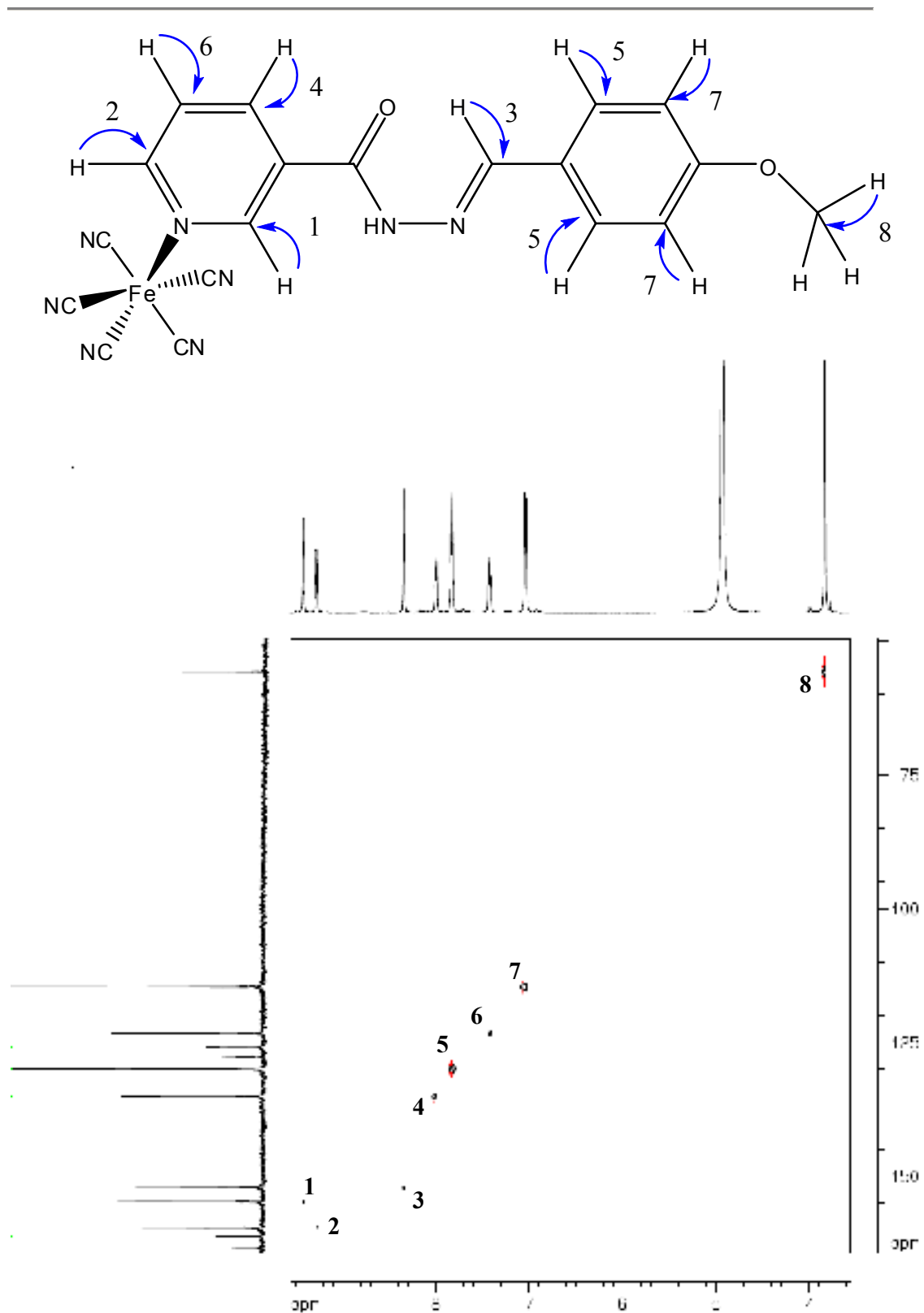


Figura 52. Diagrama de contorno de RMN bidimensional de correlação heteronuclear para o íon complexo $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NA4OMet})]^{3-}$, em D_2O , 500 MHz.

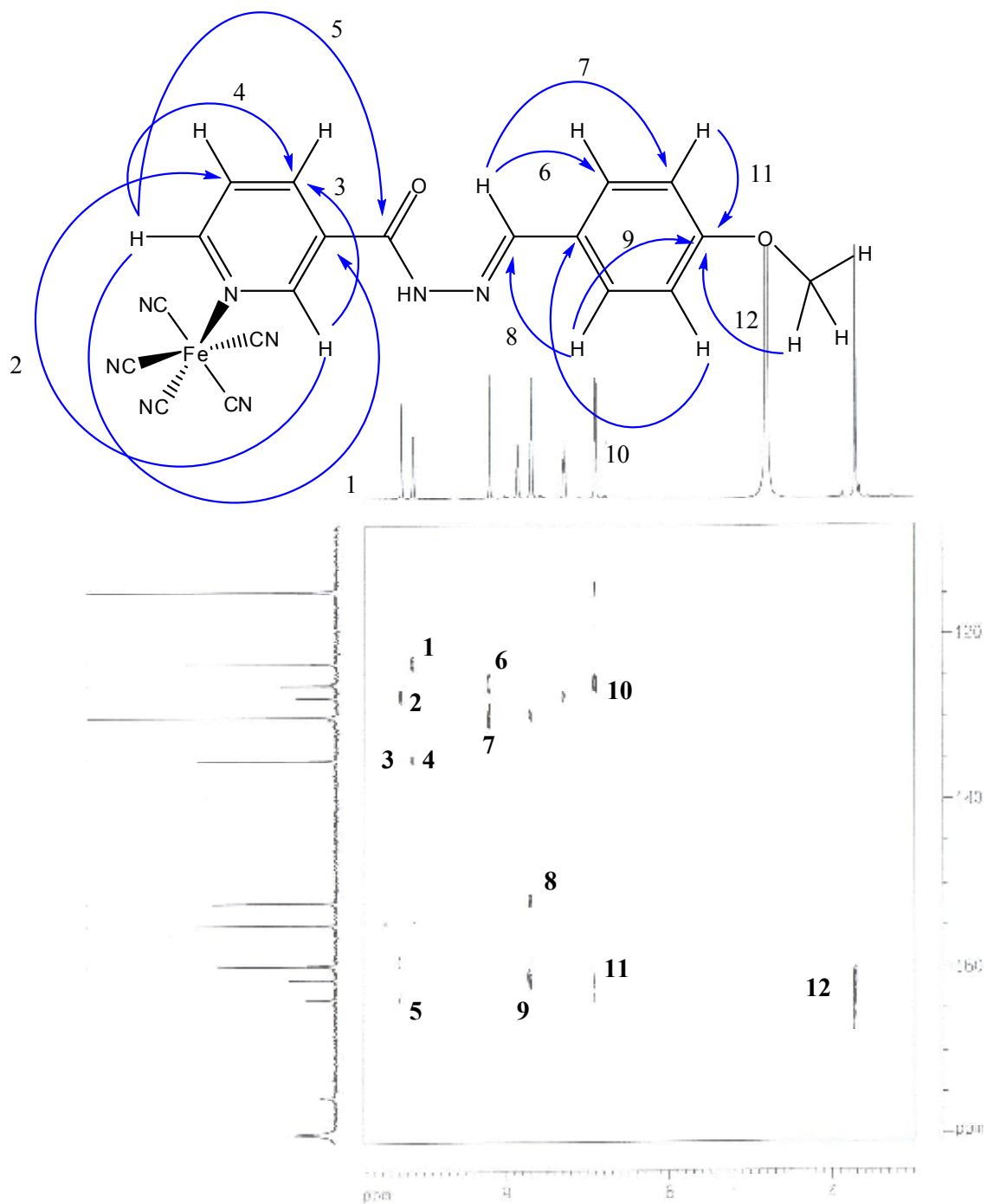


Figura 53. Diagrama de contorno de RMN bidimensional de correlação heteronuclear a longa distância para o íon complexo $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NA4OMet})]^{3-}$, em D_2O , 500 MHz.

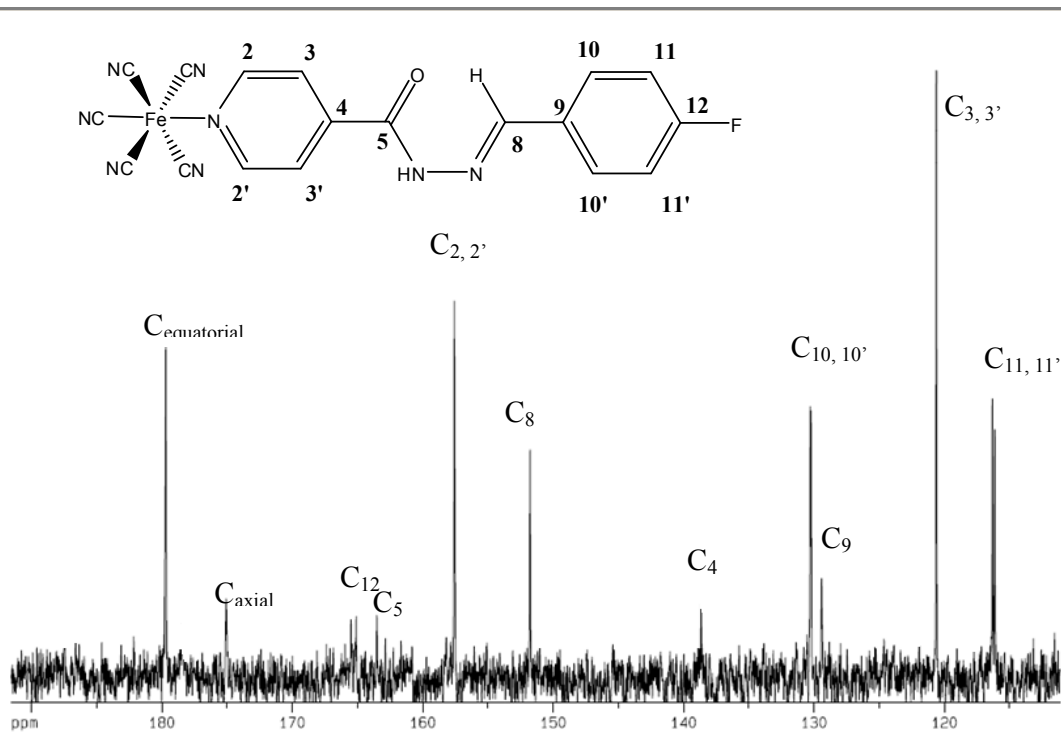


Figura 54. Espectro de RMN ^{13}C para o composto $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IA4F})]^{3-}$, em D_2O , 500 MHz.

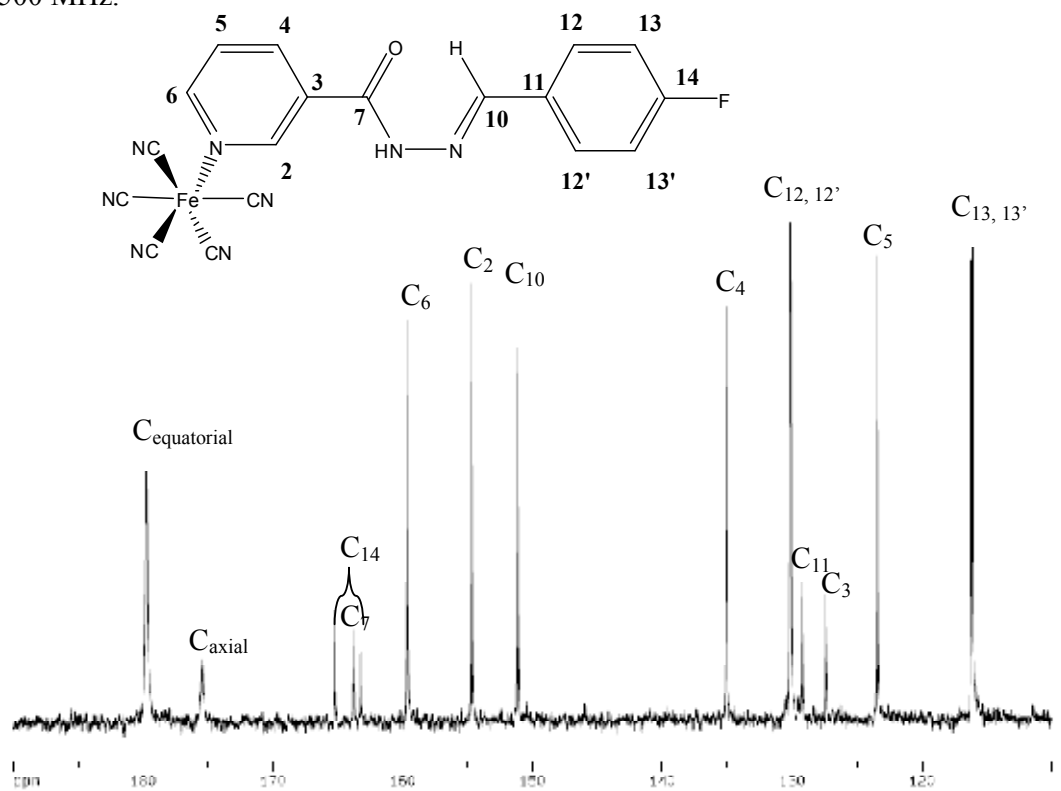


Figura 55. Espectro de RMN ^{13}C para o composto $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NA4F})]^{3-}$, em D_2O , 500 MHz.

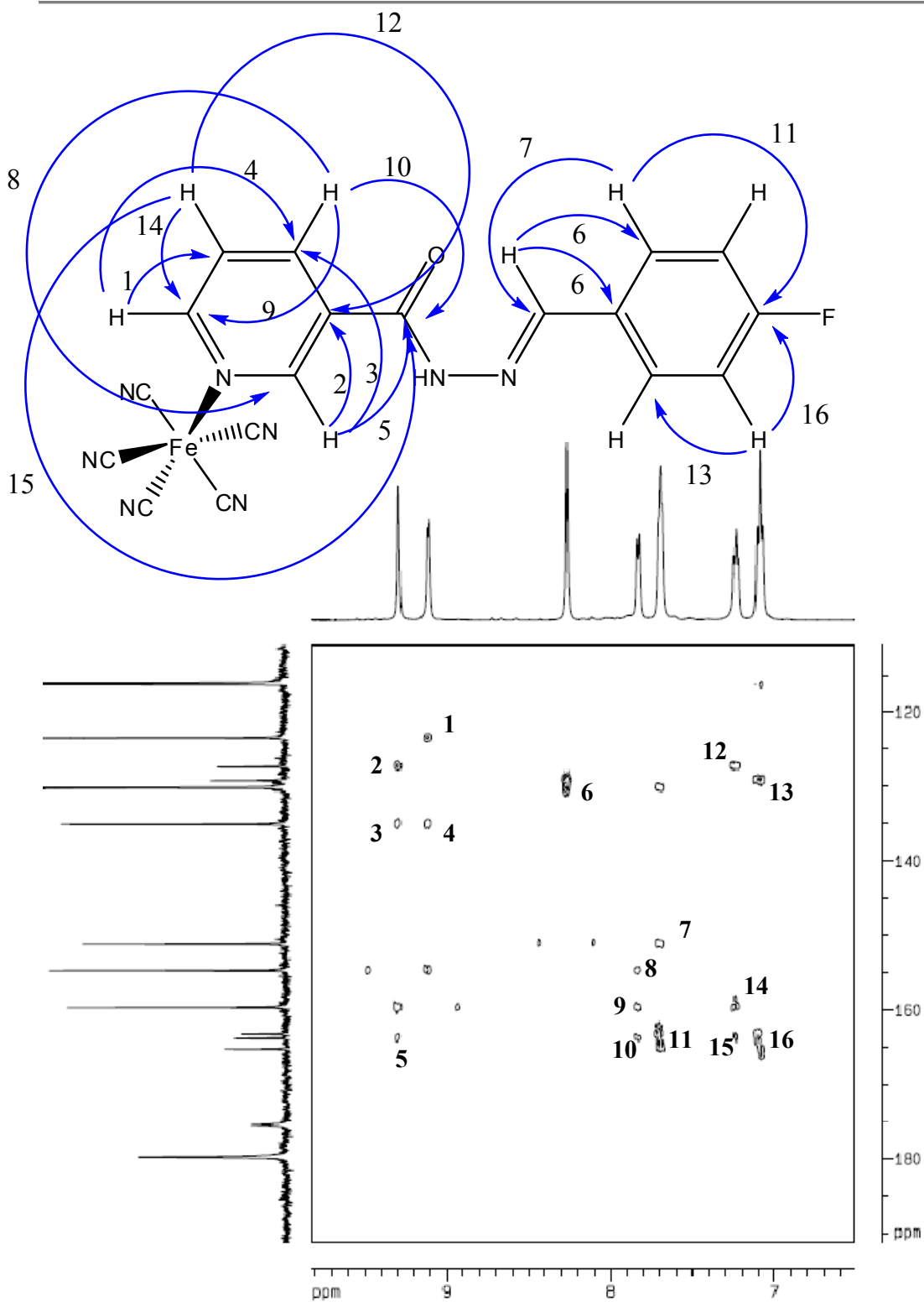


Figura 56. Diagrama de contorno de RMN bidimensional de correlação heteronuclear a longa distância para o íon complexo $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NA4F})]^{3-}$, em D_2O , 500 MHz.

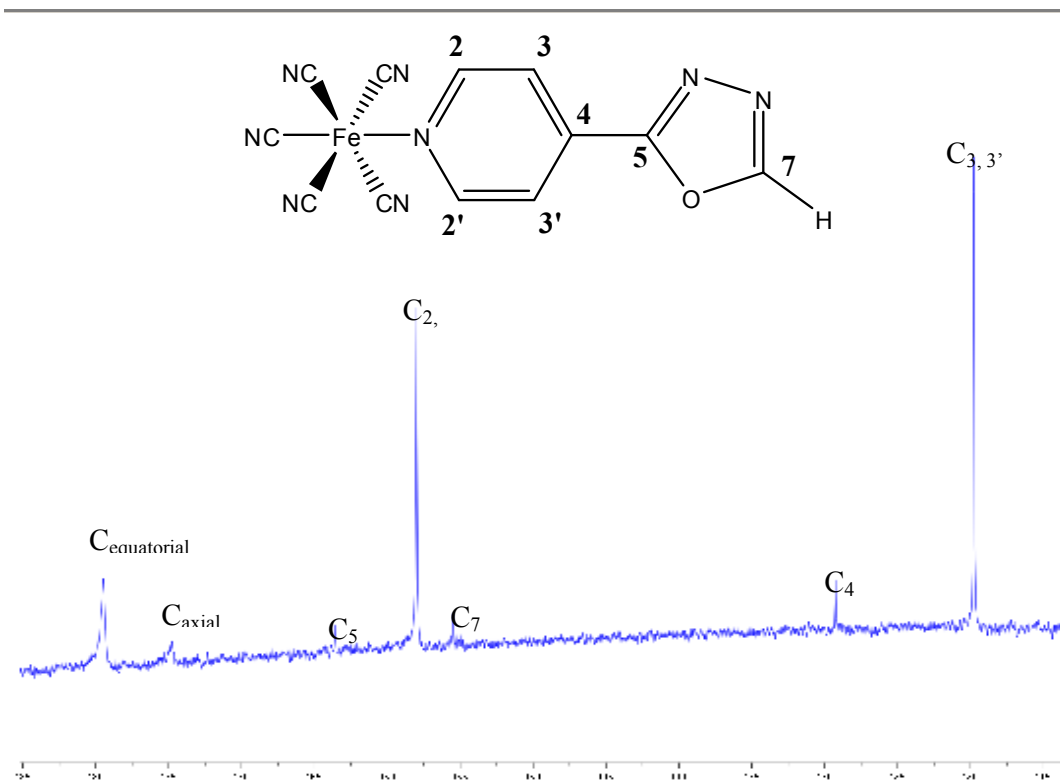


Figura 57. Espectro de RMN ^{13}C para o composto $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IO}_3\text{H})]^{3-}$, em D_2O , 500 MHz.

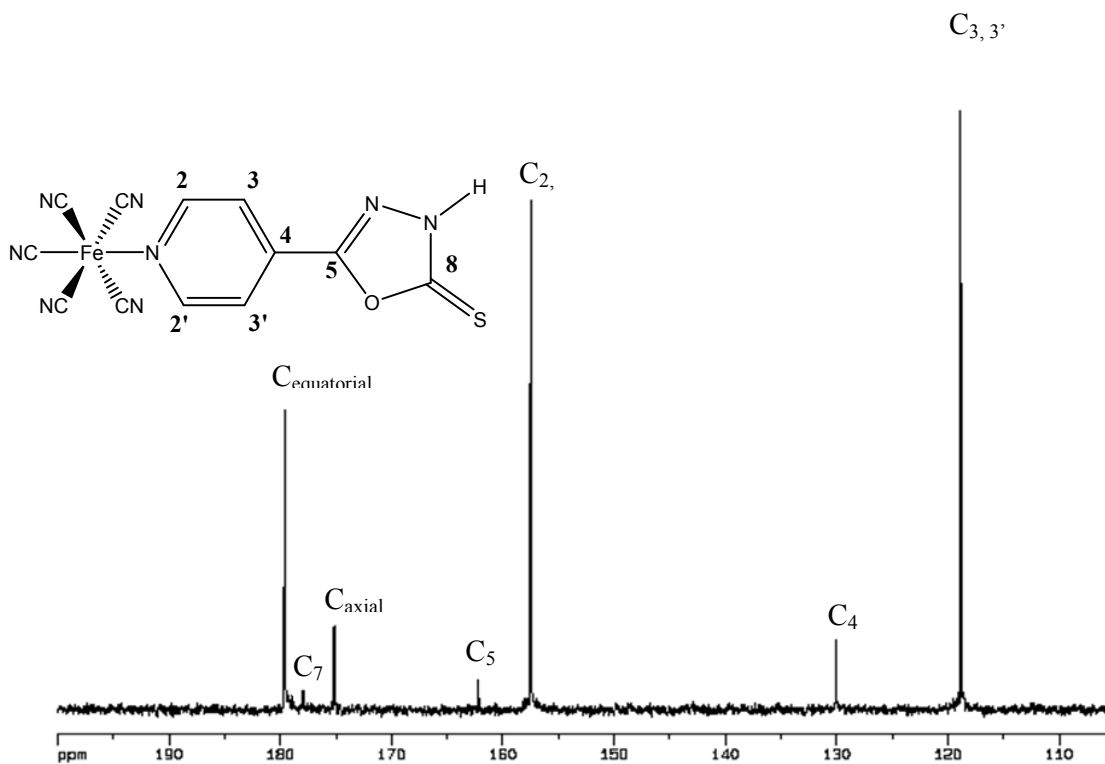


Figura 58. Espectro de RMN ^{13}C para o composto $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IO}_3\text{S})]^{3-}$, em D_2O , 500 MHz.

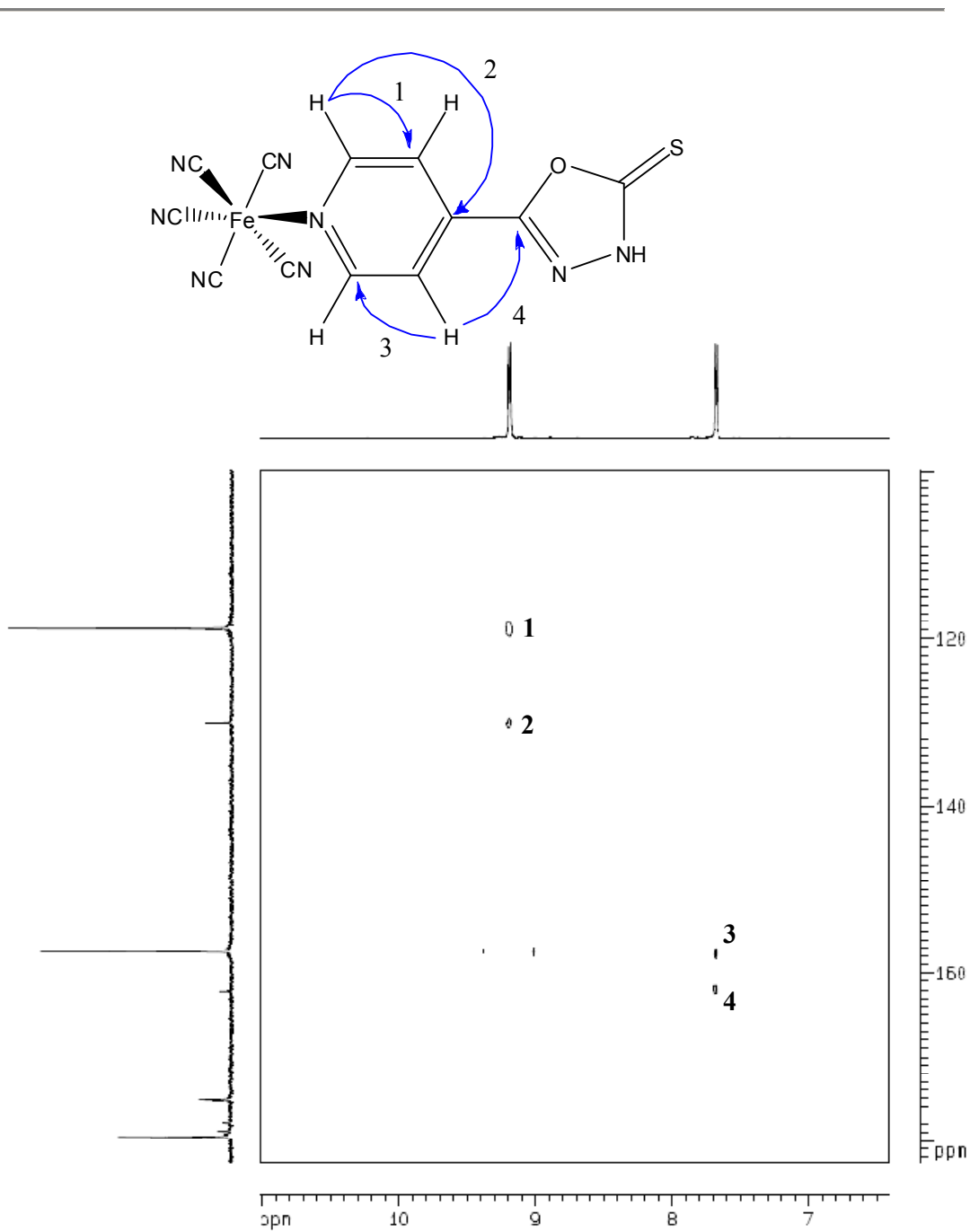


Figura 59. Diagrama de contorno de RMN bidimensional de correlação heteronuclear a longa distância para o íon complexo $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IO3S})]^{3-}$, em D_2O , 500 MHz.

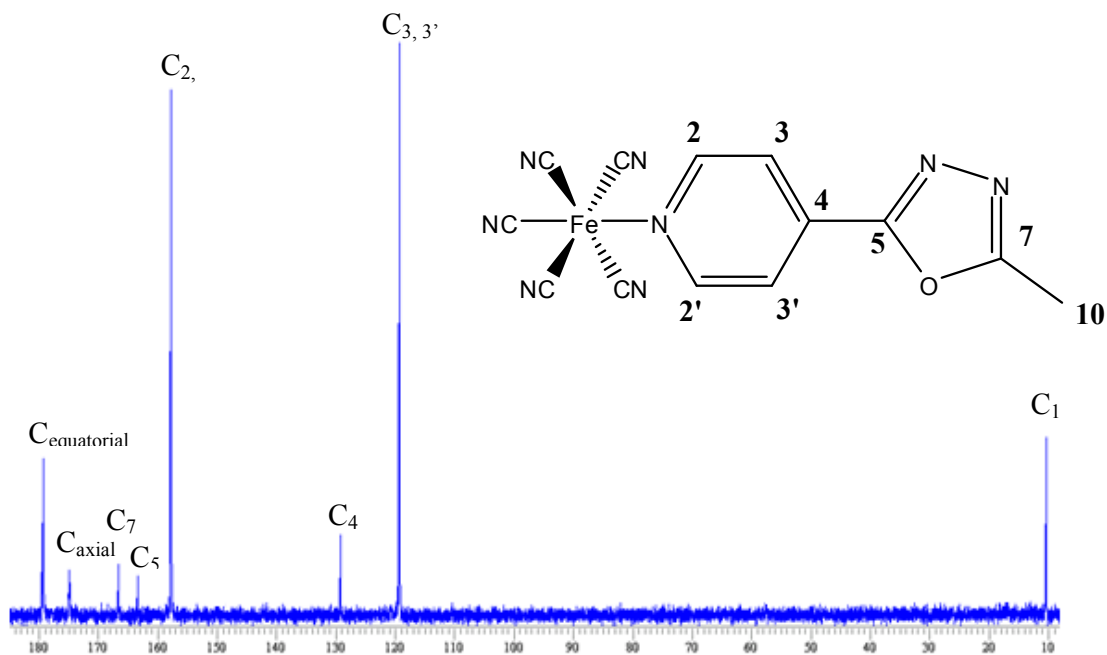


Figura 60. Espectro de RMN ¹³C para o composto [Fe(CN)₅(IO₃Met)]³⁻, em D₂O, 500 MHz.

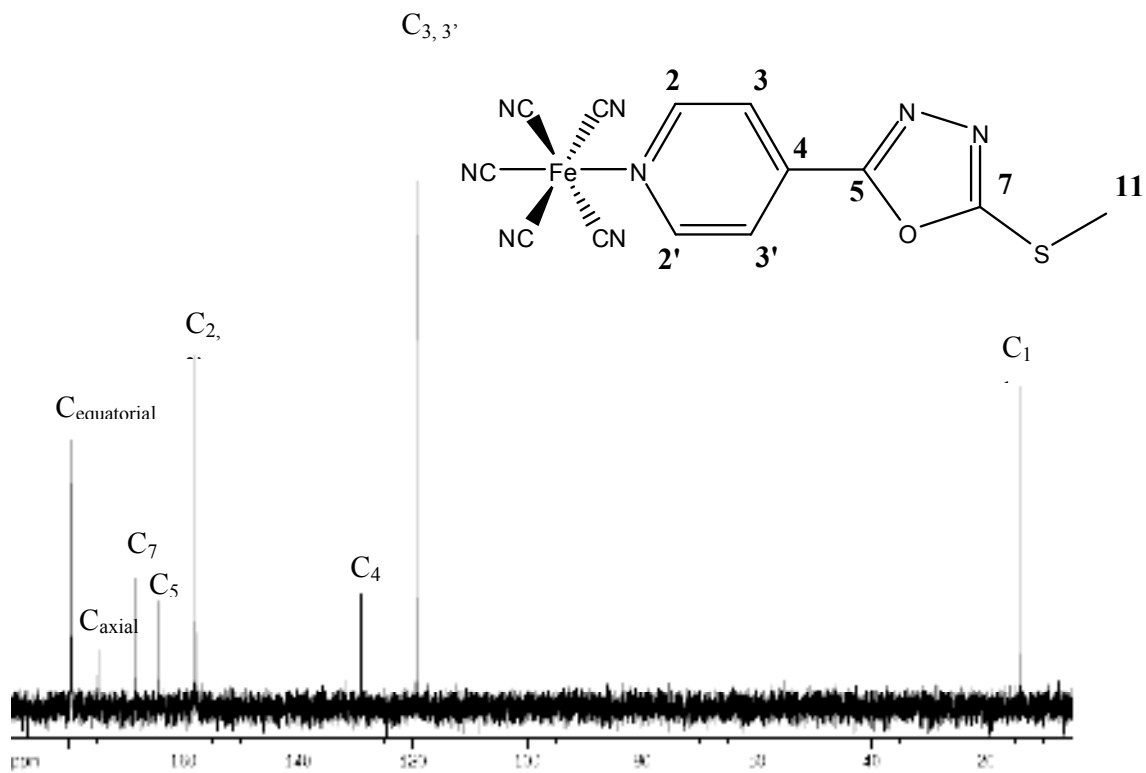


Figura 61. Espectro de RMN ¹³C para o composto [Fe(CN)₅(IO₃SMet)]³⁻, em D₂O, 500 MHz.

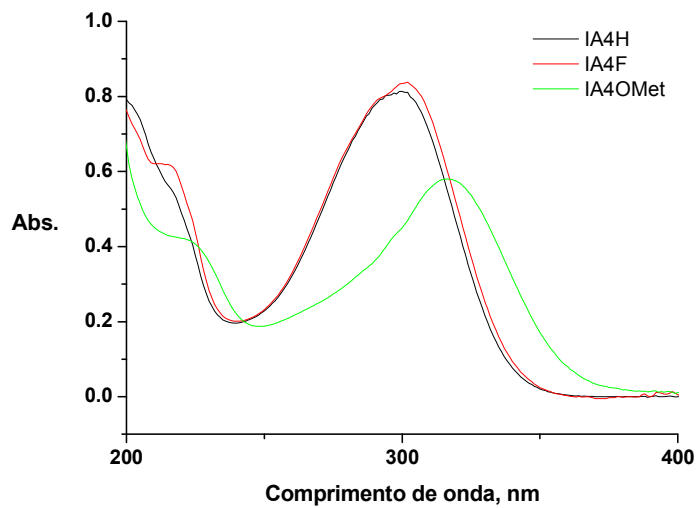


Figura 64. Espectro eletrônico em meio aquoso dos ligantes hidrazonas derivados do ácido nicotínico, pH = 6,8.

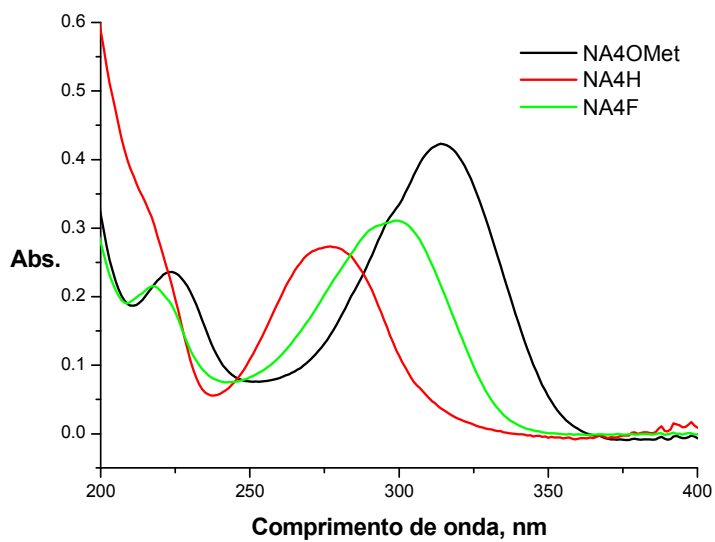


Figura 65. Espectro eletrônico em meio aquoso dos ligantes hidrazonas derivados do ácido nicotínico, pH = 6,8.

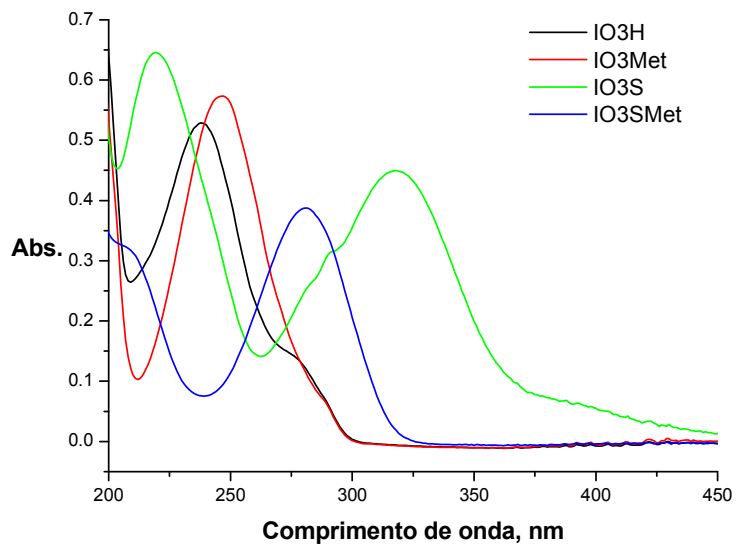


Figura 66. Espectro eletrônico em meio aquoso dos ligantes oxadiazóis, pH = 6,8.

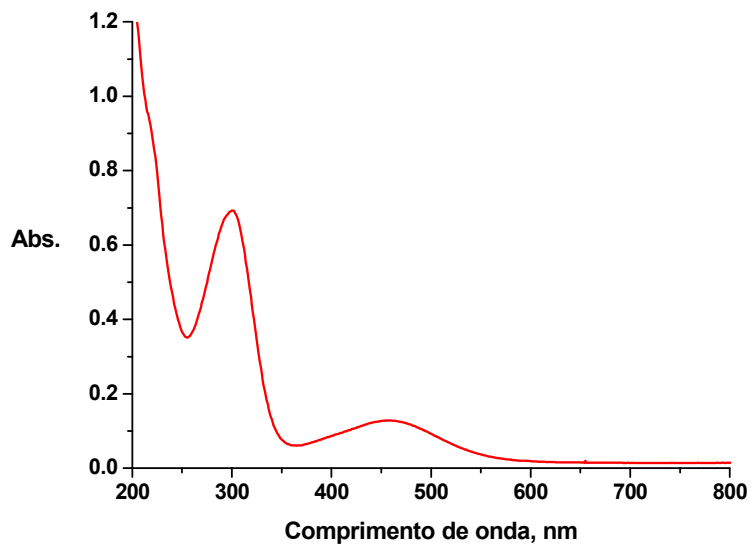


Figura 67. Espectro eletrônico em meio aquoso do íon complexo $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IA4H})]^{3-}$ pH = 6,8.

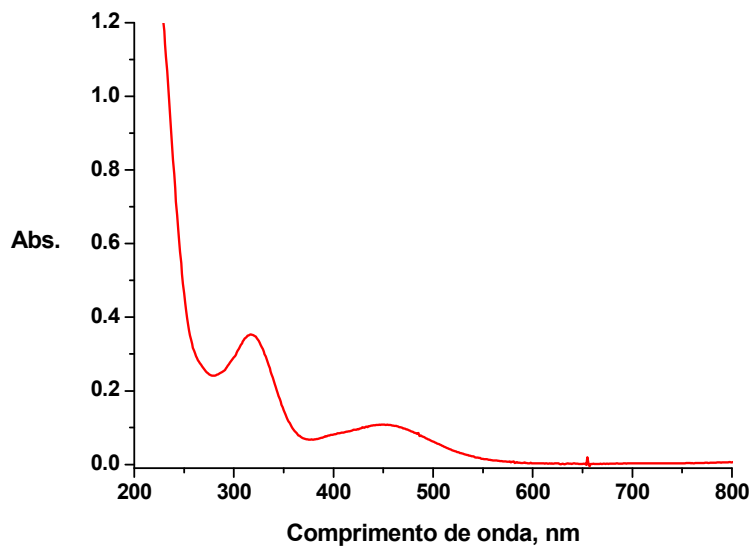


Figura 68. Espectro eletrônico em meio aquoso do íon complexo $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IA4OMet})]^{3-}$, pH = 6,8.

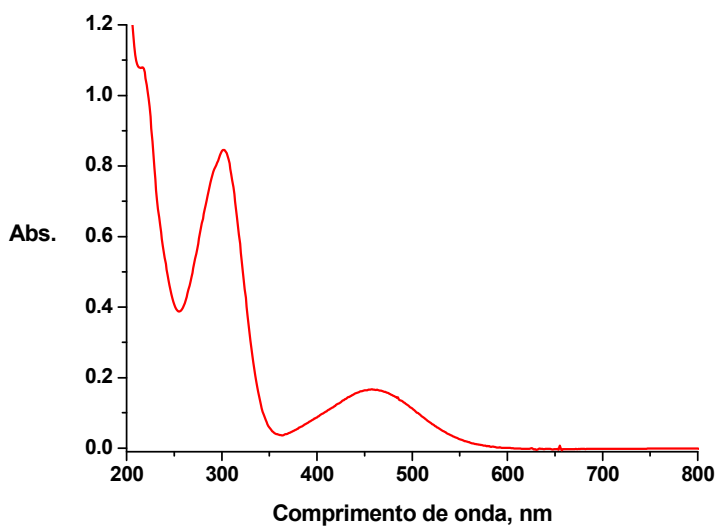


Figura 69. Espectro eletrônico em meio aquoso do íon complexo $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IA4F})]^{3-}$, pH = 6,8.

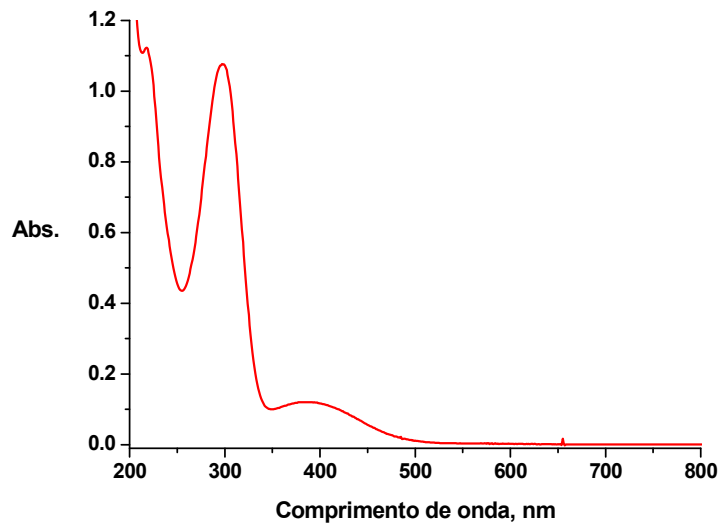


Figura 70. Espectro eletrônico em meio aquoso do íon complexo $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NA4H})]^{3-}$ pH = 6,8.

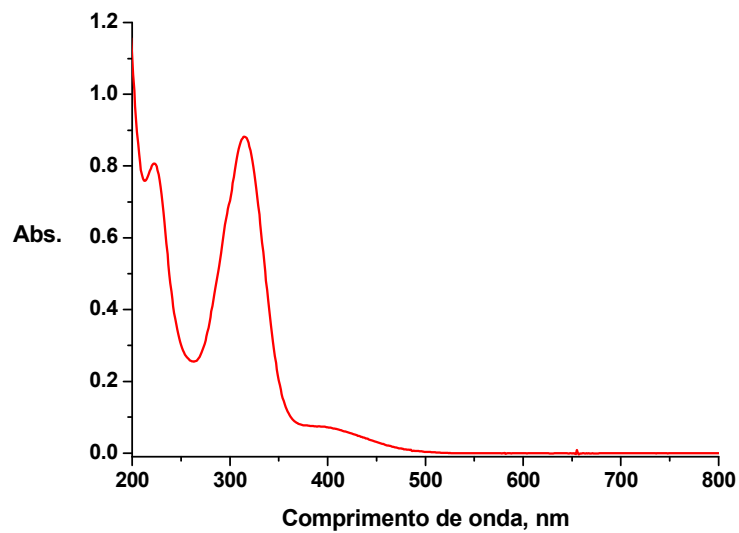


Figura 71. Espectro eletrônico em meio aquoso do íon complexo $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NA4OMet})]^{3-}$ pH = 6,8.

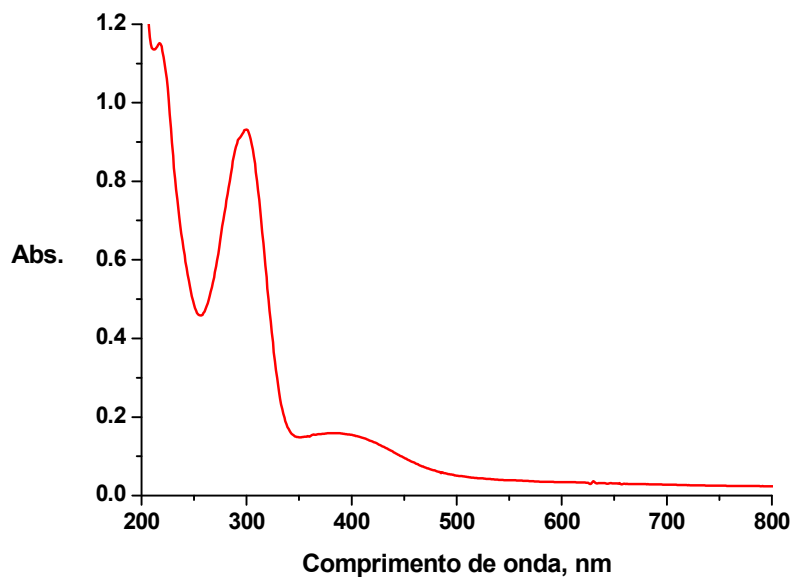


Figura 72. Espectro eletrônico em meio aquoso do íon complexo $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NA4F})]^{3-}$ pH = 6,8.

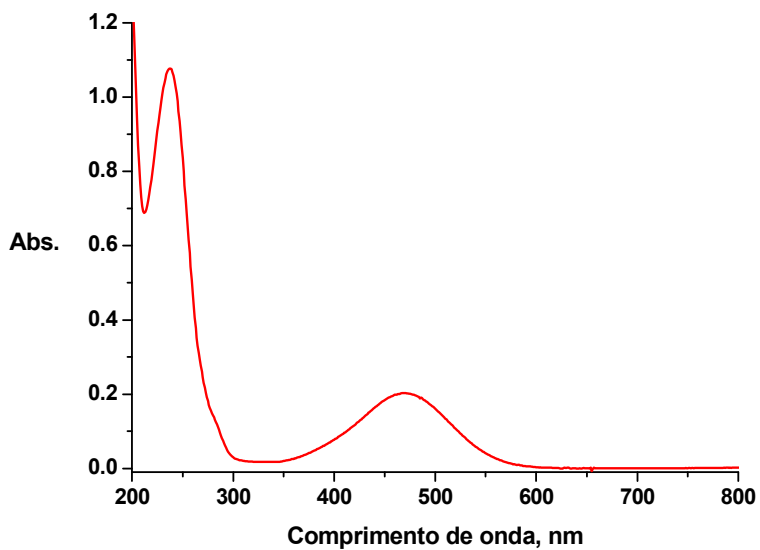


Figura 73. Espectro eletrônico em meio aquoso do íon complexo $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IO3H})]^{3-}$ pH = 6,8.

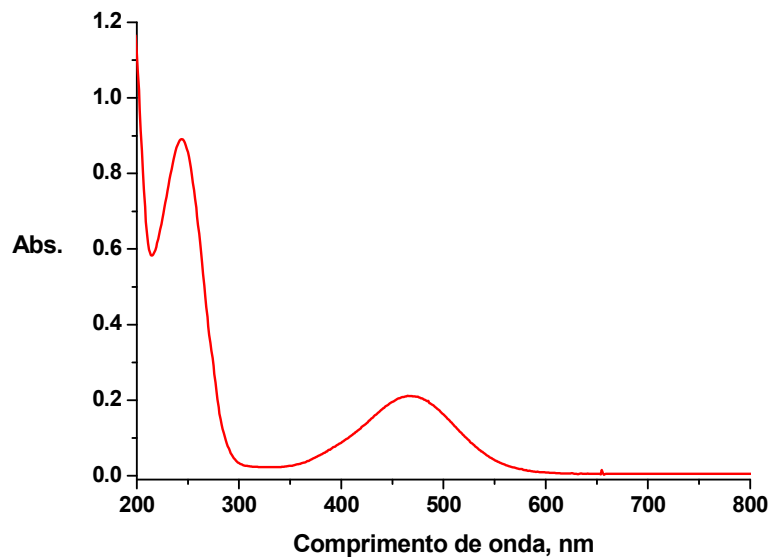


Figura 74. Espectro eletrônico em meio aquoso do íon complexo $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IO3Met})]^{3-}$ pH = 6,8.

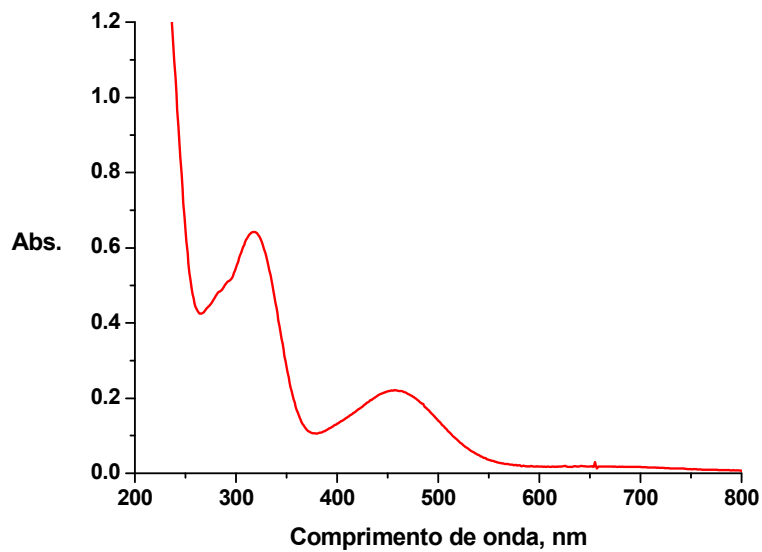


Figura 75. Espectro eletrônico em meio aquoso do íon complexo $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IO3S})]^{3-}$ pH = 6,8.

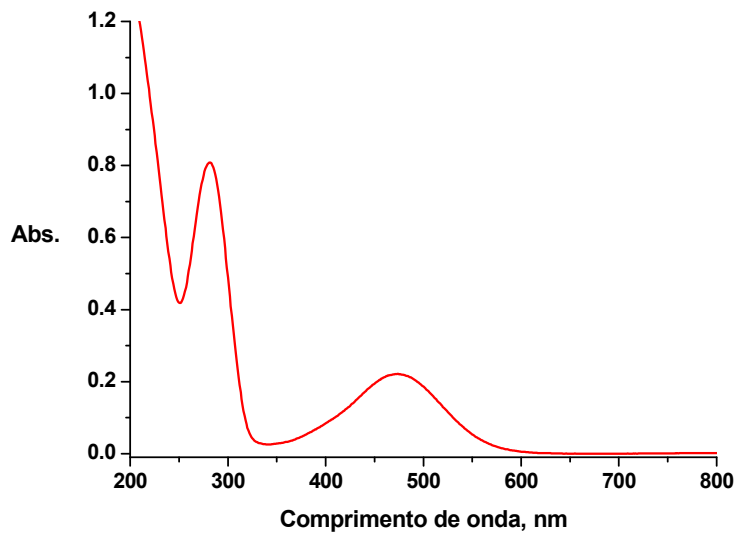


Figura 76. Espectro eletrônico em meio aquoso do íon complexo $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IO}_3\text{SMet})]^{3-}$ pH = 6,8.

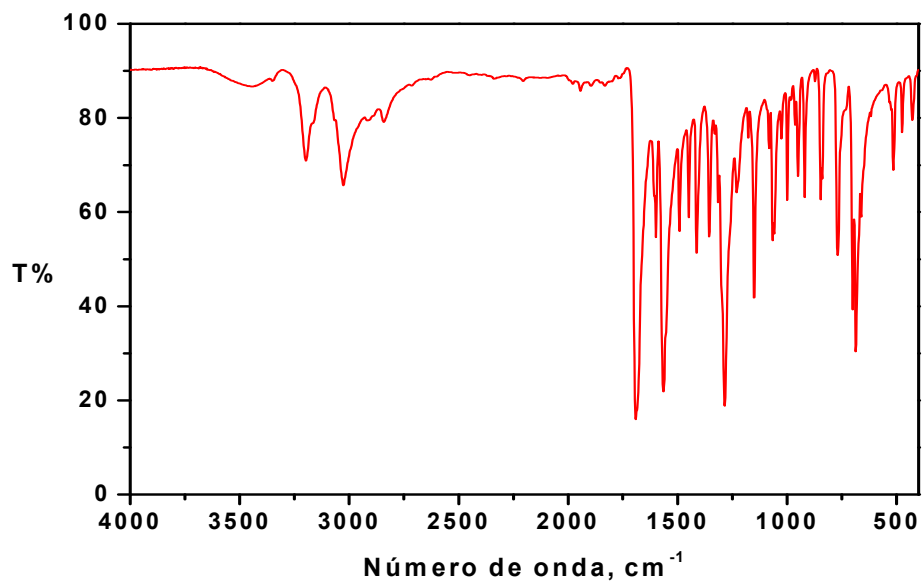


Figura 78. Espectro vibracional na região do infravermelho para o composto IA4H, em pastinha de KBr.

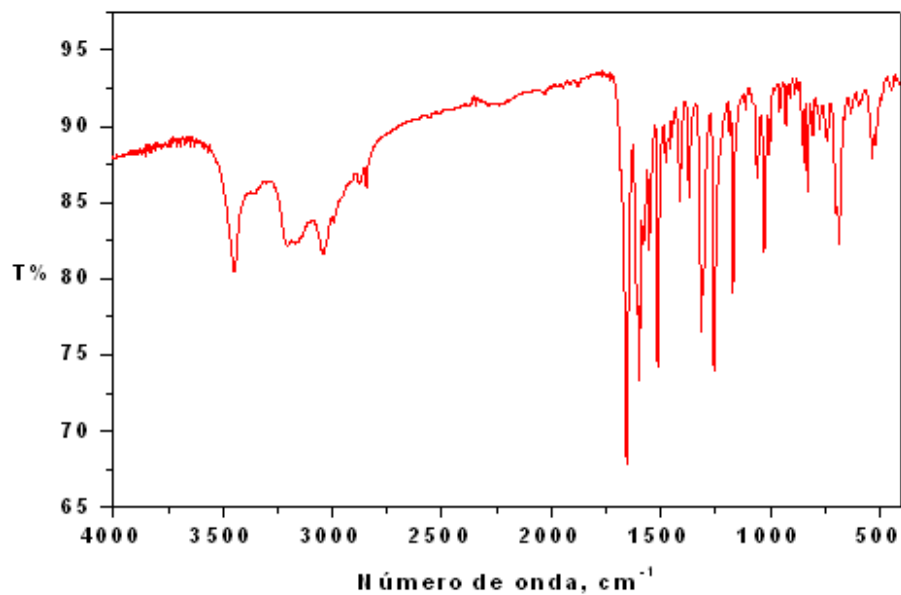


Figura 79. Espectro vibracional na região do infravermelho para o composto IA4OMet, em pastinha de KBr.

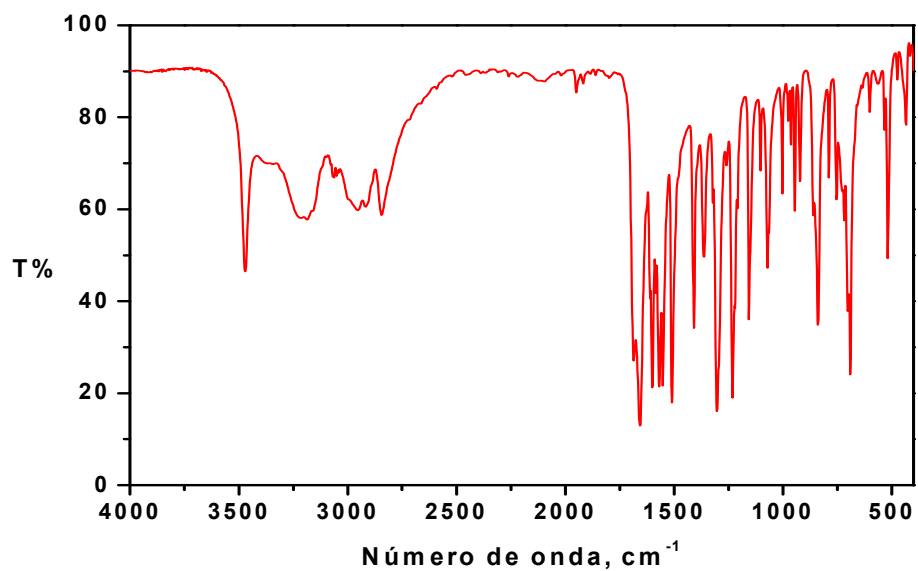


Figura 80. Espectro vibracional na região do infravermelho para o composto IA4F, em pastinha de KBr.

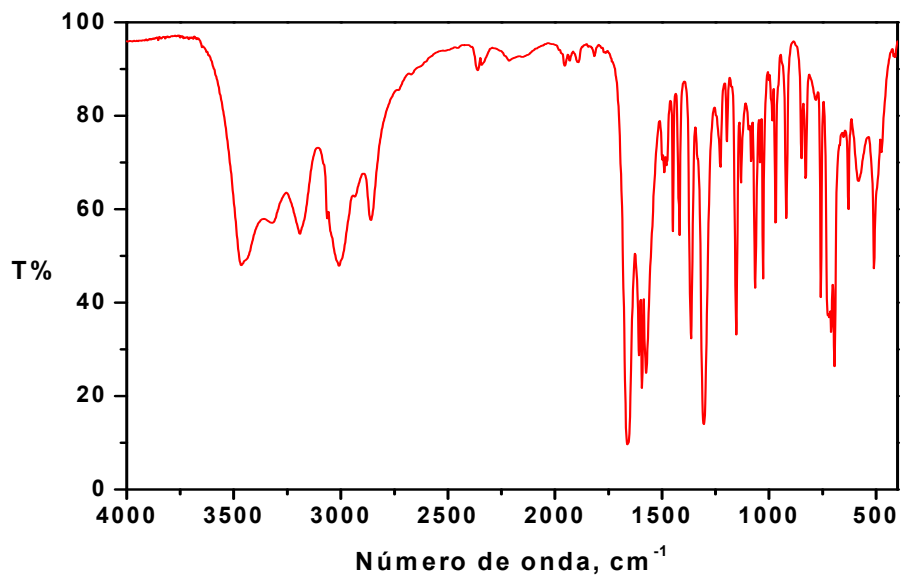


Figura 81. Espectro vibracional na região do infravermelho para o composto NA4H, em pastinha de KBr.

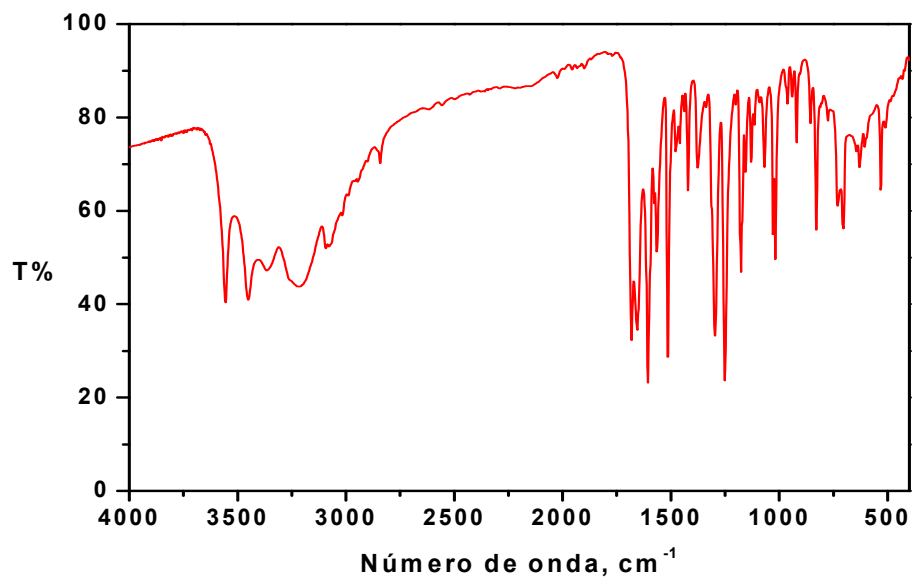


Figura 82. Espectro vibracional na região do infravermelho para o composto NA4OMet, em pastinha de KBr.

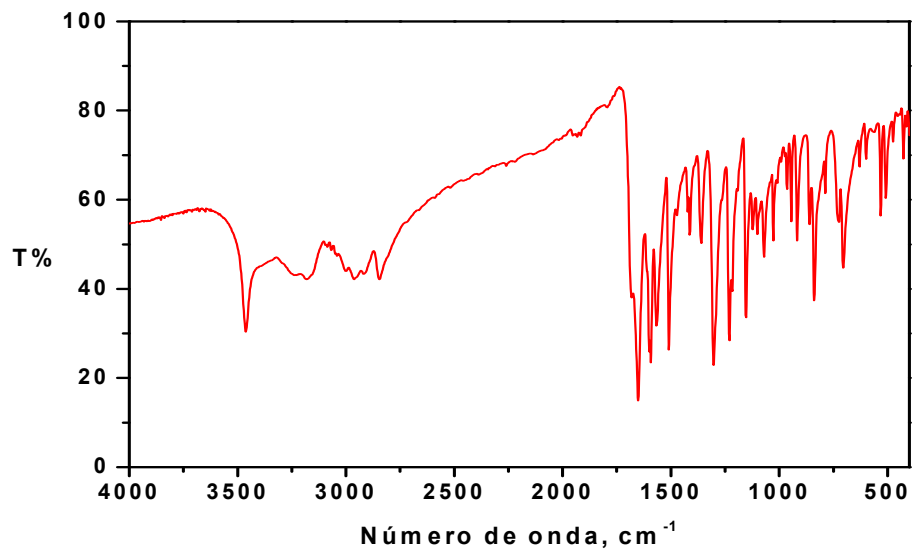


Figura 83. Espectro vibracional na região do infravermelho para o composto NA4F, em pastinha de KBr.

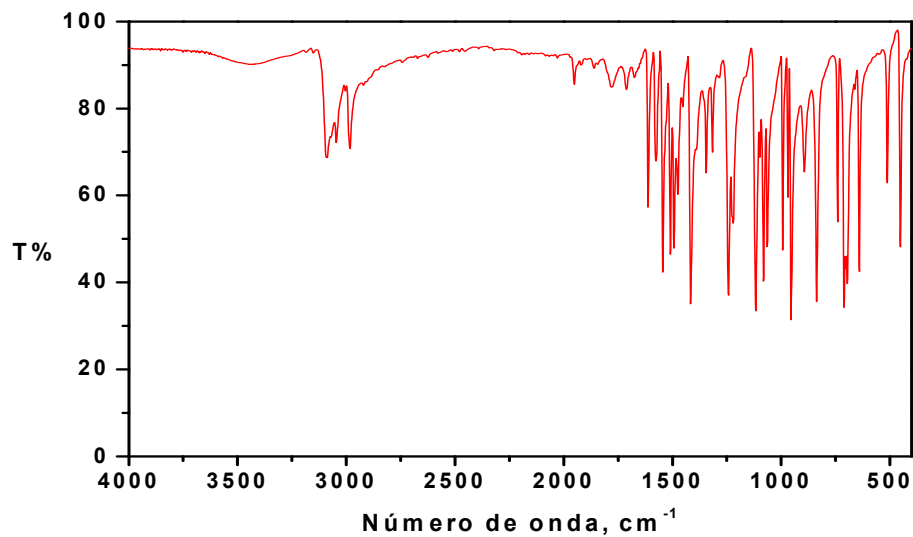


Figura 84. Espectro vibracional na região do infravermelho para o composto IO3H, em pastinha de KBr.

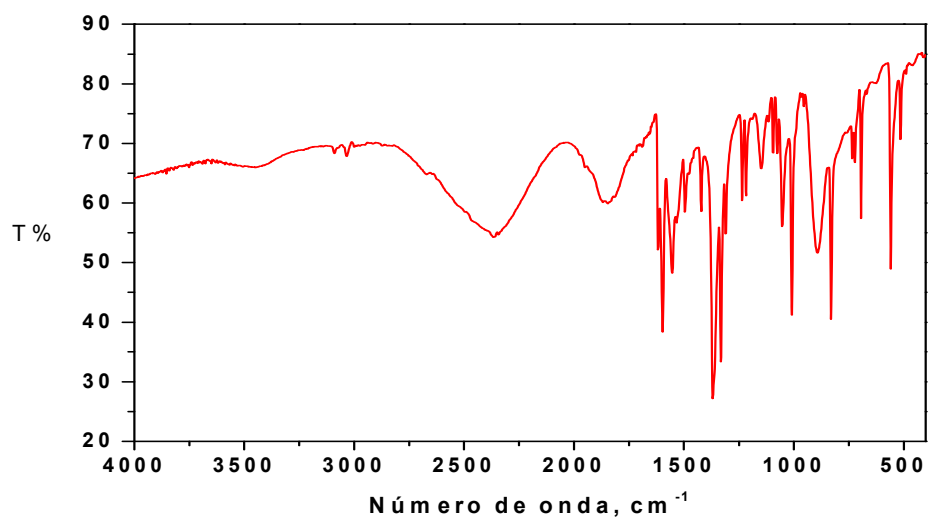


Figura 85. Espectro vibracional na região do infravermelho para o composto IO3S, em pastinha de KBr.

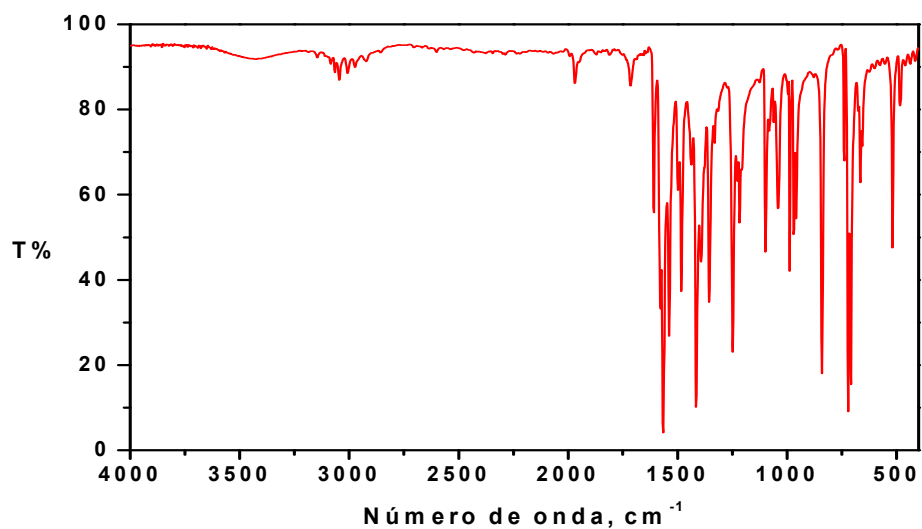


Figura 86. Espectro vibracional na região do infravermelho para o composto IO3Met, em pastinha de KBr.

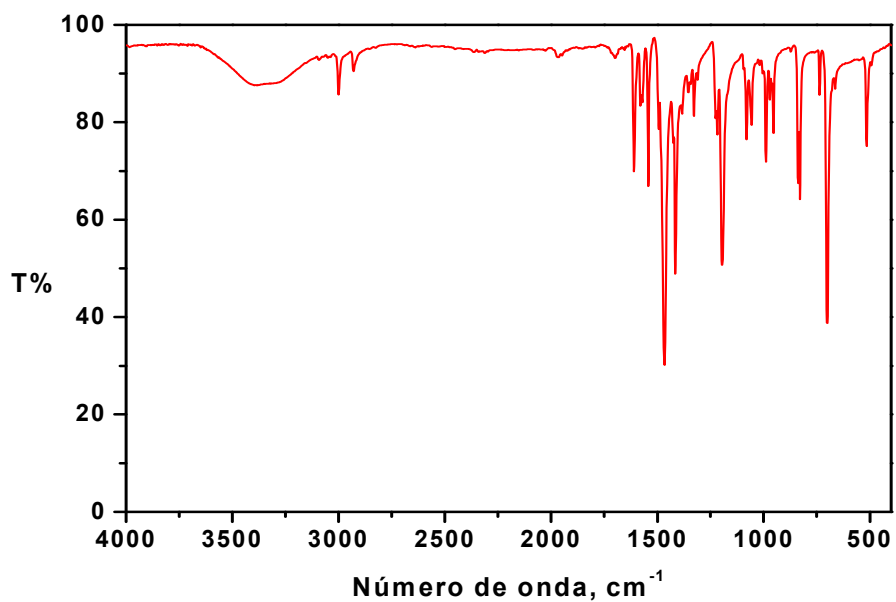


Figura 87. Espectro vibracional na região do infravermelho para o composto IO3SMet, em pastinha de KBr.

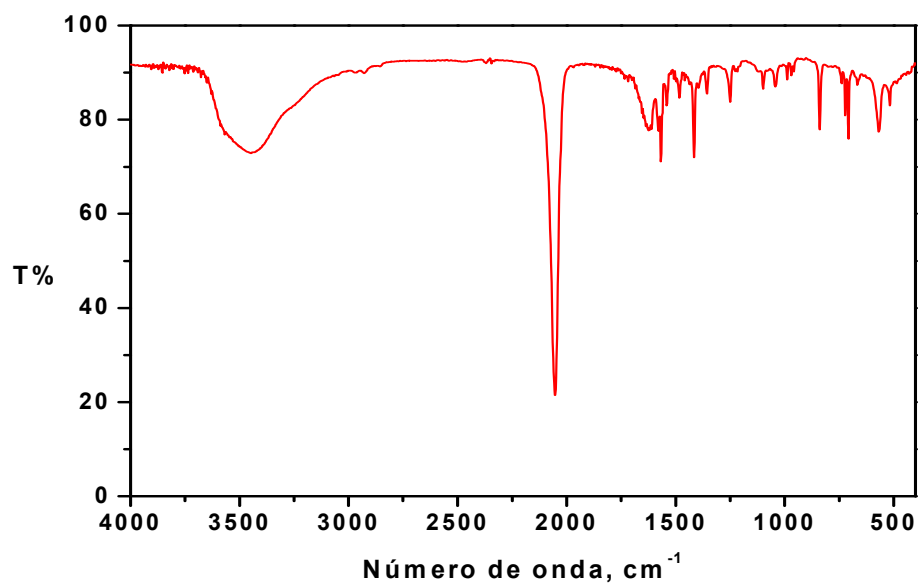


Figura 88. Espectro vibracional na região do infravermelho para o complexo $\text{Na}_3[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IA4H})].x\text{H}_2\text{O}$, em pastinha de KBr.

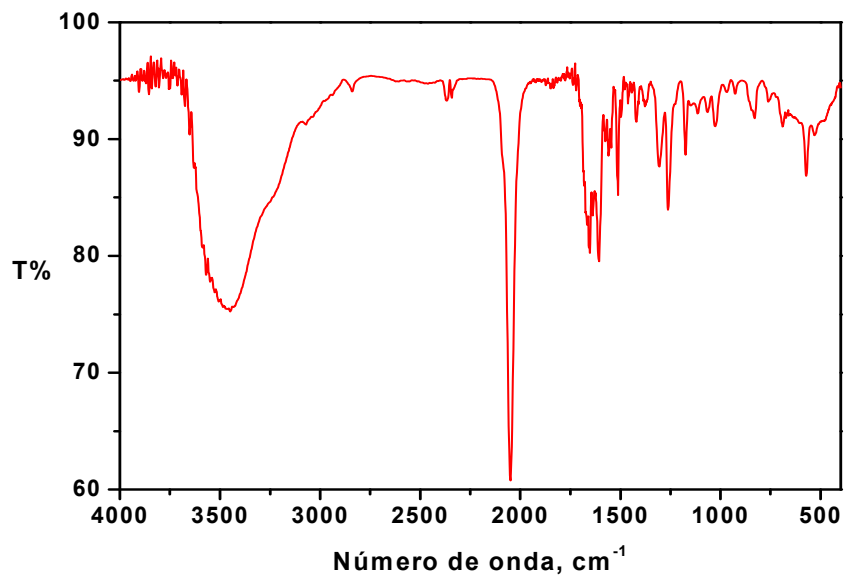


Figura 89. Espectro vibracional na região do infravermelho para o complexo $\text{Na}_3[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IA4OMet})] \cdot x\text{H}_2\text{O}$, em pastinha de KBr.

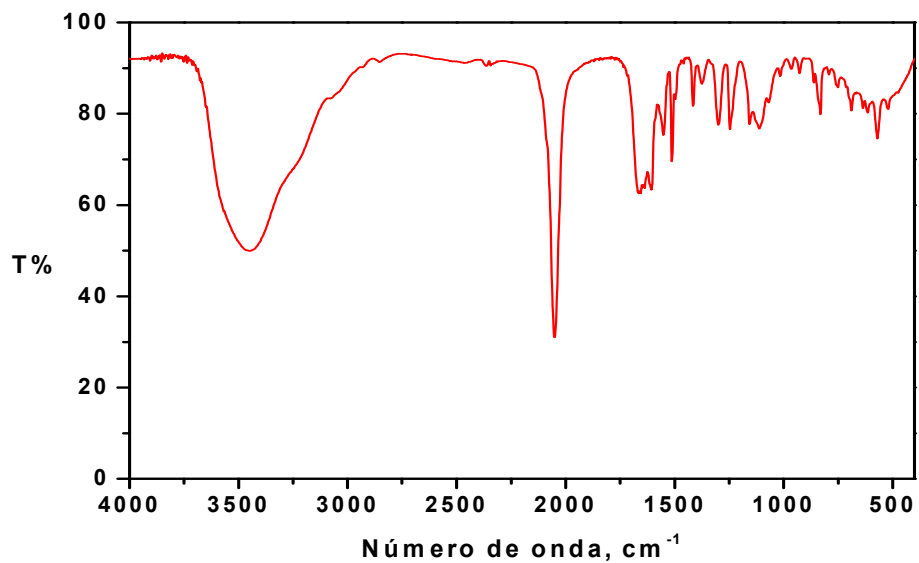


Figura 90. Espectro vibracional na região do infravermelho para o complexo $\text{Na}_3[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IA4F})] \cdot x\text{H}_2\text{O}$, em pastinha de KBr.

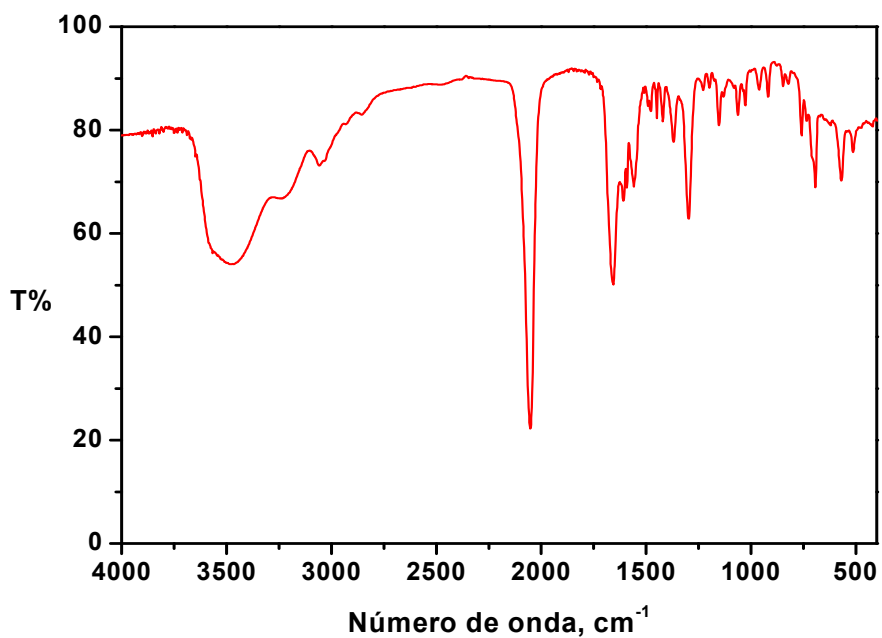


Figura 91. Espectro vibracional na região do infravermelho para o complexo $\text{Na}_3[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NA4H})] \cdot x\text{H}_2\text{O}$, em pastinha de KBr.

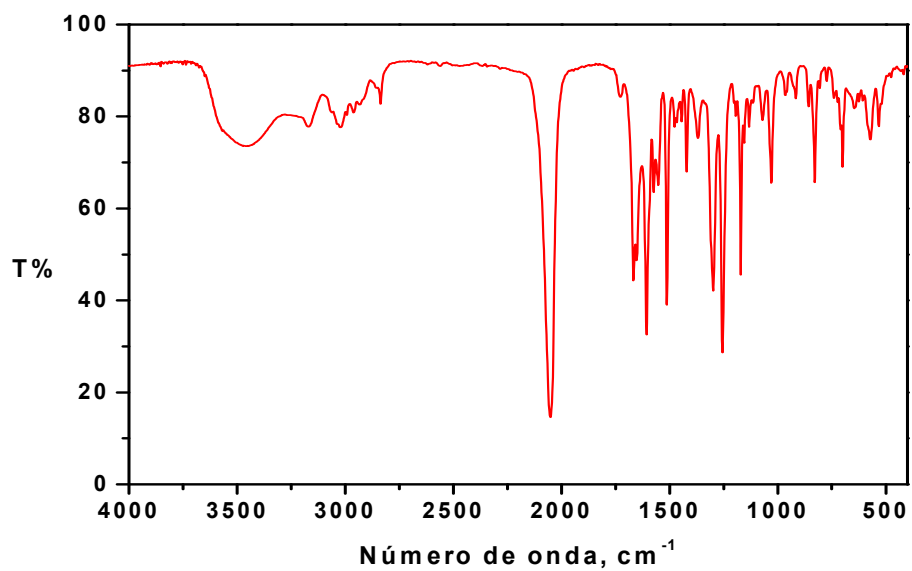


Figura 92. Espectro vibracional na região do infravermelho para o complexo $\text{Na}_3[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NA4OMet})] \cdot x\text{H}_2\text{O}$, em pastinha de KBr.

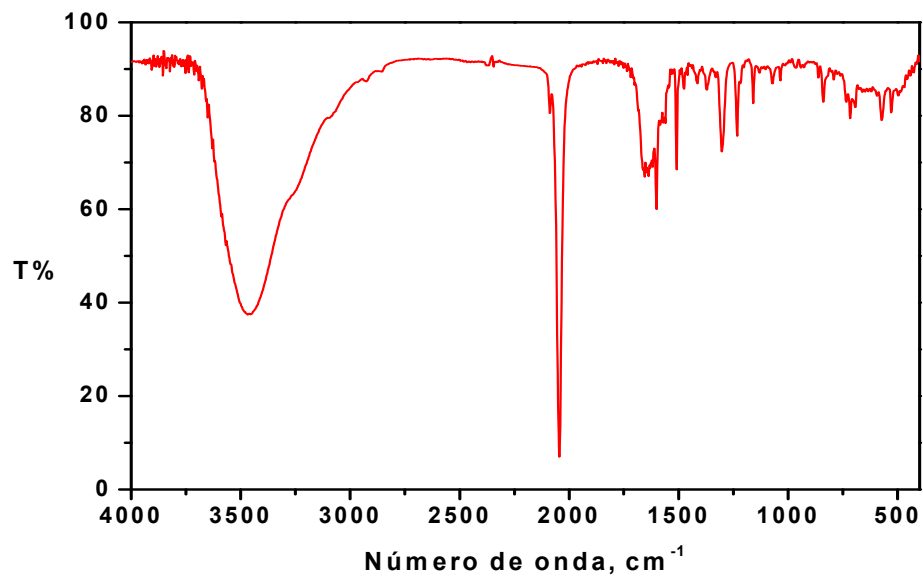


Figura 93. Espectro vibracional na região do infravermelho para o complexo $\text{Na}_3[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NA4F})] \cdot x\text{H}_2\text{O}$, em pastinha de KBr.

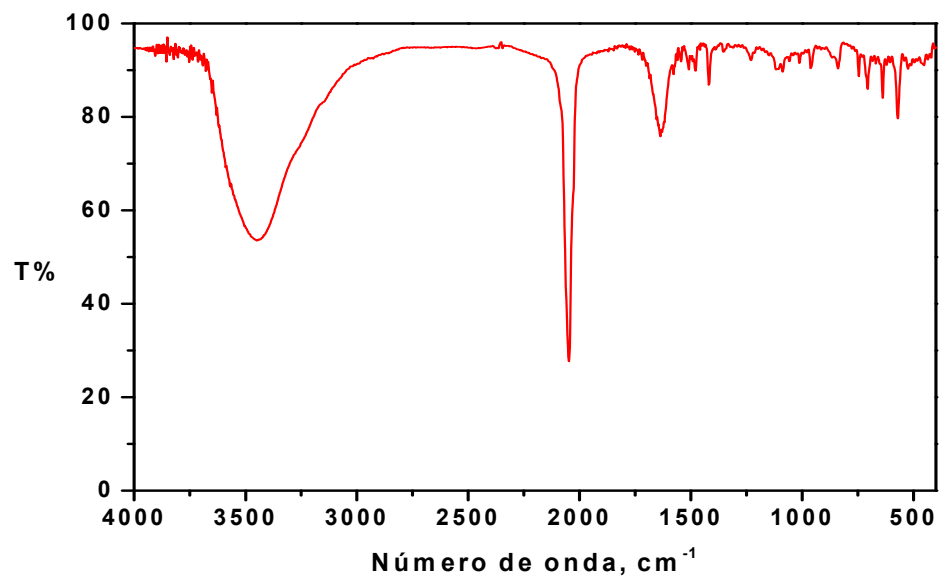


Figura 94. Espectro vibracional na região do infravermelho para o complexo $\text{Na}_3[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IO3H})] \cdot x\text{H}_2\text{O}$, em pastinha de KBr.

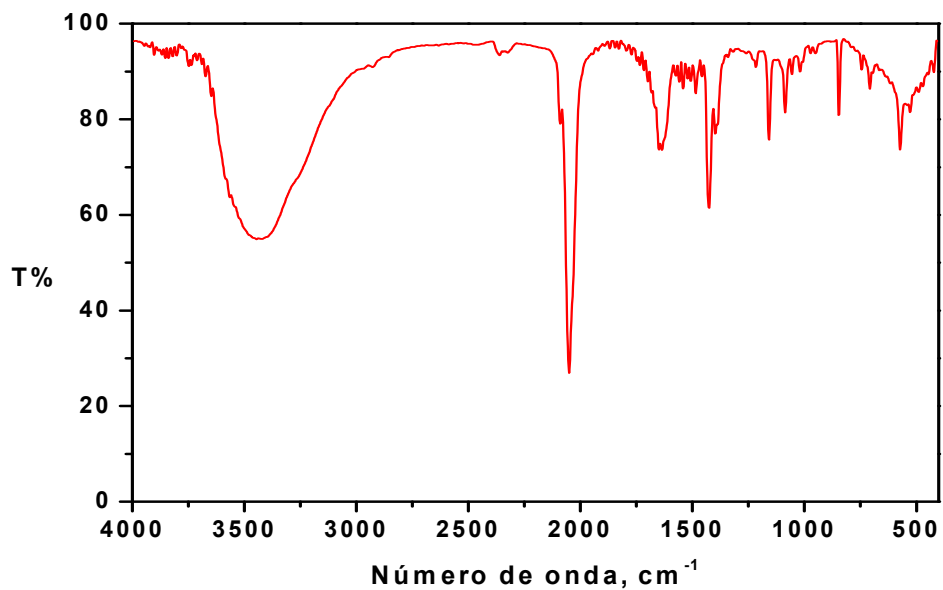


Figura 95. Espectro vibracional na região do infravermelho para o complexo $\text{Na}_3[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IO}_3\text{S})] \cdot x\text{H}_2\text{O}$, em pastinha de KBr.

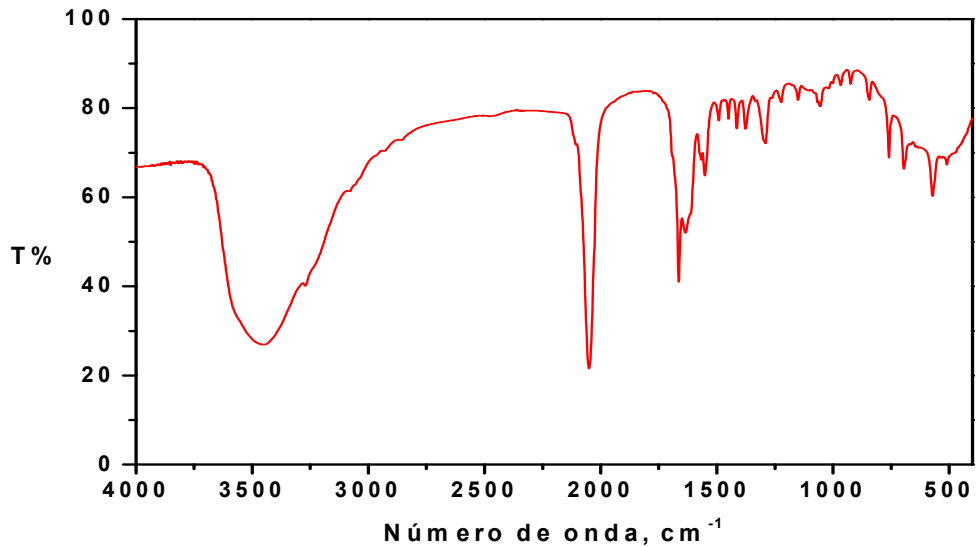


Figura 96. Espectro vibracional na região do infravermelho para o complexo $\text{Na}_3[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IO}_3\text{Met})] \cdot x\text{H}_2\text{O}$, em pastinha de KBr.

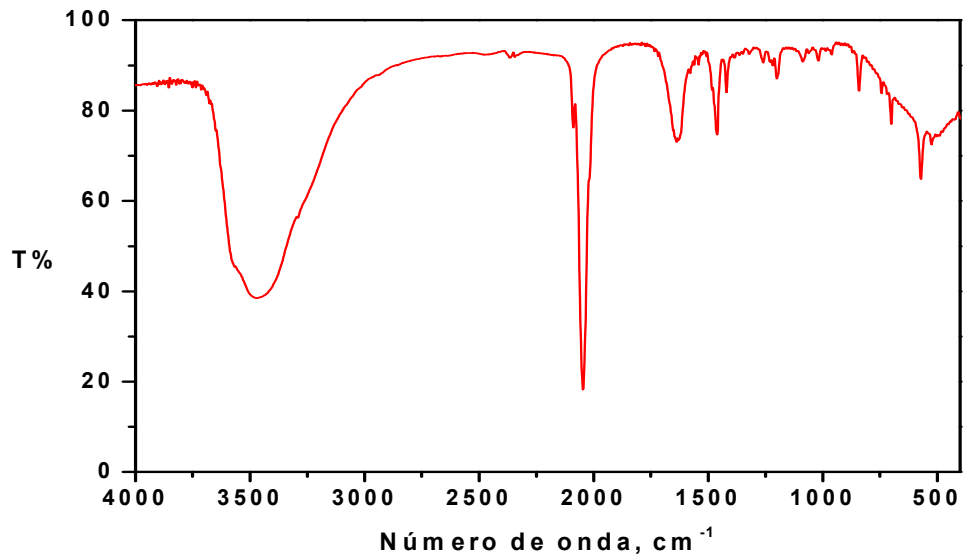


Figura 97. Espectro vibracional na região do infravermelho para o complexo $\text{Na}_3[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IO3SMet})] \cdot x\text{H}_2\text{O}$, em pastinha de KBr.

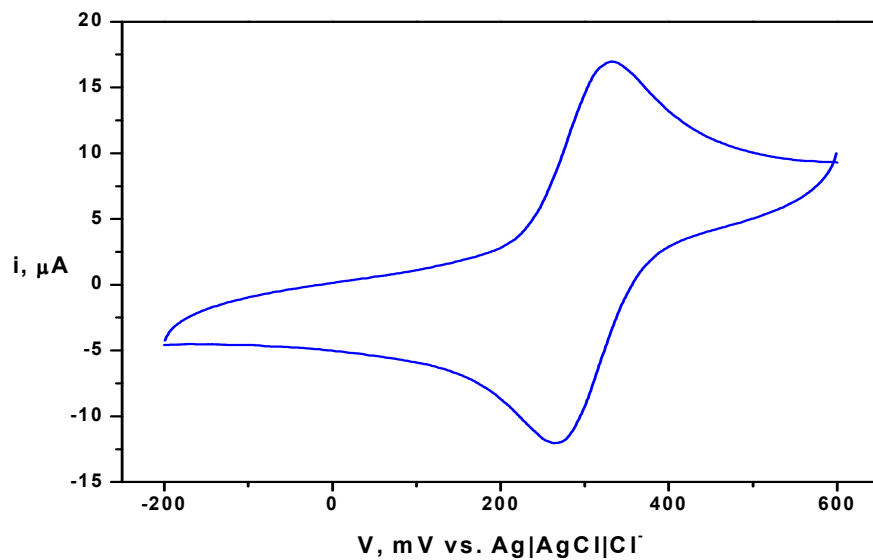


Figura 101. Voltamograma cíclico do eletrodo de carbono vítreo em solução aquosa (NaTFA $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, $\text{pH} = 6,8$) contendo o íon complexo $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IA4H})]^{3-}$, $v = 100 \text{ mV/s}$.

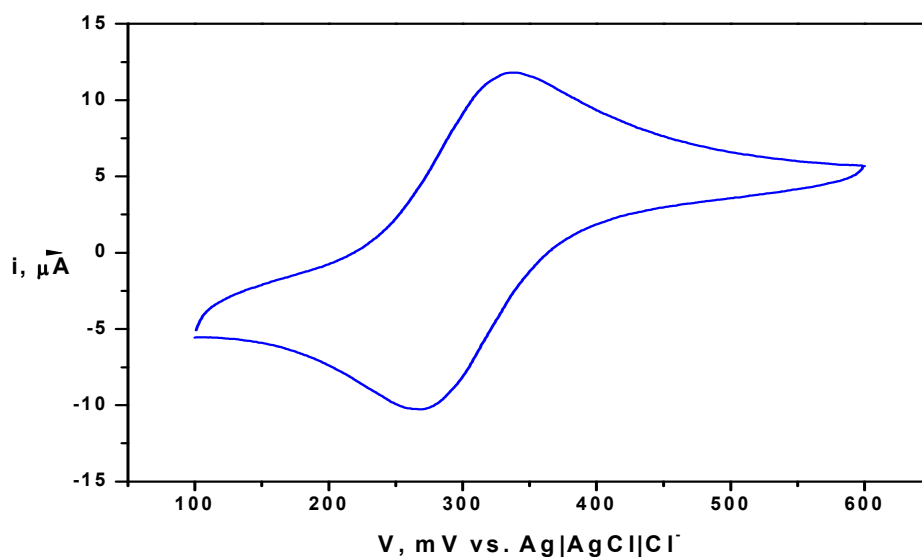


Figura 102. Voltamograma cíclico do eletrodo de carbono vítreo em solução aquosa (NaTFA 0,1 mol.L⁻¹, pH = 6,8) contendo o íon complexo [Fe(CN)₅(IA4OMet)]³⁻, v = 100mV/s.

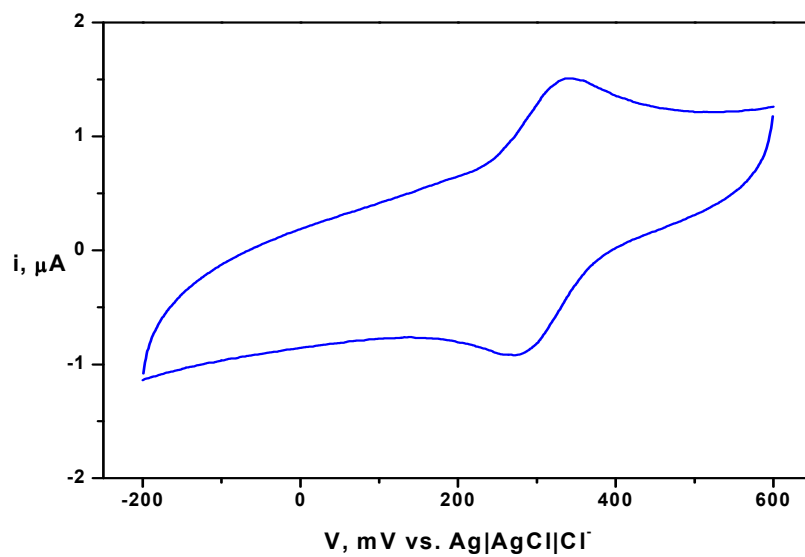


Figura 103. Voltamograma cíclico do eletrodo de carbono vítreo em solução aquosa (NaTFA 0,1 mol.L⁻¹, pH = 6,8) contendo o íon complexo [Fe(CN)₅(IA4F)]³⁻, v = 100mV/s.

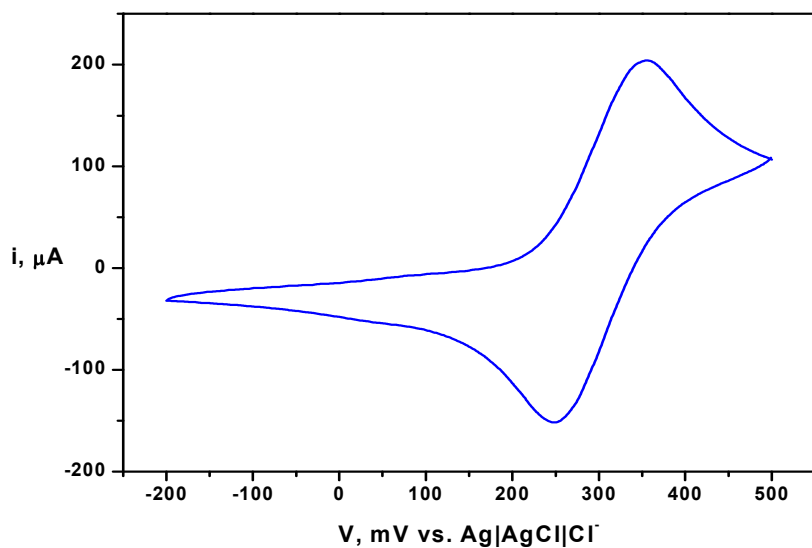


Figura 104. Voltamograma cíclico do eletrodo de carbono vítreo em solução aquosa (NaTFA $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, $\text{pH} = 6,8$) contendo o íon complexo $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NA4H})]^{3-}$, $v = 100\text{mV/s}$.

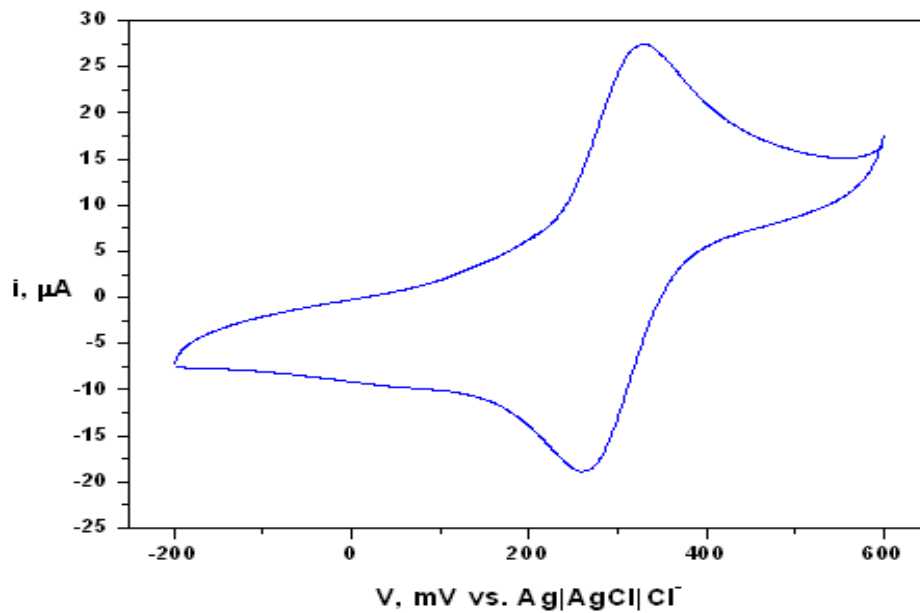


Figura 105. Voltamograma cíclico do eletrodo de carbono vítreo em solução aquosa (NaTFA $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, $\text{pH} = 6,8$) contendo o íon complexo $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NA4OMet})]^{3-}$, $v = 100\text{mV/s}$.

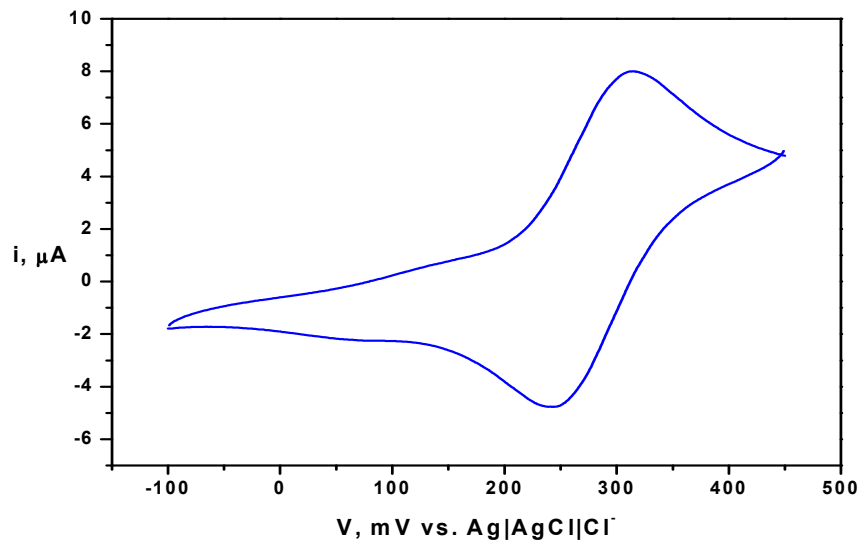


Figura 106. Voltamograma cíclico do eletrodo de carbono vítreo em solução aquosa (NaTFA 0,1 mol.L⁻¹, pH = 6,8) contendo o íon complexo $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NA4F})]^{3-}$, $v = 100\text{mV/s}$.

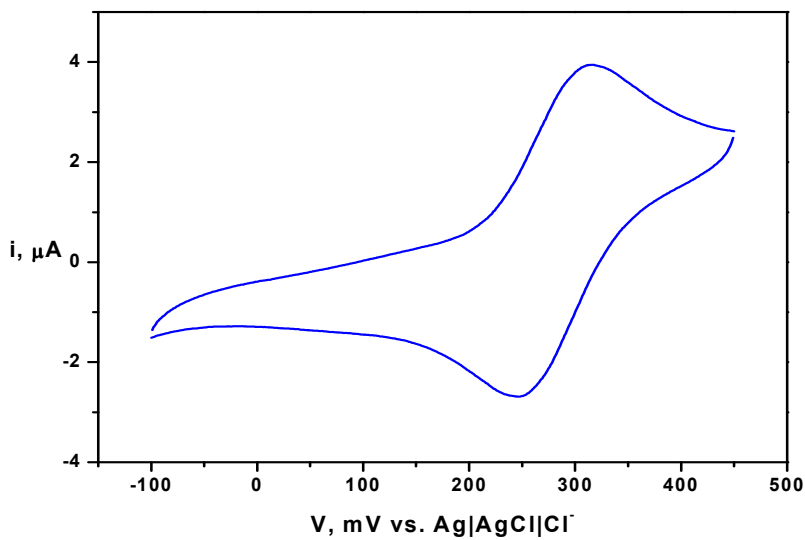


Figura 107. Voltamograma cíclico do eletrodo de carbono vítreo em solução aquosa (NaTFA 0,1 mol.L⁻¹, pH = 6,8) contendo o íon complexo $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IO3H})]^{3-}$, $v = 100\text{mV/s}$.

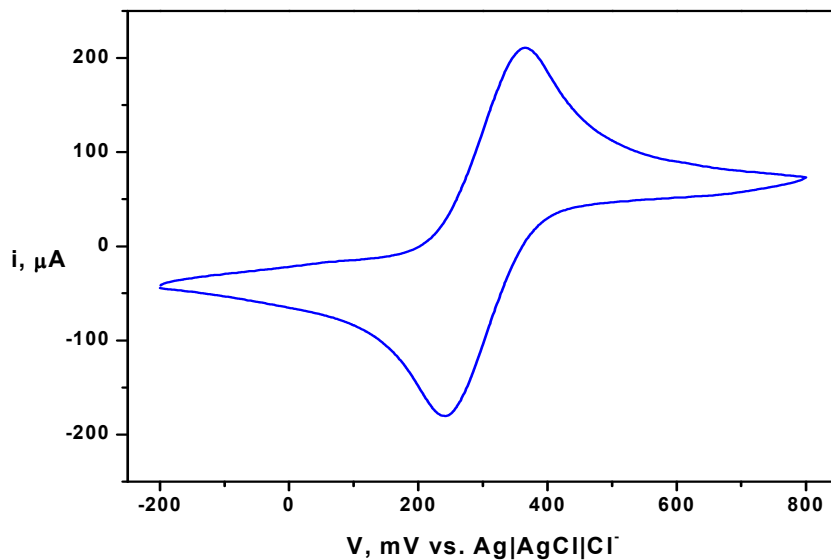


Figura 108. Voltamograma cíclico do eletrodo de carbono vítreo em solução aquosa (NaTFA $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, $\text{pH} = 6,8$) contendo o íon complexo $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IO3Met})]^{3-}$, $v = 100\text{mV/s}$.

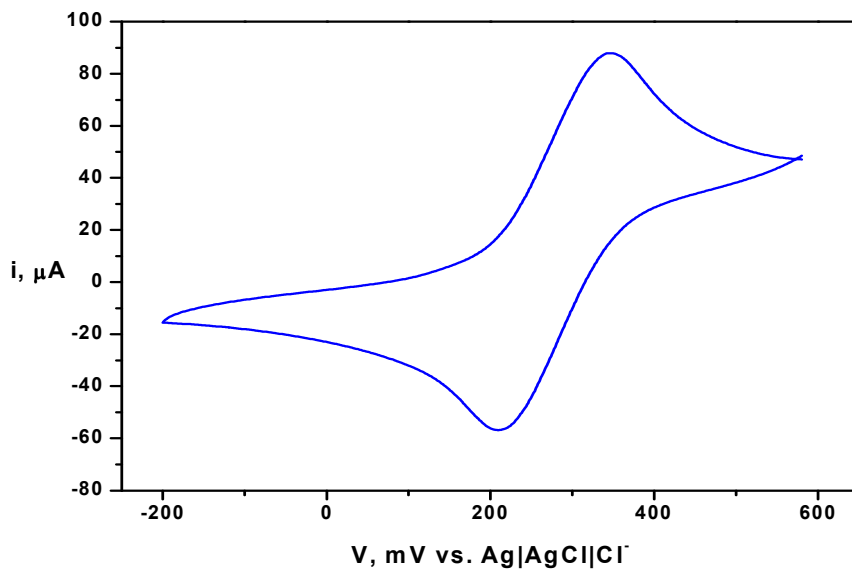


Figura 109. Voltamograma cíclico do eletrodo de carbono vítreo em solução aquosa (NaTFA $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, $\text{pH} = 6,8$) contendo o íon complexo $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IO3S})]^{3-}$, $v = 100\text{mV/s}$.

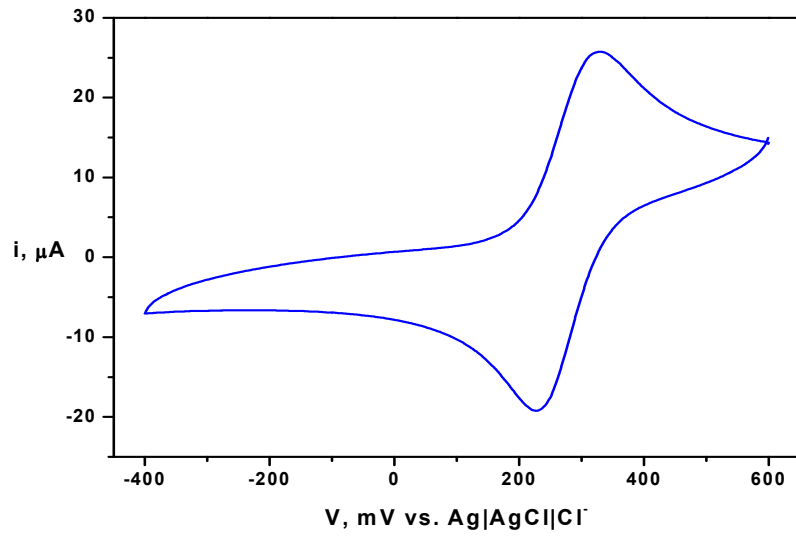
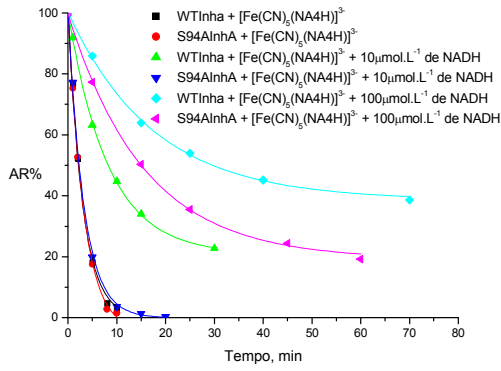
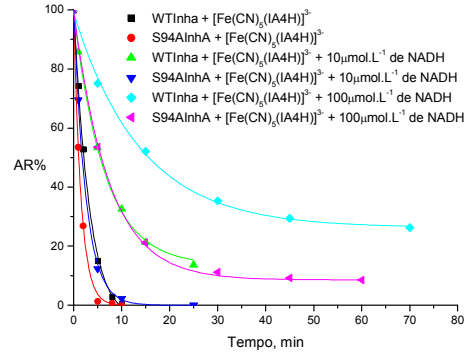


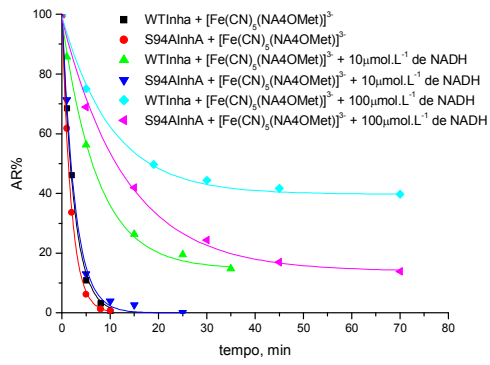
Figura 110. Voltamograma cíclico do eletrodo de carbono vítreo em solução aquosa (NaTFA $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, $\text{pH} = 6,8$) contendo o íon complexo $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{IO}_3\text{SMet})]^{3-}$, $v = 100\text{mV/s}$.



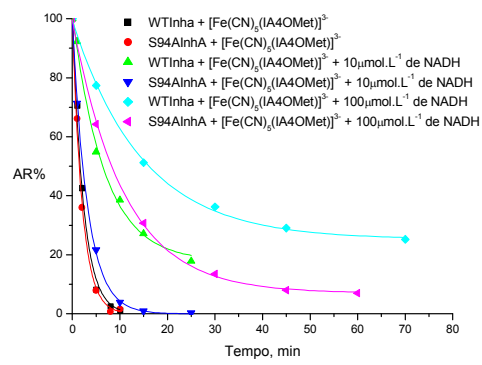
(a)



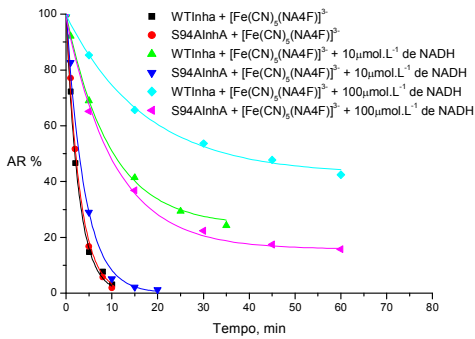
(b)



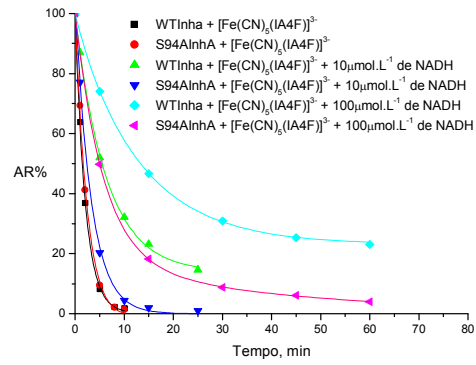
(c)



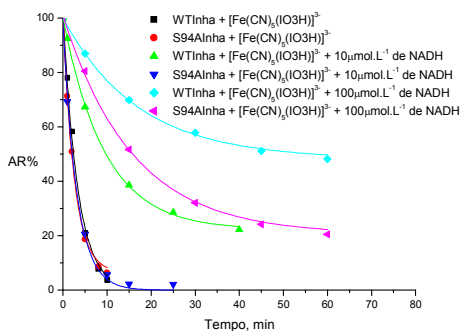
(d)



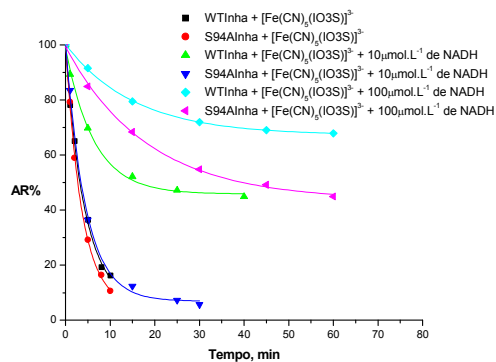
(e)



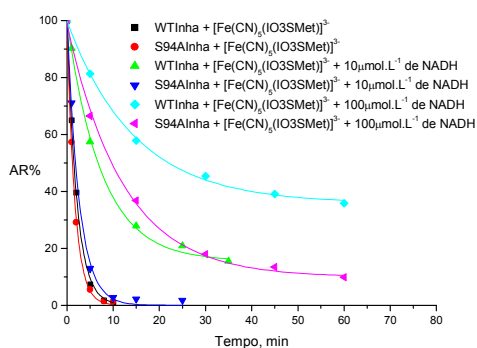
(f)



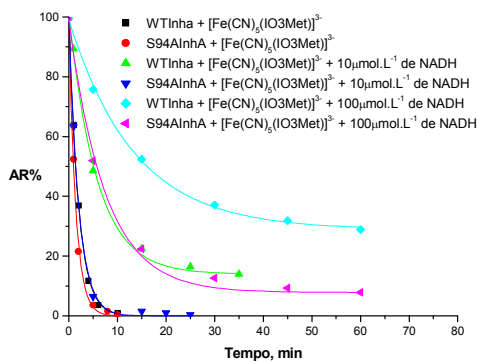
(g)



(h)



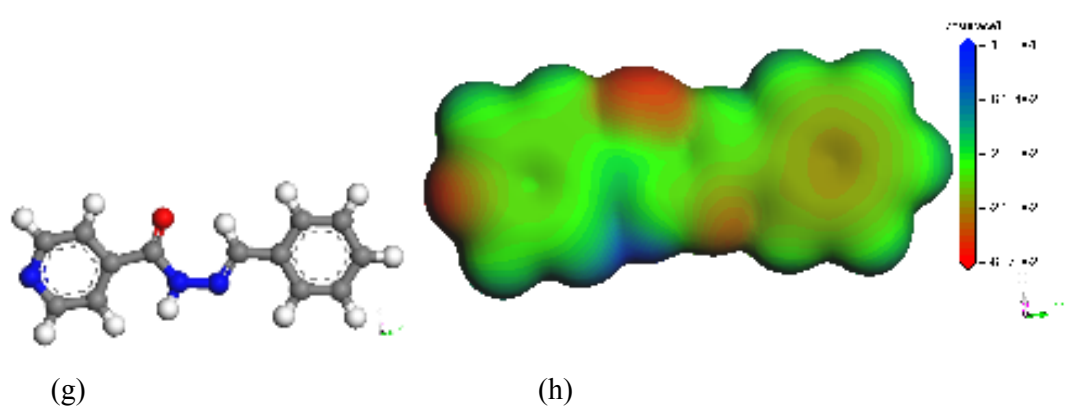
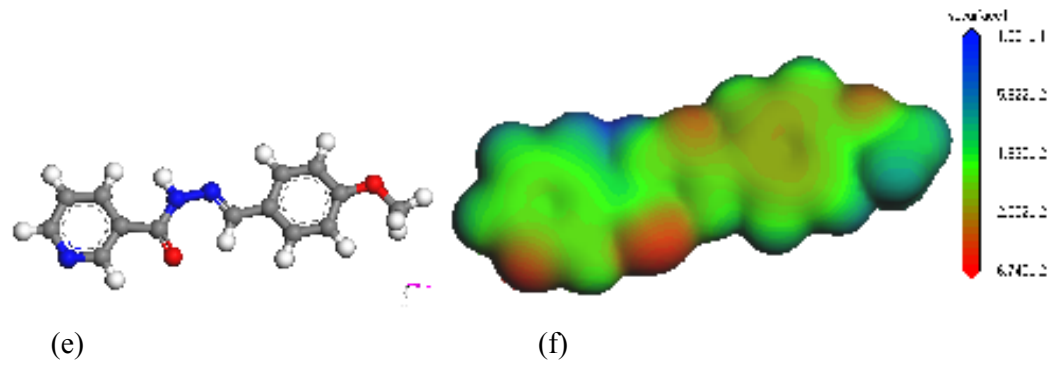
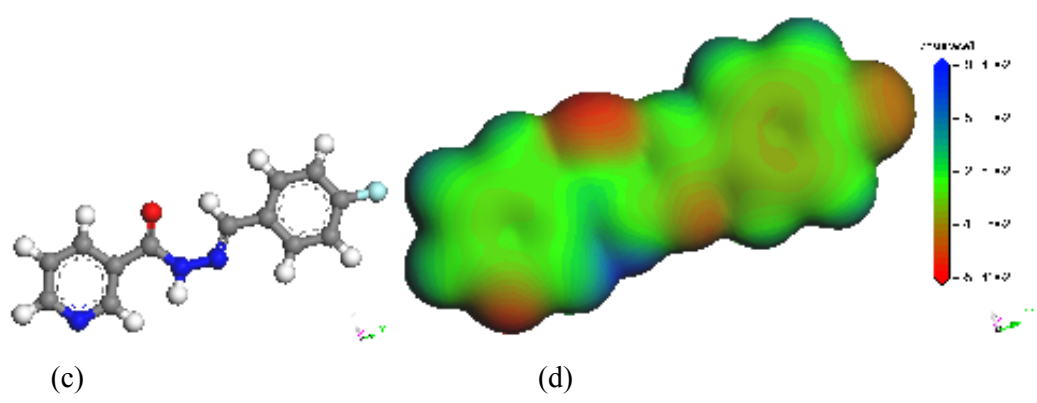
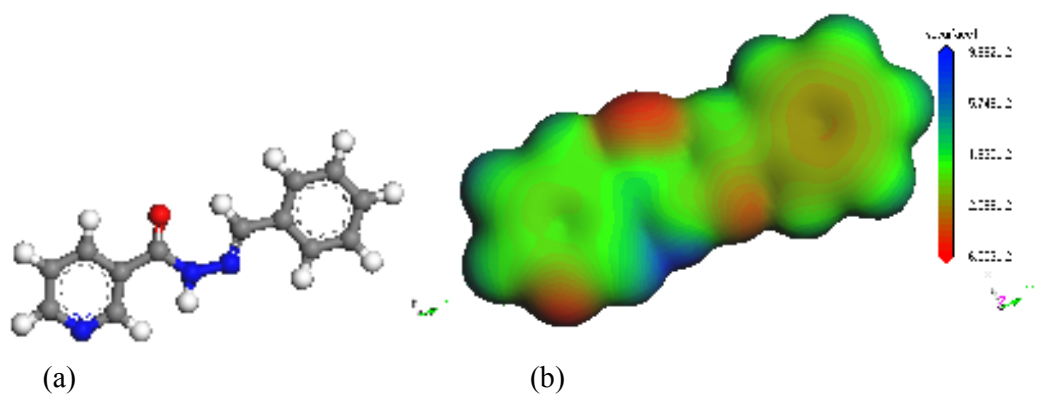
(i)



(j)

Figura 111. Gráfico de Atividade Residual (%AR) da enzima InhA inibida com o íon $[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{L}]^{3-}$, onde L = (a) NA4H; (b) IA4H; (c) NA4OMet; (d) IA4OMet; (e) NA4F; (f) IA4F; (g) IO3H; (h) IO3S; (i) IO3SMet; (j) IO3Met. (■ = Wt InhA selvagem + complexo na presença de $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de NADH; ▼ = S94A InhA + complexo na presença de $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de NADH; ◆ = Wt InhA + complexo na presença de $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de NADH; ◀ = S94A InhA + complexo na presença de $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de NADH).

Para os ligantes hidrazonas



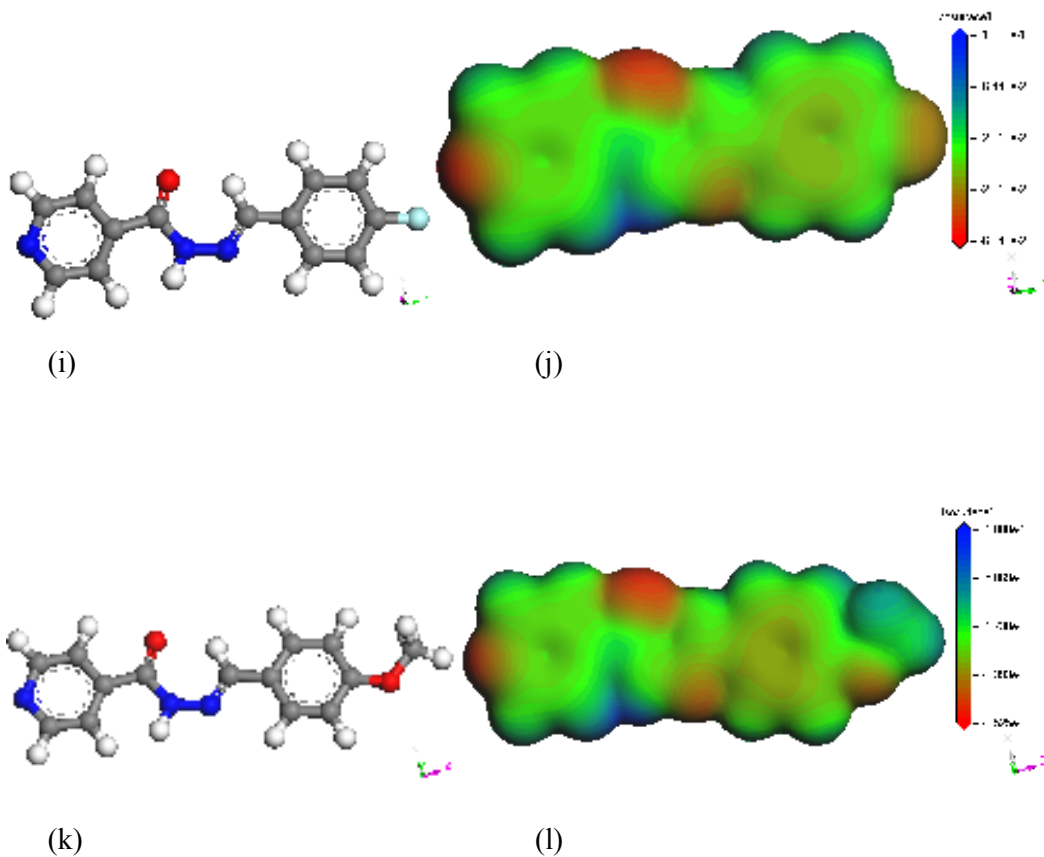
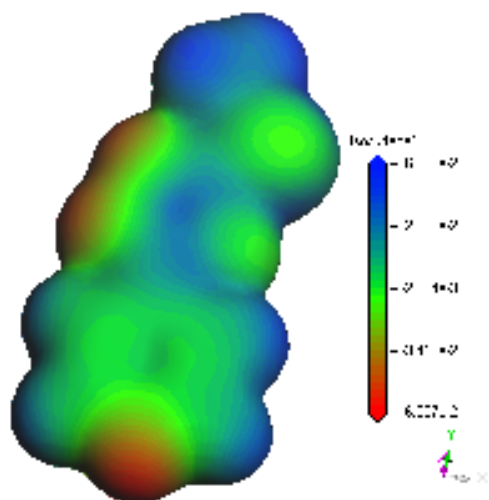
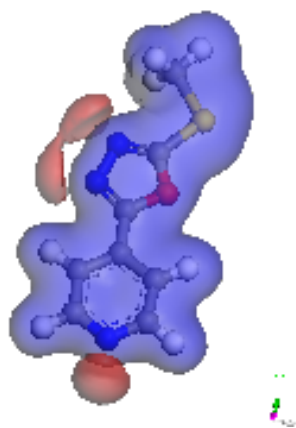
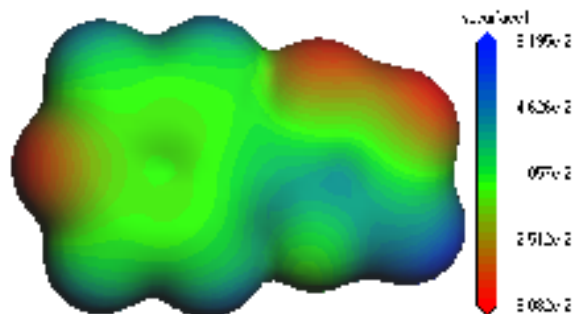
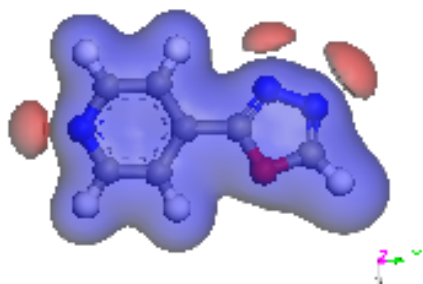
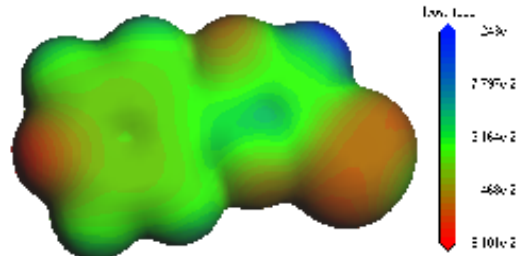
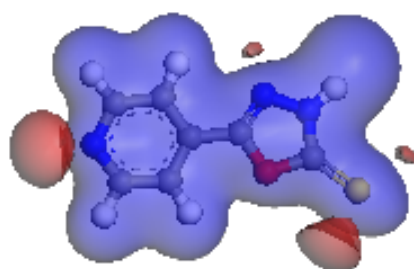


Figura 112. Estrutura otimizada para os ligantes hidrazonas e sua densidade eletrônica molecular total com gradiente de potencial eletrotático. Estruturas otimizadas: (a) NA4H; (c) NA4F; (e) NA4OMet; (g) IA4H; (i) IA4F; (k) IA4OMet. Gradiente de potencial eletrostático: (b) NA4H; (d) NA4F; (f) NA4OMet; (h) IA4H; (j) IA4F; (l) IA4OMet

Para os ligantes oxadiazóis



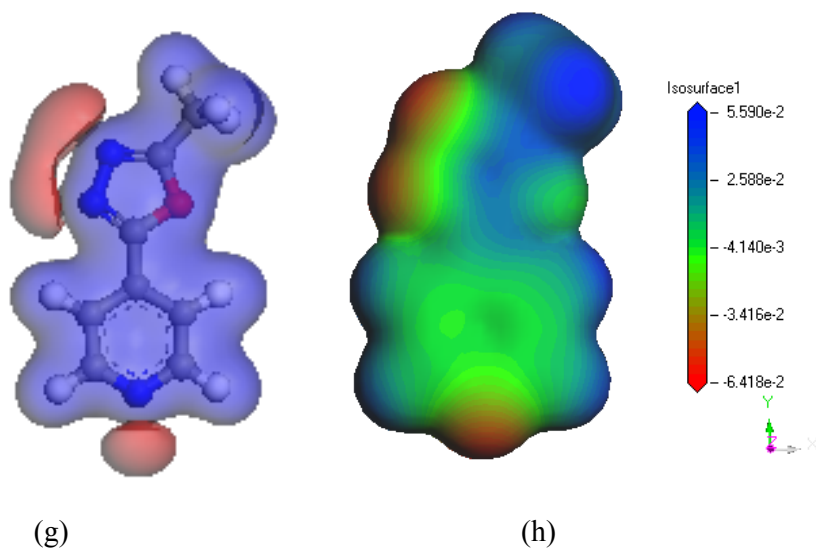
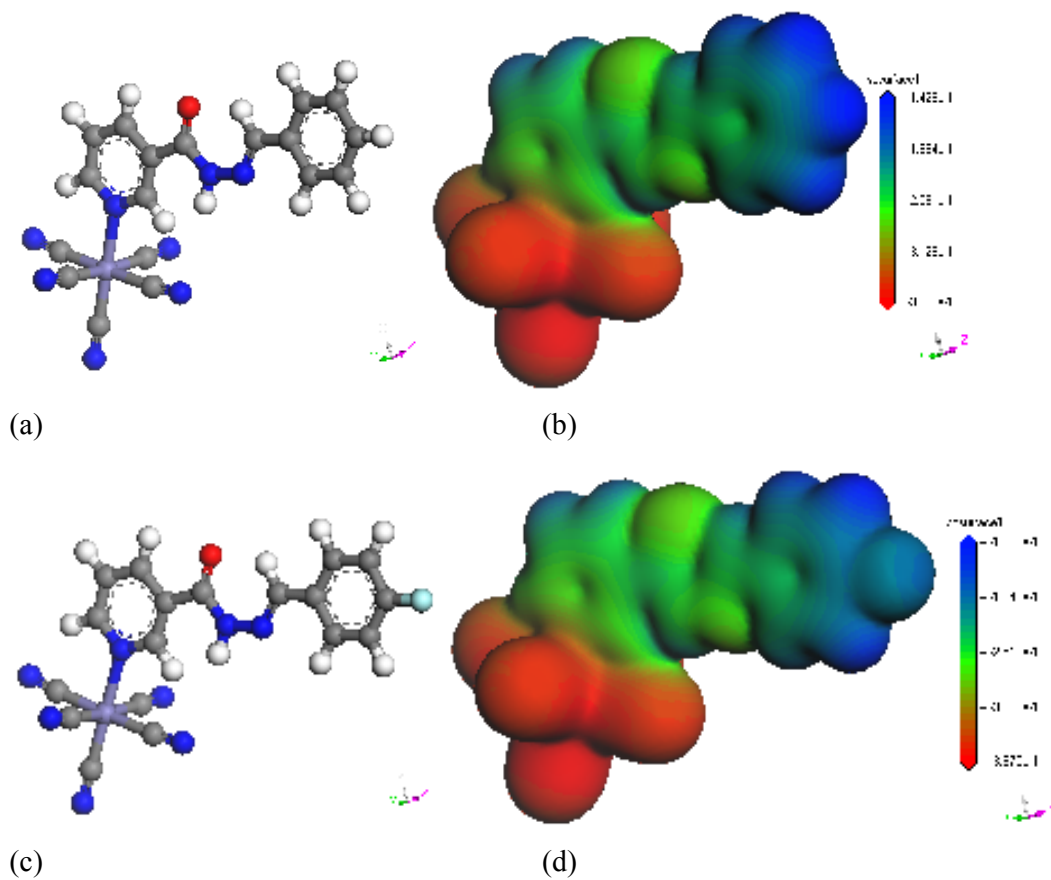
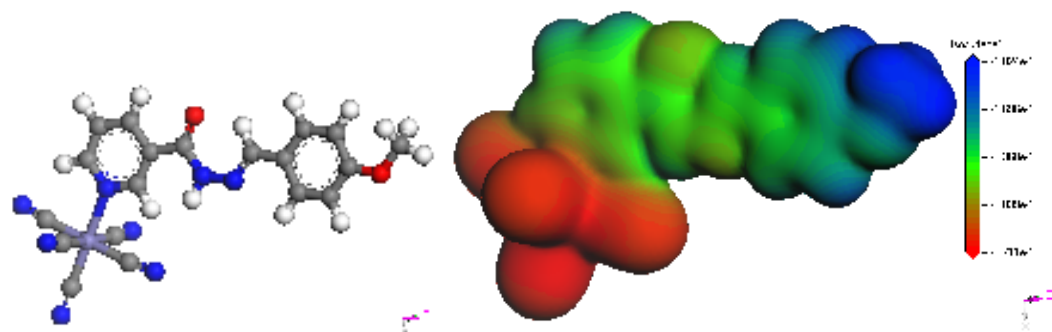


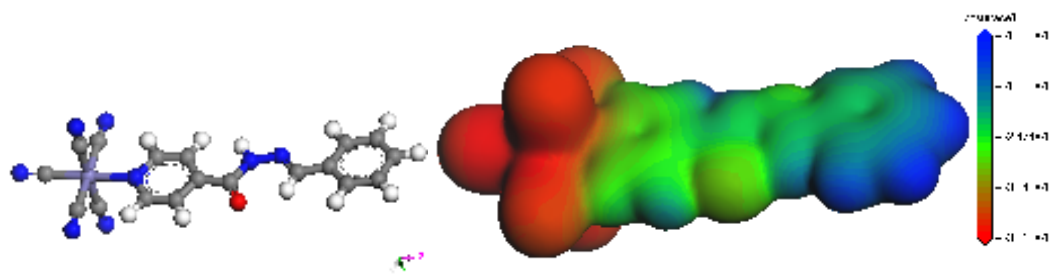
Figura 113. Estrutura otimizada contornada pelo potencial eletrostático para os ligantes oxadiazóis e sua densidade eletrônica molecular total com gradiente de potencial eletrotático. Estruturas otimizadas: (a) IO3S; (c) IO3H; (e) IO3SMet; (g) IO3Met. Gradiente de potencial eletrostático: (b) IO3S; (d) IO3H; (f) IO3SMet; (h) IO3Met.





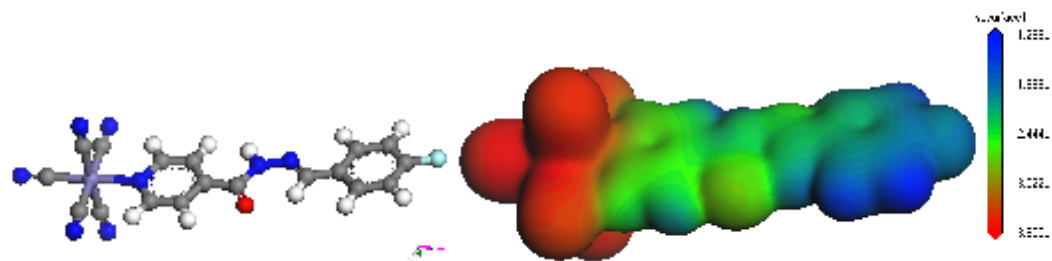
(e)

(f)



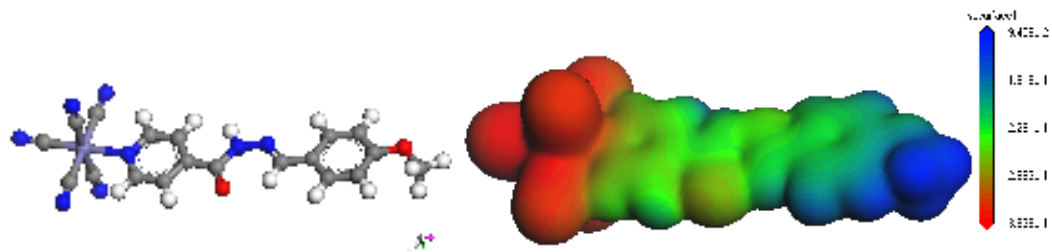
(g)

(h)



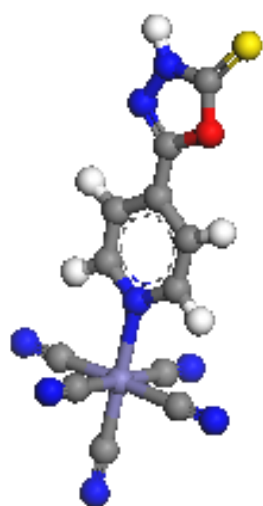
(i)

(j)

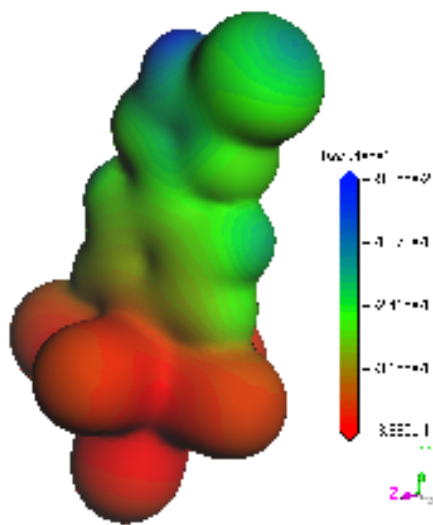


(k)

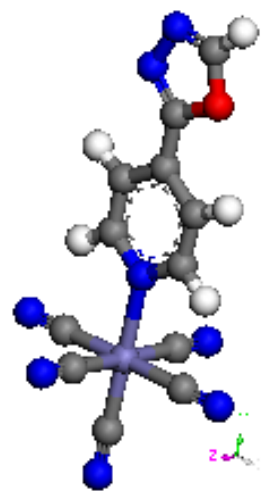
(l)



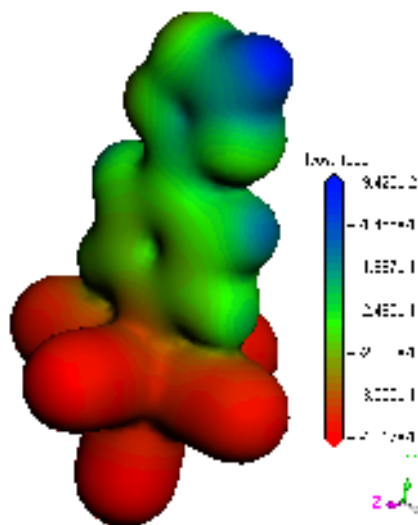
(m)



(n)



(o)



(p)

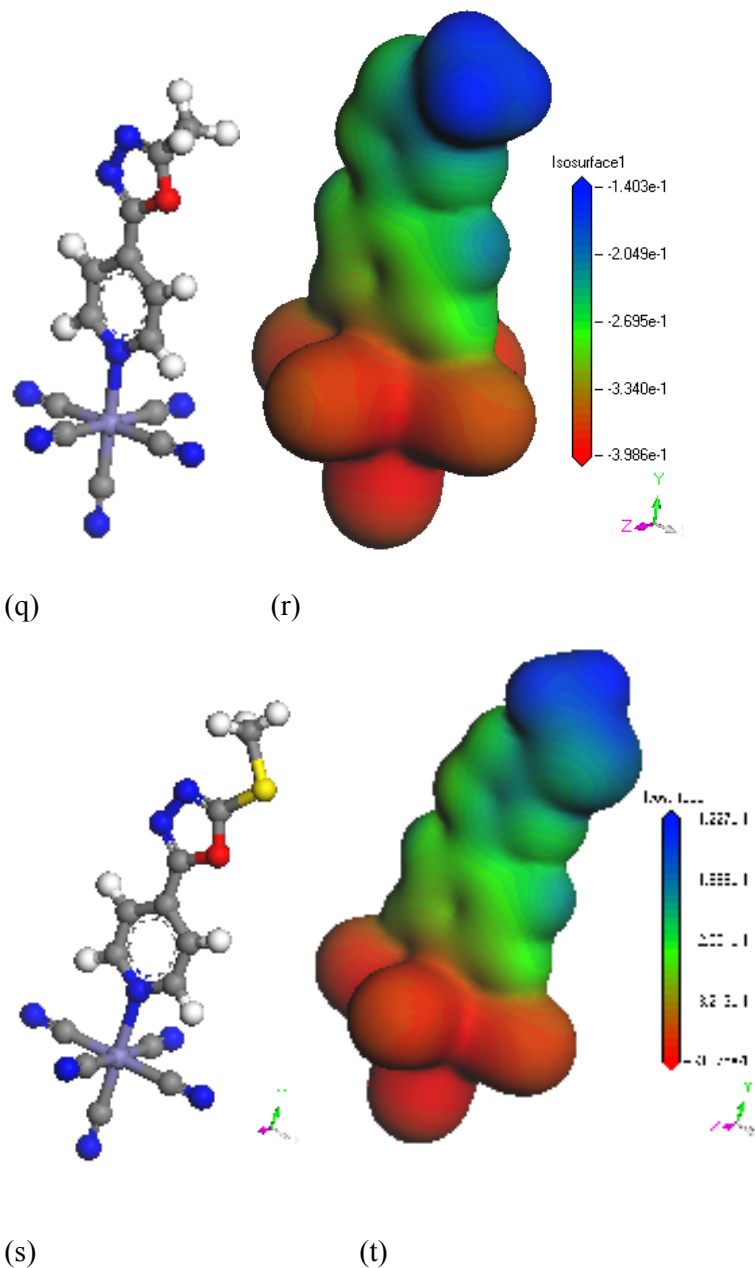
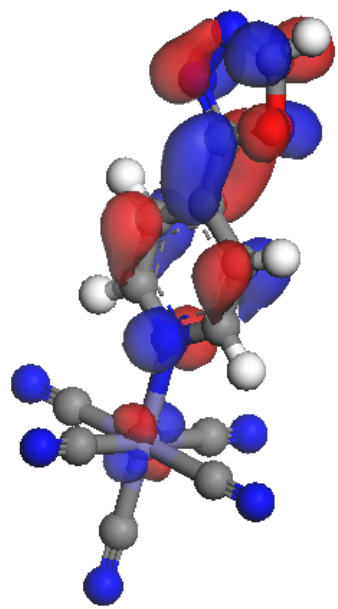
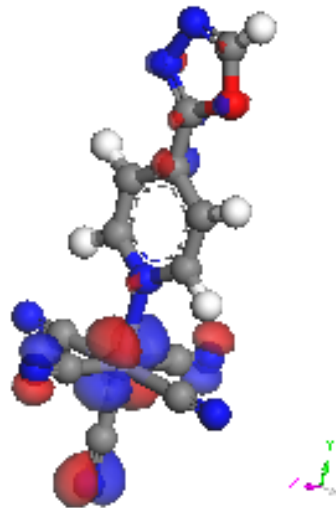


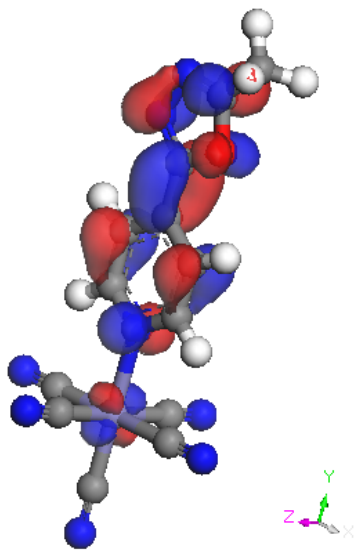
Figura 114. Estrutura otimizada para os complexos e sua densidade eletrônica molecular total com gradiente de potencial eletrostático; Estruturas otimizadas do tipo $[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{L}]^{3-}$, onde L= (a) NA4H; (c) NA4F; (e) NA4OMet; (g) IA4H; (i) IA4F; (k) IA4OMet; (m) IO3S; (o) IO3H; (q) IO3SMet; (s) IO3Met. Gradiente de potencial eletrostático dos complexos do tipo $[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{L}]^{3-}$, onde L= (b) NA4H; (d) NA4F; (f) NA4OMet; (h) IA4H; (j) IA4F; (l) IA4OMet; (n) IO3S; (p) IO3H; (r) IO3SMet; (t) IO3Met.



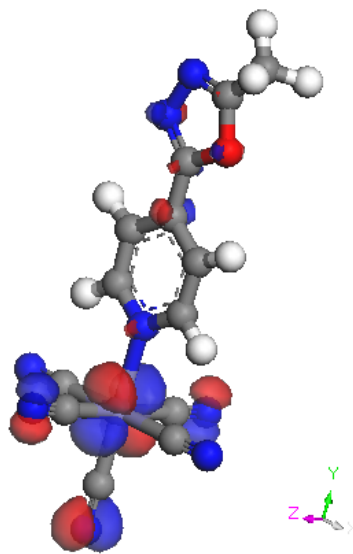
(a)



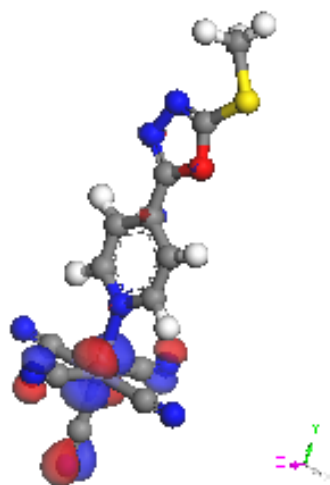
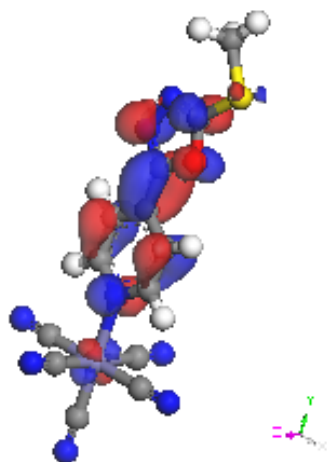
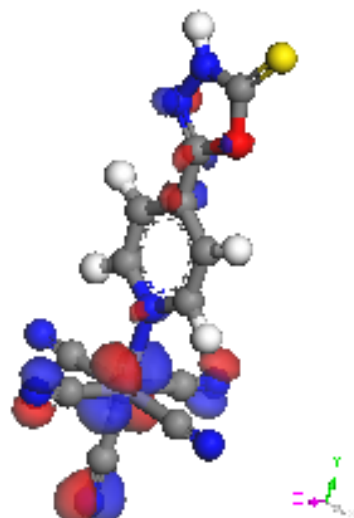
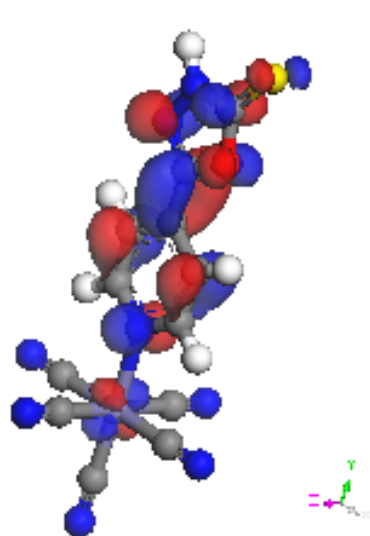
(b)

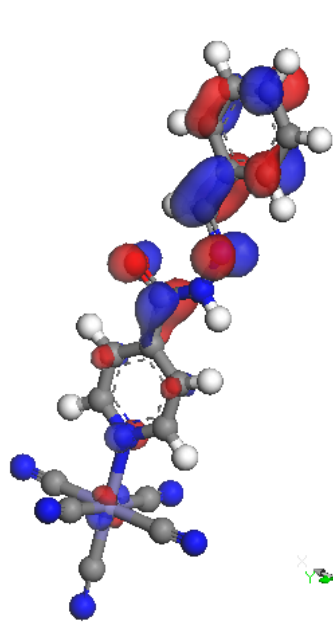


(c)

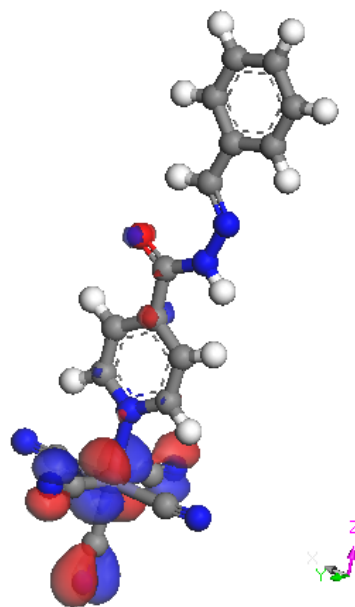


(d)

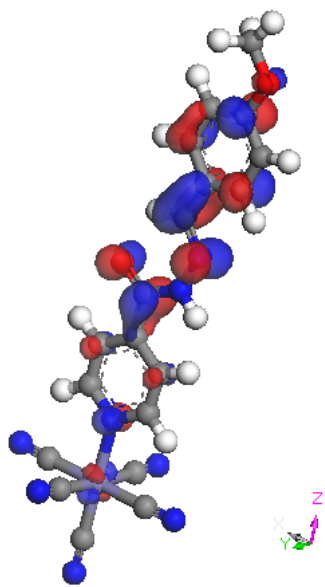




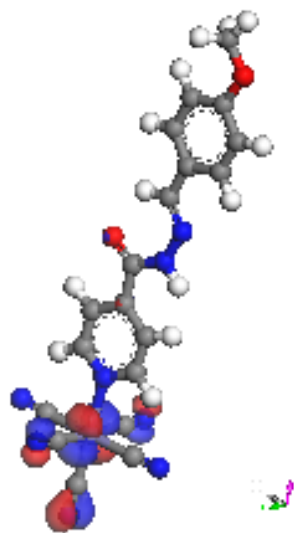
(i)



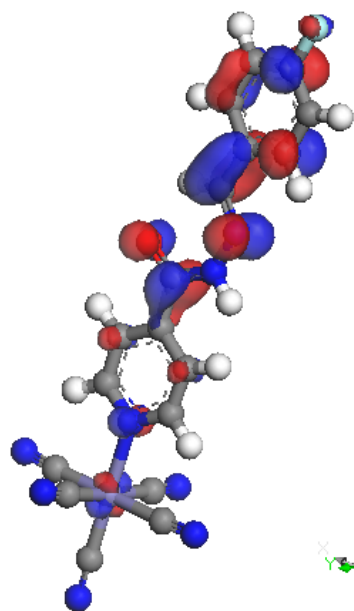
(j)



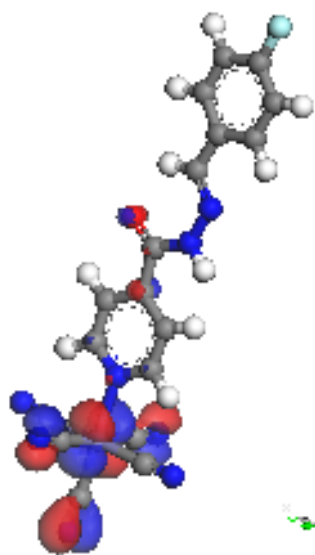
(k)



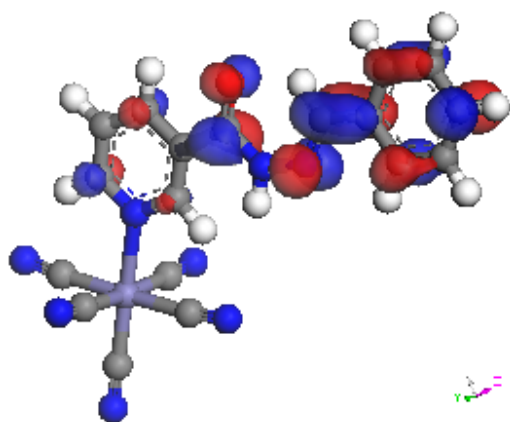
(l)



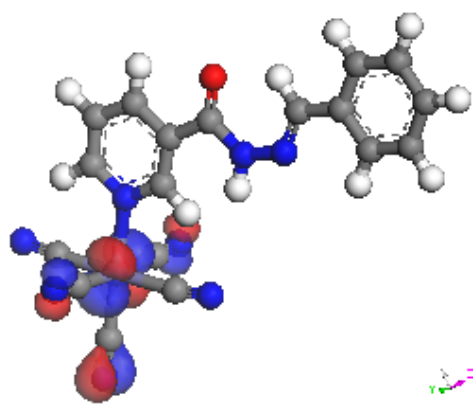
(m)



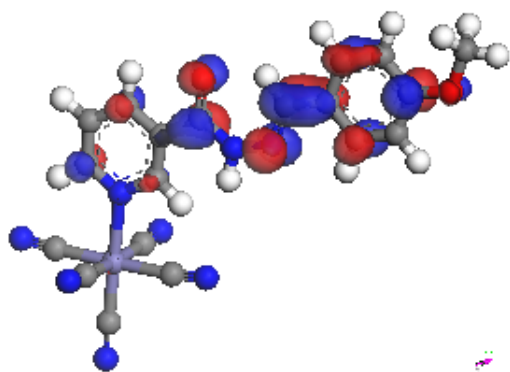
(n)



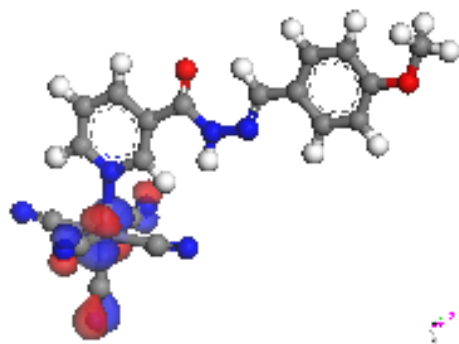
(o)



(p)



(q)



(r)

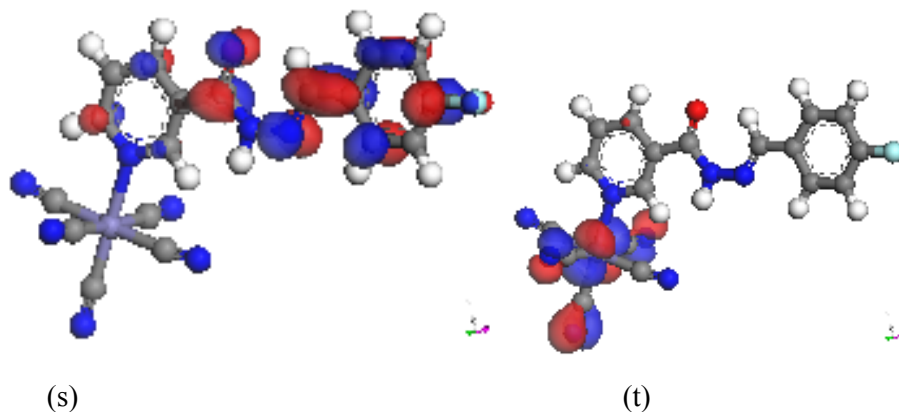


Figura 115. Orbitais de fronteira para os complexos; Orbitais LUMO para estruturas otimizadas do tipo $[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{L}]^{3-}$, onde L= (a) IO3H; (c) IO3S; (e) IO3Met; (g) IO3SMet; (i) IA4H; (k) IA4OMet; (m) IA4F; (o) NA4H; (q) NA4OMet; (s) NA4F. Orbitais HOMO-2; (b) IO3H; (d) IO3S; (f) IO3Met; (h) IO3SMet; Orbitais HOMO-1; (j) IA4H; (l) IA4OMet; (n) IA4F; (p) NA4H; (r) NA4OMet; (t) NA4F.