

 <p>UFAL</p>	<p>Universidade Federal de Alagoas Instituto de Química e Biotecnologia</p> <p><i>Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia</i> <i>PPGQB</i></p>	 <p>IQB</p>
---	--	--

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE
COMPLEXOS ORGANOMETÁLICOS DE ESTANHO(IV) COM
LIGANTES BIOATIVOS**

Ana Soraya Lima Barbosa

Maceió

2011

Ana Soraya Lima Barbosa

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE
COMPLEXOS ORGANOMETÁLICOS DE ESTANHO(IV) COM
LIGANTES BIOATIVOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Mario Roberto Meneghetti

Maceió

2011

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

B239s Barbosa, Ana Soraya Lima.
Síntese e avaliação da atividade antimicrobiana de complexos organometálicos de estanho(IV) com ligantes bioativos / Ana Soraya Lima Barbosa. – 2011.
111 f. : il., grafs.

Orientador: Mario Roberto Meneghetti.
Dissertação (mestrado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2011.

Inclui bibliografia.

1. Química inorgânica medicinal. 2. Complexos organoestânicos. 3. Ácido undecilênico. 4. Estanho(IV). 5. Antimicrobianos. 6. Química farmacêutica.
I. Título.

CDU: 546.814



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA



BR 104 Km14, Campus A. C. Simões
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins
57072-970, Maceió-Al, Brasil
Fone: (82) 3214-1384, Fax: (82) 3214-1384
email: cpgqb@qui.ufal.br

Membros da Comissão Julgadora da Dissertação de Mestrado de **Ana Soraya Lima Barbosa**, intitulada: “**Síntese e Avaliação da Atividade Antimicrobiana de Complexos Organometálicos de Estanho (IV) com Ligantes Bioativos**”, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas em 27 de janeiro de 2011, às 9h30min, na Sala de Aulas do PPGQB/UFAL.

COMISSÃO JULGADORA

Prof. Dr. Mario Roberto Meneghetti
Orientador – PPGQB/IQB/UFAL

Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana
PPGQB/IQB/UFAL

Prof.ª Dr.ª Maria Lysete de Assis Bastos
ESENFAR/UFAL

Prof.ª Dr.ª Magna Suzana Alexandre Moreira
ICBS/UFAL

Dedicatória

A Deus, por permanecer ao meu lado a cada instante; aos meus pais, irmãos e noivo, por todo carinho, apoio e paciência durante os momentos de ausência.

Agradecimentos

À **Santíssima Trindade**, por me fazer acreditar na capacidade de ser melhor a cada dia, pela força para correr atrás dos meus sonhos, pela fidelidade e misericórdia;

À **Santa Rita de Cássia**, por ser minha fiel intercessora;

Aos meus pais, **Carlos Alberto e Soraya Maria**, e irmãos, **Ana Carla e Betinho**, por todo amor, confiança e paciência;

Ao meu noivo **Hélder Farias**, pelo carinho e cumplicidade;

Aos meus **avós, tios e primos**, em especial à **Vó Lete**, pela confiança na minha capacidade e pelo orgulho de ter uma Farmacêutica na família;

Aos amigos do **Ministério Universidades Renovadas** e do **Segue-me – Aldebaran**, pela amizade constante e compreensão nos momentos de ausência;

Ao **Prof. Mario Meneghetti**, meu orientador, por me ensinar a ser cientista e, principalmente, por me apresentar à Química Inorgânica Medicinal;

A **todos os professores** que de alguma forma me ajudaram a chegar até aqui;

À **Patrícia Vasconcelos, Lívia Santiago, Raíssa Pires, Isabelle de Mélo, Lidiane Carvalho** e ao **Jefferson**, pela amizade e por me ajudarem na avaliação da atividade antimicrobiana e da toxicidade em *Artemia salina* das minhas amostras; e, em especial à **Profª. Lysete Bastos**, por abrir as portas do Laboratório de Tratamento de Feridas para que eu pudesse não só acompanhar, mas realizar esses testes;

À **Gabriela Muniz, Aline Cavalcanti e Profª. Magna Suzana**, por avaliarem a citotoxicidade dos meus complexos;

Ao **Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear (IQB/UFAL)**, pela contribuição na caracterização das minhas amostras;

Às pessoas com quem tive o prazer de conviver durante o mestrado, especialmente a **Walleska Bismaida, Raquel Meneses, Sara Figueiredo, Daví Alessandro, Talma Cerqueira, Jéssica Guedes, Monique Ângelo, Tatiana Serra** e demais amigos do **Grupo de Catálise e Reatividade Química (GCaR)/IQB**, pelos conhecimentos divididos, pelo carinho, pelas brincadeiras e risadas;

Às **amigas farmacêuticas Anne Mércia, Camila Calado, Kelma Guerra, Michelle Braga e Theolyta Araújo**, pelo incentivo, pelo companheirismo e, principalmente, pela amizade que continua mesmo após o fim da graduação;

Ao **Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas**, pela oportunidade de me tornar Mestre;

Às **Secretárias do PPGQB**, por me atenderem sempre com atenção e carinho;

Ao **CNPq**, pelo apoio financeiro.

“Confia ao Senhor a tua sorte, espera n’Ele e Ele agirá.” (Salmo 36, 5)

“De uma coisa eu estou certo: Eu espero no Senhor.

Que com Ele eu seja mais que VENCEDOR!”

(Adoração e Vida – Walmir Alencar)

Neste trabalho foram sintetizados e caracterizados três complexos de estanho(IV) a partir de cloretos organoestânicos e ácido undecilênico: $n\text{-Bu}_2\text{Sn}(\text{Und})_2$, $n\text{-Bu}_3\text{SnUnd}$ e $\text{Me}_2\text{Sn}(\text{Und})_2$, com rendimentos entre 60 e 70%. Estes compostos mostraram atividade no teste preliminar de avaliação de bioatividade (teste de toxicidade em *Artemia salina* Leach), bem como apresentaram atividades promissoras como antibacterianos e antifúngicos a partir dos resultados dos testes antimicrobianos *in vitro*, sendo em geral mais ativos que o ligante. A atividade destes novos complexos contra as bactérias Gram-positivas e contra o fungo *Candida albicans* foram mais elevadas do que contra as bactérias Gram-negativas. Como uma tendência, observa-se que os diorganoestânicos foram menos ativos que os triorganoestânicos como antifúngico e contra bactérias Gram-positivas, sendo, contudo, mais ativos contra bactérias Gram-negativas. A atividade antimicrobiana destes novos compostos foi comparada com a atividade de outros organoestânicos e, entre as substâncias testadas, notou-se que o aumento da cadeia carbônica do ligante resultou em diminuição da atividade antimicrobiana. Na avaliação de citotoxicidade, todos os complexos testados apresentaram toxicidade estatisticamente significativa em macrófagos murinos.

Palavras-chave: Química Inorgânica Medicinal, organoestânicos, estanho(IV), ácido undecilênico, antimicrobianos.

ABSTRACT

In this work were synthesized and characterized three complexes of tin(IV) from organotin chlorides and acid undecylenic: $n\text{-Bu}_2\text{Sn}(\text{Und})_2$, $n\text{-Bu}_3\text{SnUnd}$ and $\text{Me}_2\text{Sn}(\text{Und})_2$, with yields between 60 and 70%. These compounds have shown activity in preliminary screening test for evaluation of bioactivity (toxicity in *Artemia salina* Leach), and have shown promising activities such as antibacterial and antifungal agents. It was confirmed by the results in antimicrobial tests *in vitro*. The new organotin compounds were, in general, more active than the ligand. The activity of these new compounds against Gram-positive and against *Candida albicans* were higher than against Gram-negative bacteria. As a trend, it was observed that diorganotin were less active than the triorganotin compounds as antifungal and against Gram-positive bacteria, being, however, more active against Gram-negative bacteria. The antimicrobial activity of these new compounds was compared with the activity of other organotins, and among the substances tested, it was noted that increasing the carbon chain of the ligand have resulted in smaller antimicrobial activity. In the evaluation of cytotoxicity, all complexes that were tested have shown toxicity statistically significant in murine macrophages.

Keywords: Medicinal Inorganic Chemistry, organotins, tin(IV), undecylenic acid, antimicrobial.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1- Cisplatina.....	28
Figura 3.2- Algumas áreas-chave da Química Inorgânica Medicinal	29
Figura 3.3- Azulejos com esmalte de SnO ₂ do palácio Babilônico (<i>Staatliche Museen zu Berlin</i>).	30
Figura 3.4- Tabela Periódica e a classificação dos elementos quanto ao efeito biológico	32
Figura 3.5- Formas e organização das bactérias: A1- cocos; A2- diplococos; A3- estreptococos; A4- estafilococos; B1- bacilos; B2- vibriões; C- espiroquetas.....	34
Figura 3.6- Tamanhos representativos de bactérias, vírus, leveduras, protozoários e células humanas.....	35
Figura 3.7- Diferenças estruturais entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas	35
Figura 3.8- Ácido undecilênico	46
Figura 4.1 – Sistema reacional para obtenção dos organoestânicos.....	58
Figura 4.2- Larvas de <i>Artemia salina</i> Leach.	60
Figura 4.3- Etapas do teste de toxicidade frente a larvas de <i>Artemia salina</i>	64
Figura 4.4 – Escala de McFarland. Destaque do tubo 5, equivalente a 1,5 x 10 ⁶ UFC/mL....	67
Figura 4.5- Placa para teste de difusão em ágar com os discos contendo as amostras (em cima), o disco do controle negativo (CN) e do controle positivo (CP).....	69
Figura 4.6- Halos de inibição em placa de difusão em ágar. Observam-se halos nos discos da amostra e no controle positivo (CP), mas não no controle negativo (CN).	70
Figura 4.7- Placa para teste de microdiluição em caldo com o meio de cultivo BHI e as amostras.....	71
Figura 4.8- Resultado de microdiluição em caldo. Observe crescimento nos controles de crescimento (CC) e negativo (CN), e ausência de proliferação microbiana no controle positivo (CP).	73
Figura 5.1- Espectro de RMN de ¹ H do ácido undecilênico.	79
Figura 5.2- Espectro de RMN de ¹ H do undecilenato de sódio.....	79
Figura 5.3- Espectro de RMN de ¹ H do n-Bu ₂ Sn(Und) ₂	80
Figura 5.4- Espectro de RMN de ¹ H do n-Bu ₃ SnUnd.	81
Figura 5.5- Espectro de RMN de ¹ H do Me ₂ Sn(Und) ₂	82
Figura 5.6- Espectro de RMN de ¹³ C do n-Bu ₂ Sn(Und) ₂	82
Figura 5.7- Espectro de RMN de ¹³ C do n-Bu ₃ SnUnd.	83

Figura 5.8- Espectro de RMN de ^{13}C do $\text{Me}_2\text{Sn}(\text{Und})_2$	84
Figura 5.9- Espectro de RMN ^{119}Sn do $n\text{-Bu}_2\text{Sn}(\text{Und})_2$	85
Figura 5.10- Espectro de RMN de ^{119}Sn do $\text{Me}_2\text{Sn}(\text{Und})_2$	85
Figura 5.11- Espectro de RMN de ^{119}Sn do $n\text{-Bu}_3\text{SnUnd}$	86
Figura 5.12- Espectro de IV do UndH.....	87
Figura 5.13- Espectro de IV do UndNa.....	87
Figura 5.14- Espectro de IV do $n\text{-Bu}_2\text{Sn}(\text{Und})_2$	88
Figura 5.15- Espectro de IV do $\text{Me}_2\text{Sn}(\text{Und})_2$	89
Figura 5.16- Espectro de IV do $n\text{-Bu}_3\text{SnUnd}$	89
Figura 5.17- Efeito do ácido undecilênico e dos organoestânicos (100 μM) sobre a viabilidade de macrófagos (J774).....	106

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1- Comparação entre fungos e bactérias	37
Tabela 4.1 - Procedência de reagentes e solventes	53
Tabela 4.2 - Equipamentos utilizados no desenvolvimento desta pesquisa	54
Tabela 4.3 - Materiais utilizados nos ensaios antimicrobianos e toxicidade em <i>Artemia salina</i>	55
Tabela 4.4- Volumes das alíquotas utilizadas para cada concentração do teste preliminar de toxicidade em <i>Artemia salina</i>	62
Tabela 4.5- Volumes das alíquotas utilizadas para cada concentração do teste quantitativo de toxicidade em <i>Artemia salina</i>	63
Tabela 4.6- Concentrações testadas para determinação da Concentração Inibitória Mínima. 72	
Tabela 5.1- Resultados da toxicidade em larvas de <i>Artemia salina</i> Leach	90
Tabela 5.2- Comparação da toxicidade em larvas de <i>Artemia salina</i> Leach, em função dos substituintes L e R ligados ao estanho (R_nSnL_{4-n})	92
Tabela 5.3- Resultados da atividade antimicrobiana do ácido undecilênico e dos organoestânicos contra bactérias Gram-positivas, pelo método de difusão em ágar (1000 $\mu\text{g}/\text{disco}$)	94
Tabela 5.4- Resultados da atividade antimicrobiana do ácido undecilênico e dos organoestânicos contra bactérias Gram-negativas, pelo método de difusão em ágar (1000 $\mu\text{g}/\text{disco}$)	95
Tabela 5.5- Resultados da atividade antifúngica do ácido undecilênico e dos organoestânicos, pelo método de difusão em ágar (1000 $\mu\text{g}/\text{disco}$)	96
Tabela 5.6- Concentração Inibitória Mínima (CIM) do ácido undecilênico e dos organoestânicos contra bactérias Gram-positivas, pelo método de microdiluição	98
Tabela 5.7- Comparação da atividade antibacteriana dos organoestânicos contra <i>Staphylococcus aureus</i> a partir das suas concentrações inibitórias mínimas, em função dos substituintes L e R ligados ao estanho (R_nSnL_{4-n})	98
Tabela 5.8- Comparação da atividade antibacteriana dos organoestânicos contra <i>Staphylococcus epidermidis</i> a partir das suas concentrações inibitórias mínimas, em função dos substituintes L e R ligados ao estanho (R_nSnL_{4-n})	99

Tabela 5.9- Comparação da atividade antibacteriana dos organoestânicos contra <i>Streptococcus pyogenes</i> a partir das suas concentrações inibitórias mínimas, em função dos substituintes L e R ligados ao estanho (R_nSnL_{4-n})	99
Tabela 5.10- Concentração Inibitória Mínima (CIM) do ácido undecilênico e dos organoestânicos contra bactérias Gram-negativas, pelo método de microdiluição	100
Tabela 5.11- Comparação da atividade antibacteriana dos organoestânicos contra <i>Escherichia coli</i> a partir das suas concentrações inibitórias mínimas, em função dos substituintes L e R ligados ao estanho (R_nSnL_{4-n}).....	101
Tabela 5.12- Comparação da atividade antibacteriana dos organoestânicos contra <i>Klebsiella pneumoniae</i> a partir das suas concentrações inibitórias mínimas, em função dos substituintes L e R ligados ao estanho (R_nSnL_{4-n})	101
Tabela 5.13- Comparação da atividade antibacteriana dos organoestânicos contra <i>Proteus mirabilis</i> a partir das suas concentrações inibitórias mínimas, em função dos substituintes L e R ligados ao estanho (R_nSnL_{4-n})	102
Tabela 5.14- Comparação da atividade antibacteriana dos organoestânicos contra <i>Salmonella typhimurium</i> a partir das suas concentrações inibitórias mínimas, em função dos substituintes L e R ligados ao estanho (R_nSnL_{4-n})	102
Tabela 5.15- Concentração Inibitória Mínima (CIM) do ácido undecilênico e dos organoestânicos como antifúngicos, pelo método de microdiluição	103
Tabela 5.16- Comparação da atividade antifúngica dos organoestânicos contra <i>Candida albicans</i> , em função dos substituintes L e R ligados ao estanho (R_nSnL_{4-n}).....	104

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA)
AMH	Ágar Müeller-Hinton
ASD	Ágar Sabouraud Dextrose
ATCC	<i>American Type Cell Collection</i>
BHI	Infusão de cérebro e coração (do inglês: <i>brain-heart infusion broth</i>)
br sig	Sinal alargado (do inglês: <i>broad signal</i>)
CDCl₃	Clorofórmio deuterado
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CL₅₀	Concentração letal média
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
F.M.	Fórmula molecular
IC₉₅	Intervalo de confiança 95%
J	Acoplamento de spin
M	Multiplete
M.M.	Massa molar
Me₂Sn(Und)₂	Diundecilenato de dimetilestanho
Me₂SnCl₂	Dicloreto de dimetilestanho
MTT	Brometo de 3-[4,5- dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazólio
n-Bu₂Sn(Lau)₂	Dilaurato de dibutilestanho
n-Bu₂Sn(OAc)₂	Diacetato de dibutilestanho
n-Bu₂Sn(Und)₂	Diundecilenato de dibutilestanho
n-Bu₂SnCl₂	Dicloreto de dibutilestanho
n-Bu₃SnCl	Cloreto de trimetilestanho
n-Bu₃SnUnd	Undecilenato de tributilestanho
NCCLS	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
PPM	Parte por milhão
PVC	Cloreto de polivinila
Q	Quadruplete
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
S	Singleto

T	Tripleto
TAS	Teste de toxicidade em <i>Artemia salina</i>
TTC	Cloreto de trifenil tetrazólio
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UndH	Ácido undecilênico
UndNa	Undecilenato de sódio

SUMÁRIO

1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS	18
1.1 – Referências.....	22
2. OBJETIVOS	24
2.1 – Geral.....	25
2.2 – Específicos	25
3. INTRODUÇÃO	26
3.1 – Histórico e aplicações da Química Inorgânica Medicinal	27
3.2 – Compostos de estanho e suas aplicações.....	29
3.2.1- Breve histórico e aplicações	29
3.2.2- O estanho como elemento essencial	31
3.3 – Doenças infecciosas e quimioterapia antimicrobiana	32
3.3.1 – Conceitos e situação atual.....	32
3.3.2 – Estrutura e classificação da célula bacteriana.....	34
3.3.3 – Fungos: composição estrutural e principais infecções	37
3.3.4 – Classificação dos antimicrobianos	39
3.4 – Microrganismos	41
3.5 – Ácido undecilênico.....	45
3.6 – Referências.....	48
4. EXPERIMENTAL	52
4.1 – Atividades desenvolvidas e locais de realização.....	53
4.2 – Reagentes, solventes e equipamentos.....	53
4.2.1– Preparo das amostras para caracterização.....	56
4.3 – Síntese dos complexos organoestânicos.....	56
4.3.1 – Síntese do sal de sódio do ácido undecilênico	56
4.3.2– Síntese dos complexos.....	57
4.4 – Teste de toxicidade em <i>Artemia salina</i> Leach (TAS)	60
4.4.1- Obtenção das larvas de <i>Artemia salina</i>	61
4.4.2- Preparo das amostras e avaliação inicial	61
4.4.3- Controles positivo e negativo	61
4.4.4- Avaliação do grau de toxicidade.....	62
4.4.5- Ensaio quantitativo.....	62
4.4.6- Determinação da concentração letal média (CL ₅₀) e intervalo de confiança 95% (IC ₉₅)	63
4.5 – Ensaio antimicrobianos in vitro	64
4.5.1- Meios de cultivo e soluções: Composição e preparo	64
4.5.2- Microrganismos utilizados	67
4.5.3- Ativação e preparo dos inóculos contendo os microrganismos.....	67
4.5.4- Teste preliminar para avaliação de atividade antimicrobiana: Teste de difusão em ágar	68
4.5.5- Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM): Microdiluição em caldo	70
4.6 – Avaliação da citotoxicidade em macrófagos	74
4.6.1- Método do MTT.....	74
4.7 – Referências.....	75

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	77
5.1 – Síntese e caracterização dos complexos organoestânicos	78
5.1.1 - Síntese	78
5.1.2 - Caracterização.....	78
5.2 – Avaliação da toxicidade em Artemia salina Leach. (TAS)	90
5.3 – Avaliação da atividade antimicrobiana	93
5.3.1 – Teste de difusão em ágar	93
5.3.2 – Teste de microdiluição em caldo.....	97
5.4 – Avaliação da citotoxicidade em macrófagos	105
5.5 – Referências.....	108
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	112

1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Normalmente quando se pensa em fármacos, sejam eles extraídos diretamente da natureza ou sintetizados através de planejamento racional, imagina-se que suas estruturas químicas são tipicamente orgânicas. No entanto, vários fármacos contêm metais em sua estrutura e são amplamente usados na clínica médica (BERALDO & MORTIMER, 2005).

Nos seres vivos, os elementos químicos predominantes são o C, H, N e O, e como são esses também os elementos fundamentais da Química Orgânica, por esse motivo considerou-se por muito tempo que somente os compostos orgânicos e as reações que os envolviam eram indispensáveis para a vida, e que os elementos e compostos comumente chamados “inorgânicos” tinham escasso ou nenhum significado para os sistemas vivos (BARAN, 2005).

Hoje, entretanto, sabe-se que muitos elementos metálicos são fundamentais para os organismos dos seres vivos, uma vez que se ligam e interagem com moléculas biológicas, tais como proteínas e DNA, e apresentam afinidade por moléculas importantes para a vida, como, por exemplo, as moléculas de oxigênio (O₂) e de óxido nítrico (NO). De fato, a evolução natural incorporou os metais às funções vitais, tendo-se como exemplos clássicos o ferro da hemoglobina e dos citocromos, o zinco de algumas metaloenzimas e o cálcio dos ossos (BERALDO, 2005).

Alguns compostos inorgânicos têm sido usados na Medicina por muitos séculos, mas frequentemente de uma maneira empírica, com poucas tentativas para o *design* de novos compostos e com pouco ou nenhum conhecimento das bases moleculares de seus mecanismos de ação (RONCONI & SADLER, 2007).

Contudo, foi com os estudos realizados com um composto claramente inorgânico, a cisplatina – *cis*[Pt(NH₃)₂Cl₂] –, como fármaco anticancerígeno, que despertou um grande interesse na comunidade científica por complexos metálicos como possíveis agentes terapêuticos e iniciou-se uma nova era de busca por compostos contendo metais com propriedades farmacológicas, investigação de mecanismo de ação e tentativas de melhorar sua atividade (BERALDO, 2005).

Surgiu então uma nova área de pesquisa: a Química Inorgânica Medicinal. Até hoje as investigações sobre a cisplatina constituem o maior sucesso desta nova área, uma vez que a partir do seu uso clínico, em 1978, o número de mortes de homens por tumor de testículo diminuiu cerca de 80% (BERALDO, 2005).

Uma área interessante para o desenvolvimento de metalofármacos é a Química Organometálica, que estuda compostos caracterizados por apresentar uma ligação direta entre o metal e pelo menos um de seus ligantes através de uma ligação M-C, e vários estudos estão sendo realizados com o objetivo de avaliar o emprego destes compostos como agentes de interesse biológico, por exemplo, como agentes antitumorais, antimaláricos, etc. Entretanto por muito tempo essa ideia pareceu infundada, pois compostos organometálicos sempre eram associados a substâncias altamente reativas e, por consequência, sensíveis à água e ao oxigênio, que são essenciais aos seres vivos (DAGANI, 2002).

Como, em princípio, qualquer fragmento orgânico pode se ligar a um centro metálico, o número de compostos organometálicos que se pode acessar é quase ilimitado. Suas principais aplicações são, além das ciências biológicas, em catálise, materiais com propriedades especiais (cristais líquidos, supercondutores, etc) e síntese orgânica (DUPONT, 2005).

Dentre os vários metais que têm sido objeto de estudo para aplicações biológicas, complexos de estanho (Sn) tem despertado a atenção como novos agentes terapêuticos. Este metal faz parte da composição do corpo humano e, em animais, sua deficiência está relacionada a retardo do crescimento (BENITE *et al.*, 2007). Alguns complexos organometálicos de estanho(IV) já foram avaliados quanto à bioatividade e apresentaram atividades antimicrobiana (BAUL, 2008), antitumoral (HADJIKAKOU & HADJILIADES, 2009), leishmanicida (KHAN *et al.*, 2009), tripanocida (SHUAIBU *et al.*, 2004), anti-inflamatória (NATH *et al.*, 2009), entre outras.

Os agentes de doenças infecciosas humanas pertencem a cinco grupos principais de organismos: bactérias, fungos, protozoários, helmintos e vírus (LEVINSON & JAWETZ, 2006). Eles diferem entre si em função da sua estrutura, composição e organização, inclusive entre diferentes espécies de um mesmo grupo, por isso doenças causadas por cada agente têm tratamentos diferenciados.

A resistência microbiana aos fármacos atualmente disponíveis é uma das principais causas de mortalidade e aumento dos custos hospitalares, tendo particular importância para pacientes provenientes de Unidades de Terapia Intensiva. Nessas unidades, o uso regular de várias classes de antimicrobianos, entre outros fatores, tem aumentado grandemente a pressão seletiva sobre os patógenos bacterianos, levando à seleção de organismos resistentes (WUNDER, 2004).

Tendo em vista a importância da pesquisa de novos fármacos para o tratamento de infecções microbianas, o desenvolvimento de novas estratégias metodológicas para a

obtenção de protótipos de fármacos é fundamental. Por exemplo, a complexação de moléculas bioativas a metais, tal como o estanho, pode ser uma opção interessante para a descoberta de novas alternativas para a terapia antimicrobiana.

1.1 – Referências

BARAN, E. J. Suplementação de elementos-traços. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, n. 6, p. 7-12, 2005.

BAUL, T. S. B. Antimicrobial activity of organotin(IV) compounds: a review. **Applied Organometallic Chemistry**, v. 22, p. 195-204, 2008.

BENITE, A. M. C.; MACHADO, S. P.; BARREIRO, E. J. Uma visão da química bioinorgânica medicinal. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 2062-2067, 2007.

BERALDO, H. Contribuições da química inorgânica para a química medicinal. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, n. 6, p. 4-6, 2005.

BERALDO, H. & MORTIMER, E. F. Introdução. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, n. 6, p. 3, 2005.

DAGANI, R. The bio side of organometallics: Conference spotlights potential of metal-carbon compounds in medicine, synthesis, and sensing. **Chemical & Engineering News**, v. 80, n. 37, p. 23-29, 2002.

DUPONT, J. Introdução e histórico. **Química organometálica: elementos do bloco d**. Porto Alegre: Bookman, 2005. cap. 1, p. 17-27.

_____. Estrutura de organometálicos do bloco d: princípios básicos. **Química organometálica: elementos do bloco d**. Porto Alegre: Bookman, 2005. cap. 2, p. 29-56.

HADJIKAKOU, S. K. & HADJILIADES, N. Antiproliferative and anti-tumor activity of organotin compounds. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 253, p. 235-249, 2009.

KHAN, M. I. *et al.* Organotin(IV) esters of 4-maleimido-benzoic acid: synthesis, characterization and *in vitro* antileishmanial effects. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 2, p. 341-347, 2009.

LEVINSON, W. & JAWETZ, E. Bactérias comparadas a outros microrganismos. **Microbiologia médica e imunologia**. Trad. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. cap. 1, p. 13-15.

NATH, M. *et al.* Organotin(IV) tryptophanylglycinates: potential non-steroidal antiinflammatory agents; crystal structure of dibutyltin(IV) tryptophanylglycinate. **Applied Organometallic Chemistry**, v. 23, n. 9, p. 347-358, 2009.

RONCONI, L. & SADLER, P. J. Using coordination chemistry to design new medicines. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 251, p. 1633-1648, 2007.

SHUAIBU, M. N. *et al.* Effect of dibutyltin(IV) on the ultrastructure of African *Trypanosoma spp.* **Parasitology Research**, v. 92, p. 65-73, 2004.

WUNDER, R. S. Principais patógenos bacterianos em UTI: avaliação da resistência em cinco anos. **Arquivos Brasileiros de Medicina Naval**, v. 65, n. 1, p. 7-21, 2004.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 – Geral

Preparar novos complexos de estanho(IV) e realizar a avaliação da atividade biológica, visando obter novas propostas terapêuticas para o tratamento antimicrobiano.

2.2 – Específicos

- Sintetizar e caracterizar novos complexos organoestânicos derivados do ácido undecilênico;
- Avaliar de modo preliminar a bioatividade dos novos complexos através do teste de toxicidade em *Artemia salina* Leach;
- Avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica *in vitro* dos novos organoestânicos contra uma série de microrganismos de importância clínica e compará-la com a atividade do ligante, bem como de outros complexos de estanho(IV);
- Avaliar a citotoxicidade dos complexos de estanho(IV) frente a macrófagos murinos da linhagem J774.

3. INTRODUÇÃO

3. INTRODUÇÃO

3.1 – Histórico e aplicações da Química Inorgânica Medicinal

O homem sempre procurou, com oferendas, sacrifícios e invocações, acalmar a ira das divindades e delas obterem complacência, alívio e cura de seus males. Ao mesmo tempo, porém, tentou encontrar na natureza recursos para afastar as doenças e amenizar ou anular seus efeitos maléficos. Em escavações realizadas na Suméria foram encontradas receitas para o preparo de medicamentos que aparecem escritas numa placa de argila com cerca de cinco mil anos. Acredita-se que este objeto seja o documento farmacológico mais antigo que se conhece. O papiro de Ebers (de 1500 a.C.) contém uma lista de medicamentos, entre os quais alguns com propriedades reconhecidas na atualidade, como o ferro, usado para combater anemias (LUENGO, 2005).

Ainda que a elucidação dos mecanismos de ação dos metais no organismo seja relativamente recente, seu uso em Medicina vem sendo praticado há aproximadamente 5000 anos. Segundo Beraldo (2005), exemplos disso são:

- O uso de cobre pelos egípcios para esterilizar água 3000 anos antes de Cristo;
- O uso no Egito de medicamentos contendo ferro 1500 anos antes de Cristo;
- O emprego do ouro na fabricação de medicamentos na Arábia e na China há 3500 anos (mais em razão da natureza preciosa do metal do que de suas propriedades medicinais);
- O desenvolvimento e uso, no século XVI, de medicamentos à base de mercúrio pelo médico suíço Theophrastus Paracelsus (1493-1541).

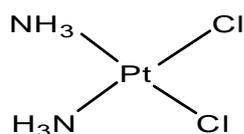
Somente nos últimos cem anos as propriedades medicinais de compostos inorgânicos começaram a ser investigadas de forma racional, com o emprego, por exemplo, de compostos de ouro no tratamento da tuberculose, dos antimonialis para o tratamento de leishmaniose e de compostos à base de arsênio para o tratamento da sífilis (BERALDO, 2005).

A Química Inorgânica Medicinal em sua forma atual teve suas origens nos trabalhos de Paul Ehrlich, prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia em 1908, e Alfred Werner, prêmio Nobel de Química em 1913 – o primeiro a ser conferido a um químico inorgânico. Ehrlich foi o fundador da quimioterapia e introduziu as primeiras ideias sobre relação estrutura-atividade e o conceito de índice terapêutico (este que está relacionado à margem de

segurança entre a dose eficaz e a tóxica de um fármaco). Fez ainda uso de complexos metálicos, em especial os de arsênio, na preparação de compostos para o tratamento da sífilis. É interessante notar que os primeiros estudos relacionando estrutura e atividade foram feitos por Ehrlich para esses compostos inorgânicos de arsênio. Werner, por sua vez, é considerado o pai da Química de Coordenação pelo desenvolvimento de sua teoria para explicar a estrutura e a ligação química nos complexos metálicos (BERALDO, 2005).

No entanto, apesar da importância dos trabalhos de Ehrlich e Werner, a Química Medicinal se dedicava principalmente ao estudo dos compostos orgânicos e produtos naturais até a descoberta, feita em 1965 pelo físico Barnett Rosenberg, das propriedades antitumorais do *cis*[(diaminodiclora) platina(II)], $cis[Pt(NH_3)_2Cl_2]$, a chamada “cisplatina” (Figura 3.1). O composto, que já era conhecido desde o final do século XIX, é um arquétipo de fármaco inorgânico, pois não contém um só átomo de carbono (BERALDO, 2005).

Figura 3.1- Cisplatina



Já no início da década de 70 a cisplatina começou a ser submetida a testes clínicos, inicialmente em pacientes terminais e posteriormente em tumores localizados, como câncer de testículo e ovário, tendo sido lançado no mercado americano em 1979. O carcinoma testicular, que era quase sempre letal, tornou-se curável em cerca de 80% dos casos quando submetidos ao tratamento com esse composto (FONTES *et al.*, 2005).

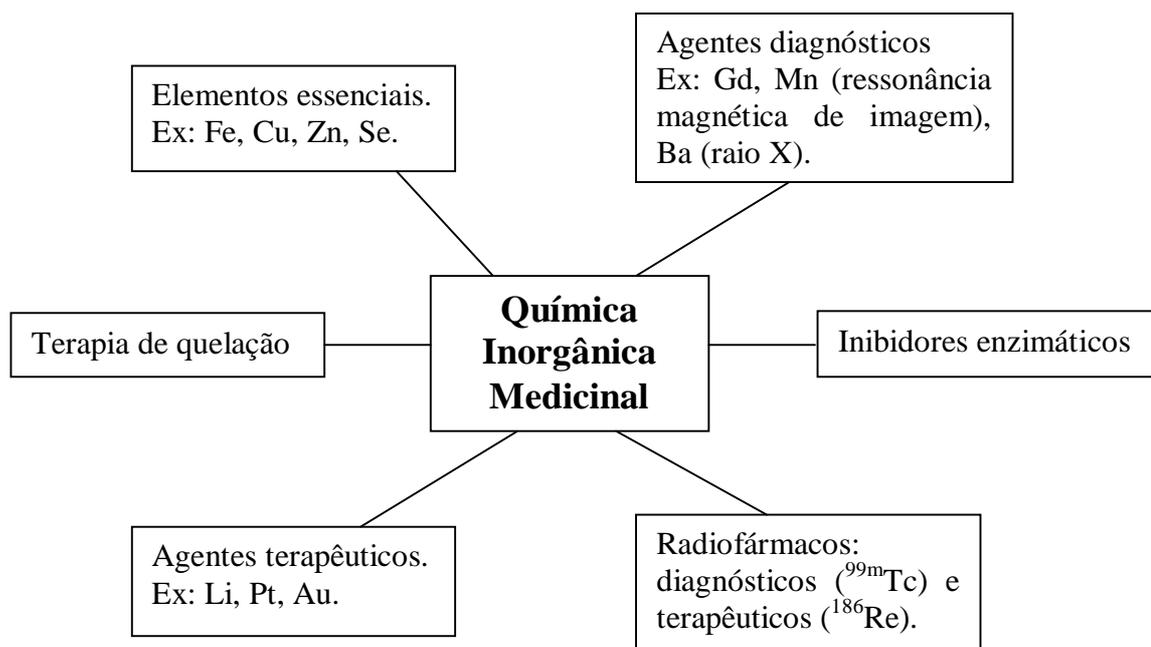
A descoberta das propriedades antitumorais da cisplatina constituiu um marco na história da Química Medicinal. Depois dessa descoberta pode-se dizer que se abriu uma nova perspectiva, com a inclusão de complexos metálicos como possíveis agentes terapêuticos. Desde então vários trabalhos se dedicaram a investigar o mecanismo de ação da cisplatina e compostos correlatos no organismo (FONTES *et al.*, 2005).

Como reflexo do desenvolvimento dessa nova área da Química Inorgânica, em 1994 apareceu o primeiro número da revista *Metal-Based Drugs*, que lista, nas suas áreas de interesse, estudos de compostos antitumorais à base de metais, como os análogos da cisplatina e outros complexos, agentes antimicrobianos, antiartríticos (como complexos de ouro), anti-hipertensivos (como complexos de ferro e rutênio), antivirais, suplementos minerais, compostos de bismuto ativos contra a bactéria *Helicobacter pylori* (causadora da úlcera

gástrica), e antiácidos, por exemplo, de alumínio, sódio, magnésio e cálcio (BERALDO, 2005).

Na Figura 3.2 são apresentadas as principais aplicações da Química Inorgânica Medicinal.

Figura 3.2- Algumas áreas-chave da Química Inorgânica Medicinal.



Fonte: Adaptado de GUO & SADLER, 1999.

3.2 – Compostos de estanho e suas aplicações

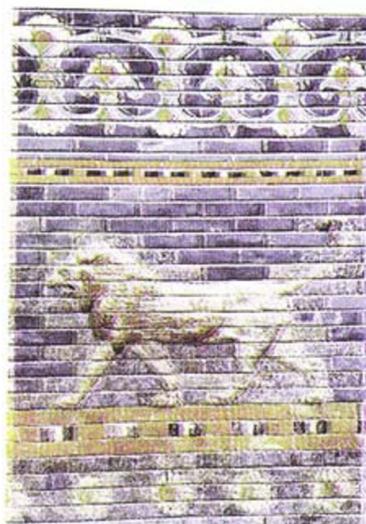
3.2.1- Breve histórico e aplicações

A família 14 da classificação periódica é de importância sem par: três de seus membros, o carbono, o estanho e o chumbo, são conhecidos da humanidade desde a antiguidade mais remota em sua forma elementar. O estanho em particular teve papel fundamental, juntamente com o cobre, na transição do neolítico à idade do bronze e no desenvolvimento civilizatório que se seguiu. O estanho também esteve presente, sob a forma de compostos inorgânicos, nas tecnologias mais antigas. O óxido de estanho(IV), SnO_2 , tem sido usado há milênios como opacificador em cerâmicas e em esmaltes vítreos (FILGUEIRAS, 1998).

Na Figura 3.3, observa-se a mais antiga aplicação conhecida de um composto de estanho: azulejos com esmalte de SnO_2 da parede do salão do trono do palácio Babilônico –

Reinado de Nabucodonosor II (604-562 a.C.), que pode ser visto no Museu Pérgamo em Berlim (FILGUEIRAS, 1998).

Figura 3.3- Azulejos com esmalte de SnO_2 do palácio Babilônico (*Staatliche Museen zu Berlin*).



Fonte: FILGUEIRAS, 1998.

O estanho é um dos mais antigos metais conhecidos pelo homem. Existem utensílios domésticos e armas feitas em bronze (cobre com cerca de 15% de estanho), que remontam a 3500 a.C. Os Fenícios tiveram um papel muito importante na divulgação dos utensílios de bronze, através das suas trocas comerciais entre a Bretanha, a Espanha e os povos do Médio Oriente. Em 49 d.C., foi referida a existência de ligas de estanho e chumbo, atualmente conhecidas por solda, que eram usadas pelos Romanos, bem como recipientes de cobre estanhado. O ferro estanhado só surgiu no século XIV, na Boêmia, ao passo que o aço estanhado (também conhecido por lata) só apareceu no século XVII (SOFTCIÊNCIAS – Tabela Periódica v2.5).

Outras aplicações de compostos inorgânicos de estanho são o pigmento azul cerúleo, nome tradicional do estanato de cobalto(II), CoSnO_3 ; o recobrimento de vidro com películas finas do óxido de estanho(IV); e o fluoreto de estanho(II), SnF_2 , largamente utilizado na fluoretação dentária (FILGUEIRAS, 1998).

Os compostos organometálicos de estanho, por sua vez, são de uso bem mais recente que os compostos inorgânicos: o primeiro composto organoestânico produzido em laboratório foi o diiodeto de dietilestanho, obtido por Frankland em 1849. As aplicações desses compostos, entretanto, só foram aproveitadas industrialmente depois de um século de

sua descoberta. Elas são de natureza variada, mas derivam principalmente de duas características fundamentais: em primeiro lugar, a grande afinidade do estanho por um doador de Lewis tal como um átomo de oxigênio, nitrogênio, fósforo ou enxofre; em segundo, as propriedades biocidas dos organoestânicos contra bactérias, fungos, insetos, moluscos e pequenos animais (FILGUEIRAS, 1998).

Deve-se ressaltar que compostos de estanho podem ainda ser aplicados como estabilizadores de PVC (cloreto de polivinila), preservadores de madeira, tintas anti-incrustantes para navios, repelentes de roedores (HOCH, 2001), catalisadores (MENDONÇA, 2008), entre outros.

Alguns complexos organometálicos de estanho(IV) encontrados na literatura apresentam atividades antimicrobiana (BAUL, 2008), antitumoral (HADJIKAKOU & HADJILIADES, 2009), leishmanicida (KHAN *et al.*, 2009), tripanocida (SHUAIBU *et al.*, 2004), anti-inflamatória (NATH *et al.*, 2009), entre outras.

3.2.2- O estanho como elemento essencial

Diz-se que um elemento é essencial para um determinado organismo quando a deficiência de sua ingestão produz desordens de certas funções, e quando sua recuperação aos níveis fisiológicos é capaz de reverter essas desordens. Sem sua participação, o organismo não pode se desenvolver normalmente e nem completar seu ciclo vital, pois sua função não pode ser realizada de forma completa por outro sistema ou elemento (BARAN, 2005).

Só recentemente tomou-se consciência de que muitos elementos inorgânicos presentes geralmente em baixas concentrações (traços), são essenciais para todos os seres vivos. Hoje se sabe que certas alterações no metabolismo desses elementos-traços são causa de várias doenças e desordens fisiológicas. Em razão das concentrações muito baixas desses elementos, a importância biológica de muitos deles só foi determinada há pouco tempo, pois foi necessário dispor, primeiramente, de métodos analíticos muito sensíveis e específicos para detectá-los e, depois, de ferramentas bioquímicas capazes de confirmar seu caráter essencial (BARAN, 2005).

A Figura 3.4 mostra uma Tabela Periódica na qual os elementos químicos estão classificados de acordo com seus efeitos biológicos. Observa-se que, dentre os traços essenciais, encontra-se o estanho (Sn), que é um metal que faz parte da composição do corpo humano e que, em animais, tem sua deficiência relacionada a retardo do crescimento (BENITE *et al.*, 2007).

Figura 3.4- Tabela Periódica e a classificação dos elementos quanto ao efeito biológico.

Fonte: Tabela Periódica Virtual – I.H. Softwares, versão 1.0.164.

3.3 – Doenças infecciosas e quimioterapia antimicrobiana

3.3.1 – Conceitos e situação atual

Antimicrobianos são substâncias que provocam morte ou inibição do crescimento de microrganismos. O principal objetivo do seu uso é o de prevenir ou tratar uma infecção, diminuindo ou eliminando os microrganismos patogênicos e, se possível, preservando os germes da microbiota normal (MACHADO *et al.*, 2008).

O tratamento com esta classe de substâncias deve ser reservado para situações em que o uso seja comprovadamente benéfico, minimizando o emprego em casos de benefício duvidoso. Isso é importante porque esses fármacos induzem o desenvolvimento de resistência, podem apresentar efeitos adversos e representam custos para o indivíduo e para a sociedade (MACHADO & BARROS, 2008).

Nesse sentido, para se controlar a resistência microbiana deve-se ter em mente que esse processo requer uma visão multidisciplinar, em que todo o corpo clínico deve ter sua participação efetiva, seja na redução de prescrições inadequadas, seja nos cuidados simples para evitar infecção, como higienização de mãos e ambientes, ou na vigilância contínua, de maneira a identificar as tendências de surgimento de mecanismos de resistências antes desconhecidos (WUNDER, 2004).

É inegável que o conhecimento disponível na área de doenças infecciosas tem aumentado de forma substancial nos últimos anos. Esse fenômeno é resultado não apenas da

melhor caracterização clínica e epidemiológica de diferentes síndromes infecciosas, mas, sobretudo, dos avanços registrados nas áreas de microbiologia e imunologia (COLOMBO, 2006).

Certamente o sucesso atingido pela humanidade no que se refere ao aumento da expectativa de vida pode ser atribuído, em muito, ao controle da morbimortalidade causada pelas doenças infecciosas. Nesse contexto, atribui-se um papel importante à melhoria das condições sanitárias, ao emprego massivo de vacinas e ao desenvolvimento da terapia antimicrobiana eficaz (PASQUALOTTO & SCHWARZBOLD, 2006).

Apesar desse sucesso, as doenças infecciosas permanecem como um dos principais problemas de saúde pública, sendo a principal causa de óbito no mundo. Segundo a Organização Mundial de Saúde, uma em cada três mortes é causada por doenças infecto-parasitárias. Nessa categoria, as principais causas são as doenças do trato respiratório inferior, a tuberculose, as doenças diarreicas, a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) e a malária. Muitas dessas condições altamente letais afetam populações jovens em países pobres, acarretando um grande impacto socioeconômico (PASQUALOTTO & SCHWARZBOLD, 2006).

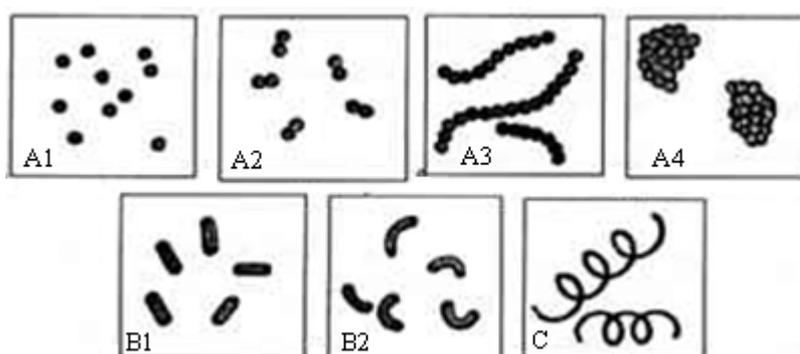
Ante ao que parece ser um massacre opressor de microrganismos, vale lembrar que a cooperação entre estes organismos e humanos é a regra, a doença é exceção. De fato, sem nossa microbiota intestinal normal estaríamos em risco pela deficiência em vitamina K, além do que a microbiota vaginal normal previne as infecções recorrentes por fungos do gênero *Candida*. Sabe-se que a maioria dessas relações é simbiótica, ou seja, benéfica para ambos; ou então, na pior das hipóteses, comensal, que é o compartilhamento do alimento do hospedeiro sem causar dano (KUMAR *et al.*, 2008).

Quando os microrganismos causam doença, a natureza e extensão da patologia dependem da virulência (patogenicidade) do microrganismo e da resposta imunológica do hospedeiro. Em consequência, a infecção no sentido microbiológico não é sinônimo de doença infecciosa no sentido clínico; a doença infecciosa ocorre quando há dano tecidual ou alteração na fisiologia do hospedeiro (KUMAR *et al.*, 2008). É importante ainda ressaltar que é necessário ter um maior cuidado em casos de pacientes imunodebilitados, visto que sua resposta imune está comprometida.

3.3.2 – Estrutura e classificação da célula bacteriana

As bactérias são classificadas, de acordo com sua forma, em três grupos básicos: cocos, bacilos e espiroquetas (Figura 3.5). Os cocos são redondos, os bacilos apresentam a forma de bastões e as espiroquetas são em forma de espiral. Algumas bactérias apresentam formas variadas e são denominadas pleomórficas (muitas formas). A forma da célula bacteriana é determinada pela presença de uma parede celular rígida e a aparência da bactéria ao microscópio é um dos critérios mais importantes para sua identificação (LEVINSON & JAWETZ, 2005a).

Figura 3.5- Formas e organização das bactérias: A1- cocos; A2- diplococos; A3- estreptococos; A4- estafilococos; B1- bacilos; B2- vibriões; C- espiroquetas.

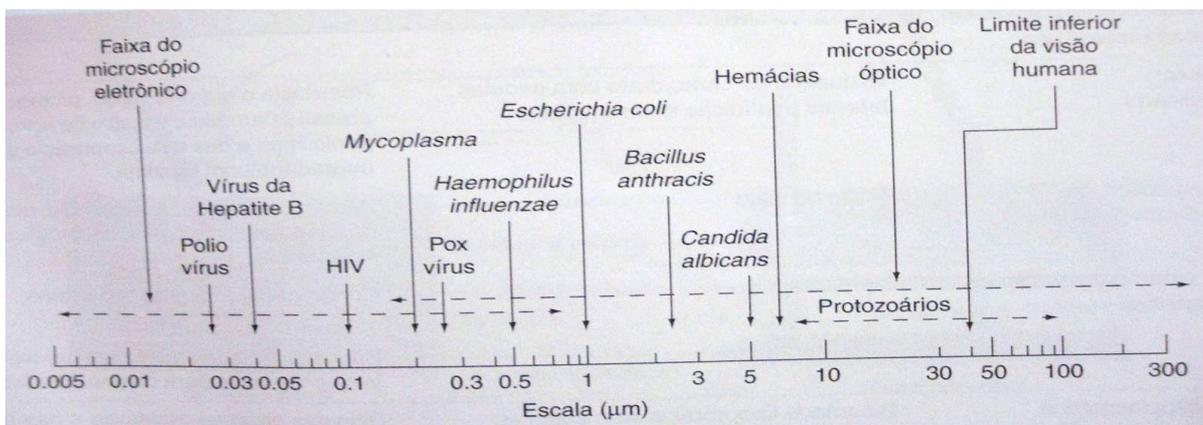


Fonte: <<http://www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/bacterias/reino-monera.php>>. (Dez/2010)

Além das formas características, a organização também é importante. Por exemplo, certos cocos ocorrem aos pares (diplococos), alguns em cadeias (estreptococos) e outros em forma de cachos de uva (estafilococos). Esta organização é determinada pela orientação e pelo grau de ligação da bactéria no momento da divisão celular. O arranjo dos bacilos e das espiroquetas é menos importante clinicamente em relação ao arranjo dos cocos (LEVINSON & JAWETZ, 2005a).

As bactérias variam em tamanho de cerca de 0,2 a 5 μm (Figura 3.6). As menores bactérias conhecidas (*Mycoplasma*) têm aproximadamente o mesmo tamanho dos maiores vírus já descritos (poxvírus) e são os menores organismos capazes de viver independentemente de um hospedeiro. As bactérias mais compridas, em forma de bastonete, se aproximam ao tamanho de algumas leveduras e das hemácias humanas (7 μm) (LEVINSON & JAWETZ, 2005a).

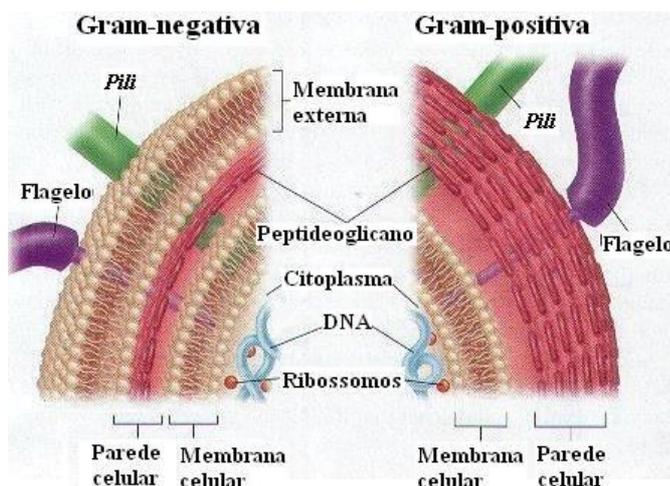
Figura 3.6- Tamanhos representativos de bactérias, vírus, leveduras, protozoários e células humanas.



Fonte: LEVINSON & JAWETZ, 2005a.

As bactérias possuem parede celular e, de acordo com a constituição dessa parede, esses organismos podem ser divididos em dois grandes grupos: bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (Figura 3.7). As diferenças entre esses dois grupos residem principalmente nas suas propriedades de permeabilidade e nos componentes de superfície. As principais diferenças reveladas pela coloração de Gram estão relacionadas à presença de uma membrana externa nas bactérias Gram-negativas e de uma espessa camada de peptidoglicano nas bactérias Gram-positivas (PRETTO, 2005).

Figura 3.7- Diferenças estruturais entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.



Fonte: Adaptado de <<http://quwickstep.com/search/gram-bacteria.html>>. (Dez/2010).

A coloração de Gram foi desenvolvida em 1884 pelo médico dinamarquês Christian Gram, sendo considerada uma das técnicas mais importantes em microbiologia.

Como dito anteriormente, separa a maioria das bactérias em dois grupos: as bactérias Gram-positivas, que se coram de azul, e as bactérias Gram-negativas, que se coram de vermelho. Esta técnica envolve as quatro etapas seguintes (LEVINSON & JAWETZ, 2005a):

- O corante cristal de violeta cora todas as bactérias de azul-violáceo;
- A solução de iodo (lugol, um mordente) é adicionada para formar o complexo cristal violeta-iodo (todas as células continuam azuis);
- O solvente orgânico, como acetona ou etanol, extrai mais eficientemente o complexo formado das bactérias Gram-negativas, de parede celular fina e ricas em lipídeos, que das bactérias Gram-positivas, de parede celular espessa; então os organismos Gram-negativos se tornam incolores e os Gram-positivos permanecem azuis;
- O corante vermelho, safranina, cora as células Gram-negativas descoloridas de vermelho, enquanto as bactérias Gram-positivas permanecem azuis.

As bactérias Gram-negativas possuem uma parede celular composta de várias camadas que diferem na sua composição química e, conseqüentemente, é mais complexa que a parede das bactérias Gram-positivas que, apesar de mais espessa, apresenta predominantemente um único tipo de macromolécula (PRETTO, 2005).

Essa parede espessa das bactérias Gram-positivas impede a passagem de compostos hidrofóbicos, devido à presença de açúcares e aminoácidos. Já a membrana externa das bactérias Gram-negativas, por apresentar características lipoproteicas, faz com que essas bactérias necessitem dispor de mecanismos que permitam a entrada de compostos hidrofílicos como açúcares, aminoácidos e certos íons; por isso essa membrana possui canais especiais chamados de porinas, que permitem a difusão desses compostos. Além disso, a membrana externa constitui uma barreira adicional à entrada, por exemplo, de agentes antibacterianos (PRETTO, 2005).

Outra estrutura essencial da célula bacteriana é conhecida como membrana citoplasmática. É uma estrutura de 8 nm de espessura que é responsável por formar uma barreira de separação entre o meio interno (citoplasma) e externo da célula. A membrana dos procaríotos difere quimicamente da membrana das células eucarióticas principalmente pela ausência de esteróis. Como principais funções desta estrutura têm-se o transporte ativo de moléculas, a geração de energia, o transporte de elétrons, a biossíntese de componentes e a secreção de enzimas e toxinas (PRETTO, 2005; LEVINSON & JAWETZ, 2005a).

Estes foram apenas alguns exemplos das estruturas celulares bacterianas e de diferenças entre bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Eles foram aqui abordados pois

essas diferenças estruturais são as principais razões de certos compostos antimicrobianos agirem sobre um grupo e não sobre o outro.

3.3.3 – Fungos: composição estrutural e principais infecções

Como os fungos são organismos eucarióticos (possuem núcleo individualizado e um rico sistema de membranas), enquanto bactérias são procarióticas, eles diferem em diversos aspectos fundamentais (Tabela 3.1). Duas estruturas celulares fúngicas são importantes em medicina (LEVINSON & JAWETZ, 2005c):

- A parede celular, que consiste principalmente em quitina (e não peptidoglicano, como nas bactérias); dessa forma, fungos são insensíveis a antimicrobianos tais como penicilina, que inibe a síntese de peptidoglicano;
- A membrana celular, que contém ergosterol e zosterol, em contraste com as membranas celulares humanas, as quais contêm colesterol. A ação seletiva da anfotericina B sobre fungos tem como base essa diferença entre os esteróis das membranas.

Tabela 3.1- Comparação entre fungos e bactérias

Característica	Fungos	Bactérias
Diâmetro	Aproximadamente 4 µm (<i>Candida</i>)	Aproximadamente 1 µm (<i>Staphylococcus</i>)
Núcleo	Eucariótico	Procariótico
Citoplasma	Mitocôndria e retículo endoplasmático presentes	Mitocôndria e retículo endoplasmático ausentes
Membrana celular	Esteróis presentes	Esteróis ausentes (exceto <i>Mycoplasma</i>)
Composição da parede celular	Quitina	Peptidoglicano
Esporos	Esporos sexuais e assexuais para a reprodução	Esporos para a sobrevivência, não para a reprodução
Dimorfismo térmico	Sim (alguns)	Não
Metabolismo	Requerem carbono orgânico; aeróbios não obrigatórios	Muitas não requerem carbono orgânico; muitos anaeróbios obrigatórios

Fonte: LEVINSON & JAWETZ, 2005c.

De acordo com Levinson & Jawetz (2005c), existem dois tipos de fungos: leveduras e fungos filamentosos. As leveduras crescem como células únicas que se reproduzem por brotamento assexual. Os fungos filamentosos, por sua vez, crescem como filamentos longos (hifas) e formam um emaranhado como em uma esteira (micélio). Algumas hifas formam paredes transversais (hifas septadas), enquanto outras não (hifas não-septadas). As hifas não-septadas são multinucleadas (cianocíticas).

Todos os fungos requerem uma fonte orgânica de carbono pré-formada: por essa razão há uma frequente associação com material em decomposição. Portanto, o *habitat* natural da maioria dos fungos é o meio ambiente. Uma importante exceção é a *Candida albicans*, a qual faz parte da microbiota humana normal (LEVINSON & JAWETZ, 2005c).

Além da classificação com base na forma de crescimento (filamentosos ou leveduriformes), os fungos patogênicos podem ser divididos conforme o tipo de infecção que provocam. As infecções fúngicas são denominadas micoses e, de acordo com a infecção, podem ser divididos em causadores de micoses superficiais ou profundas (PRETTO, 2005).

As micoses superficiais são as principais patologias causadas por fungos classificados como dermatófitos. São encontradas na derme superficial, uma vez que a epiderme é formada por queratina, a qual serve de alimento para estes microrganismos. Essas infecções podem ser agudas ou crônicas, dependendo do agente etiológico e do estado imunológico do paciente e limitam-se às camadas mais externas da pele e cabelos. Em geral, tratam-se de infecções leves, com resposta inflamatória mínima ou ausente (PRETTO, 2005).

As micoses subcutâneas, por sua vez, constituem um grupo distinto de doenças fúngicas que acometem a derme e o tecido subcutâneo. São causadas por fungos que costumam ser isolados do ambiente e que só produzem a doença em circunstâncias oportunistas ou associadas a traumatismos. Já as micoses sistêmicas são aquelas que invadem órgãos internos do organismo e são causadas por patógenos primários (ausentes na microbiota normal) ou por fungos oportunistas (PRETTO, 2005).

Infecções oportunistas são aquelas em que organismos normalmente não-patogênicos produzem doenças em hospedeiros imunocomprometidos. Podem ser causadas por diversos microrganismos, não apenas por fungos. Idosos e indivíduos com AIDS são comumente susceptíveis a este tipo de infecção, entretanto com os avanços na medicina, como a quimioterapia para tumores e a imunossupressão para o transplante de órgãos, também foi criada uma classe nova de pacientes vulneráveis a organismos normalmente inócuos, contudo oportunistas (KUMAR *et al.*, 2008).

3.3.4 – Classificação dos antimicrobianos

Há diversas maneiras de classificar os antimicrobianos, e todas apresentam méritos e dificuldades. A maior utilidade da classificação é permitir uma melhor compreensão das características dos fármacos. De acordo com Machado e cols. (2008), as principais classificações são as que seguem:

a) Por microrganismos suscetíveis:

- Antibacterianos;
- Antifúngicos;
- Antivirais;
- Antiparasitários.

b) Por origem do antimicrobiano:

- Antibióticos: produzidos por microrganismos;
- Quimioterápicos: sintetizados em laboratório.

Observação: Atualmente tem-se usado o termo “antibiótico” como sinônimo de antibacteriano, incluindo também os fármacos sintéticos.

c) Por efeito nos microrganismos:

- Bactericidas: matam as bactérias;
- Bacteriostáticos: inibem o crescimento das bactérias, sendo necessária a atuação do sistema imunológico para eliminação do microrganismo.

Observação: O mesmo tipo de terminologia pode ser empregado com outros grupos de antimicrobianos, por exemplo, fungicidas e fungistáticos, virucidas e virustáticos.

Cabe salientar que esses efeitos não são absolutos, pois fármacos primariamente bacteriostáticos podem ser bactericidas para alguns tipos de germes (por exemplo, o cloranfenicol pode ser bactericida para cepas de *Haemophilus* e *Neisseria meningitidis* plenamente sensíveis), e alguns antibióticos, predominantemente bactericidas, podem ser apenas bacteriostáticos (por exemplo, o cefaclor agindo sobre cepas de *Haemophilus* resistentes à penicilina). A obtenção do efeito bactericida, na maioria dos casos, só ocorre quando os germes estão na fase exponencial de crescimento; isso é especialmente importante para os antibióticos que agem na parede celular, com destaque para os β -lactâmicos, como penicilinas e cefalosporinas, por exemplo (MACHADO *et al.*, 2008).

d) Por mecanismo de ação:

Os antimicrobianos podem atuar de diversas maneiras, interferindo em processos metabólicos ou em estruturas dos microrganismos:

- **Parede celular:** penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos, bacitracina, vancomicina, teicoplanina, fosfomicina, aztreonam, daptomicina;
- **Membrana citoplasmática:** polimixina B, colistina, daptomicina, tirotricina, anfotericina B, nistatina, miconazol, cetoconazol, fluconazol, itraconazol, voriconazol;
- **Replicação cromossômica:** metronidazol, quinolonas, novobiocina, griseofulvina, 5-flucitosina, ribaravina, vidarabina, aciclovir, ganciclovir, cidofovir, fanciclovir, valaciclovir, penciclovir, zidovudina (ZDV), didanosina (DDI), zalcitabina (DDC), estavudina (d4T), lamivudina (3TC), abacavir, tenofovir, efavirenz, nevirapina;
- **Inibição da síntese proteica:** tetraciclina, cloranfenicol, tianfenicol, clindamicina, lincomicina, eritromicina, claritromicina, azitromicina, estreptograminas, estreptomicina, gentamicina, amicacina, tobramicina, neomicina, rifampicina, rifamicinas, oxazolidinonas;
- **Inibição metabólica:** sulfonamidas, sulfonas, trimetoprim, pirimetamina, primaquina, inibidores da protease do HIV (indinavir, saquinavir, ritonavir, nelfinavir e outros).

Segundo Levinson & Jawetz (2005b), os antimicrobianos podem, ainda, ser classificados como sendo de **amplo espectro**, que são aqueles ativos contra vários tipos de microrganismos (por exemplo, as tetraciclina, que são ativas contra muitos bastonetes Gram-negativos, clamídias, micoplasmas e riquetsias); ou de **baixo espectro**, que são aqueles ativos contra um ou poucos tipos de microrganismos (por exemplo, a vancomicina, que é principalmente utilizada contra determinados cocos Gram-positivos, tais como estafilococos e enterococos).

3.4 – Microrganismos

Um resumo das características de alguns microrganismos e das doenças que eles podem causar é apresentado a seguir (adaptado de LEVINSON & JAWETZ, 2005d; CORTEZ, 2006).

a) *Staphylococcus aureus*:

- Características- Cocos Gram-positivos dispostos em cachos. São coagulase e catalase-positivos. A maioria dos isolados produz β -lactamase, enzima que inativa fármacos que contenham o anel β -lactâmico em sua estrutura, como por exemplo penicilinas e cefalosporinas.

- Doenças- Abscessos em vários órgãos, endocardites, gastroenterites (intoxicação alimentar) e síndrome do choque tóxico, pneumonia hospitalar, infecções de feridas cirúrgicas e sepse. É um dos causadores de infecções humanas mais comuns, principalmente do sistema tegumentar.

- Habitat e transmissão- Habitam o nariz e a pele humanos. A transmissão ocorre por meio das mãos.

- Prevenção- Cefazolina é usada para prevenir infecções cirúrgicas. Não há vacina disponível. A lavagem das mãos reduz a disseminação.

- Observação- Produzem β -lactamase (mediada por plasmídeos) e alterações nas proteínas ligadoras de penicilina. Raras cepas resistentes à vancomicina têm surgido.

b) *Staphylococcus epidermidis*:

- Características- Cocos Gram-positivos dispostos em cachos. São coagulase negativa e catalase positiva.

- Doenças- Endocardites em válvulas protéticas, infecções de cateteres intravasculares, infecções do fluido cerebrospinal, sepse neonatal.

- Habitat e transmissão- Microbiota normal da pele humana e das membranas mucosas. É provável que as cepas do próprio paciente causem infecções, mas a transmissão de pessoa para pessoa pelas mãos pode ocorrer.

- Prevenção- Não existe fármaco preventivo ou vacina.

- Observação- Produzem β -lactamases e podem ser resistentes a muitos antibacterianos.

c) *Streptococcus pyogenes* (Grupo A):

- Características- Cocos Gram-positivos dispostos em cadeias. São β -hemolíticos e catalase-negativos. Sensíveis a bacitracina. Estreptococos β -hemolíticos são subdivididos em grupos A, B, etc., por diferenças de antigenicidade de seus carboidratos presentes na parede celular.

- Doenças- Doenças supurativas, como, por exemplo, faringite e celulite, e doenças (imunológicas) não-supurativas, como febre reumática e glomerulonefrite aguda.

- Habitat e transmissão- Habitam a garganta e a pele humanas. A transmissão ocorre por meio de gotículas respiratórias.

- Prevenção- A penicilina é utilizada em pacientes com febre reumática para impedir faringite recorrente por *S. pyogenes*. Isso previne danos adicionais às válvulas cardíacas. Não existe vacina.

d) *Escherichia coli*:

- Características- Bastonetes Gram-negativos facultativos e fermentadores da lactose.

- Doenças- Infecções do trato urinário, septicemia, meningite neonatal e diarreia dos viajantes são as mais comuns.

- Habitat e transmissão- Habitam o cólon humano, mas também pode haver colonização da vagina e da uretra. A partir da uretra, o organismo pode ascender e causar infecções do trato urinário. A meningite neonatal é adquirida durante o parto e a diarreia, pela rota fecal-oral.

- Prevenção- A prevenção das infecções do trato urinário envolve limitar a frequência e a duração de cateterização urinária. A prevenção da septicemia envolve a remoção imediata ou a alteração dos sítios de injeção intravenosa. A diarreia dos viajantes pode ser evitada pela ingestão de alimentos cozidos e de água fervida em alguns países. A administração de doxiciclina profilática ou pepto-bismol também pode ser usada para prevenir a diarreia dos viajantes. Não existe vacina que previna qualquer das doenças causadas por *E. coli*.

• Observação- A resistência a antimicrobianos é mediada por enzimas codificadas por plasmídeos, como a β -lactamase e as enzimas que modificam os aminoglicosídeos.

e) *Klebsiella pneumoniae*:

• Características- Bastonetes Gram-negativos com uma grande cápsula polissacarídica.

• Doenças- Pneumonia, infecções do trato urinário e septicemia.

• Habitat e transmissão- Habitam o trato entérico e o respiratório superior. Os organismos são transmitidos aos pulmões pela aspiração do trato respiratório superior e pela inalação de gotículas respiratórias. A transmissão para o trato urinário ocorre por distribuição e ascensão da flora fecal.

• Prevenção- Não há vacina ou medicamento disponível. Os cateteres urinários e intravenosos devem ser prontamente removidos; e na necessidade de manutenção, deve ser feita a troca a cada 15 dias utilizando técnicas assépticas.

• Observação- A sensibilidade aos antibacterianos deve ser testada. A resistência é mediada por enzimas codificadas por plasmídeos.

f) *Proteus mirabilis*:

• Características- Bastonetes Gram-negativos facultativos e não-fermentadores de lactose. São altamente móveis e produzem urease.

• Doenças- Infecções do trato urinário e septicemia.

• Habitat e transmissão- Habitam o cólon humano e o ambiente (solo e água). A transmissão para o trato urinário ocorre pela disseminação ascendente da flora fecal.

• Prevenção- Não há vacina ou medicamento disponível. A remoção rápida de cateteres urinários auxilia na prevenção de infecções do trato urinário.

• Observação- A sensibilidade aos antibióticos deve ser testada. A resistência é mediada por β -lactamases codificadas por plasmídeos.

g) *Pseudomonas aeruginosa*:

- Características- Bastonetes aeróbios, Gram-negativos e não-fermentadores de lactose. Produzem o pigmento piocianina (azul-esverdeado). São oxidase-positivas, o que as distingue dos membros da família Enterobacteriaceae.

- Doenças- Infecções de ferimentos, infecções do trato urinário, pneumonia e septicemia. É uma das principais causas de infecções hospitalares, especialmente em pacientes queimados e com fibrose cística. Causam endocardites em usuários de drogas endovenosas.

- Habitat e transmissão- Habitam fontes de água presentes no ambiente, como respiradores hospitalares e umidificadores. Também habitam a pele, o trato respiratório superior e o cólon de cerca de 10% das pessoas. A transmissão ocorre por meio de aerossóis de água, por aspiração e por contaminação fecal.

- Prevenção- Desinfecção de equipamentos contendo água no hospital, lavagem das mãos e rápida remoção de cateteres urinários e intravenosos são medidas indicadas. Não há vacina disponível.

- Observação- Devido à resistência comumente apresentada pelos isolados, os antibacterianos devem ser escolhidos com base nos testes de sensibilidade. A resistência é mediada por uma variedade de enzimas codificadas por plasmídeos (por exemplo, β -lactamases e enzimas acetiladoras).

h) *Salmonella typhimurium*:

- Características- Bastonetes Gram-negativos, aeróbios facultativos, que não fermentam lactose, mas produzem H_2S .

- Doenças- Salmonelose ou enterocolite. Podem causar infecção sistêmica e meningite em crianças.

- Habitat e transmissão- Habitam o trato intestinal de seres humanos e animais. Podem ser isoladas de uma grande variedade de hospedeiros, especialmente aves e suínos, mas também de seres humanos, alimentos e do meio ambiente. Frequentemente veiculadas por alimentos.

- Prevenção- É feita principalmente pela saúde pública e por medidas de higiene pessoal. Abastecimento de água clorada, cultura de amostras de fezes de manipuladores de alimentos, lavagem das mãos antes de manipular qualquer alimento, pasteurização do leite e cozimento adequado de derivados de frango e carne bovina. Não há vacinas disponíveis.

- Observação- Os antibacterianos são indicados apenas para crianças pequenas, idosos ou em indivíduos com doenças crônicas que correm risco de sepse e de abscessos disseminados, pois os antibióticos prolongam o estado de portador e possibilita o aparecimento de cepas resistentes aos antibióticos.

i) *Candida albicans*:

- Características- É um fungo leveduriforme quando localizado na membrana mucosa na qual faz parte da microbiota normal, porém forma pseudo-hifas e hifas quando invade o tecido. Não é dimórfico com relação à temperatura.

- Doenças- Sapinho, candidíase disseminada e candidíase mucocutânea crônica.

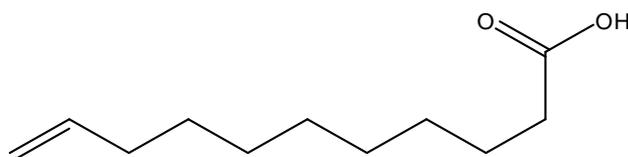
- Habitat e transmissão- Faz parte da microbiota normal da pele, das membranas mucosas e do trato gastrointestinal. Não há transmissão de pessoa para pessoa.

- Prevenção- Os fatores predisponentes devem ser reduzidos ou eliminados. O sapinho pode ser prevenido pelo uso de pastilhas orais de clotrimazol ou gargarejos com nistatina. Não existe vacina.

3.5 – Ácido undecilênico

O ácido undecilênico é o ácido 10-undecenoico, um composto insaturado de 11 carbonos (Figura 3.8) que é obtido por craqueamento do óleo de rícino. Embora raramente encontrado na natureza, pode ser observado no estado natural nas lágrimas e no suor. É insolúvel em água e apresenta um odor muito forte que tem sido usado para mascarar outros odores agroindustriais ou industriais desagradáveis (COLETICA, 1998).

Figura 3.8- Ácido undecilênico.



A principal característica do ácido undecilênico reside no fato de que, como os ácidos graxos saturados de cadeia com menos de 8 átomos de carbono, ele apresenta atividade antifúngica e antibacteriana. O espectro de ação antimicrobiana deste ácido inclui ação contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, fungos filamentosos e leveduras (COLETICA, 1998).

Este ácido é um líquido amarelo de odor rançoso característico e trata-se primeiramente de um fungistático, embora se possa observar uma atividade fungicida com exposição prolongada a altas concentrações do agente. Exibe atividade contra vários fungos, incluindo os que causam dermatofitoses (BENNETT, 2005).

A seguir são descritas algumas apresentações farmacêuticas que contêm o ácido undecilênico (BENNETT, 2005):

- a) O ácido undecilênico está disponível na forma de espuma, pomada, creme, pó, pó em *spray*, sabão e líquido;
- b) O undecilenato de zinco é comercializado em combinação com outros ingredientes. O zinco proporciona uma ação adstringente, que ajuda na supressão da inflamação;
- c) A pomada composta de ácido undecilênico contém tanto ácido undecilênico (cerca de 5%) quanto undecilenato de zinco (cerca de 20%);
- d) O undecilenato de cálcio encontra-se disponível na forma de pó.

As preparações de ácido undecilênico são utilizadas no tratamento de diversas dermatomicoses, especialmente tinha do pé, também conhecida como frieira ou pé-de-atleta, causada frequentemente pelos fungos *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes* ou *Epidermophyton floccosum* (BENNETT, 2005; MEDLEY, 2009)

Podem-se aplicar à pele concentrações do ácido de até 10%, bem como as do ácido e do sal na pomada composta. As preparações assim formuladas não costumam irritar os tecidos, e a sensibilização a elas é rara. O fármaco apresenta benefício indubitável para retardar o crescimento do fungo na tinha do pé, mas a infecção frequentemente persiste, a despeito do tratamento intensivo com preparações do ácido e do sal de zinco. Na melhor das

hipóteses, a taxa de “cura” clínica é cerca de 50%, sendo, portanto, muito menor que aquela obtida com os antifúngicos imidazólicos, a haloprogina ou o tolnaftato (BENNETT, 2005).

A eficácia no tratamento da tinha do couro cabeludo (provocada por fungos do gênero *Tricophyton sp.* ou *Microsporum sp.*) é marginal, e o fármaco não é mais utilizado com esse propósito. As preparações de ácido undecilênico também foram aprovadas para uso no tratamento da dermatite das fraldas, da tinha crural e de outras afecções dermatológicas de menor importância (BENNETT, 2005; MEDLEY, 2009).

Segundo Machado (2008), há muitos antifúngicos tópicos eficazes disponíveis no mercado brasileiro, por isso alguns agentes antigos ou pouco eficazes estão caindo em desuso, e entre eles está o ácido undecilênico.

Pelas características mostradas acima, a proposta deste trabalho foi a complexação do ácido undecilênico ao estanho como uma alternativa para aumentar sua bioatividade, bem como alargar seu espectro de ação pelo efeito sinérgico metal-ligante.

3.6 – Referências

BARAN, E. J. Suplementação de elementos-traços. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, n. 6, p. 7-12, 2005.

BAUL, T. S. B. Antimicrobial activity of organotin(IV) compounds: a review. **Applied Organometallic Chemistry**, v. 22, p. 195-204, 2008.

BENITE, A. M. C.; MACHADO, S. P.; BARREIRO, E. J. Uma visão da química bioinorgânica medicinal. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 2062-2067, 2007.

BENNETT, J. E. Antimicrobianos (continuação). In: GOODMAN & GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica**. Trad. 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2005. cap. 49, p. 971-983

BERALDO, H. Contribuições da química inorgânica para a química medicinal. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, n. 6, p. 4-6, 2005.

COLETICA (Lyon, FR). PERRIER, E. J-L.; ANTONI, D.; HUC, A. R. **Derivados de ácido undecilênico con macromoléculas hidrófilas y utilizaciones en cosmética o en farmacia**. FR 92 05181, 27 abr. 1993, 16 dez. 1998. Disponível em: <http://www.espatentes.com/pdf/2122012_t3.pdf>. Acesso em: 23 nov. 2010.

COLOMBO, A. L. Apresentação. In: PASQUALOTTO, A. C. & SCHWARZBOLD, A. V. **Doenças infecciosas: consulta rápida**. Porto Alegre: Artmed, 2006. p. 15-16.

CORTEZ, A. L. L. **Disseminação de bactérias dos gêneros *Campylobacter* e *Salmonella* em linhas de abate de aves**. Jaboticabal, 2006. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Paulista.

FILGUEIRAS, C. A. L. A nova química do estanho. **Química Nova**, v. 21, n. 2, p. 176-192, 1998.

FONTES, A. P. S.; CÉSAR, E. T.; BERALDO, H. A química inorgânica na terapia do câncer. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, n. 6, p.13-18, 2005.

GUO, Z. & SADLER, P. J. Metals in medicine. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 38, p. 1512-1531, 1999.

HADJIKAKOU, S. K. & HADJILIADES, N. Antiproliferative and anti-tumor activity of organotin compounds. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 253, p. 235-249, 2009.

HOCH, M. Organotin compounds in the environment: an overview. **Applied Geochemistry**, v. 16, p. 719-743, 2001.

KHAN, M. I. *et al.* Organotin(IV) esters of 4-maleimido-benzoic acid: synthesis, characterization and *in vitro* antileishmanial effects. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 2, p. 341-347, 2009.

KUMAR, V. *et al.* Patologia geral das doenças infecciosas. **Robbins: patologia básica**. Trad. 8th. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. cap. 9, p. 349-370.

LEVINSON, W. & JAWETZ, E. Estrutura da célula bacteriana. **Microbiologia médica e imunologia**. Trad. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. Parte I, cap. 2, p. 16-25.

_____. Drogas antimicrobianas: mecanismos de ação. **Microbiologia médica e imunologia**. Trad. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. Parte I, cap. 10, p. 71-84.

_____. Micologia básica. **Microbiologia médica e imunologia**. Trad. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. Parte V, cap. 47, p. 309-314.

_____. Resumos de organismos de importância clínica. **Microbiologia médica e imunologia**. Trad. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. Parte VIII, p. 449-486.

LUENGO, M. B. Uma revisão histórica dos principais acontecimentos da imunologia e da farmacologia na busca do entendimento e tratamento das doenças inflamatórias. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 2, n. 2, p. 64-72, 2005.

MACHADO, A. Uso tópico de antimicrobianos. In: BARROS, E. *et al.* **Antimicrobianos: consulta rápida**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008. cap. 7, p. 107-115.

MACHADO, A. & BARROS, E. Princípios básicos do uso de antimicrobianos. In: BARROS, E. *et al.* **Antimicrobianos: consulta rápida**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008. cap. 1, p. 17-23.

MACHADO, A.; GUIMARÃES, J. F.; BARROS, E. Principais grupos farmacológicos: conceitos e propriedades. In: BARROS, E. *et al.* **Antimicrobianos: consulta rápida**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008. cap. 2, p. 25-55.

MEDLEY. PAPINE, J. M. (Org). Antifúngicos. **Programa de desenvolvimento profissional ao farmacêutico**. E-learning, Mód. 12, 2009. Disponível em: <http://www.medley.com.br/aofarmacutico/src/elearning_login.asp?id_modulo=25&id_pagina=1>. Acesso em: 28 mar. 2010.

MENDONÇA, D. R. **Emprego de catalisadores de estanho(IV) em reações de transesterificação: obtenção de biodiesel**. Maceió, 2008. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Alagoas.

NATH, M. *et al.* Organotin(IV) tryptophanylglycinates: potential non-steroidal antiinflammatory agents; crystal structure of dibutyltin(IV) tryptophanylglycinate. **Applied Organometallic Chemistry**, v. 23, n. 9, p. 347-358, 2009.

PASQUALOTTO, A. C. & SCHWARZBOLD, A. V. Prefácio. **Doenças infecciosas: consulta rápida**. Porto Alegre: Artmed, 2006. p. 17-19.

PRETTO, J. B. **Potencial antimicrobiano de extratos, frações, e compostos puros obtidos de algumas plantas da flora catarinense**. Itajaí, 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade do Vale do Itajaí.

SHUAIBU, M. N. *et al.* Effect of dibutyltin(IV) on the ultrastructure of African *Trypanosoma spp.* **Parasitology Research**, v. 92, p. 65-73, 2004.

Softciências – Tabela Periódica v2.5. Disponível em: <<http://nautilus.fis.uc.pt/st2.5/scenes-p/geral/home.html>>. Acesso em: 19 mar. 2009.

Tabela Periódica Virtual, I.H. Softwares - Pesquisa e Desenvolvimento. Disponível em: <<http://www.ihsoftwares.k6.com.br>>. Acesso em: 22 out. 2008.

WUNDER, R. S. Principais patógenos bacterianos em UTI: avaliação da resistência em cinco anos. **Arquivos Brasileiros de Medicina Naval**, v. 65, n. 1, p. 7-21, 2004.

4. EXPERIMENTAL

4. EXPERIMENTAL

4.1 – Atividades desenvolvidas e locais de realização

A parte experimental deste trabalho foi desenvolvida em seis etapas: i) síntese do sal de sódio do ligante; ii) síntese dos complexos de estanho(IV); iii) caracterização dos organoestânicos sintetizados; iv) avaliação preliminar da bioatividade (teste de toxicidade em *Artemia salina*); v) avaliação da atividade antimicrobiana dos complexos; e vi) avaliação da citotoxicidade dos complexos de estanho(IV) frente a células da linhagem J774.

Todas as reações de síntese, bem como as análises de infravermelho foram realizadas no laboratório do Grupo de Catálise e Reatividade Química (GCaR) do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas (IQB / UFAL).

Os espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e ^{119}Sn foram obtidos no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear, também do IQB / UFAL.

Os testes de toxicidade em *Artemia salina* e de atividade antimicrobiana foram feitos em parceria com o Laboratório de Tratamento de Feridas (LTF) da Escola de Enfermagem e Farmácia da Universidade Federal de Alagoas (EENFAR / UFAL).

O teste de citotoxicidade em macrófagos foi desenvolvido por componentes do Laboratório de Farmacologia e Imunidade do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Alagoas (ICBS / UFAL).

4.2 – Reagentes, solventes e equipamentos

A procedência dos reagentes e solventes são mostrados na Tabela 4.1. Os reagentes, gases e solventes foram utilizados como recebidos, com exceção do tolueno, que foi seco sob destilação com sódio metálico.

Tabela 4.2 - Procedência de reagentes e solventes

Reagentes e Solventes	Fórmula Molecular	Origem
Ácido undecilênico (10-undecenoico – IUPAC)	$\text{C}_{11}\text{H}_{20}\text{O}_2$	Sigma-Aldrich
Argônio	Ar	White Martins
Bicarbonato de sódio	NaHCO_3	Vetec

(*Continua*)

Cloreto de tributilestanho	$C_{12}H_{27}ClSn$	Sigma-Aldrich
Clorofórmio	$CHCl_3$	Dinâmica
Clorofórmio deuterado	$CDCl_3$	Sigma-Aldrich
Diacetato de dibutilestanho	$C_{12}H_{24}O_4Sn$	Acros Organics
Dicloreto de dibutilestanho	$C_8H_{18}Cl_2Sn$	Sigma-Aldrich
Dicloreto de dimetilestanho	$C_2H_6Cl_2Sn$	Sigma-Aldrich
Dilaurato de dibutilestanho	$C_{32}H_{64}O_4Sn$	Sigma-Aldrich
Éter dietílico	$C_4H_{10}O$	Proquímicos
Metanol	CH_4O	Proquímicos
Sódio metálico	Na	Sigma-Aldrich
Tetrametilestanho	$C_4H_{12}Sn$	Sigma-Aldrich
Tolueno	C_7H_8	Vetec

Na Tabela 4.2 são apresentados os equipamentos utilizados para a realização deste trabalho.

Tabela 4.3 - Equipamentos utilizados no desenvolvimento desta pesquisa

Aparelho	Descrição	Local
Capela de biossegurança (fluxo laminar)	Biohazard Clean Bench. JS Research Inc. (JSR). 220 VAC, 50/60 Hz, 500W, 2.5A, 1P	LTF/ESENFAR/UFAL
Espectrofotômetro no Infravermelho	Espectrofotômetro FT-IR Varian 640-IR com ATR	IQB/UFAL
Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	Espectrômetro Bruker Avance 400.	IQB/UFAL
Estufa incubadora	Estufa microprocessada de cultura e bacteriologia. Quimis Aparelhos Científicos Ltda. Modelo Q316M2, 110/220 V, 110 W	LTF/ESENFAR/UFAL
Luminárias de mesa Pelicano articulável	Jinli Lighting Co., lâmpada fluorescente 9 W, 220 V	LTF/ESENFAR/UFAL

Para os testes antimicrobianos e de toxicidade em larvas de *Artemia salina* foram utilizados os materiais descritos na Tabela 4.3.

Tabela 4.4 - Materiais utilizados nos ensaios antimicrobianos e toxicidade em *Artemia salina*

Material	Origem
Água do mar	Coletada na Praia da Pajuçara, Maceió / AL
Alça de platina	Kai Industries, Co., Ltd.
Cepas microbianas	NewProv Produtos para Laboratório Ltda. e Cefar Diagnóstica Ltda.
Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio P.A. (TTC)	Vetec Química Fina Ltda.
Discos para antibiograma	NewProv Produtos para Laboratório Ltda. e Cefar Diagnóstica Ltda.
Meio de cultivo Ágar Müeller-Hinton	HiMedia Laboratories PVT. Ltd.
Meio de cultivo Ágar Sabouraud Dextrose	HiMedia Laboratories PVT. Ltd.
Meio de cultivo Brain-Heart Infusion Broth	HiMedia Laboratories PVT. Ltd.
Miconazol	Adquirido na Farmácia Homeopática Natural, Maceió / AL
Microplacas de 96 orifícios em poliestireno de fundo chato com tampa estéril	Biofil®
Ovos de <i>Artemia salina</i> Leach.	Adquiridos na Sea World Comercial Ltda., Maceió / AL
Papel filtro Whatman® nº 1	Whatman International Ltd.
Paquímetro mecânico	Starret Company
Pipetas automáticas de volumes variáveis	Eppendorf do Brasil, Indústria e Comércio Ltda
Placas de Petri descartáveis (diâmetro 9cm)	TPP®, Techno Plastic Products AG
Ponteiras de polietileno	TPP®, Techno Plastic Products AG
Solução de Timol 0,01%	Azul de Timol, solução 0,04%, Panreac Química
Solução injetável de Gentamicina 80mg/2mL (Garamicina – Sulfato de Gentamicina)	Schering-Plough Produtos Farmacêuticos Ltda.
Swab individual estéril	Absorve®, Jiangsul Medical Materials Co. Ltd.
Cloreto de sódio P.A.	Vetec Química Fina Ltda.
Fosfato de potássio monobásico P.A. anidro	Vetec Química Fina Ltda.
Cloreto de potássio P.A.	Quimibrás Indústrias Químicas S.A.

(Continua)

Fosfato de sódio dibásico P.A.

Álcool etílico 70%

Quimibrás Indústrias Químicas S.A.

Miyako do Brasil Ind. Com. Ltda.

4.2.1– Preparo das amostras para caracterização

4.2.1.1- Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As análises por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear foram feitas com o aparelho descrito na Tabela 4.2 e as amostras foram preparadas em tubos para RMN e solubilizadas em clorofórmio deuterado (ácido undecilênico e seus organoestânicos) ou óxido de deutério (undecilenato de sódio). Os espectros foram obtidos a temperatura ambiente e operando na frequência de 400,13 MHz para núcleos de ^1H , 100,61 MHz para núcleos de ^{13}C e 149,24 MHz para núcleos de ^{119}Sn . Os deslocamentos químicos (δ) de ^1H e ^{13}C foram medidos usando-se como referência tetrametilsilano (TMS, $\delta=0$) e para os núcleos de ^{119}Sn usou-se como referência o tetrametilestanho (TMT, $\delta=0$).

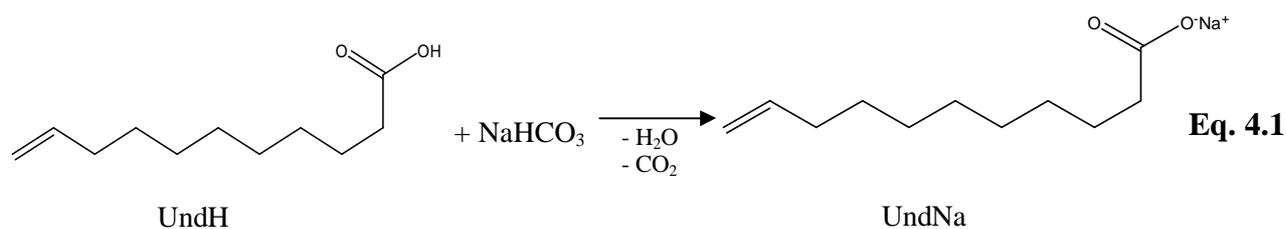
4.2.1.2- Espectroscopia no Infravermelho Médio (IV)

As análises por espectroscopia na região do infravermelho médio foram realizadas em um espectrofotômetro Varian (Tabela 4.2) empregando-se um acessório de refletância total atenuada (ATR). Os espectros abrangeram as regiões de 4000 a 500 cm^{-1} .

4.3 – Síntese dos complexos organoestânicos

Os complexos de estanho(IV) foram sintetizados de acordo com a metodologia descrita por Muhammad e cols. (2009), através da reação entre o sal de sódio do ácido graxo e o cloreto de estanho correspondente ao composto que se pretendia obter.

4.3.1 – Síntese do sal de sódio do ácido undecilênico

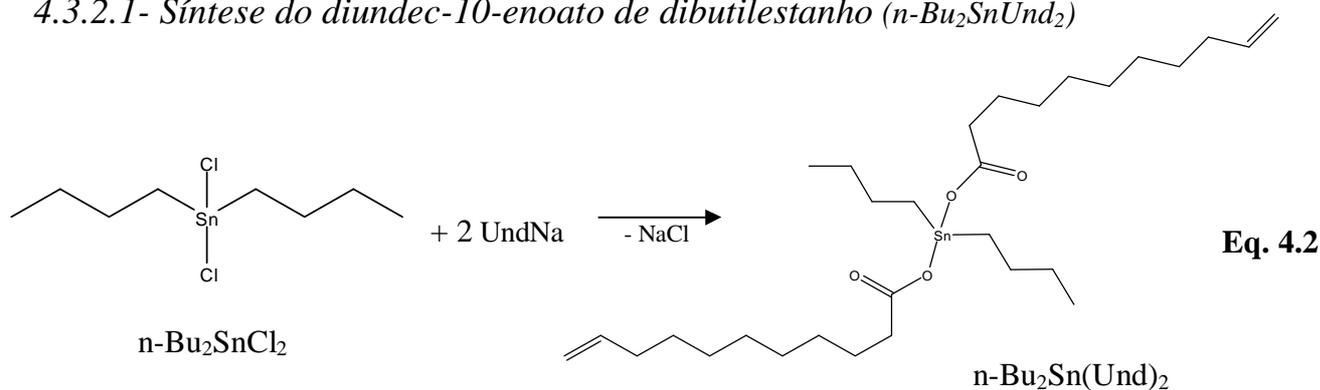


O sal de sódio do ácido undecilênico (UndNa) foi preparado por adição gota a gota de uma quantidade equimolar de NaHCO_3 (4,16 g; 49,5 mmol) dissolvido em água destilada (30 mL) a uma solução metanólica (20 mL) do ácido undecilênico (10 mL; 49,5 mmol). A solução foi agitada por 2 horas à temperatura ambiente. Após o tempo de reação, o solvente foi retirado em evaporador rotatório e seco sob altovácuo. O material obtido apresentou-se como um pó branco com aspecto de sabão (F.M.: $\text{C}_{11}\text{H}_{19}\text{NaO}_2$; M.M.: 206,26 g/mol).

Rendimento total: ~ 99%. IV ($\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$): 3081 e 2976 ($=\text{CH}$); 2919 e 2852 (as/s CH e CH_2); 1639 ($\text{C}=\text{C}$); 1553 e 1448-1409 (as/s COO); 1467 (δ CH_2); 989 e 913 (γ $=\text{CH}$); 728 (ρ CH_2). RMN ^1H (400MHz, D_2O , ppm): δ 5,85 (m, 1H, $=\text{CH}$); 4,97 (m, 2H, $=\text{CH}_2$); 2,16 (t, 2H, CH_2COO , $J= 7,67$ Hz); 2,04 (q, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{}$, $J= 7,20$ Hz); 1,54 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}$, $J= 7,07$ Hz); 1,38 (t, 2H, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{COO}$, $J= 7,58$ Hz); 1,30 (s, 8H, $(\text{CH}_2)_4(\text{CH}_2)_3\text{COO}$).

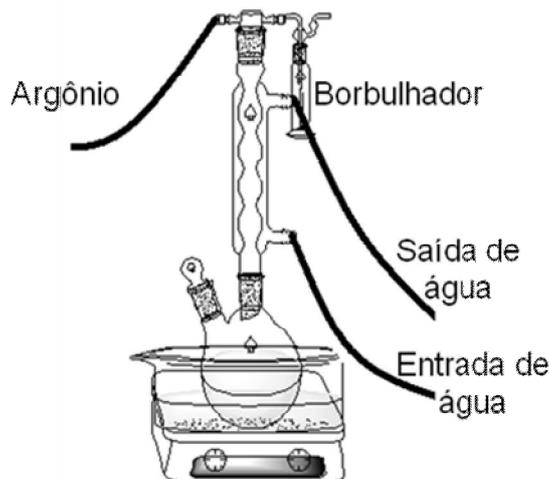
4.3.2– Síntese dos complexos

4.3.2.1- Síntese do diundec-10-enoato de dibutilestanho ($n\text{-Bu}_2\text{SnUnd}_2$)



Num balão com fundo redondo de 50 mL com duas bocas, foi solubilizado dicloreto de dibutilestanho, $n\text{-Bu}_2\text{SnCl}_2$, (0,61 g; 2,0 mmol) em tolueno seco (10 mL). Com o sistema já montado e sob agitação, foi adicionados UndNa (1,23 g; 6,0 mmol) à solução anterior. Deixou-se então reagir sob refluxo e argônio (Figura 4.1) durante 24 horas à temperatura de 121°C sob agitação.

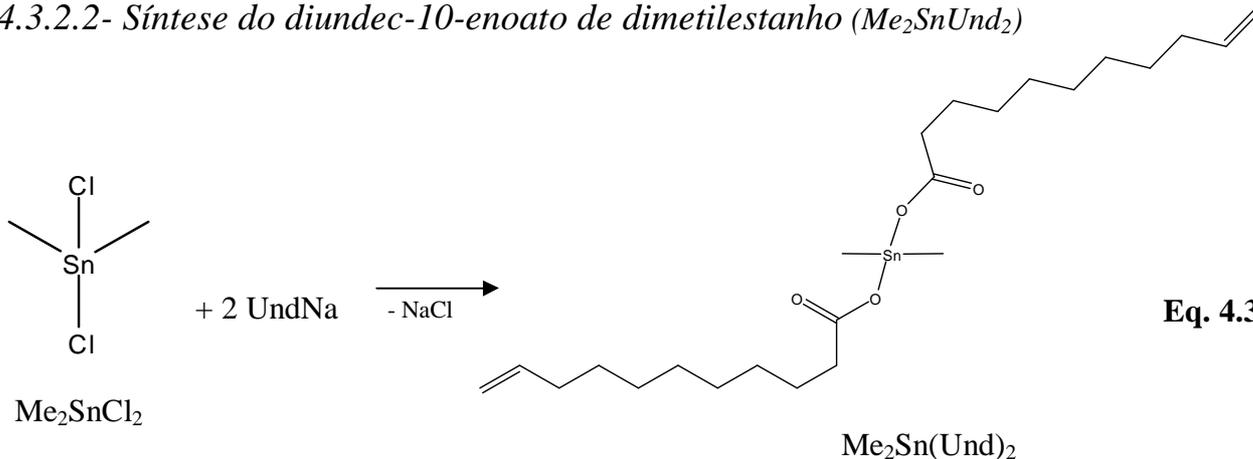
Figura 4.9 – Sistema reacional para obtenção dos organoestânicos.



Após o tempo de reação, retirou-se o banho de óleo e a mistura reacional foi mantida sob agitação e argônio por mais 5 horas à temperatura ambiente. Ao final, desligou-se a agitação, adicionou-se éter etílico (20 mL) e depois o precipitado foi separado por filtração com papel filtro e funil de vidro sinterizado. Em seguida o filtrado foi levado ao evaporador rotatório para retirada da maior parte dos voláteis e finalmente seco sob altovácuo. O produto obtido apresentou-se como um líquido amarelo claro. (F.M.: $C_{30}H_{56}O_4Sn$; M.M.: 599,47 g/mol).

Rendimento total: 64%. IV ($v_{máx}/cm^{-1}$): 3081 e 2966 (=CH); 2919 e 2852 (as/s CH e CH_2); 1738 (C=O); 1640 (C=C); 1595 e 1384 (as/s COO); 1460 (δ CH_2); 992 e 908 (γ =CH); 722 (ρ CH_2); 632 e 554 (ν as/s Sn-C); 539 (ν Sn-O). RMN 1H (400MHz, $CDCl_3$, ppm): δ 5,81 (m, 2H, =CH); 4,99 (m, 4H, = CH_2); 2,36 (t, 4H, CH_2COO , $J= 7,40$ Hz); 2,03 (q, 4H, $CH_2CH=$, $J= 7,07$ Hz); 1,65 [m, 12H, $CH_2CH_2COO + Sn(CH_2)_2$]; 1,37 [m, 4H, $Sn(CH_2)_2CH_2$]; 1,29 [m, 20H, $(CH_2)_5$]; 0,91 (t, 6H, $Sn(CH_2)_3CH_3$, $J= 7,33$ Hz]. RMN ^{13}C (100MHz, $CDCl_3$, ppm): δ 184,15 (C=O); 138,95 (=CH); 114,09 (=CH $_2$); 34,08 ($CH_2C=O$); 33,71 (=CH CH_2); 29,25 a 28,83 [=CH $CH_2(CH_2)_5$]; 26,61 ($SnCH_2CH_2$); 26,24 [$Sn(CH_2)_2CH_2$]; 25,44 ($SnCH_2$); 24,85 ($CH_2CH_2C=O$); 13,48 [$Sn(CH_2)_3CH_3$]. RMN ^{119}Sn (149MHz, $CDCl_3$, ppm): δ -149,78.

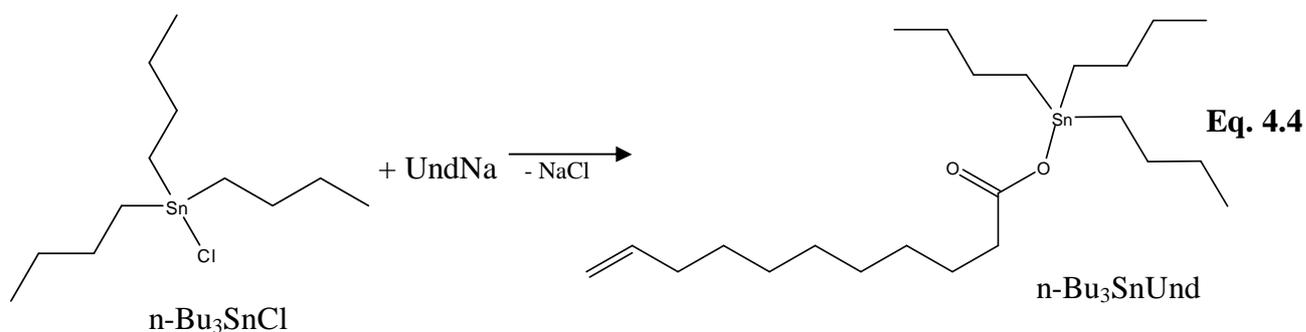
4.3.2.2- Síntese do diundec-10-enoato de dimetilestanho ($\text{Me}_2\text{SnUnd}_2$)



Este complexo foi obtido seguindo a metodologia descrita no item 4.3.2.1, exceto pelo fato de que foi usado o dicloreto de dimetilestanho (Me_2SnCl_2) como fonte do metal. Ao final, obteve-se um líquido amarelo ouro. (F.M.: $\text{C}_{24}\text{H}_{44}\text{O}_4\text{Sn}$; M.M.: 515,31 g/mol).

Rendimento total: 65%. IV ($\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$): 3081 e 2976 ($=\text{CH}$); 2919 e 2852 (as/s CH e CH_2); 1734 ($\text{C}=\text{O}$); 1639 ($\text{C}=\text{C}$); 1553 e 1409 (as/s COO); 1468 (δCH_2); 992 e 903 (γCH); 723 (ρCH_2); 640 e 570 (ν as/s Sn-C); 531 (ν Sn-O). RMN ^1H (400MHz, CDCl_3 , ppm): δ 5,81 (m, 2H, $=\text{CH}$); 4,96 (m, 4H, $=\text{CH}_2$); 2,35 (br sig, 4H, CH_2COO); 2,03 (br sig, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{}$); 1,62 (br sig, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}$); 1,31 (m, 20H, $(\text{CH}_2)_5$); 0,95 (m, 6H, SnCH_3). RMN ^{13}C (100MHz, CDCl_3 , ppm): δ 184,13 ($\text{C}=\text{O}$); 139,16 ($=\text{CH}$); 114,15 ($=\text{CH}_2$); 34,07 ($\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$); 33,78 ($=\text{CHCH}_2$); 29,28 a 28,87 [$=\text{CHCH}_2(\text{CH}_2)_5$]; 25,32 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$); 4,22 (SnCH_3). RMN ^{119}Sn (149MHz, CDCl_3 , ppm): δ -121,60.

4.3.2.3- Síntese do undec-10-enoato de tributilestanho ($n\text{-Bu}_3\text{SnUnd}$)



Num balão com fundo redondo de 50 mL com duas bocas, foram misturados cloreto de tributilestanho, $n\text{-Bu}_3\text{SnCl}$, (0,68 mL; 2,5 mmol) com tolueno seco (10 mL). Com o sistema já montado e sob agitação, foi adicionado o sal UndNa (0,82 g; 4,0 mmol) à solução

anterior. Deixou-se então reagir sob refluxo e argônio (Figura 4.1) durante 24 horas à temperatura de 121 °C sob agitação. Após o tempo de reação, retirou-se o banho de óleo e a mistura reacional foi mantida sob agitação e argônio por mais 5 horas à temperatura ambiente. Ao final, desligou-se a agitação, adicionou-se éter etílico e depois o precipitado foi separado por filtração com papel filtro e funil de vidro sinterizado. Em seguida o filtrado foi levado ao rotaevaporador e à bomba de vácuo para retirar todo o solvente e obteve-se como produto final um líquido amarelo claro. (F.M.: $C_{23}H_{46}O_2Sn$; M.M.: 473,32 g/mol).

Rendimento total: 68%. IV ($v_{m\acute{a}x}/cm^{-1}$): 3079 e 2956 (=CH); 2922 e 2853 (as/s CH e CH_2); 1738 (C=O); 1640 (C=C); 1551 e 1399 (as/s COO); 1460 (δ CH_2); 986 e 903 (γ =CH); 722 (ρ CH_2); 669 e 612 (ν as/s Sn-C); 520 (ν Sn-O). RMN 1H (400MHz, $CDCl_3$, ppm): δ 5,78 (m, 1H, =CH); 4,93 (m, 2H, = CH_2); 2,28 (t, 2H, CH_2COO , $J= 7,10$ Hz); 2,01 (q, 2H, $CH_2CH=$, $J= 7,06$ Hz); 1,58 (m, 8H, $CH_2CH_2COO + SnCH_2$); 1,28 [m, 22H, $(CH_2)_5 + SnCH_2(CH_2)_2$]; 0,89 [t, 9H, $Sn(CH_2)_3CH_3$, $J= 7,30$ Hz]. RMN ^{13}C (100MHz, $CDCl_3$, ppm): δ 179,51 (C=O); 139,16 (=CH); 114,08 (=CH $_2$); 34,88 ($CH_2C=O$); 33,78 (=CH CH_2); 29,34 28,90 [=CH $CH_2(CH_2)_5$]; 27,83 ($SnCH_2CH_2$); 27,02 [$Sn(CH_2)_2CH_2$]; 25,81 ($CH_2CH_2C=O$); 16,35 ($SnCH_2$); 13,63 [$Sn(CH_2)_3CH_3$]. RMN ^{119}Sn (149MHz, $CDCl_3$, ppm): δ 102,42.

4.4 – Teste de toxicidade em *Artemia salina* Leach (TAS)

A *Artemia salina* Leach (Artemiidae) é um microcrustáceo conhecido popularmente como camarão de água salgada (Figura 4.2). Suas larvas podem ser utilizadas na realização de um bioensaio de toxicidade rápido e de baixo custo, sendo este teste considerado uma ferramenta conveniente para avaliações preliminares de bioatividade (MEYER *et al.*, 1982).

Figura 4.10- Larvas de *Artemia salina* Leach.



Fonte: <<http://akuariofilia.blogspot.com/2009/06/artemia-salina-el-mejor-alimento-para.html>> (Dez/2010)

Este ensaio foi realizado em colaboração com a *Prof^a Dr^a Maria Lysete de Assis Bastos*, da Escola de Enfermagem e Farmácia da Universidade Federal de Alagoas. A metodologia utilizada foi adaptada dos ensaios de Alves e cols. (2000) e Bastos (2008).

4.4.1- Obtenção das larvas de *Artemia salina*

Para a obtenção das larvas de *A. salina* para o teste de toxicidade foram depositados cerca de 50 mg de ovos desta espécie em recipiente plástico (15 x 9 x 5 cm) com divisória contendo água do mar filtrada, mantendo-se este material sob iluminação artificial por 24 horas para eclosão dos ovos, de maneira que apenas um dos lados ficasse iluminado para permitir a migração das larvas de primeiro instar por fototropismo. Após esse período, estas larvas foram transferidas para placas de Petri (6 cm de diâmetro), contendo água do mar e incubadas por mais 24 horas sob iluminação artificial até atingirem o segundo instar, ideal para a realização do *TAS*.

4.4.2- Preparo das amostras e avaliação inicial

Os testes de toxicidade em larvas de *Artemia salina* foram realizados em tubos de ensaio impregnados com as amostras a serem testadas. Dessa forma, para a impregnação dos tubos de ensaio foram preparadas soluções-estoque (5000 µg/mL), utilizando-se o solvente no qual as amostras são solúveis (metanol ou clorofórmio, neste trabalho). Para o preparo das concentrações a serem testadas (1000, 100, 10 e 1 µg/mL, em triplicata), alíquotas da solução-estoque foram aplicadas no fundo dos tubos de ensaio que, posteriormente, foram colocados em capela de exaustão para evaporação completa do solvente (Tabela 4.4). Quando os tubos contendo as amostras para o teste já estavam sem solvente, adicionou-se então 1 mL de *A. salina* no segundo instar (contendo 10 larvas) e completou-se o volume para 2,5 mL com água do mar. Após 24 horas sob iluminação artificial foi realizada a leitura do experimento, observando-se o grau de toxicidade da amostra (percentual de mortalidade das larvas em cada concentração) conforme o item 4.4.4.

4.4.3- Controles positivo e negativo

Como controle negativo, utilizaram-se os solventes nos quais as amostras foram solubilizadas, colocando-se em três tubos de ensaio 500 µL dos controles, adotando-se os mesmos procedimentos do item 4.4.2. Como controle positivo, utilizou-se uma solução de Timol 0,01%, colocando-se em três tubos de ensaio 10 µL desta solução e procedendo conforme o item 4.4.2.

Tabela 4.5- Volumes das alíquotas utilizadas para cada concentração do teste preliminar de toxicidade em *Artemia salina*

Concentração-teste ($\mu\text{g/mL}$)	Volume de amostra (μL)	Concentração da solução-estoque ($\mu\text{g/mL}$)
1000	500	5000
100	50	5000
10	5	5000
1	25	100

4.4.4- Avaliação do grau de toxicidade

Após 24 horas de exposição das larvas às amostras testadas e às substâncias-controle do experimento, foi feita a contagem das larvas vivas com o auxílio de uma lupa, colocando o tubo de ensaio contra a luz de uma luminária. O número de larvas mortas foi obtido pela subtração do número de larvas vivas do total de larvas colocadas inicialmente nos tubos. O percentual de mortalidade foi calculado segundo a Equação 4.5.

$$\% \text{ mortalidade da } A. \text{ salina} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de larvas mortas}}{\text{Total de } A. \text{ salina no tubo}} \times 100 \quad \text{Eq. 4.5}$$

As amostras que promoveram mortalidade menor que 30% na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ foram consideradas atóxicas e aquelas com mortalidade $\geq 30\%$ nesta concentração foram submetidas ao ensaio quantitativo; exceto aquelas que apresentaram resultados de mortalidade $\geq 30\%$ na concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$.

4.4.5- Ensaio quantitativo

O ensaio quantitativo consistiu na avaliação da toxicidade de concentrações intermediárias àquelas que foram testadas no ensaio preliminar (item 4.4.4). Deste modo, as amostras com mortalidade $\geq 30\%$ na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ e $< 30\%$ em 100 $\mu\text{g/mL}$ foram testadas nas concentrações entre 1000 e 100 $\mu\text{g/mL}$; aquelas com mortalidade $\geq 30\%$ na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ e $< 30\%$ em 10 $\mu\text{g/mL}$ foram testadas nas concentrações entre 100 e 10 $\mu\text{g/mL}$; já as que resultaram em mortalidade $\geq 30\%$ na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ e $< 30\%$ em 1 $\mu\text{g/mL}$ foram testadas nas concentrações entre 10 e 1 $\mu\text{g/mL}$. Este ensaio foi realizado da mesma forma que o ensaio preliminar (item 4.4.2), a partir da impregnação de alíquotas de soluções-estoque das amostras a serem testadas em tubos de ensaio, em triplicata

(Tabela 4.5). Os controles negativo e positivo também foram os mesmos do ensaio preliminar (item 4.4.3). Na Figura 4.3, vê-se um resumo das etapas do teste de toxicidade frente a larvas de *Artemia salina*.

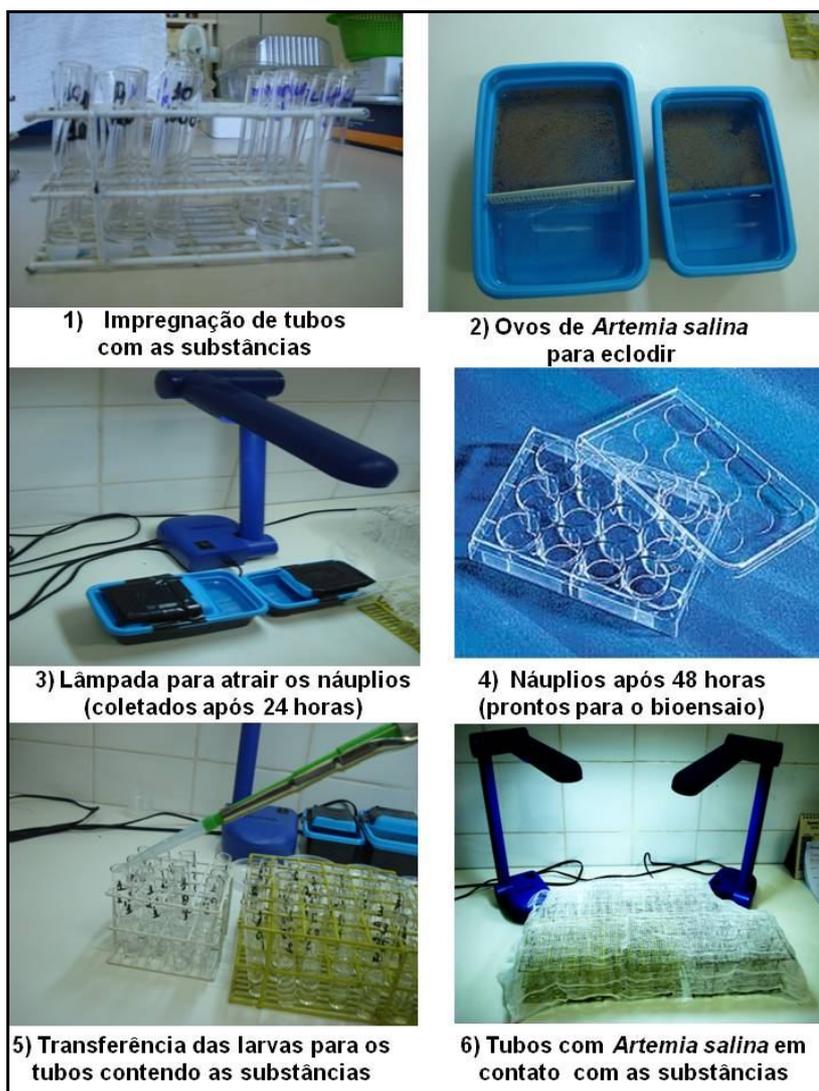
4.4.6- Determinação da concentração letal média (CL₅₀) e intervalo de confiança 95% (IC₉₅)

Os valores de CL₅₀, concentração que causa mortalidade 50% das larvas, e o intervalo de confiança (IC₉₅) foram calculados usando o método PROBIT de análise (FINNEY, 1972). Os critérios de classificação das amostras com base nos níveis de CL₅₀ no TAS adotados foram os estabelecidos por Dolabela (1997): CL₅₀ < 80 µg/mL, altamente tóxicos; entre 80 µg/mL e 250 µg/mL, moderadamente tóxico; e CL₅₀ > 250 µg/mL, com baixa toxicidade ou não tóxico.

Tabela 4.6- Volumes das alíquotas utilizadas para cada concentração do teste quantitativo de toxicidade em *Artemia salina*

Intervalo de concentração (µg/mL)	Concentração-teste (µg/mL)	Volume de amostra (µL)	Concentração da solução-estoque (µg/mL)
Entre 1000 e 100	750	375	5000
	500	250	5000
	250	125	5000
	125	62,5	5000
Entre 100 e 10	75	37,5	5000
	50	25	5000
	25	12,5	5000
	12,5	6,25	5000
Entre 10 e 1	7,5	187,5	100
	5	125	100
	2,5	62,5	100
	1,25	31,25	100

Figura 4.11- Etapas do teste de toxicidade frente a larvas de *Artemia salina*



Fonte: Autora, 2010.

4.5 – Ensaios antimicrobianos *in vitro*

Estes ensaios foram realizados em colaboração com a *Prof^a Dr^a Maria Lysete de Assis Bastos*, da Escola de Enfermagem e Farmácia da Universidade Federal de Alagoas.

4.5.1- Meios de cultivo e soluções: Composição e preparo

4.5.1.1- *Brain-Heart Infusion Broth* (BHI, HiMedia)

Meio líquido de enriquecimento utilizado para a propagação dos microrganismos durante o preparo dos inóculos e a microdiluição. Segundo o fabricante, os ingredientes deste meio são: infusão de cérebro de bezerro (200,0 g/L), infusão de coração de vaca (250,0 g/L),

protease peptona (10,0 g/L), dextrose (2,0 g/L), cloreto de sódio (5,0 g/L), fosfato dissódico (2,5 g/L), com pH final (a 25°C) de $7,4 \pm 0,2$. Este meio foi preparado num Erlenmeyer, solubilizando-se 37,0 g de meio em pó em 1,0 litro de água destilada, sob agitação manual com auxílio de um bastão de vidro. Após completa solubilização, vedou-se com rolha de algodão e gaze protegida com papel alumínio. Em seguida, esterilizou-se o meio em autoclave a 121 °C durante 15 minutos e armazenou-se sob refrigeração (4 – 8°C) até o momento do uso. Antes de cada teste o meio foi distribuído em tubos de ensaio (15 x 100 mm) esterilizados para receber o inóculo inativo e propagá-lo.

4.5.1.2- *Ágar Mueller-Hinton* (AMH, HiMedia)

Meio sólido preconizado para o teste de susceptibilidade bacteriana que apresenta boa reprodutibilidade nos testes e suporta o crescimento da maioria dos microrganismos (NCCLS, 2003). Segundo o fabricante, este meio é composto de extrato de carne (300,0 g/L), caseína ácida hidrolizada (17,5 g/L), amido (1,5 g/L) e ágar (17,0 g/L), com pH final (a 25°C) de $7,3 \pm 0,2$. Seu preparo foi feito solubilizando-se o meio em pó (38,0 g) em 1,0 litro de água destilada, em Erlenmeyer, sob agitação manual com auxílio de um bastão de vidro. Após completa solubilização, vedou-se com rolha de algodão e gaze protegida com papel alumínio. Em seguida, esterilizou-se o meio em autoclave a 121 °C durante 15 minutos e distribuíram-se cerca de 25 mL do meio de cultivo em placas de Petri estéreis (9 cm de diâmetro, previamente deixadas sob luz ultravioleta para garantir a esterilidade) a uma temperatura de 45 °C (NCCLS, 2003). Após solidificação do meio, as placas foram armazenadas sob refrigeração (4 – 8°C) até o momento do uso.

4.5.1.3- *Ágar Sabouraud Dextrose* (ASD, HiMedia)

Meio sólido utilizado para cultivo de fungos. Segundo o fabricante, contém peptona micológica (10,0 g/L), dextrose (40,0 g/L) e ágar (15,0 g/L), com pH final de $5,6 \pm 0,2$. Seu preparo foi feito num Erlenmeyer, solubilizando-se o meio (65,0 g) em 1,0 litro de água destilada, sob agitação manual com auxílio de um bastão de vidro. Após completa solubilização, vedou-se com rolha de algodão e gaze protegida com papel alumínio. Em seguida, esterilizou-se o meio em autoclave a 121 °C durante 15 minutos e distribuíram-se cerca de 25 mL do meio de cultivo em placas de Petri estéreis (9 cm de diâmetro, previamente deixadas sob luz ultravioleta para garantir a esterilidade) a uma temperatura de 45 °C. Após

solidificação do meio, as placas foram armazenadas sob refrigeração (4 – 8°C) até o momento do uso.

4.5.1.4- *Salina tamponada*

Utilizada para diluir o inóculo, visando obter o equivalente a $1,5 \times 10^6$ Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/mL (BASTOS, 2008). Esta solução foi preparada utilizando-se os seguintes sais: cloreto de sódio (5,61 g), cloreto de potássio (0,11 g), fosfato de potássio monobásico (1,0 g) e fosfato dibásico de sódio (2,0 g). Sob agitação manual com auxílio de um bastão de vidro, todos os componentes foram solubilizados 1,0 litro de água destilada, em Erlenmeyer, o qual foi vedado com rolha de algodão com gaze protegida com papel alumínio (BASTOS, 2008). Após esterilização em autoclave a 121°C durante 15 minutos, armazenou-se em refrigerador (4 – 8°C) até o momento do uso. Antes de cada teste a solução foi colocada em Erlenmeyer de 50 mL esterilizado para receber o inóculo ativo e propagá-lo para semeadura das placas contendo o meio de cultivo (após devido ajuste para $1,5 \times 10^6$ UFC/mL, de acordo com a Escala de McFarland – Figura 4.4).

4.5.1.5- *Solução de sulfato de bário da Escala de McFarland*

Foram preparadas ainda soluções-padrão de turbidez de sulfato de bário (BaSO_4), denominada Escala de McFarland, que são utilizadas para padronização da densidade do inóculo dos microrganismos para testes *in vitro* e devido ajuste do número de UFC/mL.

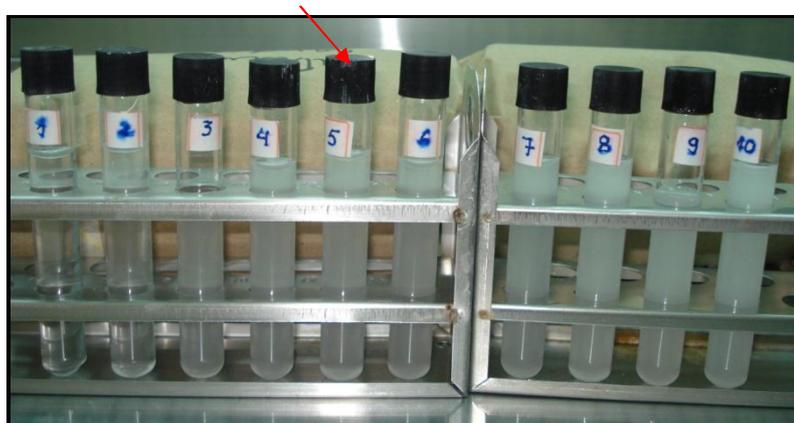
A escala foi preparada, conforme descrito por BASTOS (2008), adicionando-se em 10 tubos de ensaio, sequencialmente, quantidades crescentes de solução de cloreto de bário (BaCl_2) 1% (0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9; 1,0 mL) e ácido sulfúrico (H_2SO_4) 1% em quantidade suficiente para 10 mL.

Considera-se que as densidades resultantes correspondem respectivamente a:

Tubo 1 – $1,5 \times 10^5$ UFC/mL	Tubo 6 – $3,0 \times 10^6$ UFC/mL
Tubo 2 – $3,0 \times 10^5$ UFC/mL	Tubo 7 – $6,0 \times 10^6$ UFC/mL
Tubo 3 – $6,0 \times 10^5$ UFC/mL	Tubo 8 – $9,0 \times 10^6$ UFC/mL
Tubo 4 – $9,0 \times 10^5$ UFC/mL	Tubo 9 – $1,5 \times 10^7$ UFC/mL
Tubo 5 – $1,5 \times 10^6$ UFC/mL	Tubo 10 – $3,0 \times 10^7$ UFC/mL

Para o presente estudo selecionou-se o tubo nº 5, que corresponde a $1,5 \times 10^6$ UFC/mL na escala de McFarland (BASTOS, 2008).

Figura 4.12 – Escala de McFarland. Destaque do tubo 5, equivalente a $1,5 \times 10^6$ UFC/mL.



Fonte: Autora, 2010.

4.5.2- Microrganismos utilizados

Para os testes de atividade antimicrobiana foram utilizados os seguintes microrganismos:

- *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923);
- *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228);
- *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19615);
- *Proteus mirabilis* (ATCC 25933);
- *Escherichia coli* (ATCC 25922);
- *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028);
- *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 1383);
- *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853); e
- *Candida albicans* (ATCC 10231).

Estas cepas foram padronizadas e distribuídas pelo American Type Cell Collection (ATCC, Manassas/VA/USA). Os microrganismos foram mantidos em refrigerador com temperatura entre 4 e 8°C até o momento do uso.

4.5.3- Ativação e preparo dos inóculos contendo os microrganismos

Em tubo de ensaio contendo aproximadamente 5 mL do meio BHI, foi ativado 1 disco ou aproximadamente 10 mg dos microrganismos. Este material foi colocado em estufa bacteriológica por 24 horas a 35°C (para bactérias) ou por 48 horas a 28°C (para o fungo *Candida albicans*) e após esse período foi semeado com alça de platina em placa de Ágar

Müeller-Hinton (para bactérias) ou Ágar Sabouraud Dextrose (para *C. albicans*). Esta placa foi colocada em estufa bacteriológica nas mesmas condições anteriores. A partir das colônias de cultivo microbiano recente (máximo 24 horas para bactérias ou 48 horas para *C. albicans*), preparou-se o inóculo fazendo-se uma suspensão de cada microrganismo em solução salina. A concentração do inóculo foi ajustada de modo a se obter $1,5 \times 10^6$ UFC/mL, comparando-se a turbidez da suspensão com o tubo nº 5 da escala de McFarland (Figura 4.4).

4.5.4- Teste preliminar para avaliação de atividade antimicrobiana: Teste de difusão em ágar

4.5.4.1- Preparo dos discos com as amostras

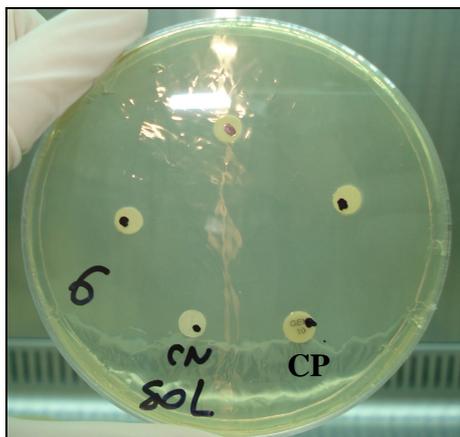
As amostras a serem testadas foram impregnadas em discos estéreis de papel filtro Whatman nº 1, com 6 mm de diâmetro, na concentração de 1000 µg/disco. Para tanto, foi preparada uma solução metanólica de concentração igual a 50 mg/mL e adicionados 20 µL desta solução nos discos previamente distribuídos em microplacas estéreis de 96 poços de fundo chato com tampa. A quantidade de discos de cada amostra para cada teste foi preparada em triplicata. Foram feitos discos para controle negativo, a partir da adição de 20 µL de metanol a discos idênticos aos utilizados para as amostras. Após secos em capela de fluxo laminar, à temperatura ambiente, os discos contendo as amostras-teste foram mantidos sob refrigeração (aproximadamente 4°C) até o momento do uso.

4.5.4.2- Teste de difusão em ágar

Os ensaios foram realizados em triplicata, de acordo com o método de difusão descrito por Kirby-Bauer (BASTOS, 2008). Assim, foram semeados os microrganismos em placas de Petri estéreis (9 cm de diâmetro) contendo o meio de cultivo adequado para cada microrganismo (Ágar Müeller-Hinton para bactérias ou Ágar Sabouraud Dextrose para *C. albicans*) com a ajuda de um *swab* estéril, a partir da suspensão de cada microrganismo em solução salina ($1,5 \times 10^6$ UFC/mL – item 4.5.3).

Cinco discos (três das amostras, um do controle positivo e outro do controle negativo) foram levemente pressionados contra a superfície do meio de cultivo para garantir o contato total com os microrganismos (Figura 4.5) e então as placas foram invertidas e incubadas a 35°C durante 24 horas (bactérias) ou a 28°C durante 48 horas (*C. albicans*).

Figura 4.13- Placa para teste de difusão em ágar com os discos contendo as amostras (em cima), o disco do controle negativo (CN) e do controle positivo (CP).



Fonte: Autora, 2010.

Como controle negativo, foram utilizados os discos contendo metanol (teoricamente sem nenhuma substância, visto que os discos estavam secos); e como controle positivo, foram utilizados discos de antimicrobianos comerciais, de acordo com os microrganismos:

- *Staphylococcus aureus*: Gentamicina (10 µg/disco);
- *Staphylococcus epidermidis*: Gentamicina (10 µg/disco);
- *Streptococcus pyogenes*: Penicilina G (10 µg/disco);
- *Proteus mirabilis*: Gentamicina (10 µg/disco);
- *Escherichia coli*: Ciprofloxacina (5 µg/disco);
- *Salmonella typhimurium*: Ceftriaxona (30 µg/disco);
- *Klebsiella pneumoniae*: Ciprofloxacina (5 µg/disco);
- *Pseudomonas aeruginosa*: Ciprofloxacina (5 µg/disco).

Apenas para o teste de atividade contra *Candida albicans* foram preparados artesanalmente discos contendo o antifúngico miconazol, conforme apresentação comercial (50 µg/disco), a partir da adição de 10 µL de uma solução aquosa de miconazol de concentração 5 mg/mL.

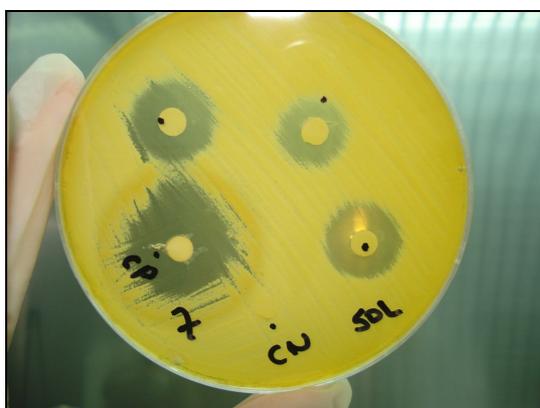
4.5.4.3- Leitura das placas e interpretação dos resultados

Os resultados da atividade inibitória do crescimento dos microrganismos foram avaliados através da medição (em mm) do diâmetro dos halos de inibição (área sem crescimento detectável a olho nu, Figura 4.6) de cada amostra, com o auxílio de um

paquímetro. O halo de inibição induzido de cada amostra-teste foi comparado com o resultado obtido pela média dos halos do controle positivo contra um mesmo microrganismo e a porcentagem de inibição do crescimento dos microrganismos foi calculada de acordo com a Equação 4.6.

$$\% \text{ de inibição} = \frac{\text{Média do halo de inibição da amostra}}{\text{Média do halo de inibição do controle positivo}} \times 100 \quad \text{Eq. 4.6}$$

Figura 4.14- Halos de inibição em placa de difusão em ágar. Observam-se halos nos discos da amostra e no controle positivo (CP), mas não no controle negativo (CN).



Fonte: Autora, 2010.

Nos ensaios preliminares *in vitro* utilizou-se como parâmetro de avaliação da atividade das amostras os valores adotados por Caceres e cols. (1998):

- Zona de inibição ≥ 75 %: Ativa;
- Zona de inibição ≥ 25 % e < 75 %: Moderadamente ativa;
- Zona de inibição < 25 %: Pouco ativa ou inativa.

Todas as amostras, incluindo as que foram classificadas como pouco ativas foram submetidas a testes de determinação da concentração inibitória mínima, conforme o item 4.5.5, para comparar o perfil de atividade dos complexos pelos métodos de difusão em ágar e microdiluição em caldo.

4.5.5- Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM): Microdiluição em caldo

A concentração inibitória mínima (CIM) é definida como a menor concentração de um agente antimicrobiano capaz de impedir o crescimento visível de um microrganismo em testes de sensibilidade por diluição em ágar ou caldo (NCCLS, 2003).

O ensaio de determinação da concentração inibitória mínima (adaptado de AYRES *et al.*, 2008) foi realizado utilizando-se a técnica de microdiluição em placas estéreis de 96 poços, que contêm linhas de A a H e colunas de 1 a 12 (Figura 4.7). Para cada amostra são necessários 36 poços, pois são testadas 12 concentrações, em triplicata. 18 poços são destinados para o teste dos controles do experimento: 6 para o controle de crescimento, 6 para o controle negativo e 6 para o controle positivo.

Para testar 4 amostras, foram adotados os procedimentos conforme o exemplo: Inicialmente, 2 placas foram numeradas da seguinte maneira:

- Placa 1: Colunas de 1 a 3 = amostra 1; de 4 a 6 = amostra 2; de 7 a 9 = amostra 3; e de 10 a 12 = amostra 4. Todas as linhas desta placa (de A a H) foram utilizadas e cada uma correspondeu a uma concentração das amostras;

- Placa 2: Colunas numeradas do mesmo modo que a placa 1, entretanto só até a linha D. Os poços de F-1 ao F-6 foram utilizados para o controle de crescimento; G-1 ao G-6, para o controle negativo; e H-1 ao H-6, para o controle positivo.

Figura 4.15- Placa para teste de microdiluição em caldo com o meio de cultivo BHI e as amostras.



Fonte: Autora, 2010.

Depois de numerados, os poços da placa a serem utilizados foram preenchidos com 100 μL do caldo BHI (duplamente concentrado) e, em seguida, 100 μL de uma solução-estoque de concentração 4400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ das amostras (solução metanólica, neste trabalho) foram adicionados nos poços de 1 a 12 da linha A da placa 1, segundo a numeração de cada amostra.

Após homogeneização do conteúdo de cada poço da linha A, 100 μL deste conteúdo foram transferidos para os orifícios da mesma coluna da linha B, ou seja, do A-1 para o B-1, do A-2, para o B-2, e assim por diante. Depois da homogeneização, 100 μL do conteúdo da linha B foram transferidos para os poços da linha C, conforme anteriormente.

Este procedimento foi repetido até a linha H da placa 1 e, desta linha, 100 µL do conteúdo dos poços foram transferidos para os orifícios correspondentes da linha A da microplaca 2, repetindo-se este processo até a linha D e desprezando-se 100 µL do conteúdo dos poços desta última linha.

Em cada poço das colunas de 1 a 12 da placa (de A a H da placa 1 e de A a D da placa 2) restará 100 µL de uma solução com concentrações decrescentes das amostras. Em seguida, adiciona-se em cada um destes poços mais 100 µL do caldo BHI e 20 µL do inóculo microbiano a partir da suspensão de cada microrganismo em solução salina ($1,5 \times 10^6$ UFC/mL – item 4.5.3). Dessa forma, o volume total de cada poço será de 220 µL e ao final deste procedimento serão obtidas concentrações decrescentes de cada amostra conforme mostrado na Tabela 4.6.

Tabela 4.7- Concentrações testadas para determinação da Concentração Inibitória Mínima

Número da microplaca	Coluna	Concentração correspondente (µg/mL)
1	A	1000
	B	500
	C	250
	D	125
	E	62,5
	F	31,2
	G	15,6
	H	7,8
2	A	3,9
	B	1,9
	C	1,0
	D	0,5

Os poços do controle de crescimento receberam 150 µL do caldo BHI, 50 µL de salina e 20 µL do inóculo microbiano, possibilitando a avaliação da viabilidade microbiana. Os poços do controle negativo receberam 50 µL do solvente utilizado para solubilizar as amostras (metanol), que foi diluído em 150 µL do caldo BHI e 20 µL do inóculo microbiano.

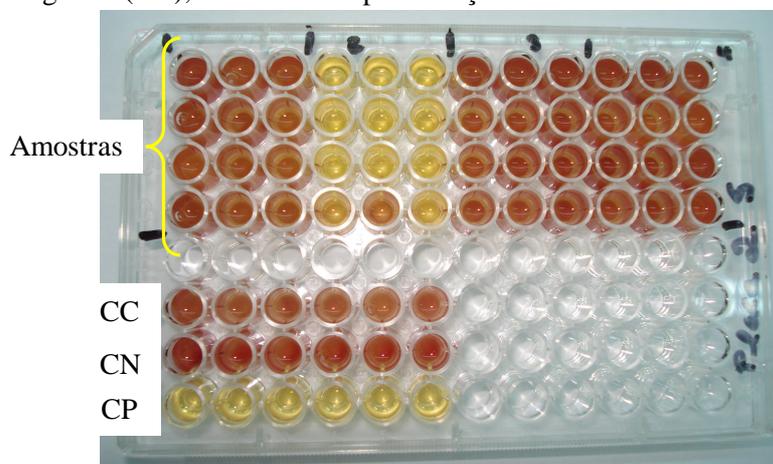
Os poços do controle positivo, por sua vez, foram preenchidos com 150 µL do caldo BHI, 50 µL de um antimicrobiano padrão e 20 µL do inóculo microbiano ou 150 µL do caldo BHI, 50 µL de salina, ¼ de discos comerciais contendo antimicrobiano e, por fim, 20

μL do inóculo microbiano ($1,5 \times 10^6$ UFC/mL – item 4.5.3). O antimicrobiano para cada microrganismo foi o mesmo utilizado para o teste de difusão em ágar (item 4.5.4.2).

As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35°C por 24 horas (para bactérias) ou a 28°C por 48 horas (para *C. albicans*), e após este tempo foi adicionado em cada poço da placa, tanto das amostras e como dos controles, $20 \mu\text{L}$ de uma solução aquosa de TTC (cloreto de trifetil tetrazolium) a 0,5%. As placas foram reincubadas em estufa bacteriológica por mais 3 horas.

Para avaliação do resultado, o aparecimento de uma coloração vermelha nos poços indicou crescimento microbiano (Figura 4.8) e, conseqüentemente, a inatividade da amostra contra o microrganismo testado naquela concentração. Contrariamente, a ausência da coloração vermelha indicou ausência de crescimento microbiano e a atividade antimicrobiana da amostra contra o microrganismo testado naquela concentração. Isto ocorre devido à redução do TTC (incolor) a uma coloração vermelha pelas colônias vivas (pela respiração), enquanto que as colônias com restrição nesta função não podem fazer esta redução.

Figura 4.16- Resultado de microdiluição em caldo. Observe crescimento nos controles de crescimento (CC) e negativo (CN), e ausência de proliferação microbiana no controle positivo (CP).



Fonte: Autora, 2010.

A leitura foi considerada válida somente quando houve crescimento microbiano nos controles negativo e de crescimento (Figura 4.8). Para avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) dos complexos organoestânicos e do ligante, os critérios estabelecidos foram os mesmos adotados por Holetz e cols. (2002):

- CIM $< 100 \mu\text{g/mL}$: Ativo;
- CIM $\geq 100 < 500 \mu\text{g/mL}$: Moderadamente ativo;

- CIM $\geq 500 < 1000$ $\mu\text{g/mL}$: Pouco ativo;
- CIM ≥ 1000 $\mu\text{g/mL}$: Inativo.

4.6 – Avaliação da citotoxicidade em macrófagos

Estes ensaios foram realizados por colaboradores do Laboratório de Farmacologia e Imunidade com a *Prof^a Dr^a Magna Suzana Alexandre Moreira*, do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Alagoas.

4.6.1- Método do MTT

A citotoxicidade das substâncias foi analisada pelo método do MTT (brometo de 3-[4,5- dimetiliazol-2-il]-2,5-difenil tetrazólio) (DENIZOT & LANG, 1986).

Este método se baseia na análise da atividade da enzima desidrogenase mitocondrial, que é capaz de metabolizar o reagente MTT em um composto colorido denominado de formazan. Esse composto pode ser diluído e posteriormente quantificado por um leitor óptico, evidenciando o metabolismo mitocondrial e conseqüentemente a quantidade de células vivas.

Para isso, células de macrófagos murinos da linhagem J774 foram incubadas em placas de 96 poços por a 37°C com 5% de CO₂ numa densidade de $7,5 \times 10^4$ células/poço. Após os devidos tratamentos das células por 48 horas, o MTT (0,1 mg/poço) foi adicionado ao meio de cultivo e a placa foi incubada em estufa de CO₂ por 4 horas. Em seguida, o meio contendo MTT foi aspirado, sendo adicionado 150 μL de SDS/Triton 10x. As absorbâncias do metabólito do MTT foram determinadas em leitor de placas a 590 nm.

As substâncias foram testadas na concentração de 100 μM , em duplicata.

4.7 – Referências

ALVES, T. M. A. *et al.* Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 3, p. 367-373, 2000.

AYRES, M. C. C. *et al.* Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 1, p. 90-97, 2008.

BASTOS, M. L. A. **Avaliação da atividade antimicrobiana “in vitro e in vivo” e estudo químico biomonitorado de *Piper hayneanum* C. DC. (Piperaceae) e *Zeyheria tuberculosa* (Vell.) Bur. (Bignoniaceae)**. Maceió, 2008. Tese (Doutorado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas.

CACERES, A. *et al.* Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections. I. Screening of activity to bacteria, fungi and American trypanosomes of 13 native plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 62, n. 3, p. 195-202, 1998.

DENIZOT F, LANG R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **Journal Immunological Methods**, v. 89, n. 2, p. 271-277, 1986.

DOLABELA, M. F. **Triagem in vitro para atividade antitumoral e anti-*Trypanosoma cruzi* de extratos vegetais, produtos naturais e substâncias sintéticas**. Belo Horizonte, 1997. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Farmacologia) – Universidade Federal de Minas Gerais.

FINNEY, D. J. **Probit Analises**. Cambridge: Cambridge University Press, 1972.

HOLETZ, F. B. *et al.* Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

MEYER, B. N. *et al.* Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 45, p. 31-34, 1982.

MUHAMMAD, N. *et al.* Organotin(IV) 4-nitrophenylethanoates: synthesis, structural characteristics and intercalative mode of interaction with DNA. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 694, p. 3431-3437, 2009.

NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards. **Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico: Norma Aprovada**. Trad. ANVISA. 6 ed. M7-A6, v. 23, n. 2, 2003.

VIEIRA, F. T. **Compostos organoestânicos com ação farmacológica**. Belo Horizonte, 2008. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Minas Gerais.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 – Síntese e caracterização dos complexos organoestânicos

5.1.1 - Síntese

Como dito anteriormente, a proposta deste trabalho foi a de preparar complexos de estanho contendo o fragmento undecilenato. Essa estratégia tem como objetivo aumentar a bioatividade do ácido undecilênico, bem como alargar seu espectro de ação pelo efeito sinérgico metal-ligante de derivados do ácido undecilênico.

A síntese dos complexos organoestânicos foi feita de forma simples e eficaz, segundo a metodologia descrita por Muhammad e cols. (2009). Primeiramente obteve-se o sal de sódio do ácido undecilênico e, a partir deste, foram sintetizados os complexos utilizando-se cloretos organoestânicos como fontes do metal. Os rendimentos da síntese dos complexos foram considerados bons, ficando entre 60 e 70%.

O undecilenato de sódio (UndNa) é um pó branco que, em água, forma espuma (podendo ser considerado um sabão). Os complexos $n\text{-Bu}_2\text{Sn}(\text{Und})_2$, $\text{Me}_2\text{Sn}(\text{Und})_2$ e $n\text{-Bu}_3\text{Sn}(\text{Und})$, por sua vez, são líquidos de cor amarelada, solúveis em éter dietílico e clorofórmio.

A confirmação da obtenção dos complexos foi feita através de análises dos respectivos espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e ^{119}Sn , bem como dos espectros na região do infravermelho médio, conforme apresentado a seguir.

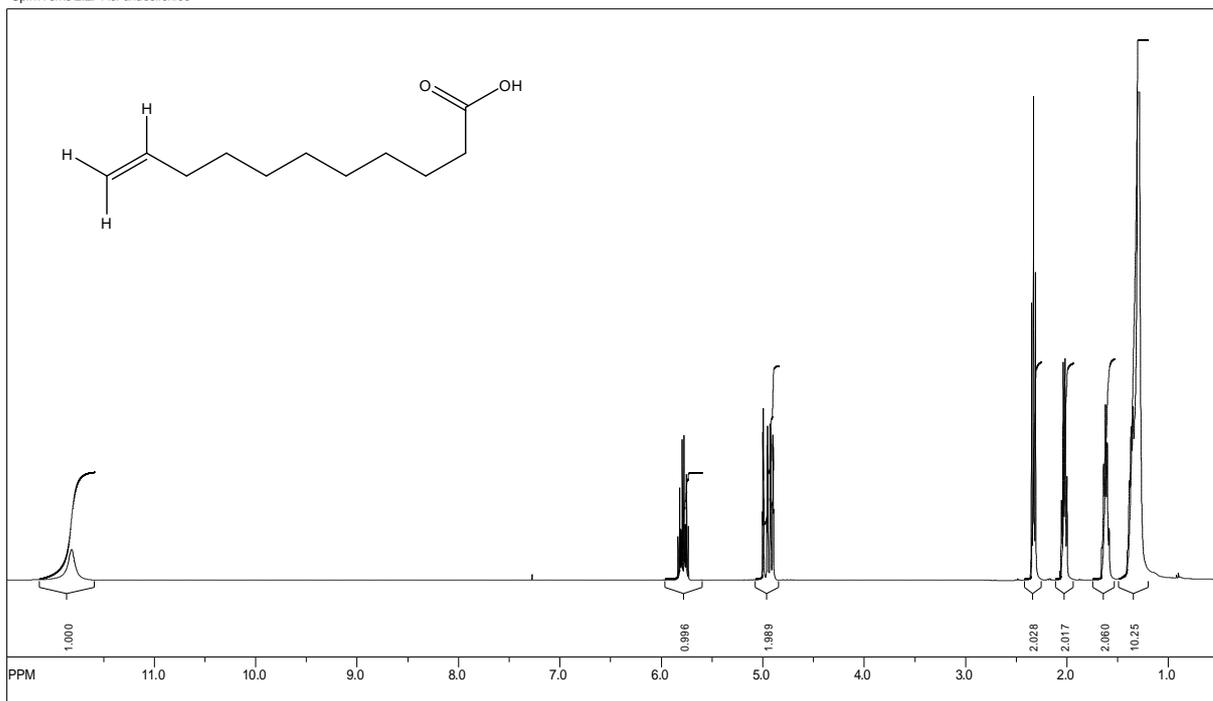
5.1.2 - Caracterização

5.1.2.1- Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (RMN ^1H)

Através da análise dos espectros de RMN ^1H , pôde ser confirmada a formação do undecilenato de sódio e dos complexos sintetizados. Os dados de RMN ^1H do ácido undecilênico (Figura 5.1) mostra o sinal do hidrogênio ácido do grupo carboxila com deslocamento químico $\delta = 11,80 \text{ ppm}$. Este sinal não é mais observado no espectro do seu sal de sódio (Figura 5.2), nem dos seus complexos (Figuras 5.3-5.5); contudo os demais sinais relativos ao fragmento undecilênico podem ainda ser facilmente detectados.

Figura 5.17- Espectro de RMN de ^1H do ácido undecilênico.

SpinWorks 2.2: Ác. undecilênico

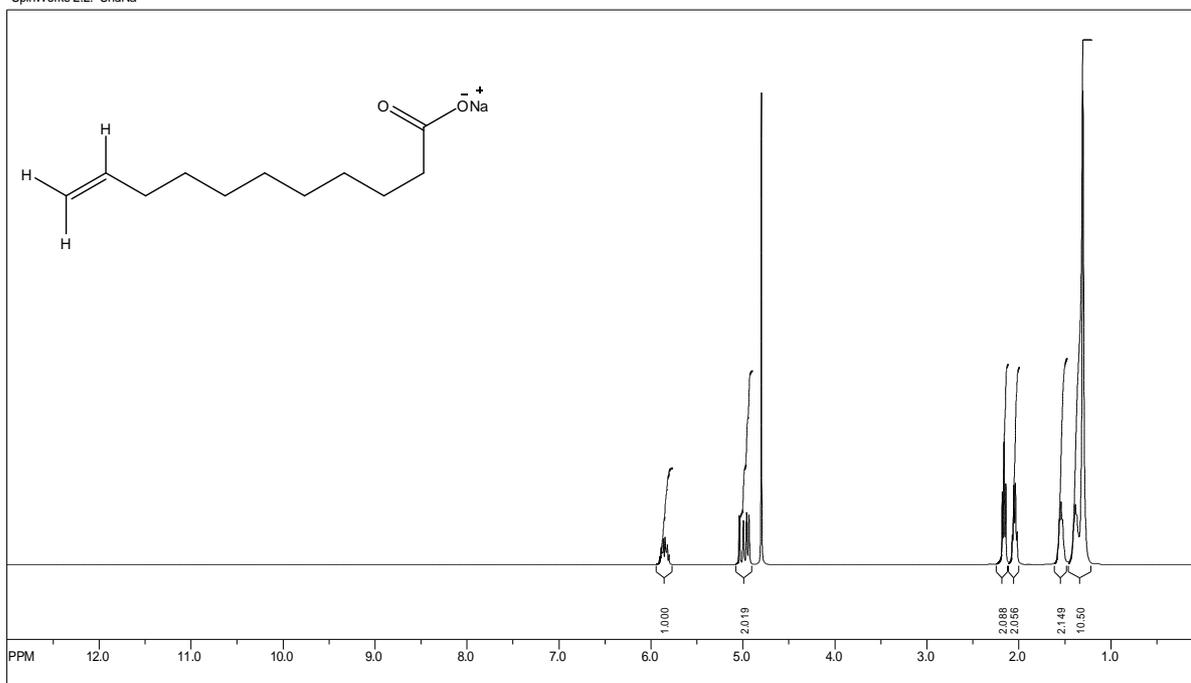


file: C:\Users\Ana Soraya\Documents\Mestrado\RMN_Soraya\ESTANHO7 mm, 27.11.09 n-Bu2Sn(OAc)2 a partir de S6, Ác undecilênico e n-Bu2Sn(Und)2 S12 Ác undecilênico\data\09090300000 MHz
 transmitter freq.: 400.20360 MHz
 time domain size: 65536 points
 width: 6476.68 Hz = 16.183518 ppm = 0.098826 Hz/pt
 number of scans: 16
 processed size: 32768 complex points
 LB: 0.000 GB: 0.0000

Fonte: Laboratório de RMN (UFAL); Autora, 2010.

Figura 5.18- Espectro de RMN de ^1H do undecilenato de sódio.

SpinWorks 2.2: UndNa



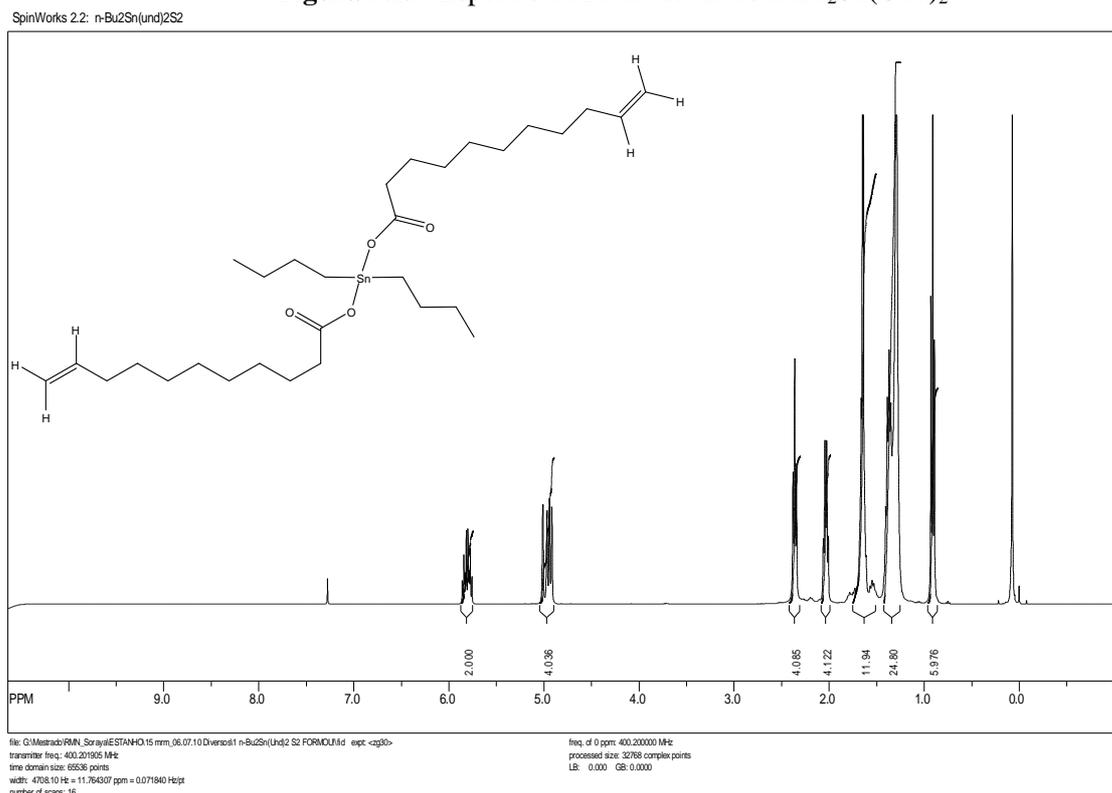
file: G:\Mestrado\RMN_Soraya\ESTANHO mm, 14.01.11 UndNa em D2O 11fd exp: <ap30>
 transmitter freq.: 400.203033 MHz
 time domain size: 65536 points
 width: 7022.47 Hz = 17.547273 ppm = 0.107154 Hz/pt
 number of scans: 16

freq. of 0 ppm: 400.199957 MHz
 processed size: 32768 complex points
 LB: 0.300 GB: 0.0000

Fonte: Laboratório de RMN (UFAL); Autora, 2010.

Observa-se no espectro do $n\text{-Bu}_2\text{Sn}(\text{Und})_2$ (Figura 5.3) a presença de sinais típicos de olefinas terminais ($\delta = 5,81$ e $4,99$ ppm), os sinais dos hidrogênios metilênicos (com deslocamentos entre $\delta = 2,36$ e $1,29$ ppm) e o tripleto das metilas do grupo ($\delta = 0,91$ ppm), este na proporção de 3:1 em relação ao hidrogênio ligado ao carbono $\text{CH } sp^2$ ($\delta = 5,81$ ppm), dando um forte indício da formação deste complexo.

Figura 5.19- Espectro de RMN de ^1H do $n\text{-Bu}_2\text{Sn}(\text{Und})_2$.



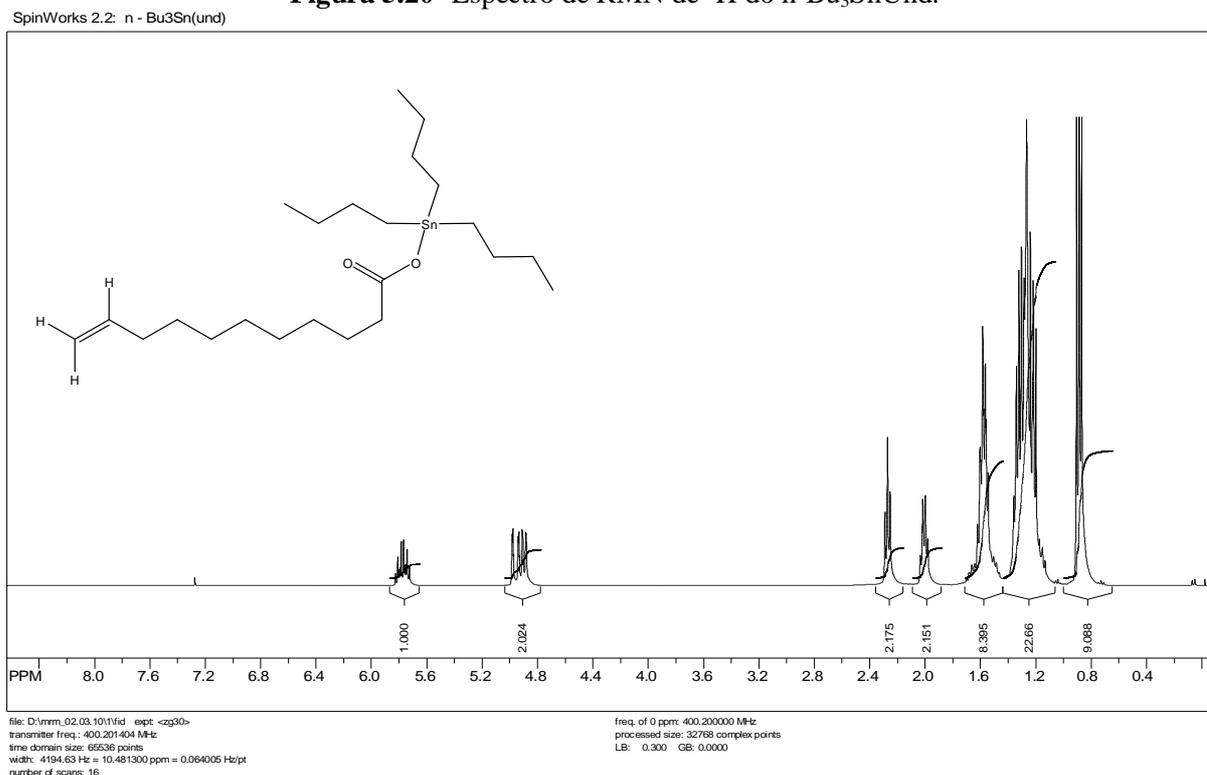
Fonte: Laboratório de RMN (UFAL); Autora, 2010.

No espectro do $n\text{-Bu}_3\text{SnUnd}$ (Figura 5.4), vê-se a presença de sinais típicos de olefinas terminais ($\delta = 5,78$ e $4,93$ ppm), os sinais dos hidrogênios metilênicos (com deslocamentos entre $\delta = 2,28$ e $1,28$ ppm) e o tripleto das metilas do grupo butil ($\delta = 0,89$ ppm). A proporção é de 9:1 dos hidrogênios metilênicos em relação ao hidrogênio ligado ao carbono $\text{CH } sp^2$ ($\delta = 5,78$ ppm), dando um forte indício de que houve a formação do complexo desejado.

Na Figura 5.5 (espectro do $\text{Me}_2\text{Sn}(\text{Und})_2$) observa-se, como nos outros complexos sintetizados, a presença dos sinais típicos de olefinas terminais ($\delta = 5,81$ e $4,96$ ppm), os sinais dos hidrogênios metilênicos (com deslocamentos entre $\delta = 2,35$ e $1,31$ ppm), bem como o sinal das metilas ($\delta = 0,95$ ppm). Nesse complexo é possível verificar os satélites de acoplamento

$^2J_{\text{H-119Sn}}$ e $^2J_{\text{H-117Sn}}$ (~ 100 Hz) (WRACKMEYER, 2008). Observa-se também que há uma proporção de 3:1 entre os hidrogênios metílicos do grupo butila e o hidrogênio ligado ao carbono sp^2 ($\delta = 5,81$ ppm). Esta proporção é mais uma prova da formação do complexo almejado.

Figura 5.20- Espectro de RMN de ^1H do n-Bu₃SnUnd.



Fonte: Laboratório de RMN (UFAL); Autora, 2010.

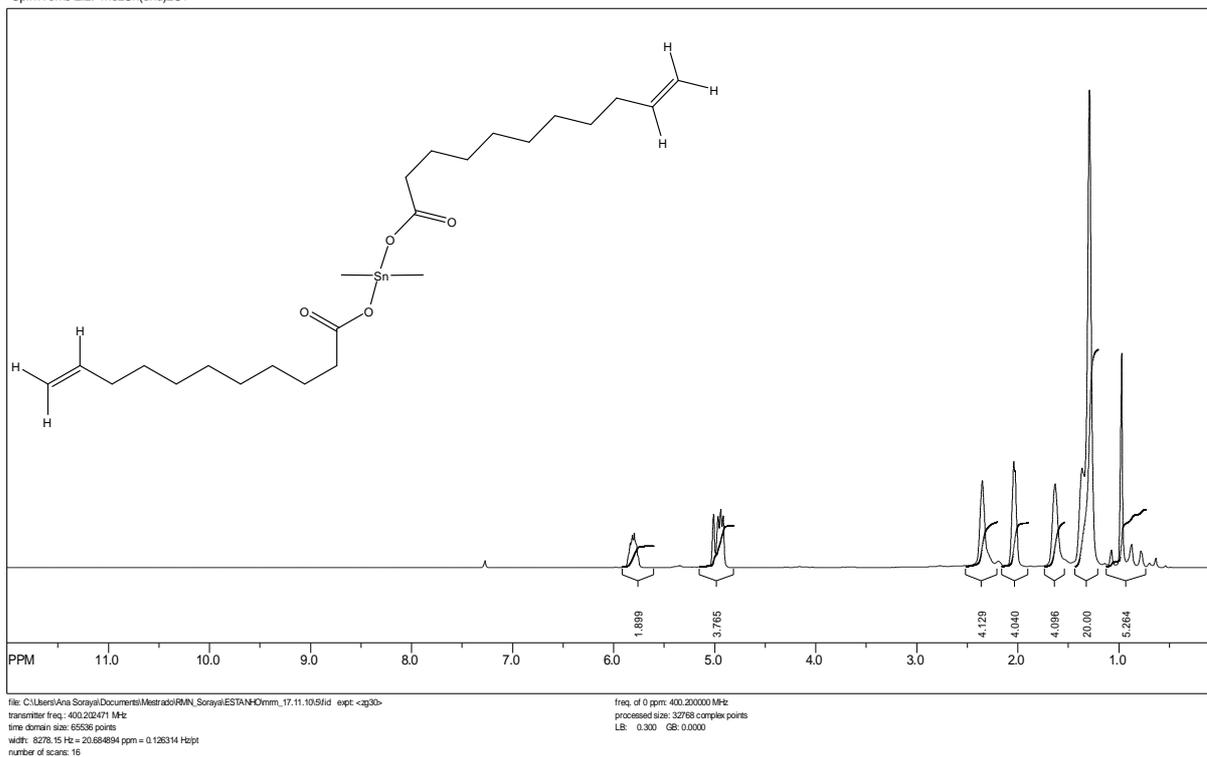
5.1.2.2- Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C (RMN ^{13}C)

Através da análise por RMN ^{13}C dos novos compostos de estanho(IV) é possível identificar os sinais típicos de olefina terminal ($\delta \sim 139$ e 114 ppm) e de carbonila ($\delta \sim 184$ ppm, para os diorganoestânicos e 179 ppm, para o triorganoestânico) do fragmento undecilênico; lembrando que o ácido undecilênico tem $\delta = 180,70$ ppm para o ligante livre. Além disso, é possível verificar a série de carbonos metilênicos entre 29 e 28 ppm) devido a presença deste último fragmento (Figuras 5.6 - 5.8).

Em relação aos substituintes alquil, nota-se que, para o n-Bu₂Sn(Und)₂ (Figura 5.6), o sinal do carbono metílico aparece em $\delta = 13,48$ ppm, que os carbonos metilênicos intermediários aparecem em $\delta \sim 26$ ppm, enquanto o sinal do carbono metilênico ligado diretamente ao metal aparece em $\delta = 25,44$ ppm.

Figura 5.21- Espectro de RMN de ^1H do $\text{Me}_2\text{Sn}(\text{Und})_2$.

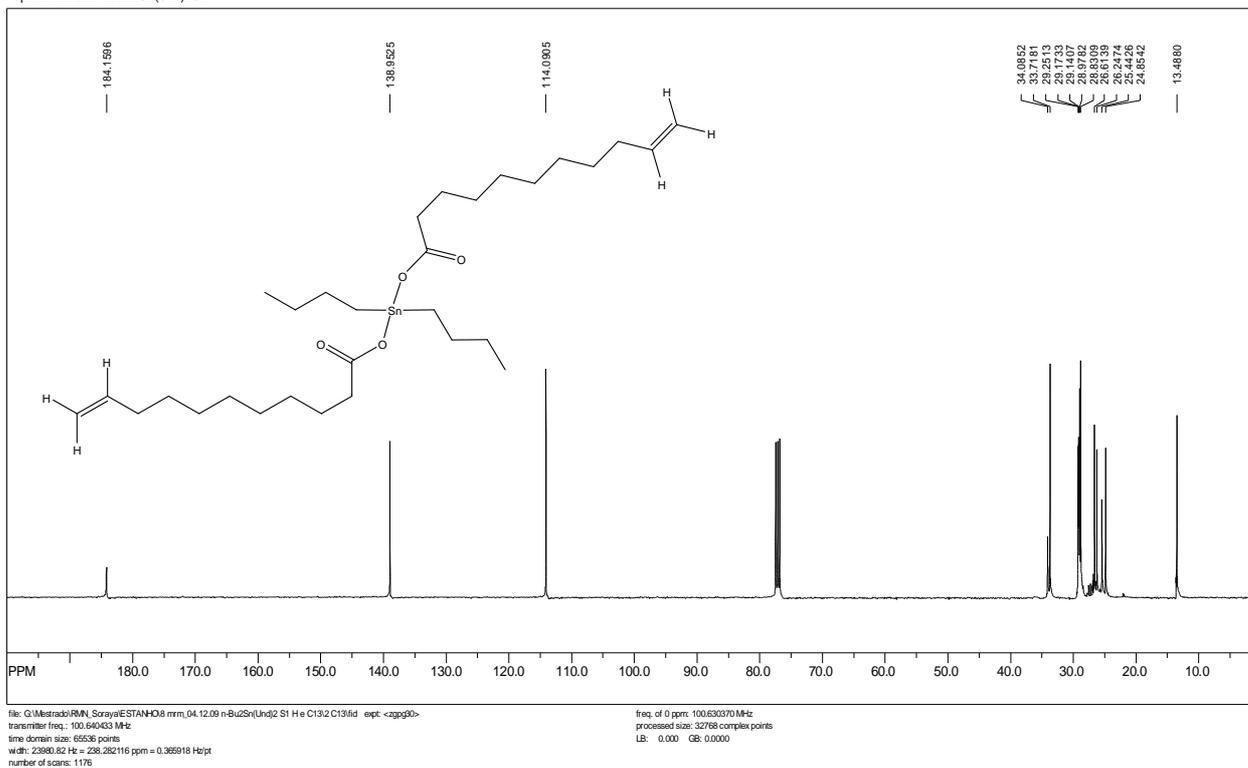
SpinWorks 2.2: Me2Sn(und)2S1



Fonte: Laboratório de RMN (UFAL); Autora, 2010.

Figura 5.22- Espectro de RMN de ^{13}C do $n\text{-Bu}_2\text{Sn}(\text{Und})_2$.

SpinWorks 2.2: N-Bu2Sn(Und)2S1

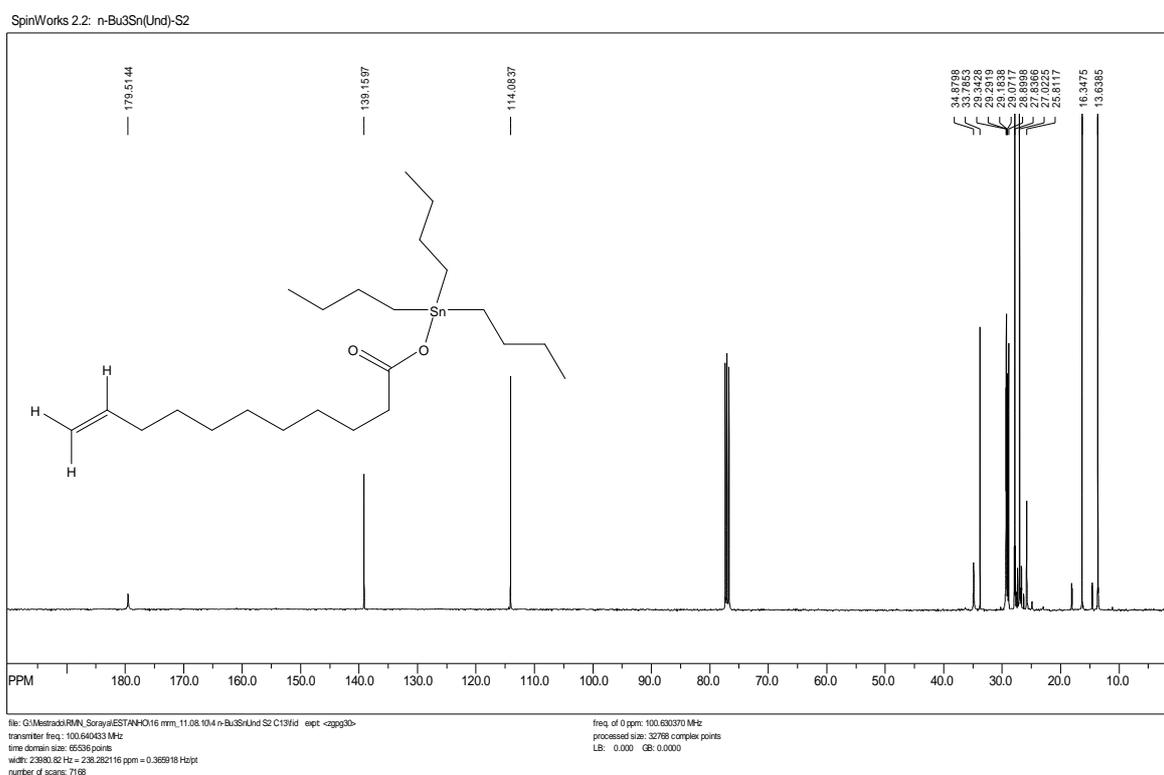


Fonte: Laboratório de RMN (UFAL); Autora, 2010.

Para o triorganoestânico n-Bu₃SnUnd (Figura 5.7), por sua vez, o sinal do carbono metílico do fragmento butil aparece em $\delta = 13,63 \text{ ppm}$, os carbonos metilênicos intermediários podem ser observados em $\delta \sim 27 \text{ ppm}$, enquanto o sinal do carbono metilênico ligado diretamente ao metal é visto em $\delta = 16,35 \text{ ppm}$.

Já para o diorganoestânico Me₂Sn(Und)₂ (Figura 5.8), o sinal do carbono das metilas é observado em $\delta = 4,22 \text{ ppm}$. Esse deslocamento tão acentuado para campo mais alto é devido a interação direta dos grupos metila com o metal.

Figura 5.23- Espectro de RMN de ¹³C do n-Bu₃SnUnd.



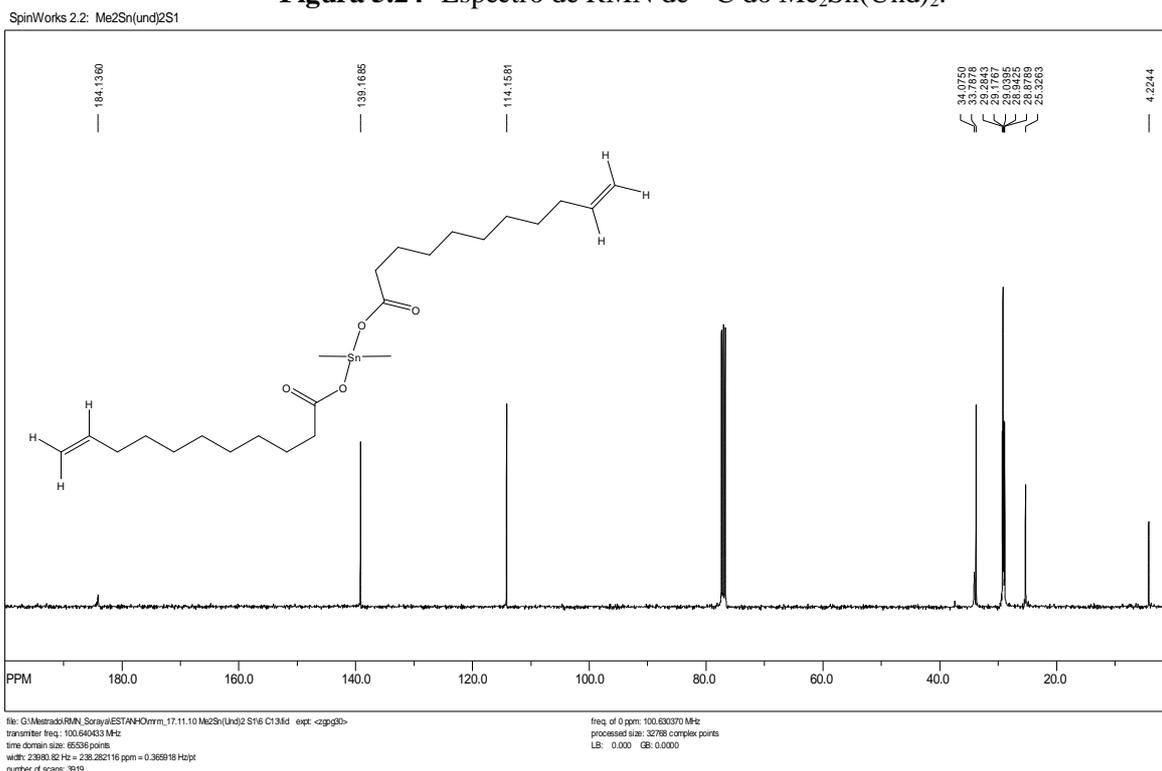
Fonte: Laboratório de RMN (UFAL); Autora, 2010.

5.1.2.3- Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ¹¹⁹Sn (RMN ¹¹⁹Sn)¹

O estanho possui numerosos isótopos naturais, dos quais três (¹¹⁵Sn, ¹¹⁷Sn e ¹¹⁹Sn) são magneticamente ativos (spin nuclear igual a 1/2). Devido à sua elevada abundância natural e propriedades magnéticas nucleares favoráveis, os núcleos ¹¹⁷Sn e ¹¹⁹Sn são atrativos para experimentos de RMN. Normalmente o isótopo ¹¹⁹Sn é o alvo mais empregado, embora espectros de RMN ¹¹⁷Sn possam ser medidos da mesma forma (WRACKMEYER, 2008; SOUZA, 2007).

¹ Não foi possível fazer o desacoplamento dos núcleos de ¹H nos espectros de RMN de ¹¹⁹Sn, mas isso não inviabiliza os valores de deslocamento químico obtidos.

Figura 5.24- Espectro de RMN de ^{13}C do $\text{Me}_2\text{Sn}(\text{und})_2$.



Fonte: Laboratório de RMN (UFAL); Autora, 2010.

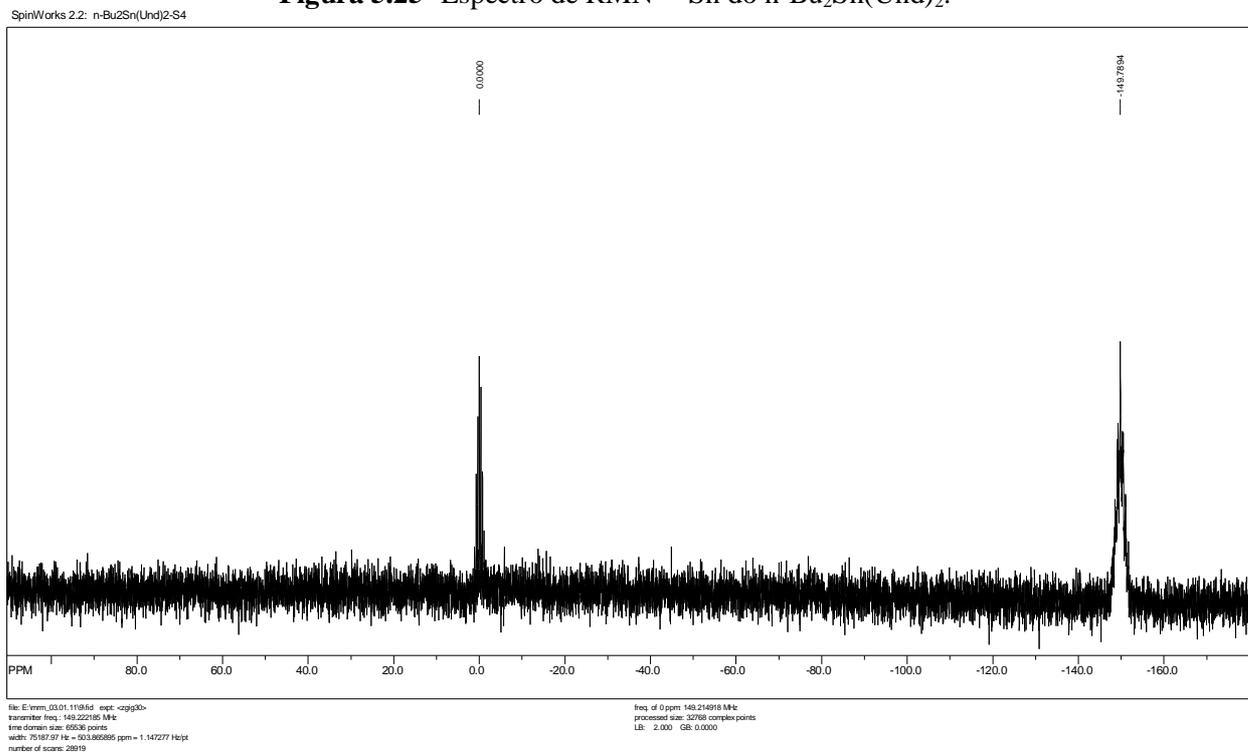
Os deslocamentos químicos no RMN ^{119}Sn de compostos de estanho diamagnético cobrem um intervalo de aproximadamente 6500 ppm, de +4000 a -2500 ppm, com $\delta = 0$ para o composto Me_4Sn . Uma gama tão grande de deslocamentos químicos indica grande sensibilidade deste parâmetro até mesmo a pequenas mudanças estruturais. As estruturas eletrônicas ao redor do respectivo núcleo ^{119}Sn dependem, de uma forma complexa, tanto do número de coordenação (2 a 10), como do estado de oxidação formal (2 ou 4, na maioria dos casos) (WRACKMEYER, 2008).

Segundo Souza (2007), um aumento no número de coordenação do estanho tende a deslocar δ para maiores valores absolutos, uma vez que o aumento da densidade eletrônica sobre o átomo de estanho causa um aumento na blindagem do centro metálico. Outros fatores, como, por exemplo, eletronegatividade, circulação de carga e impedimento estérico de grupos substituintes, podem influir na blindagem do núcleo de estanho(IV), e, conseqüentemente, no deslocamento químico do sinal de ressonância.

Os espectros de RMN de ^{119}Sn dos diorganoestânicos derivados do ácido undecilênico com substituintes butila e metila mostraram o sinal do estanho para cada composto em δ -149,78 e -121,60, respectivamente (Figuras 5.9 e 5.10), indicando a formação de um único derivado. Conforme supracitado, esses valores são típicos de espécies do tipo $\text{R}_2\text{Sn}(\text{OOCR}')_2$. O espectro do composto tributílico, por sua vez, apresentou sinal em δ 102,42

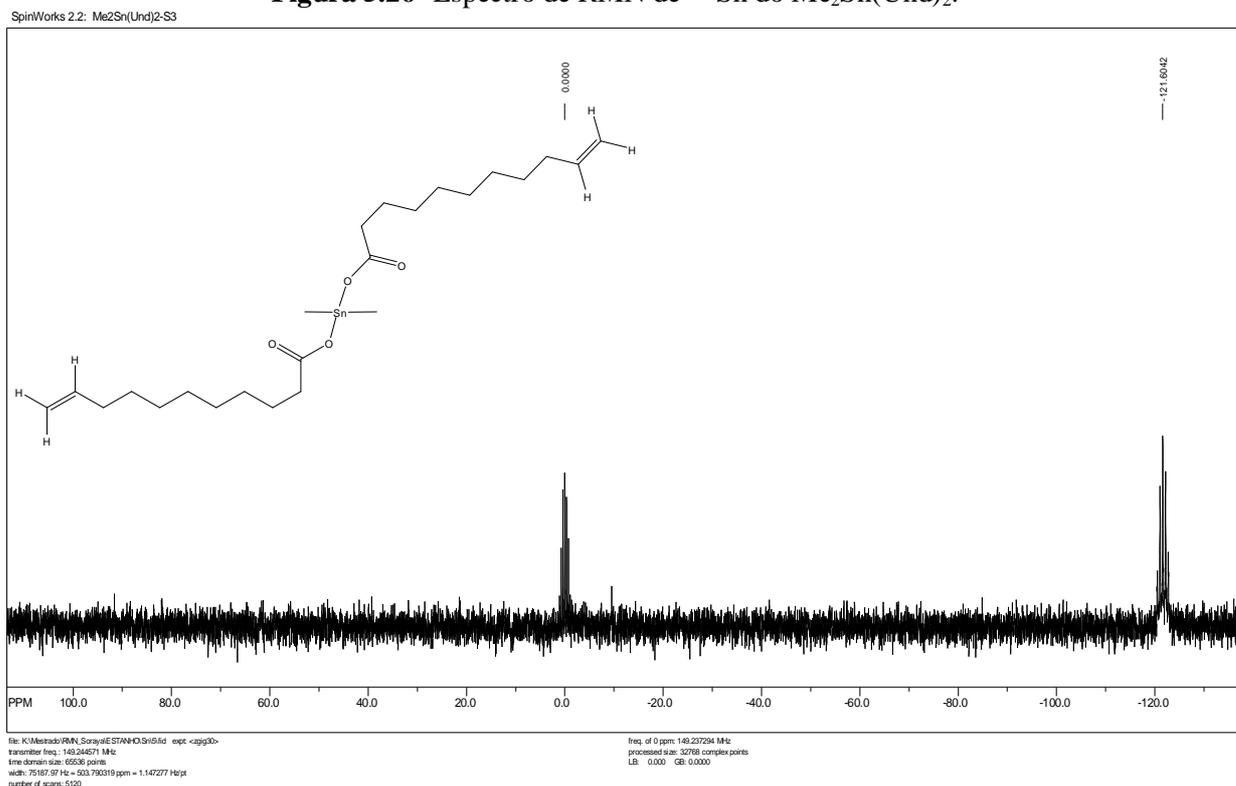
(Figura 5.11), valor próximo aos sugeridos para espécies $R_3Sn(OOCR')$ (WRACKMEYER, 2008).

Figura 5.25- Espectro de RMN ^{119}Sn do $n-Bu_2Sn(Und)_2$.



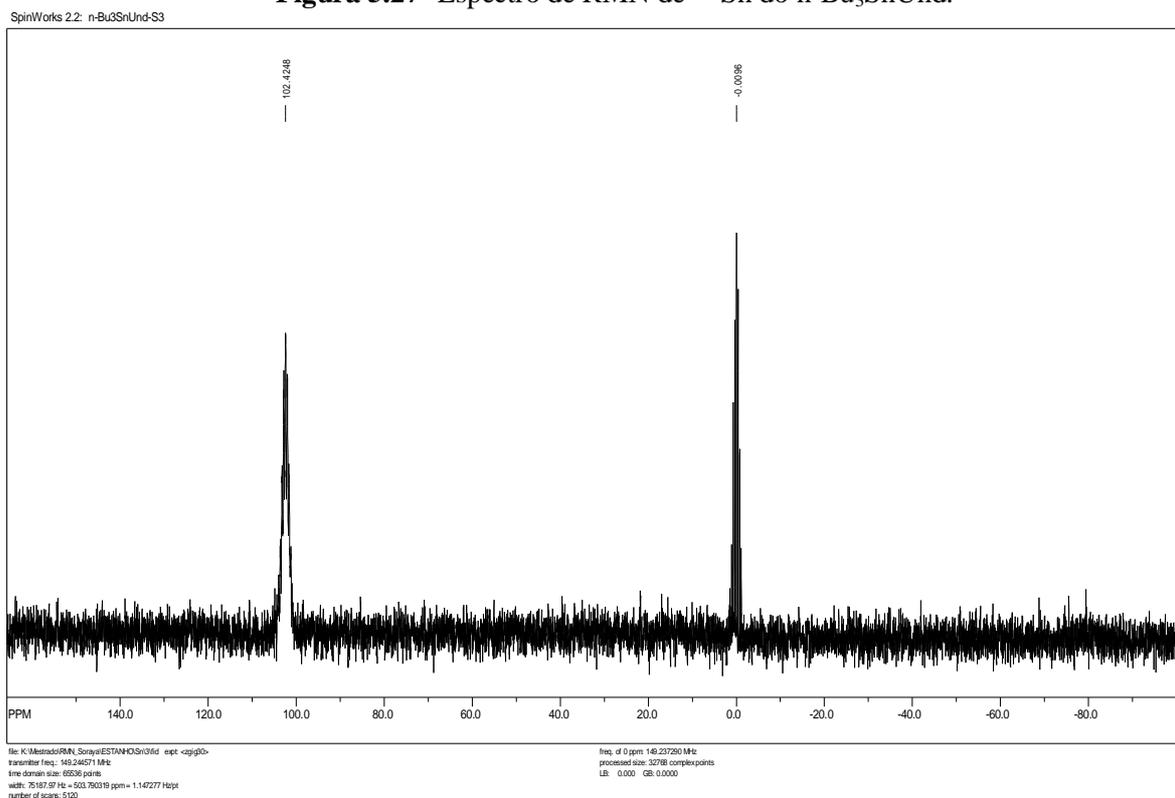
Fonte: Laboratório de RMN (UFAL); Autora, 2010.

Figura 5.26- Espectro de RMN de ^{119}Sn do $Me_2Sn(Und)_2$.



Fonte: Laboratório de RMN (UFAL); Autora, 2010.

Figura 5.27- Espectro de RMN de ^{119}Sn do $n\text{-Bu}_3\text{SnUnd}$.



Fonte: Laboratório de RMN (UFAL); Autora, 2010.

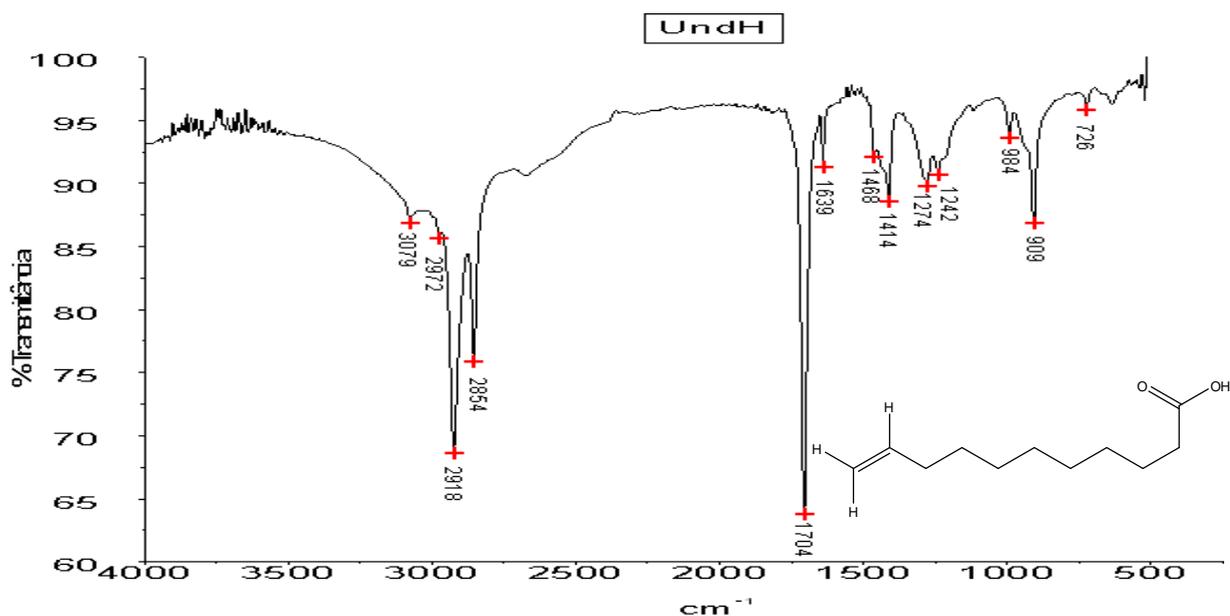
5.1.2.4- Espectroscopia no Infravermelho Médio (IV)

Os complexos sintetizados foram também caracterizados por espectroscopia na região do infravermelho médio, por ATR, a fim de confirmar a presença dos principais grupamentos esperados nas suas estruturas.

A análise do espectro do ácido undecilênico (Figura 5.12) evidenciou que este composto possui carbonos sp^3 e sp^2 , além da presença de ligação OH de carboxila. As principais bandas de absorção são: 3408-2399 cm^{-1} (ν OH, alargada); 3079 e 2972 cm^{-1} (ν =CH); 2918 e 2854 cm^{-1} (ν as/s CH e CH_2); 1704 cm^{-1} (ν C=O); 1639 cm^{-1} (ν C=C); 1468 cm^{-1} (δ CH_2); 1414 cm^{-1} (banda de combinação ν_{as} CO e δ OH); 1274 e 1242 cm^{-1} (ν_{s} CO); 984 e 909 cm^{-1} (γ =CH); 941 cm^{-1} (γ OH); 726 cm^{-1} (ρ CH_2). Esta última banda está relacionada à deformação angular tipo balanço, vista para substâncias com cadeia com mais de quatro grupos metilênicos.

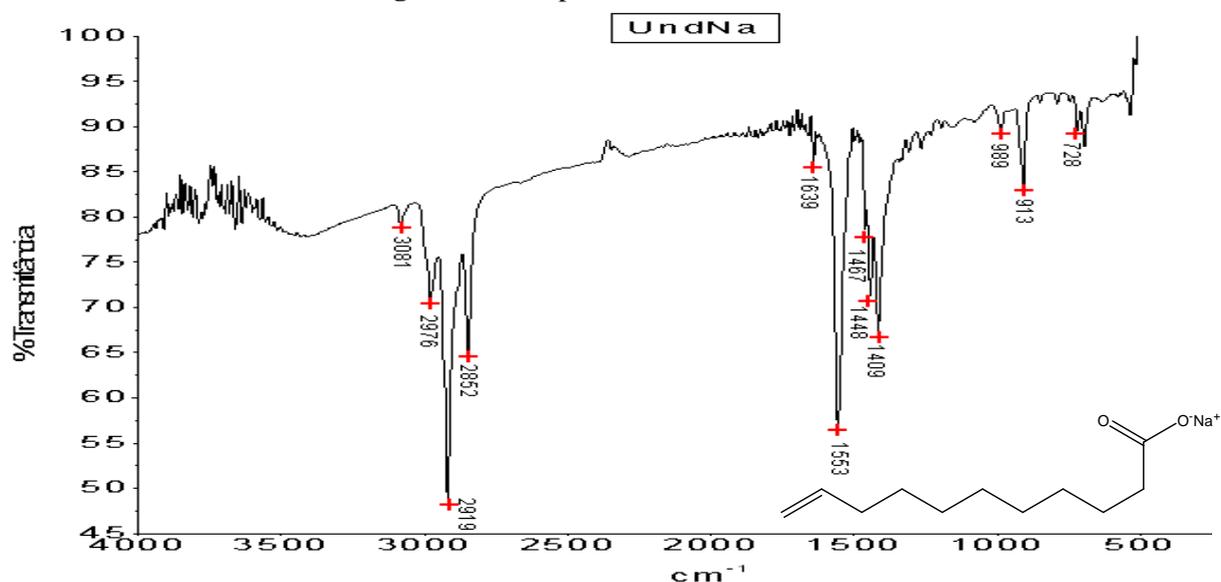
No espectro do undecilenato de sódio (Figura 5.13), as bandas de absorção relacionadas à cadeia alifática e à insaturação terminal continuam presentes, entretanto não se observam mais as bandas de OH da carboxila, dando evidências da formação do sal.

Figura 5.28- Espectro de IV do UndH.



Fonte: GCaR (UFAL); Autora, 2010.

Figura 5.29- Espectro de IV do UndNa.



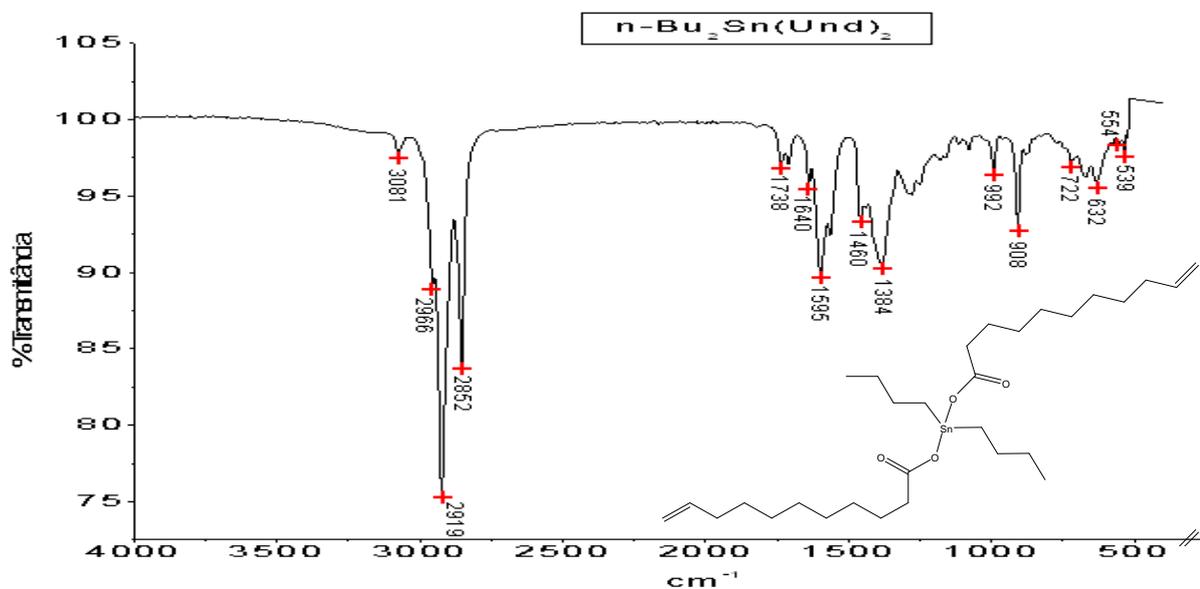
Fonte: GCaR (UFAL); Autora, 2010.

De acordo com Barbosa (2007), embora se escreva o ânion carboxilato com uma ligação dupla e uma simples entre o carbono e os oxigênios, na realidade a melhor forma de representação é o híbrido de ressonância; no qual as duas ligações C-O são iguais e apresentam ordem de ligação 1,5. Com isso, o grupo carboxilato apresenta duas vibrações de estiramento, que são simétrica e assimétrica. A primeira dá origem a uma banda de absorção em $1440\text{-}1335\text{ cm}^{-1}$, normalmente com duas ou três bandas na região indicada; enquanto o estiramento assimétrico resulta numa banda forte entre $1650\text{ e }1550\text{ cm}^{-1}$.

Desse modo, no espectro do UndNa não se vê mais a banda 1704 cm^{-1} ($\nu\text{ C=O}$) presente no ácido undecilênico, e surgem as bandas em 1553 cm^{-1} , referente ao estiramento assimétrico entre C-O, e as duas bandas em 1448 e 1409 cm^{-1} , referentes ao estiramento simétrico da ligação C-O.

No espectro de IV do $n\text{-Bu}_2\text{Sn}(\text{Und})_2$ (Figura 5.14), por sua vez, as bandas de absorção relacionadas ao undecilenato permanecem (com pequenas mudanças nos valores de absorção), entretanto se observam novas bandas derivadas do estiramento das ligações Sn-C e Sn-O, 632 e 554 cm^{-1} ($\nu\text{ as/s Sn-C}$) e 539 cm^{-1} ($\nu\text{ Sn-O}$). Esses valores são semelhantes àqueles determinados por Nath e cols. (2009) no complexo triptofanilglicinato de di-butilestanho (622 e 562 cm^{-1} para $\nu\text{ as/s Sn-C}$; e 534 cm^{-1} para $\nu\text{ Sn-O}$).

Figura 5.30- Espectro de IV do $n\text{-Bu}_2\text{Sn}(\text{Und})_2$.

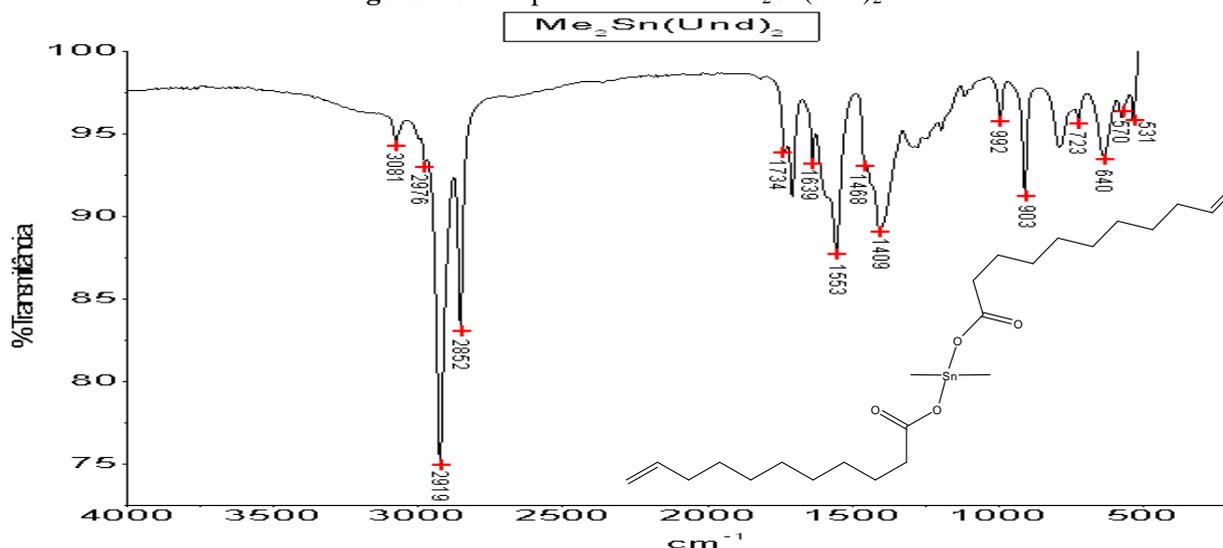


Fonte: GCaR (UFAL); Autora, 2010.

Na Figura 5.15, é apresentado o espectro de infravermelho do $\text{Me}_2\text{Sn}(\text{Und})_2$.

Da mesma forma que no espectro do $n\text{-Bu}_2\text{Sn}(\text{Und})_2$, as bandas de absorção relacionadas ao undecilenato do $\text{Me}_2\text{Sn}(\text{Und})_2$ permanecem (com pequenas mudanças nos valores de absorção), contudo pode-se observar as bandas relacionadas ao estiramento das ligações Sn-C e Sn-O em 640 e 570 cm^{-1} ($\nu\text{ as/s Sn-C}$) e 531 cm^{-1} ($\nu\text{ Sn-O}$). Nath e cols. (2009) também relataram valores semelhantes de estiramento para o complexo triptofanilglicinato de di-metilestanho (630 e 570 cm^{-1} para $\nu\text{ as/s Sn-C}$; e 521 cm^{-1} para $\nu\text{ Sn-O}$).

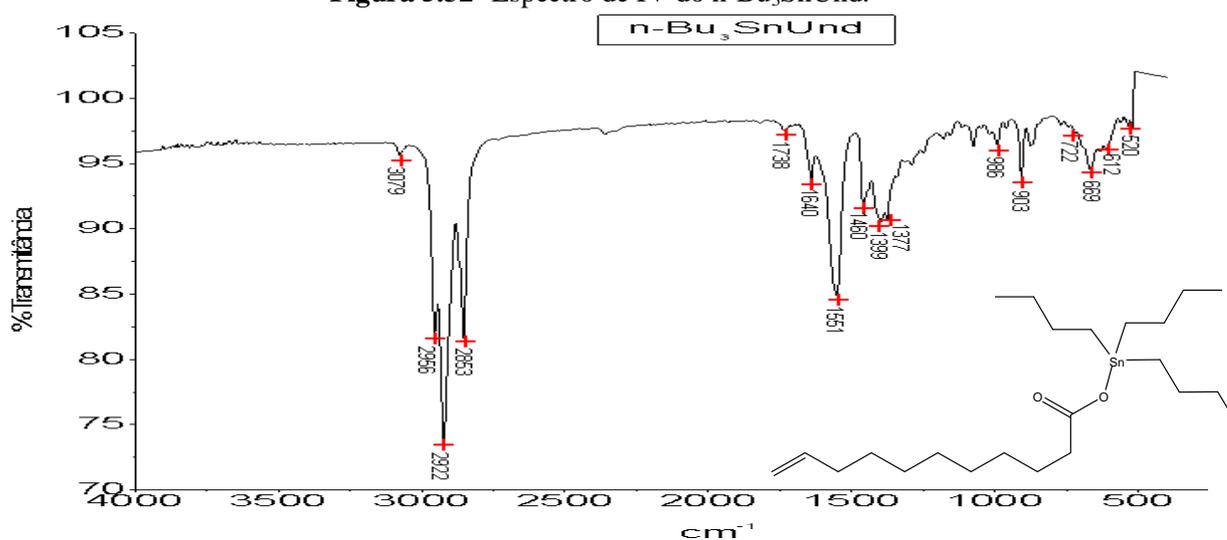
Figura 5.31- Espectro de IV do $\text{Me}_2\text{Sn}(\text{Und})_2$.



Fonte: GCaR (UFAL); Autora, 2010.

Conforme apresentado na Figura 5.16, também se observam no espectro do complexo $n\text{-Bu}_3\text{SnUnd}$ as bandas dos estiramentos do undecilenato, bem como as bandas de absorção dos estiramentos das ligações Sn-C e Sn-O (669 e 612 cm^{-1} para v as/s Sn-C; e 520 cm^{-1} para v Sn-O). Estes valores também estão próximos aos encontrados por Nath e cols. (2009) para triptofanilglicinato de tri-butilestanho, que foi de 674 e 604 cm^{-1} para v as/s Sn-C; e 517 cm^{-1} para v Sn-O.

Figura 5.32- Espectro de IV do $n\text{-Bu}_3\text{SnUnd}$.



Fonte: GCaR (UFAL); Autora, 2010.

Esses dados confirmam a formação dos complexos sintetizados neste estudo.

5.2 – Avaliação da toxicidade em *Artemia salina* Leach. (TAS)

Todos os complexos sintetizados foram avaliados quanto à toxicidade frente a larvas de *Artemia salina* Leach (TAS). Este teste é um ensaio biológico preliminar, sendo amplamente utilizado por ser rápido, de baixo custo e por ter demonstrado uma boa correlação com várias atividades biológicas, como atividade antitumoral, antibacteriana, antifúngica e contra o *Trypanosoma cruzi*, por exemplo. Em geral, extratos de plantas ou substâncias puras com alta toxicidade para *Artemia salina* ($CL_{50} < 200 \mu\text{g/mL}$) apresentam alto potencial para estas bioatividades (COSTA *et al.*, 2009).

Os resultados do TAS para alguns organoestânicos e para o ácido undecilênico são apresentados na Tabela 5.1.

Tabela 5.8- Resultados da toxicidade em larvas de *Artemia salina* Leach

Amostra	CL_{50}^a ($\mu\text{g/mL}$)	Intervalo de confiança (95%)	Grau de toxicidade ^b
Ácido undecilênico (UndH)	137,0	32,2 – 210,9	Moderadamente tóxico
n-Bu₂Sn(Und)₂	4,0	3,1 – 5,2	Altamente tóxico
n-Bu₃SnUnd	< 1,0	-	Altamente tóxico
Me₂Sn(Und)₂	45,0^c	12,5 – 206,0^c	Altamente tóxico
n-Bu ₂ SnCl ₂	2,7	1,5 – 4,6	Altamente tóxico
n-Bu ₃ SnCl	4,8	3,1 – 7,6	Altamente tóxico
Me ₂ SnCl ₂	entre 1000 e 100	-	-
n-Bu ₂ Sn(OAc) ₂	3,5	0,9 – 8,8	Altamente tóxico
n-Bu ₂ Sn(Lau) ₂	11,4	0,8 – 60,2	Altamente tóxico
Água do mar + Clorofórmio (controle negativo)	0	-	Atóxico
Água do mar + Metanol (controle negativo)	0	-	Atóxico
Água do mar + 1% Timol (controle positivo)	2,9 ^d	2,3 – 3,3 ^d	Altamente tóxico

^a Concentração letal média (calculada pela análise pelo método PROBIT); ^b Segundo Dolabela (1997); ^c Calculado a partir dos resultados preliminares; ^d ELLIS & BAXENDALE, 1997.

Não foi possível determinar a CL_{50} do $n\text{-Bu}_3\text{SnUnd}$ nem do Me_2SnCl_2 segundo a análise estatística dos resultados pelo método PROBIT (FINNEY, 1972), entretanto, a partir destes testes preliminares, espera-se que estes valores estejam abaixo de $1,0 \mu\text{g/mL}$ e entre 1000 e $100 \mu\text{g/mL}$, respectivamente.

O valor da CL_{50} obtido para o $\text{Me}_2\text{Sn(Und)}_2$ foi calculado a partir dos resultados preliminares (concentrações entre 1000 e $1 \mu\text{g/mL}$), pois não foi devidamente obtido o intervalo de confiança ($IC_{95\%}$) do teste quantitativo desta amostra. O resultado para o ácido undecilênico, por sua vez, foi obtido a partir do teste quantitativo com concentrações entre 1000 e $100 \mu\text{g/mL}$. Esta ampla faixa de concentração explica o largo intervalo de confiança obtido. Entretanto esse fato parece aceitável para muitos autores, visto que Meyer e cols. (1982), em um dos principais artigos sobre o teste de toxicidade em *Artemia salina*, apresentaram valores de $IC_{95\%}$ para suas amostras que variaram de 55 a 219, de 462 a 1290 e até de 374 a 7763 $\mu\text{g/mL}$. Muitos autores, por sua vez, não divulgam os intervalos de confiança obtidos (RAMOS *et al.*, 2009; PEREIRA & CASTRO, 2007; BARBOSA *et al.*, 2009).

Segundo Kungolo e cols. (2001), o valor da CL_{50} do Me_2SnCl_2 foi igual a $149,3 \mu\text{g/mL}$. Este valor encontra-se no intervalo obtido no teste preliminar (entre 1000 e $100 \mu\text{g/mL}$), confirmando o resultado esperado.

Como nos trabalhos de Ramos e cols. (2009) e Pereira & Castro (2007), os critérios de classificação das amostras com base nos níveis de CL_{50} no TAS foram aqueles estabelecidos por Dolabela (1997): $CL_{50} < 80 \mu\text{g/mL}$, altamente tóxicos; entre $80 \mu\text{g/mL}$ e $250 \mu\text{g/mL}$, moderadamente tóxico; e $CL_{50} > 250 \mu\text{g/mL}$, com baixa toxicidade ou não tóxico. Dessa forma, dentre os organoestânicos dos quais foi possível calcular a CL_{50} , todos foram classificados como altamente tóxicos.

Em nossos testes, o ácido undecilênico, um fármaco antibacteriano e antifúngico, foi classificado como moderadamente tóxico ($CL_{50} = 136,97 \mu\text{g/mL}$). Este resultado vem ratificar a correlação entre o bioensaio preliminar de toxicidade em *Artemia salina* e atividades antibacteriana e antifúngica, conforme descrito por Costa e cols. (2009).

Para atividades biológicas em que o grau de toxidade não é o fator fundamental desejado, como, por exemplo, atividades cicatrizante e anti-inflamatória, é importante que as amostras tenham altos valores de CL_{50} , sendo consideradas, assim, atóxicas. Entretanto, como o objetivo deste trabalho era atividade antimicrobiana, os valores encontrados mostraram-se promissores.

Deve-se, porém, ressaltar que este é um bioensaio preliminar, ou seja, busca-se apenas revelar compostos possivelmente bioativos, sendo necessários testes mais específicos contra bactérias, fungos, linhagens celulares tumorais, etc., para confirmação da atividade.

A comparação entre as CL_{50} dos compostos testados é mostrada na Tabela 5.2.

Tabela 5.9- Comparação da toxicidade em larvas de *Artemia salina* Leach, em função dos substituintes L e R ligados ao estanho (R_nSnL_{4-n})

Substituinte	Sequencia de toxicidade
L = Und	$n-Bu_3SnUnd > n-Bu_2Sn(Und)_2 > Me_2Sn(Und)_2 > UndH$
L = Cl	$n-Bu_2SnCl_2 > n-Bu_3SnCl > Me_2SnCl_2$
R = n-Bu ₂	$n-Bu_2SnCl_2 > n-Bu_2Sn(OAc)_2 > n-Bu_2Sn(Und)_2 > n-Bu_2Sn(Lau)_2$

Vieira (2008), em seu trabalho com complexos organoestânicos do ácido cólico, relata a mesma sequência de toxicidade frente a larvas de *A. salina* encontrada para os complexos do ácido undecilênico: $Bu_3SnL > Bu_2SnL_2 > Me_2SnL_2$. Já a sequência encontrada para os derivados clorados, foi a seguinte: $n-Bu_2SnCl_2 > n-Bu_3SnCl > Me_2SnCl_2$; neste caso, diferentemente dos complexos derivados dos ácidos cólico e undecilênico, o diorganoestânico foi mais tóxico do que o triorganoestânico. Todavia, como a diferença entre os valores de CL_{50} é muito pequena ($CL_{50} = 2,69$ e $4,83 \mu g/mL$, respectivamente), esta variação pode ser incluída na margem de erro experimental.

Por fim, para os diorganoestânicos com R igual a n-butila, nota-se a diminuição da toxicidade com o aumento do número de carbonos do ligante L (carboxilato) e consequente aumento da massa molecular. Assim, os complexos clorados (sem ligantes L) foram mais tóxicos do que aqueles com L= acetato (2 carbonos), que foi mais tóxico que aqueles com L= undecilenato (11 carbonos), e que, por sua vez, foi mais tóxico do que aquele com L= laurato (12 carbonos).

Segundo Nguyen e cols. (2000), acredita-se que os triorganoestânicos se ligam à mitocôndria e inibem a fosforilação oxidativa. Eles também podem atuar como trocadores de Cl^-/OH^- através da membrana mitocondrial, resultando em distúrbio do gradiente de prótons. Mas embora o mecanismo de toxicidade dos triorganoestânicos não seja bem conhecido, os fenômenos induzidos por eles, como diminuição da respiração mitocondrial e lise de hemácias, sugerem que a sua toxicidade está relacionada à membrana e pode envolver proteínas e/ou fosfolipídeos.

Já a ação tóxica de compostos diorganoestânicos tem sido atribuída à sua tendência em interagir com coenzimas e enzimas (VIEIRA, 2008).

A atividade artemicida do timol, utilizado como controle positivo do TAS, é devida à sua capacidade de romper a membrana citoplasmática e, conseqüentemente, levar as larvas de *A. salina* à morte por desidratação (ELLIS & BAXENDALE, 1997).

Cabe lembrar que neste estudo a técnica adotada foi a impregnação das amostras diretamente nos tubos de ensaio, o que facilita enormemente a execução do teste. Neste caso, buscou-se o solvente mais adequado para solubilização das amostras, sendo o solvente, em seguida, eliminado por evaporação. Tal metodologia permite a obtenção de resultados mais confiáveis, pela garantia de uma medida apurada da quantidade de amostra colocada em contato com as larvas de *A. salina*.

5.3 – Avaliação da atividade antimicrobiana

Foram avaliadas as atividades antibacteriana e antifúngica dos novos complexos de estanho(IV) pelos métodos de difusão em ágar e de microdiluição em caldo. Os resultados destes testes são apresentados a seguir.

5.3.1 – Teste de difusão em ágar

Os novos compostos organoestânicos derivados do ácido undecilênico, bem como do próprio ácido undecilênico e alguns organoestânicos comerciais foram avaliados frente às bactérias *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. pyogenes*, *P. mirabilis*, *E. coli*, *S. typhimurium*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* e ao fungo *C. albicans*, pelo método de difusão em ágar, na concentração de 1000 µg/disco.

Contra a bactéria *S. aureus*, todos os cloretos organoestânicos testados, além do n-Bu₂Sn(OAc)₂ e o n-Bu₃SnUnd foram considerados ativos (inibição ≥ 75%); o ácido undecilênico, o n-Bu₂Sn(Und)₂ e o Me₂Sn(Und)₂ foram considerados moderadamente ativos (≥ 25% e < 75%); e o n-Bu₂Sn(Lau)₂, pouco ativo (inibição < 25%), conforme apresentado na Tabela 5.3. O n-Bu₂Sn(OAc)₂ apresentou inclusive atividade comparável à do controle positivo (gentamicina) neste teste de difusão em ágar (zona de inibição de 102 ± 3,7%).

Tabela 5.10- Resultados da atividade antimicrobiana do ácido undecilênico e dos organoestânicos contra bactérias Gram-positivas, pelo método de difusão em ágar (1000 µg/disco)

Amostras	Microrganismos		
	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. pyogenes</i>
	% Zona de inibição do crescimento ^a (± DP ^b)		
UndH	37 (± 1,4)	32 (± 0)	73 (± 2,3)
n-Bu₂Sn(Und)₂	29 (± 1,4)	36 (± 1,4)	49 (± 3,7)
n-Bu₃SnUnd	88 (± 2,4)	73 (± 4,1)	HMG^c
Me₂Sn(Und)₂	53 (± 3,7)	48 (± 0,9)	67 (± 1,6)
n-Bu ₂ SnCl ₂	HMG ^c	69 (± 1,4)	HMG ^c
n-Bu ₃ SnCl	HMG ^c	HMG ^c	HMG ^c
Me ₂ SnCl ₂	HMG ^c	HMG ^c	HMG ^c
n-Bu ₂ Sn(OAc) ₂	102 (± 3,7)	22 (± 1,6)	HMG ^c
n-Bu ₂ Sn(Lau) ₂	21 (± 0)	29 (± 3,3)	33 (± 2,0)

^a Calculado de acordo com a Eq. 4.6 (item 4.5.4.3); ^b Desvio-Padrão; ^c Halos muito grandes (sobrepostos).

Contra a bactéria *S. epidermidis*, por sua vez, as amostras tiveram a seguinte classificação: n-Bu₃SnCl e Me₂SnCl₂ foram consideradas ativas (inibição ≥ 75%); n-Bu₂Sn(OAc)₂, pouco ativa (< 25%); e as demais, moderadamente ativas (inibição ≥ 25% e <75%). Pode-se observar que o n-Bu₃SnUnd foi considerado moderadamente ativo, entretanto ele se encontra na faixa limite para ser considerado ativo, com uma zona de inibição de 73 ± 4,1% (Tabela 5.3).

Já frente à bactéria *S. pyogenes*, todos os cloretos organoestânicos testados, além do n-Bu₂Sn(OAc)₂ e o n-Bu₃SnUnd foram considerados ativos; e as demais substâncias testadas foram moderadamente ativas. Observa-se, porém, que o UndH foi considerado moderadamente ativo, contudo ele se encontra na faixa limite para ser classificado como ativo (zona de inibição de 73 ± 2,3%), como pode ser visto na Tabela 5.3.

Na Tabela 5.4 são apresentados os resultados da atividade dos organoestânicos contra cepas ATCC de bactérias Gram-negativas.

Nota-se que o ácido undecilênico não apresenta atividade contra as bactérias Gram-negativas neste teste; entretanto os complexos sintetizados neste estudo apresentaram melhores resultados. Estes apresentaram, de certo modo, atividades semelhantes aos cloretos de estanho (Tabela 5.4). Em alguns casos, porém, como por exemplo frente a *E. coli*, *K. pneumoniae* e *S. typhimurium*, o n-Bu₂Sn(Und)₂ e o n-Bu₃SnUnd foram inativos, apesar de seus análogos na forma de cloreto serem moderadamente ativos. Outro exemplo curioso é a

atividade moderada do n-Bu₃SnUnd frente a *P. mirabilis*, apesar do seu cloreto de origem ser inativo contra este microrganismo.

Tabela 5.11- Resultados da atividade antimicrobiana do ácido undecilênico e dos organoestânicos contra bactérias Gram-negativas, pelo método de difusão em ágar (1000 µg/disco)

Amostras	Microrganismos				
	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. typhimurium</i>
	% Zona de inibição do crescimento ^a (± DP ^b)				
UndH	NA ^c	NA ^c	NA ^c	NA ^c	NA ^c
n-Bu ₂ Sn(Und) ₂	NA ^c	NA ^c	52 (± 13,2)	42 (± 1,9)	NA ^c
n-Bu ₃ SnUnd	NA ^c	NA ^c	39 (± 5,9)	27 (± 0)	NA ^c
Me ₂ Sn(Und) ₂	25 (± 0)	34 (± 1,9)	42 (± 0)	47 (± 3,2)	39 (± 0)
n-Bu ₂ SnCl ₂	34 (± 1,9)	36 (± 0)	44 (± 2,3)	28 (± 0)	38 (± 1,4)
n-Bu ₃ SnCl	37 (± 4,5)	28 (± 0)	NA ^c	33 (± 5,0)	30 (± 1,4)
Me ₂ SnCl ₂	55 (± 1,9)	47 (± 2,3)	37 (± 3,7)	56 (± 3,8)	38 (± 8,7)
n-Bu ₂ Sn(OAc) ₂	25 (± 0)	28 (± 0)	39 (± 2,3)	35 (± 5,6)	29 (± 0)
n-Bu ₂ Sn(Lau) ₂	NA ^c	NA ^c	64 (± 5,9)	30 (± 3,8)	NA ^c

^a Calculado de acordo com a Eq. 4.6 (item 4.5.4.3); ^b Desvio-Padrão; ^c Nenhuma atividade.

Seguindo os critérios de Caceres e cols. (1998), a atividade antibacteriana contra *E. coli* das seguintes amostras foram classificadas como moderadamente ativas: os cloretos organoestânicos, o Me₂Sn(Und)₂ e o n-Bu₂Sn(OAc)₂. As demais substâncias foram consideradas inativas a partir deste método de avaliação antibacteriana (Tabela 5.4).

Quanto à atividade contra *K. pneumoniae*, o ácido undecilênico, o n-Bu₂Sn(Und)₂, o n-Bu₃SnUnd e o n-Bu₂Sn(Lau)₂ foram classificados como inativos, enquanto as demais amostras foram moderadamente ativas (Tabela 5.4).

Contra a bactéria *P. mirabilis*, as amostras tiveram a seguinte classificação: o n-Bu₃SnCl e o ácido undecilênico foram considerados inativos (inibição < 25 %), e os demais, moderadamente ativos (inibição ≥ 25% e < 75%), conforme visto na Tabela 5.4.

Frente à bactéria *P. aeruginosa*, por sua vez, apenas o ácido undecilênico foi inativo, enquanto todas as outras amostras testadas foram classificadas como moderadamente ativas a partir dos resultados de inibição do crescimento bacteriano na placa de ágar (Tabela 5.4). Este resultado é promissor, visto que este microrganismo é resistente a muitos

antibióticos e, sendo fundamentalmente um patógeno oportunista, causa infecções importantes em pacientes hospitalizados, por exemplo, naqueles com queimaduras extensivas, quando as defesas da pele são destruídas (LEVINSON & JAWETZ, 2005).

Para a atividade contra *S. typhimurium* pelo método de difusão em ágar, foram considerados inativos o ácido undecilênico, o n-Bu₃SnUnd, o n-Bu₂Sn(Und)₂ e o n-Bu₂Sn(Lau)₂. As demais substâncias avaliadas foram classificadas como moderadamente ativas.

Observa-se que as amostras testadas foram menos ativas contra as bactérias Gram-negativas do que contra bactérias Gram-positivas, e estes resultados são condizentes com as informações encontradas na literatura para organoestânicos (GLEESON *et al*, 2008).

Na Tabelas 5.5 são mostrados os resultados da atividade antifúngica dos organoestânicos contra *C. albicans*.

Segundo os parâmetros de classificação adotados neste trabalho, os cloretos n-Bu₃SnCl e Me₂SnCl₂ foram considerados ativos, estando este último na faixa limite entre ativo e moderadamente ativo, com zona de inibição de crescimento fúngico de $75 \pm 7,3\%$. O n-Bu₂Sn(Lau)₂, por sua vez, foi inativo, enquanto as demais amostras avaliadas foram moderadamente ativas (inibição $\geq 25\%$ e $< 75\%$) seguindo-se o método de difusão em ágar (Tabela 5.5).

Tabela 5.12- Resultados da atividade antifúngica do ácido undecilênico e dos organoestânicos, pelo método de difusão em ágar (1000 µg/disco)

Amostras	Micorganismo
	<i>Candida albicans</i>
	% Zona de inibição do crescimento ^a (\pm DP ^b)
UndH	52 (\pm 0)
n-Bu₂Sn(Und)₂	34 (\pm 1,9)
n-Bu₃SnUnd	59 (\pm 2,3)
Me₂Sn(Und)₂	52 (\pm 0)
n-Bu ₂ SnCl ₂	45 (\pm 6,2)
n-Bu ₃ SnCl	HMG ^c
Me ₂ SnCl ₂	75 (\pm 7,3)
n-Bu ₂ Sn(OAc) ₂	45 (\pm 2,3)
n-Bu ₂ Sn(Lau) ₂	NA ^d

^a Calculado de acordo com a Eq. 4.6 (item 4.5.4.3); ^b Desvio-Padrão; ^c Halos muito grandes (sobrepostos);

^d Nenhuma atividade.

De acordo com os dados apresentados, os resultados encontrados para os novos organoestânicos mostraram-se promissores, especialmente contra *C. albicans* e contra bactérias Gram-positivas.

5.3.2 – Teste de microdiluição em caldo

Na avaliação da atividade antimicrobiana pelo teste de microdiluição em caldo, foram utilizados os mesmos microrganismos do teste de difusão em ágar e foram adotados os valores de concentração inibitória mínima descritos Holetz e cols. (2002):

- CIM < 100 µg/mL: Ativo;
- $100 \leq \text{CIM} < 500$ µg/mL: Moderadamente ativo;
- $500 \leq \text{CIM} < 1000$ µg/mL: Pouco ativo;
- $\text{CIM} \geq 1000$ µg/mL: Inativo.

Segundo o documento do NCCLS (2003), a concentração inibitória mínima não representa um valor absoluto, e a “verdadeira” CIM está num ponto entre a menor concentração do teste que inibe o crescimento do organismo (ou seja, a leitura da CIM) e a próxima menor concentração do teste. Por exemplo, se forem usadas diluições de duas vezes e for determinado que a CIM é 16 µg/mL, a “verdadeira” CIM estará entre 16 e 8µg/mL. Por esse motivo, quando há inibição do crescimento na menor concentração testada, o verdadeiro valor da CIM não pode ser determinado com precisão e deve ser considerado como igual a ou menor que a menor concentração encontrada.

Na Tabela 5.6 são apresentados os valores de concentração inibitória mínima das substâncias avaliadas, obtidos contra bactérias Gram-positivas.

Frente à bactéria *S. aureus*, o n-Bu₂Sn(Und)₂, o n-Bu₃SnUnd, o n-Bu₂SnCl₂, o n-Bu₃SnCl e o n-Bu₂Sn(OAc)₂ foram classificados como ativos; o Me₂Sn(Und)₂, o Me₂SnCl₂ e o n-Bu₂Sn(Lau)₂ foram considerados moderadamente ativos; enquanto o ácido undecilênico foi considerado pouco ativo de acordo os valores de CIM (Tabela 5.6).

Na Tabela 5.7, observa-se a comparação da atividade dos organoestânicos frente à bactéria *S. aureus* em séries análogas, a partir das suas concentrações inibitórias mínimas. Nota-se que todos os complexos sintetizados são mais ativos que o ácido undecilênico e que respectivo derivado o triorganoestânico é mais ativo que os diorganoestânicos.

Segundo os resultados de CIM contra *S. epidermidis* (Tabela 5.6), n-Bu₃SnCl, n-Bu₃SnUnd e n-Bu₂SnCl₂ foram considerados ativos (CIM < 100 µg/mL); n-Bu₂Sn(Lau)₂,

pouco ativo ($500 \leq \text{CIM} < 1000 \mu\text{g/mL}$); e as demais amostras, moderadamente ativas ($100 \leq \text{CIM} < 500 \mu\text{g/mL}$).

Tabela 5.13- Concentração Inibitória Mínima (CIM) do ácido undecilênico e dos organoestânicos contra bactérias Gram-positivas, pelo método de microdiluição em caldo

Amostras	Microrganismos		
	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. pyogenes</i>
	CIM ($\mu\text{g/mL}$)		
UndH	500 ($3 \times 10^3 \mu\text{M}$)	250 ($1 \times 10^3 \mu\text{M}$)	15,6 (85 μM)
n-Bu₂Sn(Und)₂	31,2 (52 μM)	250 (417 μM)	31,2 (52 μM)
n-Bu₃SnUnd	15,6 (33 μM)	1,0 (2 μM)	1,0 (2 μM)
Me₂Sn(Und)₂	250 (485 μM)	250 (485 μM)	250 (485 μM)
n-Bu ₂ SnCl ₂	15,6 (51 μM)	15,6 (51 μM)	15,6 (51 μM)
n-Bu ₃ SnCl	$\leq 0,5 (\leq 2 \mu\text{M})$	$\leq 0,5 (\leq 2 \mu\text{M})$	$\leq 0,5 (\leq 2 \mu\text{M})$
Me ₂ SnCl ₂	250 ($1 \times 10^3 \mu\text{M}$)	250 ($1 \times 10^3 \mu\text{M}$)	250 ($1 \times 10^3 \mu\text{M}$)
n-Bu ₂ Sn(OAc) ₂	31,2 (89 μM)	250 (712 μM)	15,6 (44 μM)
n-Bu ₂ Sn(Lau) ₂	250 (396 μM)	500 (792 μM)	250 (396 μM)

Tabela 5.14- Comparação da atividade antibacteriana dos organoestânicos contra *Staphylococcus aureus* a partir das suas concentrações inibitórias mínimas, em função dos substituintes L e R ligados ao estanho ($\text{R}_n\text{SnL}_{4-n}$)

Substituinte	Sequencia de atividade
L = Und	n-Bu ₃ SnUnd > n-Bu ₂ Sn(Und) ₂ > Me ₂ Sn(Und) ₂ > UndH
L = Cl	n-Bu ₃ SnCl > n-Bu ₂ SnCl ₂ > Me ₂ SnCl ₂
R = n-Bu ₂	n-Bu ₂ Sn(Und) ₂ \approx n-Bu ₂ SnCl ₂ > n-Bu ₂ Sn(OAc) ₂ > n-Bu ₂ Sn(Lau) ₂

Observa-se na Tabela 5.8 a comparação da atividade dos organoestânicos, em termos de concentração inibitória mínima, frente à bactéria *S. epidermidis* em séries análogas. Nota-se que o n-Bu₃SnUnd é mais ativo que o ligante e os demais complexos sintetizados e que, assim como contra *S. aureus*, o triorganoestânico é mais ativo que os diorganoestânicos. No caso dos complexos contendo o fragmento n-Bu₂Sn, observa-se que aquele com o

undecilenato é mais ativo que aqueles com os demais carboxilatos, sendo, entretanto, menos ativos que aquele com o cloreto.

Tabela 5.15- Comparação da atividade antibacteriana dos organoestânicos contra *Staphylococcus epidermidis* a partir das suas concentrações inibitórias mínimas, em função dos substituintes L e R ligados ao estanho (R_nSnL_{4-n})

Substituinte	Sequencia de atividade
L = Und	$n-Bu_3SnUnd > n-Bu_2Sn(Und)_2 > Me_2Sn(Und)_2 > UndH$
L = Cl	$n-Bu_3SnCl > n-Bu_2SnCl_2 > Me_2SnCl_2$
R = n-Bu ₂	$n-Bu_2SnCl_2 > n-Bu_2Sn(Und)_2 > n-Bu_2Sn(OAc)_2 > n-Bu_2Sn(Lau)_2$

De acordo com os critérios adotados neste estudo, o $Me_2Sn(Und)_2$, o Me_2SnCl_2 e o $n-Bu_2Sn(Lau)_2$ foram considerados moderadamente ativos, enquanto as demais substâncias testadas foram consideradas ativas contra a bactéria *S. pyogenes* (Tabela 5.6).

A sequência de atividade em séries análogas dos organoestânicos, em termos de concentração inibitória mínima, obtidas no teste de microdiluição em caldo frente à bactéria *S. pyogenes*, é apresentada na Tabela 5.9. Observa-se para os undecilenatos a mesma sequência obtida para as demais bactérias Gram-positivas, exceto para o ácido undecilênico, que se mostrou mais ativo que o complexo com as metilas.

Tabela 5.16- Comparação da atividade antibacteriana dos organoestânicos contra *Streptococcus pyogenes* a partir das suas concentrações inibitórias mínimas, em função dos substituintes L e R ligados ao estanho (R_nSnL_{4-n})

Substituinte	Sequencia de atividade
L = Und	$n-Bu_3SnUnd > n-Bu_2Sn(Und)_2 > UndH > Me_2Sn(Und)_2$
L = Cl	$n-Bu_3SnCl > n-Bu_2SnCl_2 > Me_2SnCl_2$
R = n-Bu ₂	$n-Bu_2Sn(OAc)_2 > n-Bu_2Sn(Und)_2 \approx n-Bu_2SnCl_2 > n-Bu_2Sn(Lau)_2$

Na Tabela 5.10 são apresentados os valores de concentração inibitória mínima das substâncias avaliadas, observados contra bactérias Gram-negativas.

Pelos parâmetros de avaliação da CIM adotados neste estudo, o $n-Bu_2SnCl_2$ e o $n-Bu_2Sn(OAc)_2$ foram considerados ativos ($CIM < 100 \mu g/mL$); o $Me_2Sn(Und)_2$, o Me_2SnCl_2 e o $n-Bu_3SnCl$, pouco ativos ($500 \leq CIM < 1000 \mu g/mL$); e os demais, inativos ($CIM \geq 1000 \mu g/mL$) contra a bactéria *E. coli* (Tabela 5.10).

Tabela 5.17- Concentração Inibitória Mínima (CIM) do ácido undecilênico e dos organoestânicos contra bactérias Gram-negativas, pelo método de microdiluição em caldo

Amostras	Microrganismos			
	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>S. typhimurium</i>
	CIM ($\mu\text{g/mL}$)			
UndH	> 1000 ($> 5 \times 10^3 \mu\text{M}$)	Entre 1000 e 500 (Entre 5×10^3 e $3 \times 10^3 \mu\text{M}$)	Entre 1000 e 500 (Entre 5×10^3 e $3 \times 10^3 \mu\text{M}$)	Entre 1000 e 500 (Entre 5×10^3 e $3 \times 10^3 \mu\text{M}$)
n-Bu ₂ Sn(Und) ₂	> 1000 ($> 2 \times 10^3 \mu\text{M}$)	> 1000 ($> 2 \times 10^3 \mu\text{M}$)	Entre 1000 e 500 (Entre 2×10^3 e $1 \times 10^3 \mu\text{M}$)	> 1000 ($> 2 \times 10^3 \mu\text{M}$)
n-Bu ₃ SnUnd	> 1000 ($> 2 \times 10^3 \mu\text{M}$)	> 1000 ($> 2 \times 10^3 \mu\text{M}$)	500 ($1 \times 10^3 \mu\text{M}$)	> 1000 ($> 2 \times 10^3 \mu\text{M}$)
Me ₂ Sn(Und) ₂	500 (970 μM)	500 (970 μM)	500 (970 μM)	500 (970 μM)
n-Bu ₂ SnCl ₂	31,2 (103 μM)	125 (411 μM)	7,8 (26 μM)	Entre 1000 e 500 (Entre 3×10^3 e $2 \times 10^3 \mu\text{M}$)
n-Bu ₃ SnCl	Entre 1000 e 500 (Entre 3×10^3 e $2 \times 10^3 \mu\text{M}$)	> 1000 ($> 3 \times 10^3 \mu\text{M}$)	125 (384 μM)	> 1000 ($> 3 \times 10^3 \mu\text{M}$)
Me ₂ SnCl ₂	500 ($2 \times 10^3 \mu\text{M}$)	250 ($1 \times 10^3 \mu\text{M}$)	125 (569 μM)	500 ($2 \times 10^3 \mu\text{M}$)
n-Bu ₂ Sn(OAc) ₂	31,2 (89 μM)	62,5 (178 μM)	15,6 (44 μM)	500 ($1 \times 10^3 \mu\text{M}$)
n-Bu ₂ Sn(Lau) ₂	> 1000 ($> 2 \times 10^3 \mu\text{M}$)	> 1000 ($> 2 \times 10^3 \mu\text{M}$)	> 1000 ($> 2 \times 10^3 \mu\text{M}$)	> 1000 ($> 2 \times 10^3 \mu\text{M}$)

De acordo com a Tabela 5.11, os cloretos diorganoestânicos apresentam maior atividade antibacteriana frente a *E. coli* do que o triorganoestânico, diferentemente do que foi encontrado para as atividades contra as bactérias Gram-positivas desta pesquisa.

Tabela 5.18- Comparação da atividade antibacteriana dos organoestânicos contra *Escherichia coli* a partir das suas concentrações inibitórias mínimas, em função dos substituintes L e R ligados ao estanho (R_nSnL_{4-n})

Substituinte	Sequencia de atividade
L = Cl	$n-Bu_2SnCl_2 > Me_2SnCl_2 > n-Bu_3SnCl$
R = n-Bu ₂	$n-Bu_2Sn(OAc)_2 > n-Bu_2SnCl_2$

Frente à bactéria *K. pneumoniae*, apenas o $n-Bu_2Sn(OAc)_2$ foi considerado ativo; os cloretos $n-Bu_2SnCl_2$ e Me_2SnCl_2 foram considerados moderadamente ativos; o $Me_2Sn(Und)_2$ e o UndH, pouco ativos; e, por fim, os demais foram considerados inativos, por apresentarem CIM maior ou igual a 1000 µg/mL (Tabela 5.10).

Na Tabela 5.11 é apresentada a sequencia de atividade dos organoestânicos, em séries análogas, frente à bactéria *K. pneumoniae*, a partir dos resultados de CIM. Observa-se que, dos complexos sintetizados, apenas o $Me_2Sn(Und)_2$ apresenta atividade, sendo inclusive mais ativo que o ácido ligante. Os cloretos diorganoestânicos foram, assim como contra *E. coli*, mais ativos do que o triorganoestânico, que, neste caso, não apresentou atividade antibacteriana.

Tabela 5.19- Comparação da atividade antibacteriana dos organoestânicos contra *Klebsiella pneumoniae* a partir das suas concentrações inibitórias mínimas, em função dos substituintes L e R ligados ao estanho (R_nSnL_{4-n})

Substituinte	Sequencia de atividade
L = Und	$Me_2Sn(Und)_2 > UndH$
L = Cl	$n-Bu_2SnCl_2 > Me_2SnCl_2$
R = n-Bu ₂	$n-Bu_2Sn(OAc)_2 > n-Bu_2SnCl_2$

Segundo os resultados do teste de microdiluição em caldo das amostras contra *P. mirabilis* (Tabela 5.10), o $n-Bu_2SnCl_2$ e o $n-Bu_2Sn(OAc)_2$ foram considerados ativos (CIM < 100 µg/mL); o $n-Bu_2Sn(Lau)_2$, inativo (CIM ≥ 1000 µg/mL); e as demais amostras, moderadamente ativas ($100 \leq CIM < 500$ µg/mL).

A comparação entre as atividades dos organoestânicos contra *P. mirabilis* é apresentada na Tabela 5.13. Nela, observa-se que o $Me_2Sn(Und)_2$ é mais ativo que os demais derivados undecilenatos e que o ácido ligante. Neste caso, o $n-Bu_2SnCl_2$ foi mais ativo que o $n-Bu_3SnCl$ e Me_2SnCl_2 .

Nota-se que o aumento do número de carbonos do ligante L em complexos n-Bu₂Sn resulta em diminuição da atividade antibacteriana, chegando até a ser inativo, como no caso do n-Bu₂Sn(Lau)₂ (cadeia alifática com 12 carbonos).

Tabela 5.20- Comparação da atividade antibacteriana dos organoestânicos contra *Proteus mirabilis* a partir das suas concentrações inibitórias mínimas, em função dos substituintes L e R ligados ao estanho (R_nSnL_{4-n})

Substituinte	Sequencia de atividade
L = Und	Me ₂ Sn(Und) ₂ > n-Bu ₃ SnUnd > n-Bu ₂ Sn(Und) ₂ > UndH
L = Cl	n-Bu ₂ SnCl ₂ > n-Bu ₃ SnCl > Me ₂ SnCl ₂
R= n-Bu ₂	n-Bu ₂ SnCl ₂ > n-Bu ₂ Sn(OAc) ₂ > n-Bu ₂ Sn(Und) ₂

Quanto à atividade contra *S. typhimurium* pelo método de microdiluição em caldo, foram considerados inativos o n-Bu₃SnUnd, o n-Bu₂Sn(Und)₂, o n-Bu₃SnCl e o n-Bu₂Sn(Lau)₂, enquanto as outras amostras foram pouco ativas (Tabela 5.10).

Dos complexos sintetizados neste estudo, apenas o Me₂Sn(Und)₂ apresentou atividade contra *S. typhimurium*, sendo também mais ativo que o ácido undecilênico contra esta bactéria. Os cloretos diorganoestânicos foram, assim como contra *E. coli* e *K. pneumoniae*, mais ativos que o triorganoestânico, que, por sua vez, não apresentou atividade antibacteriana contra *S. typhimurium* (Tabela 5.14).

Tabela 5.21- Comparação da atividade antibacteriana dos organoestânicos contra *Salmonella typhimurium* a partir das suas concentrações inibitórias mínimas, em função dos substituintes L e R ligados ao estanho (R_nSnL_{4-n})

Substituinte	Sequencia de atividade
L = Und	Me ₂ Sn(Und) ₂ > UndH
L = Cl	Me ₂ SnCl ₂ > n-Bu ₂ SnCl ₂
R= n-Bu ₂	n-Bu ₂ Sn(OAc) ₂ > n-Bu ₂ SnCl ₂

Atividades pequenas ou ausentes de organoestânicos contra bactérias Gram-negativas e, em geral, elevadas ou moderadas contra Gram-positivas são condizentes com os dados encontrados na literatura para organoestânicos (GLEESON *et al*, 2008), como visto anteriormente.

Embora pouco se conheça dos efeitos de compostos de estanho em processos microbianos, sabe-se que alguns processos bacterianos podem ser inibidos por complexos organoestânicos, sendo todos relacionados à função de membrana. Eles incluem efeitos de alteração na geração de energia, transporte de solutos, retenção e oxidação de substratos (BAUL, 2008)

Na Tabela 5.15 são apresentados os valores de concentração inibitória mínima das substâncias avaliadas, obtidos contra o fungo da espécie *C. albicans*.

Tabela 5.22- Concentração Inibitória Mínima (CIM) do ácido undecilênico e dos organoestânicos como antifúngicos, pelo método de microdiluição em caldo

Amostras	Microrganismo
	<i>Candida albicans</i>
	CIM ($\mu\text{g/mL}$)
UndH	62,5 (339 μM)
n-Bu₂Sn(Und)₂	7,8 (13 μM)
n-Bu₃SnUnd	$\leq 0,5$ ($\leq 1 \mu\text{M}$)
Me₂Sn(Und)₂	31,2 (60 μM)
n-Bu ₂ SnCl ₂	1,9 (6 μM)
n-Bu ₃ SnCl	$\leq 0,5$ ($\leq 2 \mu\text{M}$)
Me ₂ SnCl ₂	125 (569 μM)
n-Bu ₂ Sn(OAc) ₂	$\leq 0,5$ ($\leq 1 \mu\text{M}$)
n-Bu ₂ Sn(Lau) ₂	15,6 (25 μM)

Todas as amostras testadas neste estudo contra *C. albicans* foram consideradas ativas (CIM < 100 $\mu\text{g/mL}$), exceto o Me₂SnCl₂, que foi considerado moderadamente ativo (100 \leq CIM < 500 $\mu\text{g/mL}$), conforme visto na Tabela 5.15.

A comparação entre as atividades dos organoestânicos contra *C. albicans* é apresentada na Tabela 5.16, na qual se observa que, como contra bactérias Gram-positivas, os triorganoestânicos são mais ativos que os diorganoestânicos; e estes, por sua vez, mais ativos do que o ácido undecilênico.

Tabela 5.23- Comparação da atividade antifúngica dos organoestânicos contra *Candida albicans*, em função dos substituintes L e R ligados ao estanho (R_nSnL_{4-n})

Substituinte	Sequencia de atividade
L = Und	$n-Bu_3SnUnd > n-Bu_2Sn(Und)_2 > Me_2Sn(Und)_2 > UndH$
L = Cl	$n-Bu_3SnCl > n-Bu_2SnCl_2 > Me_2SnCl_2$
R = n-Bu ₂	$n-Bu_2Sn(OAc)_2 > n-Bu_2SnCl_2 > n-Bu_2Sn(Und)_2 > n-Bu_2Sn(Lau)_2$

Vieira (2008), em seu trabalho com organoestânicos, relata que alguns derivados organoestânicos causaram decréscimo no nível de lipídios, evidenciando a interferência dos compostos na biossíntese deste componente celular. As avaliações morfológicas por microscopias eletrônicas de varredura e de transmissão revelaram a presença de vários danos celulares, incluindo extravasamento de material citoplasmático. Segundo esta autora, alterações na permeabilidade da membrana, por uma provável interação de compostos organoestânicos com esteroides presentes no envoltório celular e uma possível solubilidade lipídica poderiam estar induzindo a formação de poros. Desse modo, a investigação sugere que o mecanismo de ação dos complexos organoestânicos em células de *C. albicans* seja similar ao dos compostos poliênicos, os quais são prescritos em clínicas médicas para tratamento de infecções causadas por este microrganismo.

Deve-se comentar ainda que houve, conforme observado, diferenças na ação inibitória dos compostos de estanho quando em solução (meio líquido, como o que é utilizado no método de microdiluição em caldo) e em ágar (soluções pseudo-sólidas). Este fato também foi relatado por Vieira (2008). Uma explicação seria a diferença de solubilidade dos complexos nos meios de cultivo, o que facilita ou dificulta o seu desempenho no teste e, conseqüentemente, interfere no resultado final.

Ostrosky e cols. (2008) afirmam que o método da microdiluição vem sendo bastante utilizado, principalmente devido à sua sensibilidade e quantidade mínima de reagentes, o que possibilita um maior número de réplicas, aumentando, assim, a confiabilidade dos resultados. Segundo Alves e cols. (2008), considera-se que o método de diluição em caldo é a melhor opção para se determinar a atividade antimicrobiana, quando comparado a outras metodologias.

De uma forma geral, pode-se dizer que os complexos sintetizados foram mais ativos que o ácido undecilênico, um composto com atividade antimicrobiana comprovada. Entretanto eles apresentaram pouca atividade contra bactérias Gram-negativas, sendo dentre

eles os diorganoestânicos fracamente mais ativos. Segundo Vieira (2008), membranas de bactérias Gram-negativas possuem uma forte barreira de permeabilidade para muitos tipos de antibióticos, conseqüentemente, elas são resistentes a muitas substâncias ativas contra organismos Gram-positivos.

Contra bactérias Gram-positivas e o fungo *C. albicans*, por sua vez, os organoestânicos mostraram resultados promissores, com destaque para o n-Bu₃SnUnd e o n-Bu₂Sn(Und)₂. Estes resultados são condizentes com aqueles obtidos para o teste preliminar de bioatividade (teste de toxicidade frente a larvas de *A. salina*), no qual os complexos contendo substituintes n-butila apresentaram menores valores de CL₅₀ que o complexo com metila.

5.4 – Avaliação da citotoxicidade em macrófagos

Muitos métodos de análise podem ser usados para medir o nível de toxicidade celular de diversas substâncias, e uma redução colorimétrica do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazólio) em células tem sido amplamente utilizado para este tipo de avaliação (FAHEINA-MARTINS, 2009).

O método do MTT foi utilizado para avaliar a citotoxicidade das amostras deste estudo, e foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Denizot & Lang (1986).

O método se baseia na análise da atividade da enzima desidrogenase mitocondrial, que é capaz de metabolizar o reagente MTT em um composto colorido denominado de *formazan*. Esse composto pode ser diluído e posteriormente quantificado por um leitor óptico, evidenciando o metabolismo mitocondrial e conseqüentemente a quantidade de células vivas (DENIZOT & LANG, 1986).

Segundo Faheina-Martins (2009), o MTT entra na célula por endocitose e, em seguida, sofre redução na mitocôndria ativa em células viáveis, formando o *formazan*. Esta análise tem sido usada com sucesso para verificar a capacidade de redução mitocondrial e viabilidade celular. Os cristais de *formazan* são solubilizados, formando assim uma solução colorida cuja medição da densidade óptica é diretamente proporcional ao número de células viáveis presentes na amostra.

As absorbâncias do metabólito do MTT foram determinadas em leitor de placas a 590 nm e os resultados obtidos são apresentados na Figura 5.17.

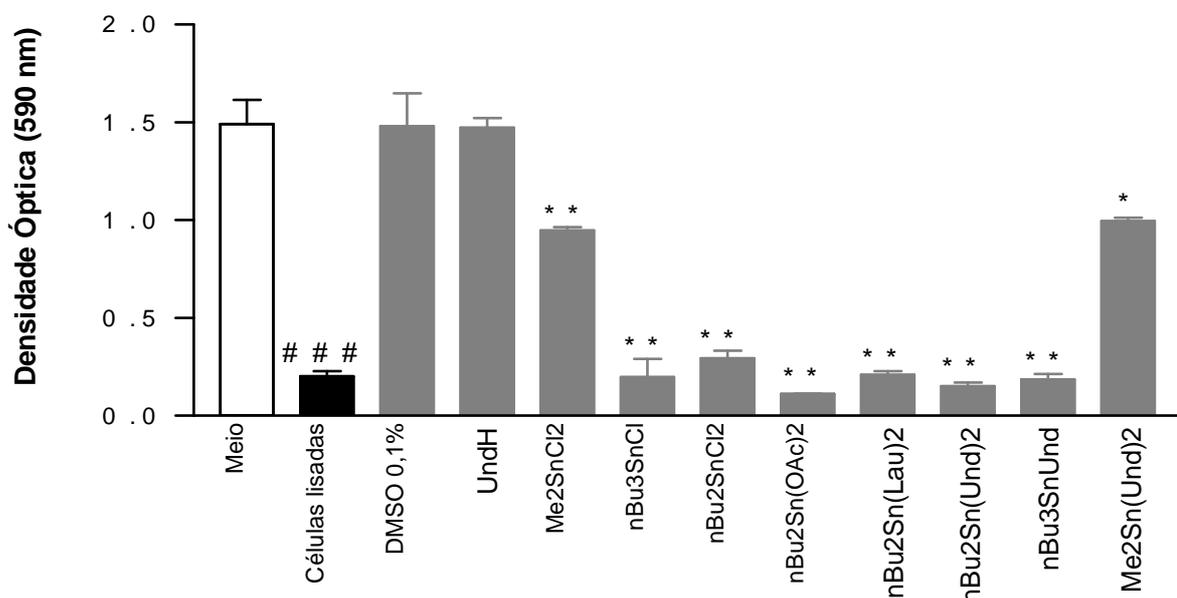
Os resultados mostraram uma citotoxicidade estatisticamente significativa para todos os compostos organoestânicos na concentração de 100 µM, sendo os complexos com

substituintes metila os menos tóxicos. Tendências semelhantes na sequência de toxicidade foram encontrados por Vieira (2008).

Já o ácido undecilênico não foi tóxico para estas células, com resultados de densidade óptica comparáveis ao do solvente e do meio de cultivo.

Cabe salientar que todos estes resultados obtidos com este teste corroboram aqueles obtidos no teste de toxicidade em *A. salina*.

Figura 5.33- Efeito do ácido undecilênico e dos organoestânicos (100 μ M) sobre a viabilidade de macrófagos (J774).



* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Fonte: LaFI (UFAL), 2011.

Atualmente, sabe-se que compostos organoestânicos de fórmula geral R_nSnL_{4-n} apresentam uma variedade de efeitos biológicos, dependendo do número n , do tipo de grupo orgânico R ligado ao íon metálico e do tipo de ligante L (KATSOULAKOU *et al.*, 2008). De acordo com Vieira (2008), a natureza do grupo alquil é de grande importância para determinar sua toxicidade. Segundo Baul (2008), a toxicidade dos organoestânicos está relacionada à sua lipofilicidade.

Dessa forma, através de modificações estruturais, principalmente dos grupos R, pode-se modular a toxicidade desses complexos de estanho(IV), sendo possível sua aplicação para diferentes objetivos farmacológicos.

Organoestânicos com baixa toxicidade são relatados, por exemplo, por Nath e cols. (2009), para complexos de estanho(IV) com atividade anti-inflamatória; e por Nath (2008), para organoestânicos com atividade anti-hipertensiva.

O tratamento de carpetes e cortinas, por exemplo, aliado a uma boa rotina de limpeza, pode ajudar no controle de microrganismos alergênicos em ambientes fechados, bem como pode controlar o desenvolvimento de patógenos oportunistas, sob condições adequadas (UEHARA *et al.*, 2008).

Segundo Uehara e cols. (2008), se a microbiota alergênica é controlada ou até mesmo reduzida, isto resultará numa melhor qualidade de vida, especialmente para pacientes que sofrem de alergias, bem como pode ser útil em casos de ambientes onde tenham pacientes imunocomprometidos. Estes autores estudaram a atividade antimicrobiana do maleato de tri-n-butilestanho após sua aplicação industrial em carpetes de diversos materiais (polipropileno, poliéster, poliamida e lã), e encontraram resultados promissores.

Esta seria uma alternativa interessante para a utilização antimicrobiana dos complexos organoestânicos sintetizados neste estudo.

5.5 – Referências

ALVES, E. G. *et al.* Estudo comparativo de técnicas de *screening* para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1224-1229, 2008.

BARBOSA, L. C. A. Absorção de grupos funcionais comuns. **Espectroscopia no infravermelho na caracterização de compostos orgânicos**. Viçosa: Ed. UFV, 2007. Cap. 4, p. 55-138.

BARBOSA, T. P. *et al.* Improved synthesis of seven aromatic Baylis-Hillman adducts (BHA): evaluation against *Artemia salina* Leach. and *Leishmania chagasi*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 1726-1730, 2009.

BAUL, T. S. B. Antimicrobial activity of organotin(IV) compounds: a review. **Applied Organometallic Chemistry**, v. 22, p. 195-204, 2008.

CACERES, A. *et al.* Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections. I. Screening of activity to bacteria, fungi and American trypanosomes of 13 native plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 62, n. 3, p. 195-202, 1998.

COSTA, E. S. S. *et al.* Estudos farmacognósticos, fitoquímicos, atividade antiplasmódica e toxicidade em *Artemia salina* de extrato etanólico de folhas de *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott, Araceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 4, p. 834-838, 2009.

DENIZOT, F. & LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **Journal Immunological Methods**, v. 89, n. 2, p. 271-277, 1986.

DOLABELA, M. F. **Triagem *in vitro* para atividade antitumoral e anti-*Trypanosoma cruzi* de extratos vegetais, produtos naturais e substâncias sintéticas**. Belo Horizonte, 1997. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Farmacologia) – Universidade Federal de Minas Gerais.

ELLIS, M. D. & BAXENDALE, F. P. Toxicity of seven monoterpenoids to tracheal mites (*Acari*: Tarsonemidae) and their honey bee (*Hymenoptera*: Apidae) hosts when applied as fumigants. **Journal of Economic Entomology**, v. 90, p. 1087-1091, 1997.

FAHEINA-MARTINS, G. V. **Avaliação do potencial citotóxico das lectinas de *Canavalia ensiformes*, *Canavalia brasiliensis* e *Cratylia floribunda***. João Pessoa, 2009. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Universidade Federal da Paraíba.

FINNEY, D. J. **Probit Analyses**. Cambridge: Cambridge University Press, 1972.

GLEESON, B. *et al.* Novel organotin antibacterial and anticancer drugs. **Polyhedron**, v. 27, p. 3619-3624, 2008.

HOLETZ, F. B. *et al.* Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

KATSOULAKOU, E. *et al.* Diorganotin(IV) complexes of dipeptides containing the α -aminoisobutyryl residue (Aib): preparation, structural characterization, antibacterial and antiproliferative activities of [(n-Bu)₂Sn(H₂L)] (LH = H-Aib-L-Leu-OH, H-Aib-L-Ala-OH). **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 102, p. 1397-1405, 2008.

KUNGOLO, A. *et al.* Assessment of toxicity and bioaccumulation of organotin compounds. **Proceedings of the 7th International Conference on Environmental Science and Technology**, p. 499-505, 2001.

LEVINSON, W. & JAWETZ, E. Bastonetes Gram-negativos relacionados ao trato entérico. **Microbiologia médica e imunologia**. Trad. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. Parte II, cap. 18, p. 127-144.

MEYER, B. N. *et al.* Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 45, p. 31-34, 1982.

MUHAMMAD, N. *et al.* Organotin(IV) 4-nitrophenylethanoates: synthesis, structural characteristics and intercalative mode of interaction with DNA. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 694, p. 3431-3437, 2009.

NATH, M. Toxicity and the cardiovascular activity of organotin compounds: a review. **Applied Organometallic Chemistry**, v. 22, n. 10, p. 598-612, 2008.

NATH, M. *et al.* Organotin(IV) tryptophanylglycinates: potential non-steroidal antiinflammatory agents; crystal structure of dibutyltin(IV) tryptophanylglycinate. **Applied Organometallic Chemistry**, v. 23, n. 9, p. 347-358, 2009.

NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards. **Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico: Norma Aprovada**. Trad. ANVISA. 6 ed. M7-A6, v. 23, n. 2, 2003.

NGUYEN, H. *et al.* Toxicity of triorganotin compounds to the brine shrimp, *Artemia salina*. **Applied Organometallic Chemistry**, v. 14, p. 349-354, 2000.

OSTROSKY, E. A. *et al.* Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

PEREIRA, A. C. & CASTRO, D. L. Prospecção Fitoquímica e Potencial Citotóxico de *Unxia kubitzkii* H. Rob. (Asteraceae-Heliantheae). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 2, p. 231-233, 2007.

RAMOS, S. C. S. *et al.* Antibacterial and cytotoxic properties of some plant crude extracts used in Northeastern folk medicine. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2A, p. 376-381, 2009.

SOUZA, A. T. **Síntese e caracterização de complexos organoestânicos com hidroxiantraquinonas**. Brasília, 2007. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade de Brasília.

UEHARA, S. *et al.* Activity of tri-n-butyl tin maleate in carpets against *Staphylococcus aureus* and *Aspergillus niger*, verified through two methodologies: inhibition halo (hz) and inhibition surface (print). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 50, n. 3, p. 191-194, 2008.

VIEIRA, F. T. **Compostos organoestânicos com ação farmacológica**. Belo Horizonte, 2008. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Minas Gerais.

WRACKMEYER, B. Fundamentals in tin chemistry: NMR spectroscopy of tin compounds. In: GIELEN, M. (edit). **Tin chemistry: fundamentals, frontiers and applications**. Chichester: Wiley, 2008. Cap. 2, p. 17-52.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Foram sintetizados e caracterizados três complexos de estanho(IV) derivados do ácido undecilênico: $n\text{-Bu}_2\text{Sn}(\text{Und})_2$, $n\text{-Bu}_3\text{SnUnd}$ e $\text{Me}_2\text{Sn}(\text{Und})_2$. Estes compostos mostraram-se ativos contra vários microrganismos e, a partir dos resultados obtidos podem-se considerar as seguintes conclusões:

- Os complexos foram obtidos através de rota sintética simples e eficaz, com rendimentos entre 60 e 70%, e tiveram sua formação comprovada pelo estudo comparativo com os dados espectroscópicos de RMN ^1H , RMN ^{13}C e IV do ácido graxo ligante, bem como pela análise dos espectros de RMN ^{119}Sn .

- Os resultados do RMN ^{119}Sn evidenciam a presença de uma espécie de estanho em solução e deslocamentos químicos típicos para estruturas do tipo $\text{R}_2\text{Sn}(\text{OOCR}')_2$ e $\text{R}_3\text{Sn}(\text{OOCR}')$.

- Os complexos mostraram-se tóxicos frente a larvas do microcrustáceo *Artemia salina*, com valores de CL_{50} de 45,02; 4,04; e menor que 1 $\mu\text{g/mL}$ para $\text{Me}_2\text{Sn}(\text{Und})_2$, $n\text{-Bu}_2\text{Sn}(\text{Und})_2$ e $n\text{-Bu}_3\text{SnUnd}$, respectivamente; indicando potencial atividade biológica.

- A bioatividade dos novos complexos foi confirmada através de testes antimicrobianos, obtendo-se como resultados: maior atividade contra bactérias Gram-positivas e, em especial, contra o fungo *Candida albicans*, mostrando-se bastante promissoras suas aplicações com esta finalidade.

- Os halos de inibição observados para os novos organoestânicos contra bactérias Gram-positivas variaram de 88 a 29% contra *Staphylococcus aureus*; de 73 a 36% contra *Staphylococcus epidermidis*; contra *Streptococcus pyogenes*, foram encontrados para $n\text{-Bu}_3\text{SnUnd}$ halos tão grandes que se sobrepunham, não sendo possível medi-los, e halos de 49 e 67% para $\text{Me}_2\text{Sn}(\text{Und})_2$ e $n\text{-Bu}_2\text{Sn}(\text{Und})_2$, respectivamente.

- Para organismos Gram-negativos, os complexos preparados foram pouco ativos, sendo o $\text{Me}_2\text{Sn}(\text{Und})_2$ o único com certa atividade frente a todas as bactérias Gram-negativas estudadas nesse trabalho. Os testes de difusão em ágar para este composto indicaram halos de inibição bacteriana de 25% contra *Escherichia coli*, 34% contra *Klebsiela pneumoniae*, 42% contra *Proteus mirabilis*, 39% contra *Salmonella typhimurium* e 47% contra *Pseudomonas aeruginosa*. Cabe ressaltar que o ácido undecilênico foi inativo frente a todas essas bactérias Gram-negativas. Os demais complexos sintetizados não mostraram atividade contra *E. coli*, *K.*

pneumoniae e *S. typhimurium*, e apenas frente a *P. mirabilis* e *P. aeruginosa* eles produziram halos de inibição entre 27 e 52%.

- As Concentrações Inibitórias Mínimas dos novos complexos variaram de 250 a 15,6 $\mu\text{g/mL}$ contra *S. aureus*; de 250 a 1,0 $\mu\text{g/mL}$ contra *S. epidermidis* e *Streptococcus pyogenes*; e de 31,2 a valores menores que 0,5 $\mu\text{g/mL}$ contra *C. albicans*. Frente a bactérias Gram-negativas estes compostos foram menos ativos, com Concentrações Inibitórias Mínimas variando entre valores acima de 1000 até 500 $\mu\text{g/mL}$.

- Como uma tendência, observa-se que os diorganoestânicos foram menos ativos que os triorganoestânicos como antifúngicos e contra bactérias Gram-positivas, sendo, contudo, mais ativos contra bactérias Gram-negativas; e que, entre os complexos testados, o aumento da cadeia carbônica do ligante resulta em diminuição da atividade antimicrobiana.

- Os resultados de toxicidade em macrófagos mostraram uma citotoxicidade estatisticamente significativa para todos os compostos organoestânicos na concentração de 100 μM , sendo os complexos com substituinte metila os menos tóxicos.

Como continuidade deste trabalho, pretende-se sintetizar outros complexos organoestânicos com ligantes bioativos, visto que foi observada, como esperado, uma melhora na atividade em relação ao ligante livre. Pretende-se ainda tentar diminuir a toxicidade desses complexos através da modificação de seus substituintes alquil, objetivando sempre manter a atividade antimicrobiana e minimizar os efeitos tóxicos.