

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

SISBI/UFU



1000218898

11011  
54  
L58211  
TES / M.E.M.

UTILIZAÇÃO DE COMPOSTOS DE  
COORDENAÇÃO DE RUTÊNIO(II/III) COMO  
BACTERICIDAS

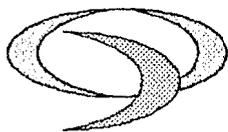
Gisele Del Fiume Lemes

Dissertação de Mestrado

Orientador: Prof. Dr. Luiz Alfredo Pavanin

JUNHO

2004



Programa de Pós Graduação em Química- MESTRADO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Química

e-mail: [cpqguimica@ufu.br](mailto:cpqguimica@ufu.br)

Fone/Fax: 3239-4385

---

**ALUNA: GISELE DEL FIUME LEMES**

**NÚMERO DE MATRÍCULA: 5001402-9**

**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: QUÍMICA INORGÂNICA**

**PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA: NÍVEL MESTRADO**

**TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:**

***“Utilização de Compostos de Coordenação  
de Rutênio (II/III) como Bactericidas”***

**ORIENTADOR: PROF. DR. LUIZ ALFREDO PAVANIN**

A Dissertação foi **APROVADA** em apresentação pública realizada no Anfiteatro do Bloco X do Campus Santa Mônica em 05 de julho de 2004 às 14:00 horas, tendo como Banca Examinadora:

**NOME:**

**ASSINATURA:**

Prof. Dr. Luiz Alfredo Pavanin (IQ/UFU)  
(Universidade Federal de Uberlândia)

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nívia Maria Melo Coelho (IQ/UFU)  
(Universidade Federal de Uberlândia)

Prof. Dr. Roberto Santana da Silva (USP/RP)  
(Fac. Ciências Farmacêuticas/USP/RP)

Uberlândia, 05 de julho de 2004.

# Mensagem

Vigie seus pensamentos, pois seus pensamentos se tornarão suas palavras

Vigie suas palavras, pois suas palavras se tornarão seus atos

Vigie seus atos, pois seus atos se tornarão a sua vida.

# À Deus

Agradeço à Deus e seus colaboradores por estarem comigo em todos os momentos, e pela oportunidade da vida e viver intensamente todos os momentos e aprender a aproveitar esses momentos com uma só certeza de aprender cada vez mais.

*Aos meus pais Jorge Luis e Teresinha Elisa, à minha irmã Helen, à minhas sobrinhas*

*Letícia, Lorena e Lavínia*

*Ao meu esposo Fábio , que sempre me incentivaram e souberam  
compreender minhas ausências, mesmo nas datas mais especiais.*

*À minha filha Thaís que me acompanhou em todas as etapas da conclusão deste  
trabalho.*

*À vocês dedico esta conquista.*

# Agradecimentos

A todos que de que algum modo, que incentivou e acompanhou a minha jornada, o meu agradecimento.

Frequentemente, o meu cansaço e preocupações foram sentidos e compartilhados por vocês.

Tantas foram as vezes, em que me distanciei de vocês e apeguei aos livros.

Hoje sou diferente. mudei, cresci e... cheguei lá.

E vocês estão junto a mim, como no começo de tudo.

A alegria desta conquista também é de todos vocês.

Afinal o amor, estímulo, carinho e compreensão são a alma desta vitória.

Muito Obrigado!

# Agradecimentos Especiais

Ao Prof. Luiz Alfredo Pavanin, orientador acadêmico, pelo apoio e confiança depositada.

Ao Prof. Paulo Gontijo e ao Laboratório de Microbiologia que muito contribuiu à realização deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório Filmes Poliméricos e Supramolecular André Luis Marquez, Daniel Tizo, Wagner Batista, Rose , Daniela, Iara e Alessandra pelo apoio e companheirismo de sempre.

Aos técnicos Claudete e Ricardo do Laboratório de Microbiologia que muito auxiliaram para a concretização desta dissertação.

Às colegas Renata, Kariciele e Gláucia pelo companheirismo no laboratório durante a realização dos experimentos.

À Isabel, secretária do curso de pós-graduação, pela atenção de sempre.

# Sumário

Sumário	ii
Lista de Figuras	iv
Lista de Tabelas	vi
Abreviaturas	vii
Resumo	xvi
Abstract	xvii
Estrutura	xviii
<b>1 Introdução</b>	<b>1</b>
1.1 Rutênio: Breve Histórico	1
1.1.1 Rutênio: Onde é encontrado na natureza	2
1.1.2 Rutênio: Extração e principais utilidades na indústria	2
1.2 Aspectos Gerais da Química do Rutênio	3
1.2.1 Considerações sobre Conceitos Ácido-Base	3
1.2.2 Considerações sobre Caráter <i>duro e mole</i>	3
1.3 Propriedades do Rutênio (II/III)	4
1.4 Compostos de Coordenação na Medicina	5
1.4.1 Aplicações Biológicas do Rutênio	7
1.5 Aspectos Gerais da Química de Ligantes do Rutênio	7
1.6 Bactérias Estudadas	8
1.6.1 Classificação de Gram	8
1.6.2 Diferença entre as bactérias Gram positivas e Gram Negativas	10
1.7 Resistência Bacteriana	11
1.7.1 Bactericidas	13
1.8 Bactérias: Onde são encontradas e o que causam	13
1.8.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	14
1.8.2 Importância Clínica	14
1.9 <i>Salmonella</i>	15

# Lista de Figuras

1.1	Bactéria Gram Positiva: Aparecem com cor arroxeada ao microscópio óptico quando tingidas por uma coloração por violeta genciana. . . . .	9
1.2	Bactéria Gram Negativa: Aparecem com cor avermelhada ao microscópio óptico quando tingidas por fucsina. . . . .	10
1.3	Ilustração do aspecto de células coradas de <i>Staphylococcus aureus</i> , vistas ao microscópio óptico (esquerda) e aspecto das células vistas ao microscópio eletrônico de transmissão (direita). . . . .	15
1.4	<i>Salmonella sp</i> : vista ao microscópio eletrônico de transmissão. . . . .	17
1.5	<i>Escherichia coli</i> : vista ao microscópio eletrônico de transmissão. . . . .	19
3.1	Rota Sintética dos compostos de coordenação de <i>Ru(III)</i> e <i>Ru(II)</i> . . . .	26
3.2	Diagrama do processo envolvido na inoculação de um composto em meio de cultura. . . . .	30
4.1	Espectro eletrônico quantitativo, na concentração $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.dm}^{-3}$ do composto $[\text{RuCl}(\text{NH}_3)_5]^{2+}$ , em água . . . . .	33
4.2	Espectro eletrônico quantitativo, na concentração $5,05 \cdot 10^{-5} \text{ mol.dm}^{-3}$ do composto $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5(4\text{-pic})](\text{BF}_4)_2$ , em água . . . . .	33
4.3	Espectro eletrônico quantitativo, na concentração $9,87 \cdot 10^{-5} \text{ mol.dm}^{-3}$ do composto $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5(4\text{-acpy})](\text{BF}_4)_2$ , em água . . . . .	34
4.4	Espectro eletrônico quantitativo, na concentração $1,02 \cdot 10^{-4} \text{ mol.dm}^{-3}$ do composto $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5(\text{py})](\text{BF}_4)_2$ , em água . . . . .	34
4.5	Espectro eletrônico quantitativo, na concentração $4,76 \cdot 10^{-5} \text{ mol.dm}^{-3}$ do composto $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5(\text{isn})](\text{BF}_4)_2$ , em água . . . . .	35
4.6	Voltamograma cíclico do eletrólito suporte $\text{KCl } 0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$ , com velocidade de varredura $100 \text{ mV.s}^{-1}$ . . . . .	37
4.7	Voltamograma cíclico do composto $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5(\text{py})](\text{BF}_4)_2$ , com concentração igual a $1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol.dm}^{-3}$ e $\text{KCl}$ a $0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$ e velocidade de $100 \text{ mV.s}^{-1}$ . . . . .	38
4.8	Voltamograma cíclico do composto $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5(4\text{-pic})](\text{BF}_4)_2$ , com concentração igual a $1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol.dm}^{-3}$ e $\text{KCl}$ a $0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$ e velocidade de $100 \text{ mV.s}^{-1}$ . . . . .	39

- 
- 4.9 Foto de uma placa de petri, utilizando o método de difusão com *Staphylococcus aureus*, com disco contendo  $[RuCl(NH_3)_5]Cl_2$ , nas concentrações de  $10\mu g$  à  $40\mu g$ , por disco. . . . . 41

# Lista de Tabelas

1.1	Características estruturais das bactérias gram positivas e gram negativas . . . . .	11
4.1	Bandas de absorção e coeficiente de absortividade molar ( $\xi$ ), em solução aquosa dos compostos de coordenação do tipo $[Ru(NH_3)_5(L)]^{2+/3+}$ . . . . .	36
4.2	Os potenciais formal de redução do par Ru(II)/Ru(III) . . . . .	39
4.3	Concentrações dos discos do composto de coordenação $[RuCl(NH_3)_5]^{2+}$ . . . . .	40
4.4	Atividade inibitória dos compostos de coordenação de Rutênio(II/III), sobre as bactérias Gram positivas, em função da concentração em disco . . . . .	42
4.5	Atividade inibitória dos compostos de coordenação de Rutênio(II/III), sobre as bactérias Gram positivas, em halo de inibição (mm) . . . . .	43
4.6	Atividade inibitória dos compostos de coordenação de Rutênio(II/III), sobre as bactérias Gram negativas . . . . .	44
4.7	Atividade inibitória dos compostos de coordenação de Rutênio(II/III), sobre as bactérias Gram negativas, em halo de inibição (mm) . . . . .	45
4.8	Padrão para testes de disco de susceptibilidade antimicrobiana, aprovado pela ASM-2, Villanova, Pa., 1976, The National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reprinted with permission. . . . .	48

# Abreviaturas

- *4-acpy* – Acetilpiridina ;
- *ATCC* – American Type Culture Collection ;
- *DMSO* – dimetilsulfóxido;
- ( $\xi$ ) – Coeficiente de absorvidade molar;
- *HTFA* – Ácido trifluoracético;
- *isn* – isonicotinamida;
- *Im* – imidazol;
- *IL* – Absorção interna do ligante ;
- *MLCT* – Transferência de carga do metal ligante;
- *EPH* – Eletrodo Normal de Hidrogênio;
- *4-pic* – 4-Picolina;
- *py* – Piridina;
- *UV* – Ultravioleta;
- *Vis* – Visível.

## Resumo

A aplicação de compostos inorgânicos em medicina é uma área que tem experimentado um rápido crescimento em relação a aplicação em terapia clínica e diagnóstico médico.

Isto tem chamado a atenção de cientistas no que tange ao estudo e desenvolvimento de novas drogas baseado no uso de compostos de coordenação. Uma das possibilidades de desenvolvimento destes novos compostos está relacionado a coordenação de moléculas de natureza biológica à íons metálicos de transição, na formação de compostos de coordenação.

Neste trabalho, é apresentado a síntese e a caracterização de compostos de coordenação, com aminas coordenados aos íons de Rutênio (II) e (III).

O enfoque principal é a ação destes compostos na atividade inibitória de crescimento de algumas bactérias *Gram positivas* (*Enterococcus faecalis*, *Enterobacter faecium*, *Staphylococcus aureus*) e *Gram negativas* (*Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Salmonella sp*).

Os resultados experimentais mostram que a atividade inibitória foi mais acentuada no composto de coordenação de Rutênio (III) e para as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

Aparentemente o íon metálico e o estado de oxidação devem ser fatores considerados para a atividade inibitória, juntamente com o envolvimento em algum processo biológico das bactérias.

# Abstract

The application in medicine of inorganic compounds is a growth field especially in the areas of novel therapeutic approaches and diagnostics.

As consequence of the renewed interest, the development of novel drugs based on coordination compounds is actually a very active area of research. Within this frame, special attention is dedicated to the development of novel compounds coordinating of biological interest with transition metals.

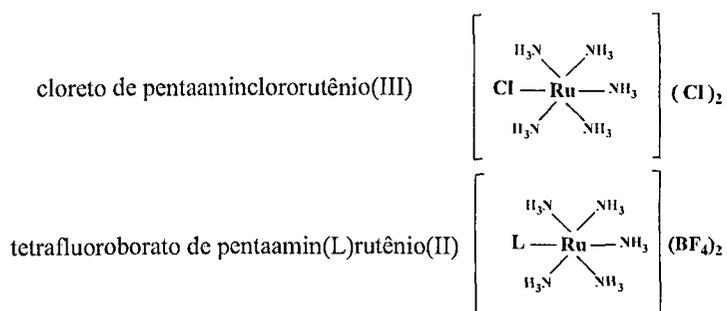
This work presents the results of our investigation of the syntheses and characterization of the coordination compounds between amines ligands and ruthenium(II) and (III).

The focus is on grow inhibition activity of some Gram-positive bacterias ( *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter faecium*, *Staphylococcus aureus* ) and Gram-negativa bacterias ( *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Salmonella sp.* ).

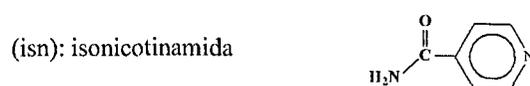
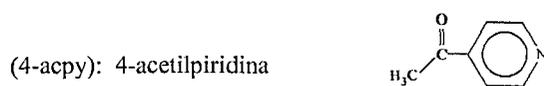
The best inhibition effect was observed with ruthenium(III) based coordination compounds for bacterias *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* .

The results support the metal oxidation state and the interaction with bacterias are the main factors controlling the grown inhibition.

## Estrutura dos Compostos



Onde L =



# Capítulo 1

## Introdução

### 1.1 Rutênio: Breve Histórico

O rutênio foi o último metal da família da platina a ser descoberto. Em 1824, foram descobertos extensos depósitos aluviais de platina nativa na região dos Urais, na Rússia, do qual o rutênio surge sempre associado a outros metais da família da platina.

Muito rapidamente a Rússia tornou-se o principal produtor de rutênio, desenvolvendo e aperfeiçoando a sua indústria metalúrgica. Vários cientistas, de onde se destaca G. W. Osann, da Universidade de Dopart, ocuparam-se do estudo dos resíduos insolúveis da platina.

Em 1828, Osann anuncia a descoberta de novos constituintes desses resíduos, a que chamou plurano e rúten.

Apesar destes trabalhos não serem considerados por químicos de renome da época, como Berzelius, serviu de estímulo a outros como K. K. Klaus, da Universidade de Kazan que, em 1844, descobriu o rutênio.

O nome do elemento foi proposto por Klaus e deriva de uma designação latinizada de "Rússia", grande produtor destes metais e como reconhecimento do trabalho de Osann [65].

### 1.1.1 Rutênio: Onde é encontrado na natureza

O rutênio surge sempre associado a outros metais principalmente da família da platina, formando ligas indefinidas em depósitos de minérios de níquel, minérios de cobre e na platina livre nos depósitos de pláceres, sendo a sua abundância comparável à do ródio e do irídio.

Os principais produtores mundiais dos metais desta família são o Canadá, a África do Sul e a Rússia.

A abundância do rutênio na crosta terrestre é estimada em  $10^{-4}$  ppm (partes por milhão), ou seja de 0,001 gramas por tonelada [66].

### 1.1.2 Rutênio: Extração e principais utilidades na indústria

A extração do rutênio é um processo químico complexo em que se forma cloreto amoniacal de rutênio. Reduzido a pó pelo hidrogênio, é tratado pela técnica de solda arco-argônio.

Metal de elevado ponto de fusão, o rutênio não é facilmente trabalhável, com o que sua aplicação industrial se restringe à formação de ligas duras com a platina e outros metais do mesmo grupo, usadas na fabricação de jóias e de contatos elétricos resistentes ao desgaste.

A adição de 0,1% de rutênio aumenta a resistência das ligas em centenas de vezes. O rutênio também é utilizado em:

- Filamentos elétricos;
- Material resistente à corrosão ( Ligas metálicas com 30 à 70% de rutênio)
- Catalisador em reações específicas
- Substituto da platina em joalheria
- Ponta de caneta tinteiro.

Merece especial referência a sua utilização como catalisador específico na hidrogenação dos grupos carbonila [67].

## 1.2 Aspectos Gerais da Química do Rutênio

A diferença de estado de oxidação, configuração eletrônica e número de coordenação, estão intimamente relacionadas com a diversidade de comportamento apresentada aos compostos de rutênio pelos elementos de transição.

### 1.2.1 Considerações sobre Conceitos Ácido-Base

Os compostos de coordenação foram inicialmente classificados em ácidos e bases por Lewis [36], como espécies que atuam respectivamente como receptores (íons metálicos centrais) e doadores (ligantes) de pares eletrônicos.

Contudo vários sistemas não se enquadravam dentro deste conceito. Atualmente consideramos ácido e base simplesmente receptores e doadores de elétron [52], o que permite incluir dentro da classificação ácido-base uma variedade muito maior de sistemas [40].

De acordo com o comportamento apresentado pelo sistema este conceito se torna mais flexível, ao ponto de alguns íons metálicos, originalmente considerados ácidos, atuarem como bases, e, em alguns casos, simultaneamente como ácidos e bases, utilizando para isto um conjunto de orbitais de simetria apropriada [42].

### 1.2.2 Considerações sobre Caráter *duro e mole*

Inicialmente os compostos de coordenação foram classificados em ácidos ou bases, conforme a sua atuação como receptores (íons metálicos centrais), ou doadores de pares eletrônicos (ligantes) [36]. Nem sempre, podemos classificar um íon metálico no esquema ácido-base [15], [40], devido a complexidade existente entre as interações eletrônicas nos compostos de coordenação.

Pearson [44], propôs um critério baseado na natureza da ligação entre as espécies que formam o par ácido base:

- (a) Aquelas que apresentam uma grande afinidade pelo próton e tem normalmente pequena polarizabilidade (bases duras);
- (b) Aquelas que apresentam comportamento opostos (bases moles).

Seguindo esta classificação, os ácidos (íons metálicos) são classificados como "duros" ou "moles" dependendo do fato deles formarem complexos mais estáveis com o tipo (a) ou (b). Conforme o comportamento apresentado pelo sistema formado, esta conceituação se torna mais flexível, a ponto de alguns íons metálicos, originalmente considerados ácidos, atuarem como bases, e em alguns casos, simultaneamente como ácidos e bases [19].

### 1.3 Propriedades do Rutênio (II/III)

A química do rutênio é investigada desde a sua descoberta em 1844. Embora raro é um dos metais de menor custo do grupo da platina, estando disponível comercialmente em várias formas, sendo o  $RuCl_3 \cdot nH_2O$  o mais utilizado em síntese.

O rutênio aparece entre os metais de transição como um elemento de características particulares, especialmente em estados de oxidação baixos, sendo que os complexos de  $Ru(II)$  e  $Ru(III)$ , quase invariavelmente possuem número de coordenação seis, baixo spin e geometria octaédrica.

Como tais, os três orbitais  $d(t_{2g})$  orientados para as faces do octaedro estão completamente preenchidos em complexos de rutênio (II) e possuem uma vaga eletrônica em complexos de rutênio (III) [57].

O  $Ru(II)$ , isoeletrônico com o ródio(III) e irídio(III), é um sistema  $d^6$  de configuração  $(t_{2g})^6$ , comporta-se normalmente como íon metálico  $\pi$ -doador, relativamente "mole", sendo portanto, encontrado com ligantes tipo bases "moles", insaturados que apresentam orbitais vazios, tais como:  $N_2$ ,  $NO$ ,  $CO$ , organonitrilas, piridinas, fosfitos, arsinas e outros.

O  $Ru(III)$  é um sistema  $d^5$  de configuração  $(t_{2g})^5$ , comporta-se normalmente como íon metálico  $\pi$ -receptor, relativamente "duro", tem preferência por ligantes saturados tais

como:  $H_2O$ ,  $NH_3$ ,  $OH^-$ ,  $Cl^-$ , sendo bastante inerte à troca de ligantes.

As propriedades citadas para os complexos de rutênio são de particular interesse clínico, pois além da labilidade por diferentes ligantes há ainda a possibilidade em alcançar diferentes estados de oxidação, influenciando na reatividade química e conseqüentemente na ação farmacológica dos complexos de rutênio.

## 1.4 Compostos de Coordenação na Medicina

Avanços recentes como a compreensão do funcionamento das funções como metaloproteínas e alguns modelos de íons metálicos nos sítios ativos das enzimas, contribuíram para se entender como os íons metálicos agem naturalmente nestes sítios ativos dos organismos vivos e como esses mesmos íons são envolvidos em algumas doenças, fornecendo assim dados para o desenvolvimento de novas estratégias clínicas, usando os complexos metálicos como agentes terapêuticos.

Os metalofármacos vêm sendo desenvolvidos em laboratórios acadêmicos ainda em pequena escala.

O sucesso dos fármacos sintéticos aplicação e/ou produção são compostos orgânicos, do qual fazem parte da maioria das pesquisas por produtos sintéticos.

A pouca demanda dos químicos e farmacologistas, que trabalham na área medicinal, em lidar com os complexos metálicos biologicamente ativos, constituem uma barreira na identificação dos complexos e a ação possível dentro de um ser vivo.

Esses fatores levam as indústrias farmacêuticas e o governo a não investirem nos programas de pesquisas com íons metálicos de transição, porque são metais pesados e tóxicos, acumulam no organismo, (principalmente Fe, Cu e Zn), retardam assim, o desenvolvimento da utilização dos metalofármacos, além dos estudos preliminares serem demasiadamente longo, antes de serem aplicados.

Por outro lado, há muita iniciativa por parte dos químicos para serem os pioneiros no desenvolvimento dessas novas drogas e revolucionar os tratamentos clínicos [14].

Atualmente, busca-se no mundo inteiro, novas drogas para o combate de inúmeras

doenças, que ainda não têm tratamento pela medicina.

O uso de compostos inorgânicos em terapias clínicas ampliaram a possibilidade de gerar uma nova classe de drogas de alta seletividade e eficiência.

Existe uma vasta quantidade de material e completa descrição físico-química que fazem dos compostos inorgânicos um amplo caminho para novas pesquisas e alternativas para novos tratamentos.

Dentre eles, os complexos metálicos, merecem atenção especial, devido ao caráter particular de suas ligações com biomoléculas [16].

Com a descoberta de drogas anticancerígenas, como a cisplatina por Rosenberg em 1965 [49], cerca de 70% de todos os pacientes com câncer utilizam este tratamento. Assim nos dias atuais há um grande interesse no desenvolvimento dos metalofármacos.

Devido a possibilidade de se utilizar compostos do grupo da platina em terapia clínica e atividade antineoplásica observada em alguns derivados da platina, a semelhança química entre os elementos do grupo, a vasta literatura relacionada à química destas substâncias e a baixa toxicidade observada em alguns compostos [1], os compostos do grupo da platina despertam o interesse no desenvolvimento de metalodrogas.

Um grande número de compostos de coordenação têm sido testados para analisar suas propriedades anticancerígenas e antimicrobianas, já sendo muitos deles usados em terapia clínica.

Fracassos dos testes clínicos tem acontecido e uma razão para isto pode ser a cinética dos compostos de coordenação por formarem diferentes espécies em solução através de reação ou interação com o solvente utilizado [2].

Para serem testados clinicamente, cada composto tem que ser isolado e caracterizado, e testado quanto a sua atividade.

Muitos compostos de coordenação de  $Ru(III)$  e  $Ru(II)$  tem mostrado essa eficiência e uma certa estabilidade quando dissolvidos em água, condição elementar para que seja bem sucedido em terapias clínicas, uma vez que o corpo humano em cerca de 80% é composto por água, portanto, as suas propriedades vêm sendo exploradas para este fim.

### 1.4.1 Aplicações Biológicas do Rutênio

Em terapia clínica, esses compostos possuem vasta aplicação como imunossupressores [18], antibióticos [2], [11], anticancerígenos [50], terapia fotodinâmica [62], intercalador de DNA [55], agente anti HIV [39], no tratamento de Doença de Chagas [41] e desenvolvimento de sensores para monitoramento da variação de insulina no sangue de um paciente diabético [10].

Os compostos octaédricos de  $Ru(II)$  e  $Ru(III)$ , mostram vantagens em relação a sua atividade biológica, principalmente por suas propriedades antineoplásica.

Compostos de coordenação de rutênio tetramina-, pentamina-, heterocíclico- e dimetil-sulfóxido possuem alta afinidade por ligantes doadores (ex: nitrogênio) "in vivo" e como resultado exibem vários níveis de atividade biológica incluindo ação antitumoral "in vivo" [25].

## 1.5 Aspectos Gerais da Química de Ligantes do Rutênio

Desde 1960 a química das aminas de rutênio(II) e rutênio (III) recebem muita atenção e mostra ser uma área bastante promissora [56] [21] [59].

Na química sintética dos metais de transição, particularmente com ligantes de aminas orgânicas e inorgânicas e iminas, o rutênio vem sendo utilizado, proporcionando muitas inovações para novos metalofármacos.

Devido ao campo forte de ligação e tendo os estados de oxidação mais comuns de  $Ru(II)$ ,  $Ru(III)$  e  $Ru(IV)$ , em solução aquosa, e sendo usualmente octaédricos, frequentemente são inertes à substituição dos ligantes.

As vantagens de utilizar complexos de aminas de rutênio, em desenvolvimento de metalofármacos incluem:

1. Rotas sintéticas bem elaboradas, originando complexos com estados de oxidação estáveis e estruturas bem definidas;

2. Labilidade para trocar ligantes, com capacidade de transferência de carga e velocidade considerável de substituição destes ligantes e potenciais de redução;

Estas duas vantagens possibilitam o aumento do conhecimento dos efeitos biológicos dos compostos de coordenação de rutênio.

Outra possibilidade é a formação de complexos metálicos envolvidos na transferência de elétrons em sistemas biológicos.

Muitas aminas orgânicas e inorgânicas de  $Ru^{3+}$  e  $Ru^{2+}$  tendem a se ligar seletivamente nos sítios de iminas nas biomoléculas. Ao contrário dos sítios de amina, não protonam em pH neutro, deixando o par de elétrons do nitrogênio disponível para se ligar com o íon metálico coordenado [14].

Conseqüentemente, os complexos de rutênio são freqüentemente seletivos, quando coordenados com o nitrogênio das histidil imidazol nas proteínas [27] [37] e o N7 do sítio do anel imidazol e das purinas de nucleotídeos, tendo como vantagem, atacar certos tecidos devido à seletividade com os ácidos nucléicos, oligonucleotídeos e algumas das propriedades das proteínas [3].

## 1.6 Bactérias Estudadas

As bactérias podem ser classificadas em Gram positivas e Gram negativas.

### 1.6.1 Classificação de Gram

Um dos principais métodos de identificação de bactérias é a coloração que foi desenvolvida pelo médico dinamarquês Hans Christian Gram (1853-1938).

A técnica de Gram consiste em espalhar e secar as bactérias em uma lâmina de microscopia e corá-las com violeta genciana e iodo. Após, lava-se a lâmina com álcool e cora-se com fucsina, que possui cor rosada.

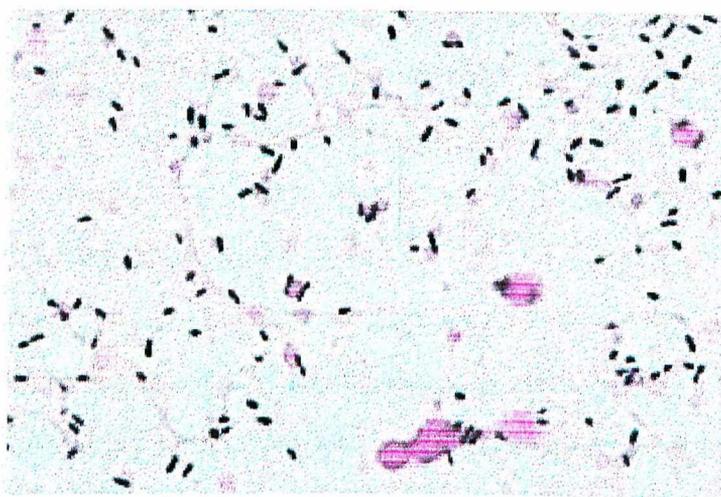
Vistas ao microscópio, certas bactérias coram-se de violeta, enquanto outras ficam coradas de rosa. As que ficam de cor violeta são denominadas Gram(+) (Gram positivas),

como mostrado na figura 1.1 e as que têm coloração rosa são as Gram(-) (Gram negativas), conforme com a figura 1.2.

Os alternativos resultados de coloração se devem às diferenças de composição química das paredes bacterianas.

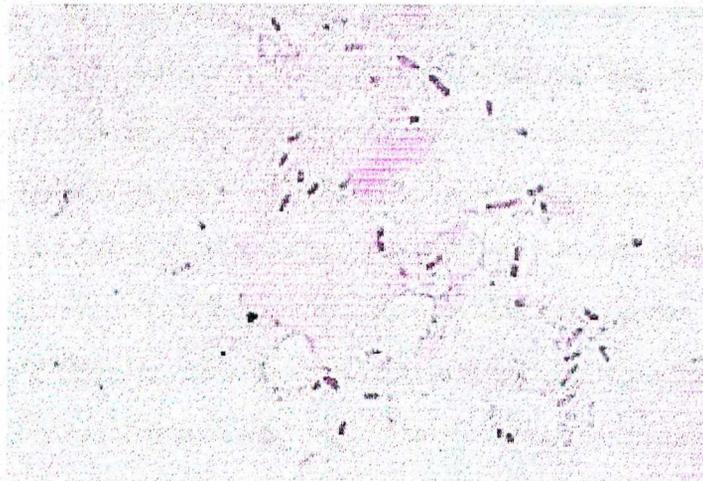
As Gram negativas não retêm o corante violeta, corando-se só de rosa. Já as Gram positivas fixam a violeta de genciana, tornando dessa cor.

O método de identificação microscópico de Gram é valioso, pois as bactérias Gram negativas são mais perigosas tendo paredes menos permeáveis aos antibióticos, o que dificulta a ação farmacológica destas substâncias [46].



Fonte <http://www.iesambi.org.br> acesso em 10/11/2003

Figura 1.1: Bactéria Gram Positiva: Aparecem com cor arroxeada ao microscópio óptico quando tingidas por uma coloração por violeta genciana.



Fonte: Fonte <http://www.iesambi.org.br> acesso em 10/11/2003.

Figura 1.2: Bactéria Gram Negativa: Aparecem com cor avermelhada ao microscópio óptico quando tingidas por fucsina.

### 1.6.2 Diferença entre as bactérias Gram positivas e Gram Negativas

A coloração de Gram, como anteriormente foi visto, é uma técnica que divide as bactérias em positivas e negativas, expressando diferentes características da bactéria, quanto à composição química, estrutura, permeabilidade da parede celular, fisiologia e metabolismo, como mostrado na tabela 1.1.

Tabela 1.1: Características estruturais das bactérias gram positivas e gram negativas

Característica	Gram Positiva	Gram Negativa
Composição	ácido teicóico + ribonucleato de Mg mucopolissacarídeos (> de 60%) (peptidoglicano) Pressão osmótica 25 atm	lipopolissacarídeos mucopolissacarídeos (< de 10%) (peptidoglicano) Pressão osmótica 8 atm
Espessura	$\pm 20nm$	$\pm 10nm$
Aminoácidos	pouco	muito
Lipídios	$\pm 2\%$	$\pm 20\%$
Peptogliciano	$\pm 90\%$ ( muitas camadas)	$\pm 5 - 10\%$ (1 - 2camadas)
Polissacarídeo	Pouco	Muito
Formam	Protoplastos*	Esferoplastos**

\* Protoplastos: bactérias que, mesmo perdendo a parede celular mantém as suas funções.

\*\* Esferoplastos: bactérias que, na perda, mantém um pouco da parede celular e, em momento oportuno, reconstitui.

Nota - ácido teicóico: é uma estrutura anti-gênica importante, reconhecida pelo sistema imune (induz formação de anticorpos espécie - específicos). São encontrados na camada externa da parede celular bactérias Gram positivas).

A parede celular dá forma à célula, promove resistência a choques mecânicos e osmóticos, serve de sítio de absorção de vírus e é responsável pela divisão das bactérias em Gram positivas e Gram negativas [46].

## 1.7 Resistência Bacteriana

As bactérias surgiram na terra há cerca de 3,5 bilhões de anos, em ambiente hostil: temperaturas altíssimas, radiações ultravioleta e cósmicas, tempestades e falta de nutrientes.

Elas superaram todas as condições adversas e evoluíram para ocupar hoje todos os

hábitats, até aqueles de condições mais extremas. Sua grande capacidade de adaptação está associada à estrutura genômica, que garante a troca de genes entre as bactérias, usando para isso elementos não cromossômicos: plasmídios, transposons e até bacteriófagos.

Estes últimos destroem as bactérias hospedeiras, mas podem carregar e espalhar genes bacterianos.

A causa primária da resistência da ação dos antibióticos é a mutação espontânea e a recombinação dos genes (reprodução), que criam variabilidade genética sobre a qual atua a seleção natural, dando vantagens aos mais aptos. As drogas atuam como agentes seletivos, favorecendo as raras bactérias resistentes presentes na população.

A resistência a antimicrobianos tem aumentado drasticamente nos últimos anos [31] [32].

O uso abusivo dos antimicrobianos contribui para aumentar a pressão seletiva dessas drogas, criando ambiente muito favorável às bactérias resistentes.

Entre os usos abusivos temos:

- A indicação indiscriminada de drogas por médicos,
- A auto medicação de pacientes (toma-se na dose errada e em situações erradas como gripe, por exemplo, sendo que os antibióticos só atacam células e os vírus são acelulares),
- O uso como aditivo em rações animais, principalmente para aumentar o peso,
- A tecnologia do DNA recombinante, que permite criar organismos transgênicos, quase sempre usa como vetores pequenos plasmídios. Como em geral estes contêm genes de resistência a drogas, o produto final pode ser contaminado.

Um só gênero de bactérias do solo, o *Streptomyces*, produz mais de 50% dos antibióticos disponíveis no mercado [64].

Por isso há uma necessidade constante de desenvolvimento e descoberta de novas drogas que combatam esses agentes.

Existe o "SENTRY Antimicrobial Surveillance Program" que é um programa mundial de vigilância de resistência a antimicrobianos. Esse programa apresenta as seguintes características principais:

- Avalia um grande número de antibacterianos
- Avalia mecanismos de resistência em nível molecular
- Divulga os resultados para todas áreas médicas em congressos e revistas
- Incentiva a descoberta de novos antimicrobianos, que sejam sensíveis às bactérias.

É muito importante o desenvolvimento de novas drogas, pois com a resistência das bactérias aos antibióticos aumentaria ainda mais a infecção hospitalar, fazendo um número cada vez maior de vítimas [45].

### 1.7.1 Bactericidas

Atuam na membrana plasmática ou parede celular bacteriana, inibindo sua síntese e provocando sua destruição. Como exemplo temos os antibióticos penicilina, cefalosporina e vancomicina que atuam sobre as enzimas responsáveis pela síntese da parede.

A bactéria pode adquirir resistência produzindo enzimas (transferases e betalactamases), que alteram ou degradam drogas, por inibição da permeabilidade da membrana plasmática e pelo efluxo de drogas - bombeamento de drogas para fora da célula [60].

## 1.8 Bactérias: Onde são encontradas e o que causam

Existe uma grande quantidade de bactérias Gram negativas e Gram positivas, entre elas:

### 1.8.1 *Staphylococcus aureus*

Apesar de estarem associados a variados tipos de infecções, os *Staphylococcus sp.*, usualmente colonizam a pele e as mucosas do corpo. Por isso, as infecções freqüentemente resultam da introdução dessas cepas em locais previamente estéreis, após um trauma ou abrasão da pele ou mucosas. Entretanto, muitas vezes este trauma é mínimo e passa despercebido.

Os *Staphylococcus* também podem ser transferidos de pessoa a pessoa. Uma vez transmitidos, estes microorganismos podem se estabelecer como microbiota do organismo colonizado e, posteriormente, provocar infecções. Por outro lado, eles também podem ser diretamente introduzidos em locais estéreis pelos profissionais de saúde, durante um procedimento cirúrgico.

Esta transmissão interpessoal é muito importante no ambiente hospitalar, particularmente quando as cepas envolvidas forem multi-resistentes aos antibióticos.

### 1.8.2 Importância Clínica

Sem sombra de dúvidas o *Staphylococcus aureus*, figura 1.3 é a espécie mais virulenta dos *Staphylococcus sp.*

Uma ampla gama de fatores contribui para essa virulência. Várias toxinas e enzimas mediam a invasão tecidual e a sobrevida no sítio da infecção.

Muitas das infecções, mesmo as superficiais, podem se tornar potencialmente fatais se não tratadas prontamente.

Infecções superficiais localizadas como as foliculites (infecções do folículo piloso) podem se aprofundar e se tornarem furúnculos. Os carbúnculos, infecções mais graves e profundas, podem se originar da confluência dos furúnculos.

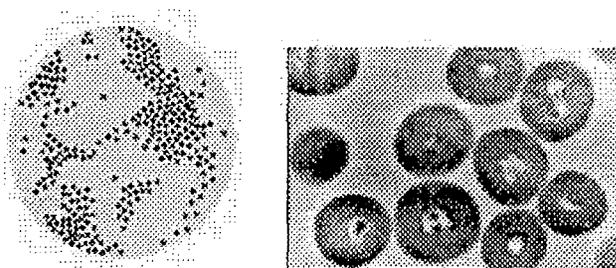
No impetigo, infecção da camada epidérmica da pele, ocorre a produção de vesículas que, após se romperem, se tornam lesões cobertas por crostas de pús. Independente do local inicial da infecção, a natureza invasiva deste microorganismo colabora para o aprofundamento da infecção, bacteremia e distribuição para um ou mais órgãos.

O *Staphylococcus aureus* também produz toxinas que estão relacionadas com doenças como a síndrome da pele escaldada e a síndrome do choque tóxico.

Nestes casos, apesar de o microorganismo poder estar relativamente localizado, a produção de toxinas potentes pode causar efeitos sistêmicos e devastadores. Também produz toxinas relacionadas à intoxicação alimentar.

O uso abusivo e indiscriminado de agentes antimicrobianos na prática clínica humana e veterinária, tem um efeito seletivo no surgimento e manutenção de resistência a drogas.

Particularmente entre *Staphylococcus aureus*(figura 1.3), sua versatilidade no desenvolvimento de resistência a vários agentes antimicrobianos contribui para a sua sobrevivência em ambientes hospitalares e difusão entre os pacientes [35].



Fonte: <http://www.biologianaweb.com> acesso em 15/12/2003.

Figura 1.3: Ilustração do aspecto de células coradas de *Staphylococcus aureus*, vistas ao microscópio óptico (esquerda) e aspecto das células vistas ao microscópio eletrônico de transmissão(direita).

## 1.9 *Salmonella*

As bactérias do gênero *Salmonella* (figura 1.4), pertencem à família *Enterobacteriaceae*.

A *Salmonella* é conhecida há mais de 100 anos e o termo é uma referência ao cientista americano chamado Salmon, que descreveu a doença associada à bactéria pela primeira vez.

A *Salmonella*(figura 1.4) é transmitida ao homem através da ingestão de alimentos

contaminados com fezes animais. Os alimentos contaminados apresentam aparência e cheiro normais e a maioria deles é de origem animal, como carne de gado, galinha, ovos e leite. Entretanto, todos os alimentos, inclusive vegetais, podem tornar-se contaminados.

É muito freqüente a contaminação de alimentos crus de origem animal.

O cozimento de qualquer destes alimentos contaminados mata a *Salmonella*.

A manipulação de alimentos por pessoas contaminadas que não lavam as mãos com sabonete, pode causar sua contaminação.

Fezes de animais de estimação, especialmente os que apresentam diarreia, podem conter *Salmonella*, e as pessoas em contato com estes animais podem ser contaminadas e contaminar a outras se não adotarem medidas rígidas de higiene (lavar as mãos com sabonete).

Répteis são hospedeiros em potencial para a *Salmonella* e as pessoas devem lavar as suas mãos imediatamente após manusear estes animais, mesmo que o réptil seja saudável.

A maior parte das pessoas infectadas com *Salmonella* apresenta diarreia, dor abdominal (dor de barriga) e febre. Estas manifestações iniciam de 12 a 72 horas após a infecção.

A doença dura de 4 a 7 dias e a maioria das pessoas se recupera sem tratamento. Em algumas pessoas infectadas, a diarreia pode ser severa a ponto de ser necessária a hospitalização devido à desidratação [28].

Os idosos, crianças e aqueles com as defesas diminuídas (diminuição da resposta imune) são os grupos mais prováveis de ter a forma mais severa da doença. Uma das complicações mais graves é a difusão da infecção para o sangue e daí para outros tecidos, o que pode causar a morte caso a pessoa não seja rapidamente tratada.

Após este período, a pessoa fica recuperada, podendo permanecer ainda por algum tempo um hábito intestinal irregular.

Caso o paciente se torne severamente desidratado ou a infecção se difunda do intestino para outras regiões do organismo, medidas terapêuticas devem ser tomadas, incluindo a hospitalização.

Pessoas com diarreia severa devem ser reidratadas através da administração endovenosa de soro. Os casos graves, em que a infecção se difunde, devem ser tratados com antibióti-

---

*Utilização de Compostos de Coordenação de Rutênio (II/III) como Bactericidas*

cos [28].

Os casos de toxinfecções alimentares causados por *Salmonella* aumentaram a partir da década de 80 [48]. Foi atribuído esse aumento ao consumo de ovos e subprodutos contaminados por *Salmonella enteritidis*.

Na Inglaterra e País de Gales, a carne de frango foi responsável por surtos e casos esporádicos e por aproximadamente 30.000 casos/ano de toxinfecção alimentar em seres humanos [63].

No Brasil, [58] reportaram um aumento do isolamento de *Salmonella enteritidis* a partir de 1993. Na Itália, de 1991 a 1994, dos 1969 surtos de origem alimentar, *Salmonella* foi responsável por 81%, dos quais 34% foram *Salmonella enteritidis* [51].

Os produtos de origem animal, principalmente avícolas, são considerados uma importante fonte de proteína humana. No comércio brasileiro, as carcaças podem ser encontradas na forma resfriada e congelada. O resfriamento não inviabiliza a presença de bactérias como as do gênero *Salmonella* [22] [9] [63].



Fonte: <http://www.biologianaweb.com> acesso em 15/12/2003.

Figura 1.4: *Salmonella sp.*: vista ao microscópio eletrônico de transmissão.

## 1.10 *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* (figura 1.5) é um microorganismo responsável por um quadro clínico caracterizado por gastroenterite severa (cólicas e diarreia), e especialmente severa quando atinge indivíduos em idade jovem ou avançada, e aqueles já debilitados por outras doenças.

A *Escherichia coli* figura 1.5 faz parte da flora intestinal normal dos seres humanos e outros primatas, sendo que uma minoria das suas cepas causa doenças por vários mecanismos diferentes.

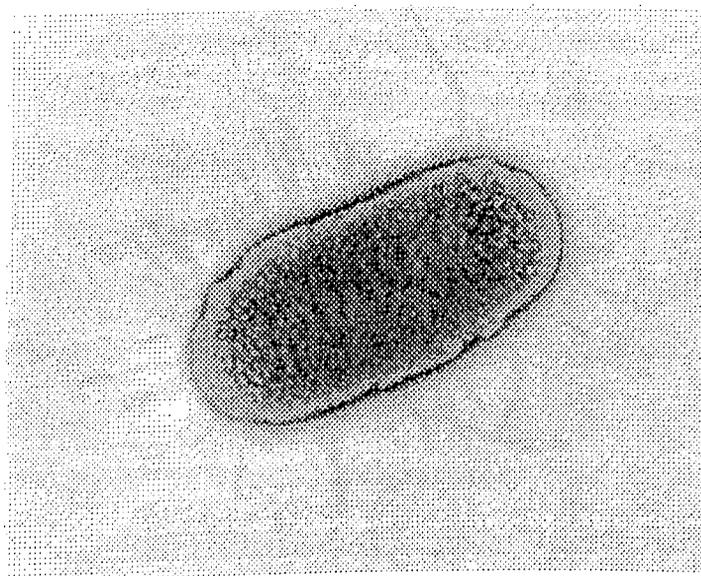
Entre essas, estão as cepas enteroinvasivas (EIEC), sendo os principais sorogrupos O28ac, O29, O112, O124, O136, O143, O144, O152, O164 e O167, que são anticorpos para diferenciá-las [4].

As infecções por EIEC são endêmicas nos países menos desenvolvidos e responsáveis por 1 a 5% dos episódios de diarreias dentre os que procuraram atendimento médico.

Um dos principais surtos, veiculados por alimentos, atribuído à *Escherichia coli* enteroinvasiva nos EUA ocorreu em 1973, e foi devido ao consumo de queijo importado da França. Nos países desenvolvidos há relatos de surtos e infecções ocasionais por EIEC.

A maioria dos casos de infecção relatados nos EUA ocorreram no período do verão onde a temperatura ambiente se eleva favorecendo o crescimento do microorganismo e ocorre grande consumo de carnes de hamburgers, muitas vezes mal passados. [4]

A principal forma de infecção é o consumo de produtos de origem bovina, que não sofreram tratamento térmico adequado para a eliminação da *Escherichia coli* (Carnes mal passadas) e leite cru [58].



Fonte:<http://www.wadsworth.org/databank/ecoli.htm> acesso em 15/12/2003

Figura 1.5: *Escherichia coli*: vista ao microscópio eletrônico de transmissão.

## Capítulo 2

### Objetivos

Os objetivos propostos neste trabalho são testar a atividade bactericida dos compostos de coordenação de rutênio(II/III)

#### 2.1 Objetivos Específicos

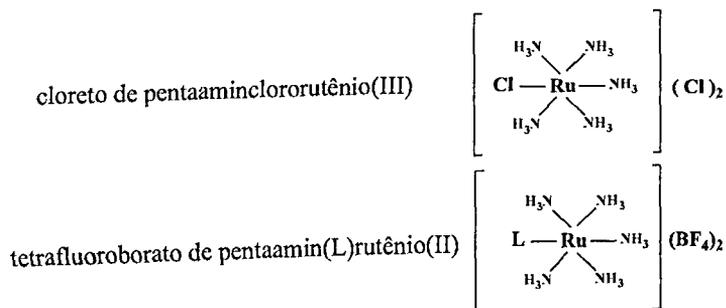
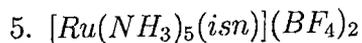
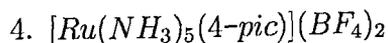
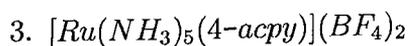
Testar a atividade dos compostos de coordenação de rutênio(II/III), em bactérias Gram positivas e Gram negativas, utilizando o método de difusão, conhecido também por teste Kerby-Bawer[47].

##### 2.1.1 Compostos Utilizados

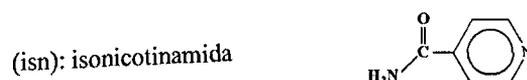
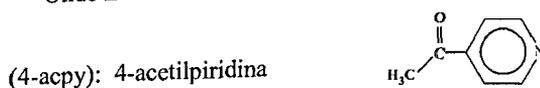
Os testes foram realizados, utilizando um composto de coordenação de *Ru*(III) e quatro tipos de compostos de coordenação de *Ru*(II):

1.  $[RuCl(NH_3)_5]Cl_2$
2.  $[Ru(NH_3)_5(py)](BF_4)_2$

2.1 Objetivos Específicos



Onde L =



Utilizaram-se várias espécies de bactérias gram positivas e gram negativas, responsáveis por inúmeras intoxicações e/ou infecções em seres humanos.

Gram negativas:

- *Escherichia coli* ATCC 25922

Utilização de Compostos de Coordenação de Rutênio (II/III) como Bactericidas

- *Serratia marcescens*

- *Salmonella sp*

Gram positivas:

- *Enterococcus faecalis*

- *Enterobacter faecium*

- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

A carga do rutênio nos complexos e os tipos de ligantes, será correlacionada com a atividade bactericida e discutida em função dos resultados biológicos.

# Capítulo 3

## Materiais e Métodos

### 3.1 Síntese dos Compostos de Coordenação de Rutênio

#### 3.1.1 Linha de Argônio

Todos os experimentos e manipulações envolvendo complexos de rutênio(II) foram efetuados sob atmosfera de argônio e protegidos da luz, segundo as técnicas descritas na literatura [17], [5], [6].

O argônio foi utilizado para que a execução das experiências com sais de rutênio(II) ocorresse na ausência de oxigênio. O argônio canalizado foi passado por um frasco lavador contendo solução de cromo(II) em  $HClO_4$  (solução de perclorato de crômio) aproximadamente  $1 \text{ mol.dm}^{-3}$ , para retenção de traços de oxigênio eventualmente presentes na linha.

As soluções de cromo(II) foram obtidas por redução do correspondente sal de cromo(III) por amálgama de zinco.

A troca de cor da solução de Cr(III), verde, para Cr(II), azul, indica a ausência de oxigênio. A solução redutora foi mantida em contato permanente com zinco amalgamado, para a sua constante regeneração.

Em seguida, o argônio foi borbulhado num frasco lavador contendo água destilada.

### 3.1.2 Amálgama de Zinco

10 gramas de zinco metálico granulado foi lavado com HCl  $1 \text{ mol.dm}^{-3}$ , em seguida lavou-se com água destilada em abundância.

Adicionou-se uma solução de cloreto de mercúrio(II)  $0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$ , e depois de alguns minutos, a solução foi separada do amálgama, que foi lavado diversas vezes com água destilada.

Ácido nítrico concentrado foi então adicionado, sendo lavado imediatamente com água em abundância, e posterior secagem com papel.

### 3.1.3 Preparação dos compostos de coordenação de rutênio

Os compostos foram sintetizados conforme descrito na literatura [17] [7] [8] [43], com algumas modificações.

### 3.1.4 Síntese do composto $[RuCl(NH_3)_5]Cl_2$

5 gramas de  $RuCl_3 \cdot 3H_2O$  foram dissolvidos em  $63 \text{ cm}^3$  de água destilada. A esta solução, foram adicionados lentamente  $43 \text{ cm}^3$  de hidrato de hidrazina  $0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$  sob agitação constante, havendo liberação de calor e vigorosa efervescência.

A mistura resultante foi mantida sob agitação constante por 4 horas. A solução avermelhada obtida, foi colocada em banho de gelo com posterior adição vigorosa de  $125 \text{ cm}^3$  de HCl concentrado, havendo aparecimento de uma cor marrom-amarelada.

O sistema foi colocado em refluxo por duas horas e resfriado em banho de gelo, originando um precipitado amarelo. O sólido foi separado por filtração à vácuo e o precipitado foi lavado com pequenas quantidades de HCl  $1,5 \text{ mol.dm}^{-3}$  para a remoção do cloreto de amônio formado.

**Purificação:** O sólido foi adicionado em HCl  $0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$  quente ( cada 1 grama de sólido usam-se  $100 \text{ cm}^3$  de HCl) e filtrado ainda quente.

---

*Utilização de Compostos de Coordenação de Rutênio (II/III) como Bactericidas*

Então, o produto foi reprecipitado por adição de excesso de ácido clorídrico concentrado. Após resfriamento, um sólido amarelo cristalino foi separado por filtração, lavado com etanol, éter e secado a vácuo.

Rendimento da ordem de 80%.

### 3.1.5 Síntese do Composto $[Ru(NH_3)_5L](BF_4)_2$

Foram adicionados 200 mg de  $[RuCl(NH_3)_5]Cl_2$  a 3  $cm^3$  de água desaerada, tendo sido nesta mistura adicionada uma gota de ácido trifluoracético (pH da solução entre 2 e 3).

Após cerca de 15 minutos, adicionou-se amálgama de zinco (0,5 g) com contínuo borbulhamento de argônio e protegendo a mistura da luz.

A suspensão, inicialmente amarelada, tornou-se alaranjada depois de 45 minutos. A seguir, adicionou-se o ligante (L), em solução, duas vezes em excesso previamente desaerada.

A cor alaranjada da solução ficou acentuada. Deixou-se o sistema reagir por uma hora, ao abrigo da luz, e então, filtrou-se a mistura sobre solução saturada, recém preparada, filtrada e desaerada de tetrafluoroborato de sódio (Partindo de 0,6 g de  $NaBF_4$  em 0,6  $cm^3$  de água).

A mistura foi deixada na geladeira para completar a precipitação (em torno de 1,5 horas), e, então filtrada. Os cristais alaranjados obtidos foram lavados três vezes com etanol, éter e filtrados à vácuo.

O produto foi recristalizado usando-se 2  $cm^3$  de água desaerada.

**Purificação:** O processo utilizado foi semelhante ao descrito por Isied em [29]

Ao complexo obtido foi adicionado uma quantidade mínima de HCl 0,1  $mol.dm^3$  e reprecipitado pela adição de acetona (em geral cinco vezes a quantidade de ácido utilizado).

O ligante L pode ser:

- L= 4-picolina
- L= 4-acetilpiridina

---

*Utilização de Compostos de Coordenação de Rutênio (II/III) como Bactericidas*

- L= piridina
- L= isonicotinamida

Rendimento médio: 35%. (Para todos os ligantes)

### 3.1.6 Rota Sintética

A rota sintética seguiu o esquema abaixo:

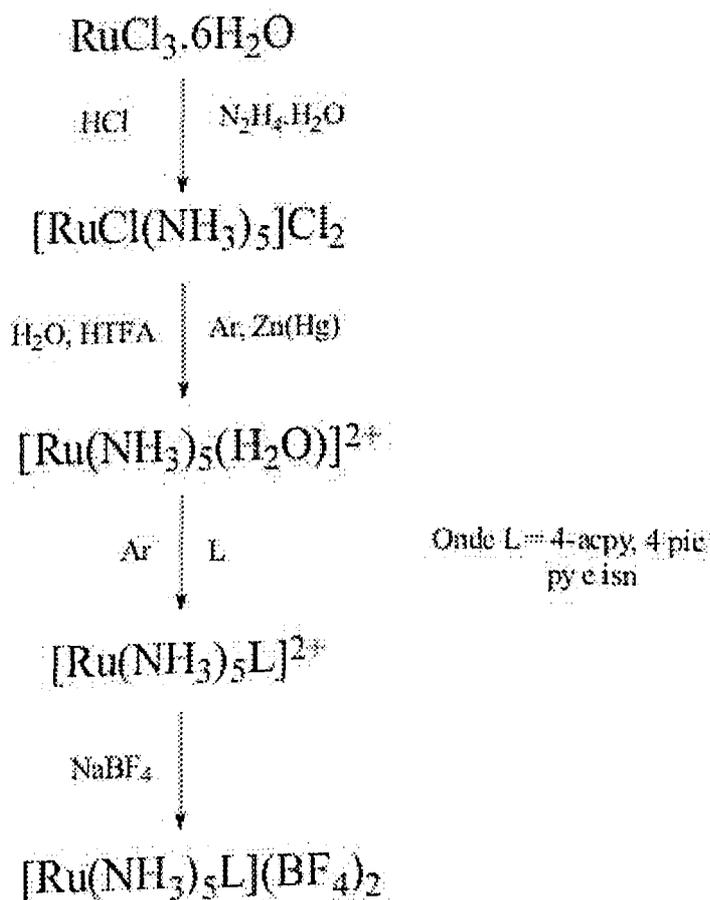


Figura 3.1: Rota Sintética dos compostos de coordenação de Ru(III) e Ru(II)

### 3.1.7 Equipamentos Utilizados

A caracterização dos compostos de rutênio(II/III), foi realizado por espectrofotometria no UV-Vis, utilizando os espectrofotômetros HP8452 e HP8453, ambos com arranjo de diodos, interfaceado a um computador HP com processador Pentium.

Para a obtenção dos espectros foram utilizadas cubetas de quartzo de caminho óptico igual a 1,0 cm.

Os ciclovoltamogramas dos compostos de coordenação foi realizado pelo sistema Potenciostato Galvanostato AUTOLAB PGSTAT20, e registrador X-Y, Windows Version.

Foram empregados três eletrodos, sendo o de trabalho carbono vítreo, o de referência Ag/AgCl KCl(3mol.dm<sup>-3</sup>), e como eletrodo auxiliar, o de platina.

Os compostos foram dissolvidos em água bidestilada.

As medidas foram feitas sob atmosfera inerte, sendo o oxigênio eliminado borbulhando-se argônio puro na solução.

## 3.2 Materiais Utilizados

### 3.2.1 Meio de Cultura

Tryptic Soy Broth (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA )

Este meio de cultura contém:

Componentes	Concentração ( $g.dm^{-3}$ )
Pancreatic digest of casein	17,0
Papaic digest of soybean meal	3,0
NaCl	5,0
Dipotassuim phosphate	2,5
Dextrose	2,5
pH $7,3 \pm 0,2$	
à $25^{\circ}C$	

*Fonte: Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA*

As bactérias semeadas no meio de cultura, foram incubadas à  $37^{\circ}C$  por 24 horas.

Decorrido este tempo, cerca de  $1\text{ cm}^3$  desta cultura é dissolvida em  $5\text{ cm}^3$  de solução salina e comparada a turvação padrão.

As suspensões de microorganismos foram previamente ajustadas ao tubo 2 da escala de MacFarland, apresentando aproximadamente  $6.10^8$  bactérias. $cm^{-3}$ , segundo padrões estabelecidos pelo National Comite Control Laboratory Standart (NCCLS).

O crescimento bacteriano foi evidenciado pela constatação macroscópica da turvação deste meio de cultura.

Com um swab,(cotonete de haste comprida e flexível, que já vem esterilizado num invólucro de papel), é umedecido na solução de salina com a bactéria a ser analisada, e distribuído em toda placa de petri que contém o agar Mueller Hinter

### 3.2.2 Agar Mueller Hinter

Composição típica (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA)

Componentes	Concentração ( $g.dm^{-3}$ )
Infusão de carne desidratada	300,0
Hidrolisado de caseína	17,5
Amido	1,5
Agar	17,0

Fonte: Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA

Dissolve-se 38 g Mueller Hinter agar em água destilada, perfazendo um volume de 1  $dm^3$  à pH  $7,4 \pm 0,2$ .

Autoclavou-se por 15 minutos à 121 °C. Ao esfriar distribuiu-se cerca de 50  $cm^3$  da solução em placas de petri (100x20 mm). Ao solidificar o agar, a placa está pronta para realizar os testes.

### 3.2.3 Confeção dos discos

Foram utilizados discos de penicilina, que foram autoclavados, por 20 minutos, à 121 °C, pois a penicilina é termolábil e se degrada facilmente à altas temperaturas e pressão.

Foi utilizado uma penicilina G10U, validade 06/03/2002, código 640616, Laborclin, Registro MS 10097010044.

Estes discos foram utilizados para serem impregnados com os complexos a serem testados.

Numa capela de fluxo laminar, devidamente limpa com álcool etílico à 70%, é ligado em seguida a lâmpada de ultra violeta por 20 minutos para matar os germes contidos no ar da capela e conseqüentemente evitar possíveis contaminações.

Os compostos foram dissolvidos em água deionizada e esterelizada, a concentração final de cada solução foi de  $1mg.cm^{-3}$ .

Numa placa de petri foram colocados os discos e em cada disco foi colocado uma quantidade da solução do composto de coordenação, a fim de se obter a concentração de 10 à 40  $\mu g$ , por disco.

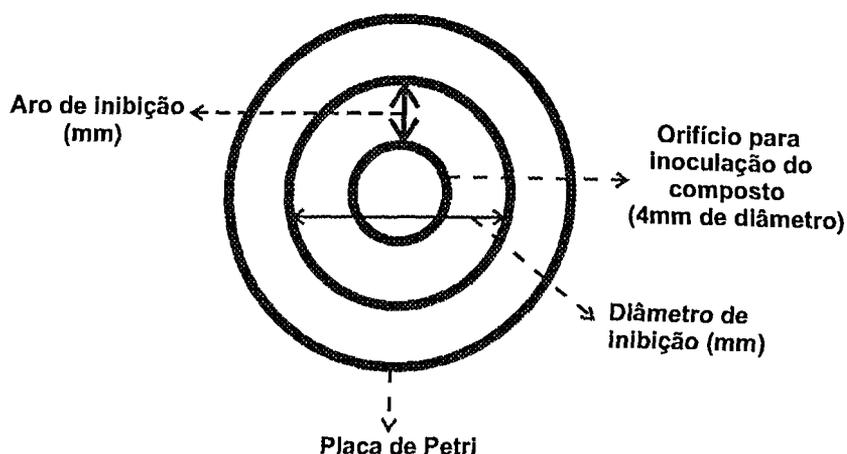


Figura 3.2: Diagrama do processo envolvido na inoculação de um composto em meio de cultura.

Depois de secas estavam prontas para serem utilizadas nos antibiogramas.

### 3.3 Ensaios Microbiológicos

O método a ser utilizado para medir a atividade antimicrobiana é o teste de difusão, conhecido também por teste Kerby-Bawer[47].

Neste teste o antibiótico é impregnado nos discos em placas, figura 3.2 com meio de cultura inoculada com espécies bacterianas .

Depois de 16 - 18 horas as placas são examinadas e o diâmetro da zona de inibição redor do orifício de inoculação indica os resultados positivos ou negativos em relação ao crescimento do microorganismo.

Este teste é padronizado e adequado para muitas espécies infecciosas e de patogenias bacterianas.

A concentração do antibiótico em interfase entre as bactérias em crescimento e as inibidas é conhecida como concentração crítica e se aproxima da concentração mínima inibitória (CMI), obtida através de diluição das soluções.

Assim os métodos disco- placa não permitem uma leitura direta do valor da CMI.

Para se quantificar a CMI deve-se fazer vários testes, utilizando o método de diluição do composto de coordenação em questão.

Nesta leitura os diâmetro de inibição podem ser interpretados como: (s) sensível, (i) intermediário e (r) resistente.

É indicado quando a bactéria ou fungo responsável pelo processo infeccioso não pode predizer a sua sensibilidade, especialmente quando a bactéria pode apresentar resistência aos antibióticos comuns.

É um método fácil de se realizar, rápido e barato, e aplicável para uma grande variedade de bactérias, principalmente bactérias aeróbicas que não necessitam de um crescimento rápido, tais como: *Staphylococcus sp*, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas sp*, dentre outras.

Para realizar as culturas nas placas, o ágar e o meio de cultura, devem estar em condições fisiológicas para garantir maior confiabilidade aos testes a serem realizados.

Neste trabalho foram utilizadas espécies bacterianas tais como:

Gram negativas:

- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Serratia marcescens*
- *Salmonella sp*

Gram positivas:

- *Enterococcus faecalis*
- *Enterobacter faecium*
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

# Capítulo 4

## Resultados e Discussões

### 4.1 Análise dos Compostos de Coordenação de Rutênio(II/III)

A caracterização dos composto de coordenação de rutênio foram feitos pela técnica de espectrometria na região do UV-Vis.

#### 4.1.1 Espectro Ultravioleta-Visível

Os espectros de absorção na região do ultravioleta e visível dos compostos sintetizados, em solução aquosa, estão mostrados nas figuras, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5.

A tabela 4.1 apresenta os comprimentos de onda das bandas de transferência de carga do metal ligante (TCML) e os coeficientes de absortividade molar ( $\xi$ ) das pentaminas de rutênio(II/III).

Como característica geral, as pentaminas de rutênio(II/III), em seus espectros de absorção na região do ultravioleta e visível, apresentam banda na região do ultra violeta(200-350 nm) e outra na região do visível (350-750 nm).

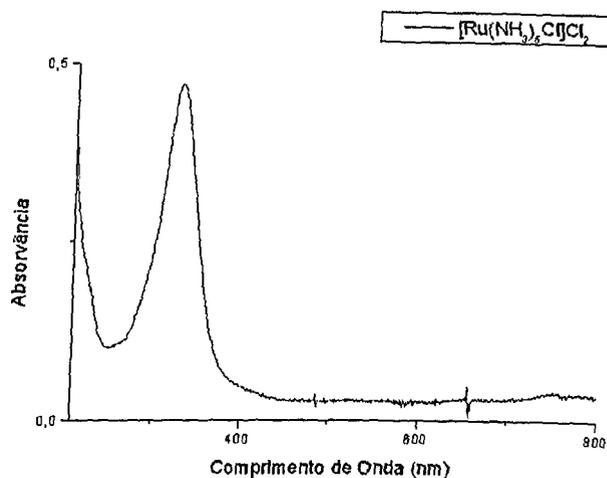


Figura 4.1: Espectro eletrônico quantitativo, na concentração  $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.dm}^{-3}$  do composto  $[\text{RuCl}(\text{NH}_3)_5]^{2+}$ , em água

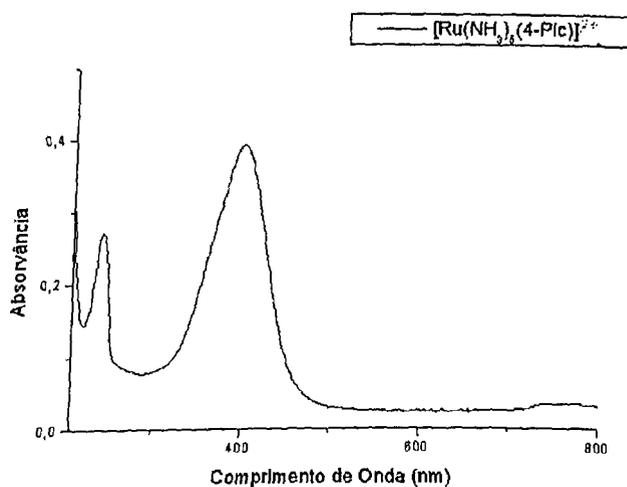


Figura 4.2: Espectro eletrônico quantitativo, na concentração  $5,05 \cdot 10^{-5} \text{ mol.dm}^{-3}$  do composto  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5(4\text{-pic})](\text{BF}_4)_2$ , em água

#### 4.1.2 Bandas na região do Visível

Os compostos do tipo  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5(\text{L})]^{2+}$ , onde L = Cl(cloro), 4-pic (4-picolina), 4-acpy (4-acetilpiridina), py (piridina), isn (isonicotinamida), apresentaram uma banda na

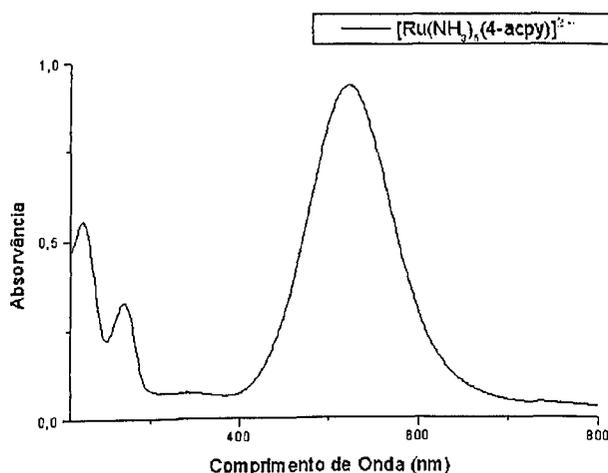


Figura 4.3: Espectro eletrônico quantitativo, na concentração  $9,87 \cdot 10^{-5} mol.dm^{-3}$  do composto  $[Ru(NH_3)_5(4-acpy)](BF_4)_2$ , em água

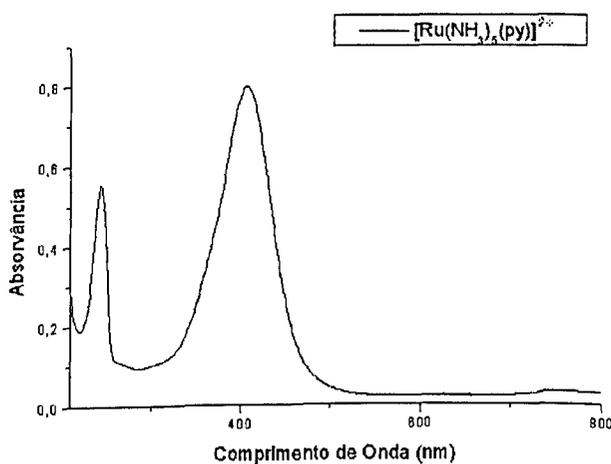


Figura 4.4: Espectro eletrônico quantitativo, na concentração  $1,02 \cdot 10^{-4} mol.dm^{-3}$  do composto  $[Ru(NH_3)_5(py)](BF_4)_2$ , em água

região do visível. Os dados são mostrados na tabela ??.

Os íons de rutênio(II), como mostrado nas figuras 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, tendem a ser estabilizados por ligantes tipicamente moles, porém neste caso, o mecanismo é bastante

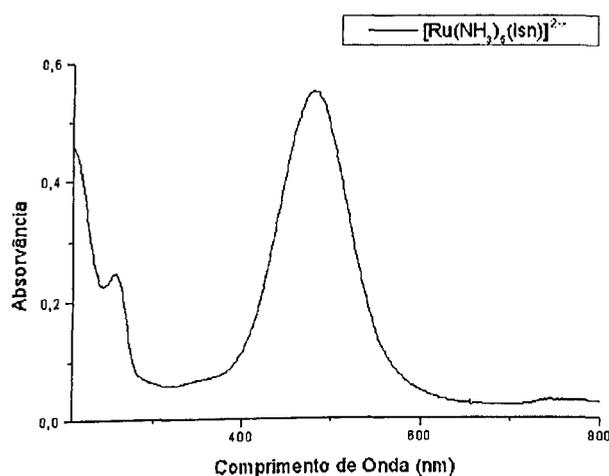


Figura 4.5: Espectro eletrônico quantitativo, na concentração  $4,76 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  do composto  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5(\text{isn})](\text{BF}_4)_2$ , em água

diverso. A formação de ligações covalentes com os átomos doadores dos ligantes conduziria a um excesso de carga negativa sobre o metal, tornando-o pouco estável, porém esse excesso pode ser removido por meio de interações de "ligação reversa" ("back bonding"), utilizando os orbitais de simetria  $\pi$ , que no caso do rutênio(II), são totalmente preenchidos.

Para que isso ocorra é necessário que os ligantes tenham orbitais vazios de mesma simetria e de energias próximas às dos orbitais  $t_{2g}$  do rutênio(II). Assim, a remoção de carga sobre o rutênio(II) se dá por via transferência de carga do metal para o ligante (TCML), que no caso envolve os elétrons originalmente  $t_{2g}$ .

Para os compostos de coordenação de rutênio(II) estudados,  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5(4\text{-acpy})]^{2+}$ ,  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5(\text{py})]^{2+}$ ,  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5(4\text{-pic})]^{2+}$ ,  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5(\text{isn})]^{2+}$ , os ligantes piridínicos possuem orbitais vazios de simetria próxima ao do metal.

Esta característica gera um excesso de carga na ligação  $\sigma$ , e o metal devolve para o ligante o excesso de cargas.

Assim, apresenta a TCML que é característica no Vis e prevalece as bandas IL do ligante 4.1.

### 4.1.3 Bandas na região do Ultravioleta

Comparando os espectros eletrônicos dos compostos nas figuras 4.1, 4.3, 4.5, 4.2, 4.4, podemos observar que dos compostos formados, o complexo  $[RuCl(NH_3)_5]^{2+}$ , possui banda na região do ultravioleta, com energia um pouco mais alta e intensidade semelhante aos ligantes livres.

O rutênio(III) por ter característica receptor  $\pi$ , prefere ligantes saturados, mas o ligante cloro, não tem facilidade em atuar com doador  $\pi$  neste caso.

Assim, nota-se que o espectro possui uma banda na região do ultravioleta que são atribuídas às absorções internas do ligante (IL) [59], caracterizada pelas transições eletrônicas  $\pi - \pi^*$  como visto na figura 4.1.

Tabela 4.1: Bandas de absorção e coeficiente de absorvidade molar ( $\xi$ ), em solução aquosa dos compostos de coordenação do tipo  $[Ru(NH_3)_5(L)]^{2+/3+}$

Ligante (L)	Ligante Livre (nm)	$TCML - 1(nm)$	$IL(nm)$
<i>4-pic</i>	253	397 (3,88)	244 (3,65)
<i>4-acpy</i>	282 (3,69)	523 (3,96)	271 (3,52) 223 (3,75)
<i>py</i>	256	407 (3,88)	244 (3,67)
<i>isn</i>	263	479 (4,05)	260 (3,70)

## 4.2 Voltametria Cíclica

A figura 4.6 , mostra o voltamograma cíclico do eletrólito suporte (KCl) usado nas medidas. Os valores dos potenciais é atribuído uma incerteza da ordem de 10 mV.

Através dos voltamogramas cíclicos obteve-se os parâmetros do potencial formal vs EPH (  $E_f$  vs.NHE (mV))

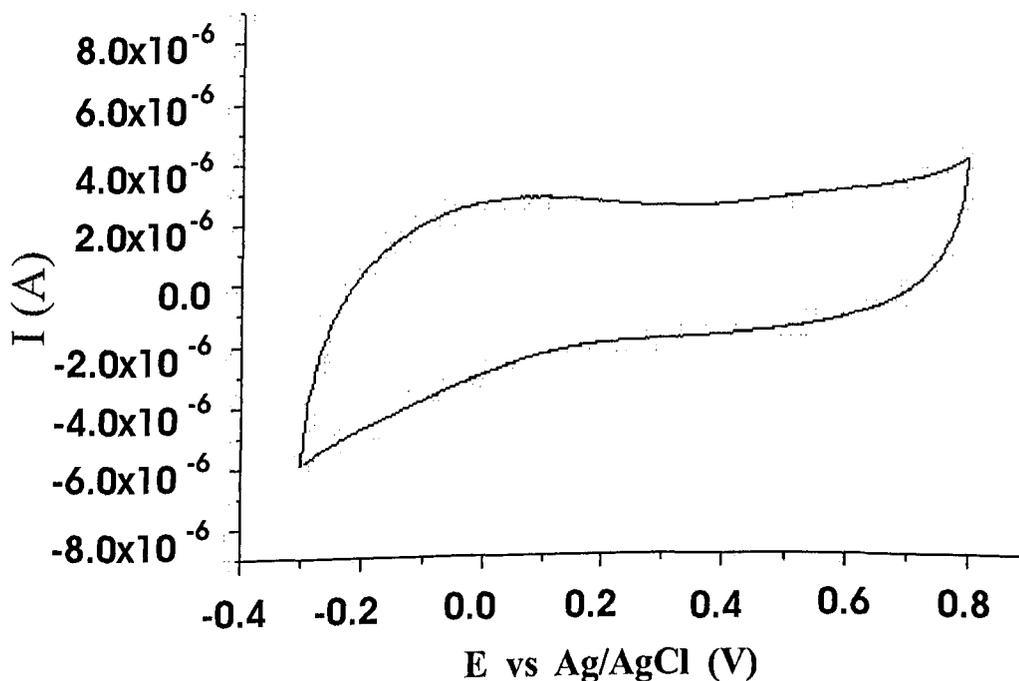


Figura 4.6: Voltamograma cíclico do eletrólito suporte KCl 0,  $1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ , com velocidade de varredura  $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ .

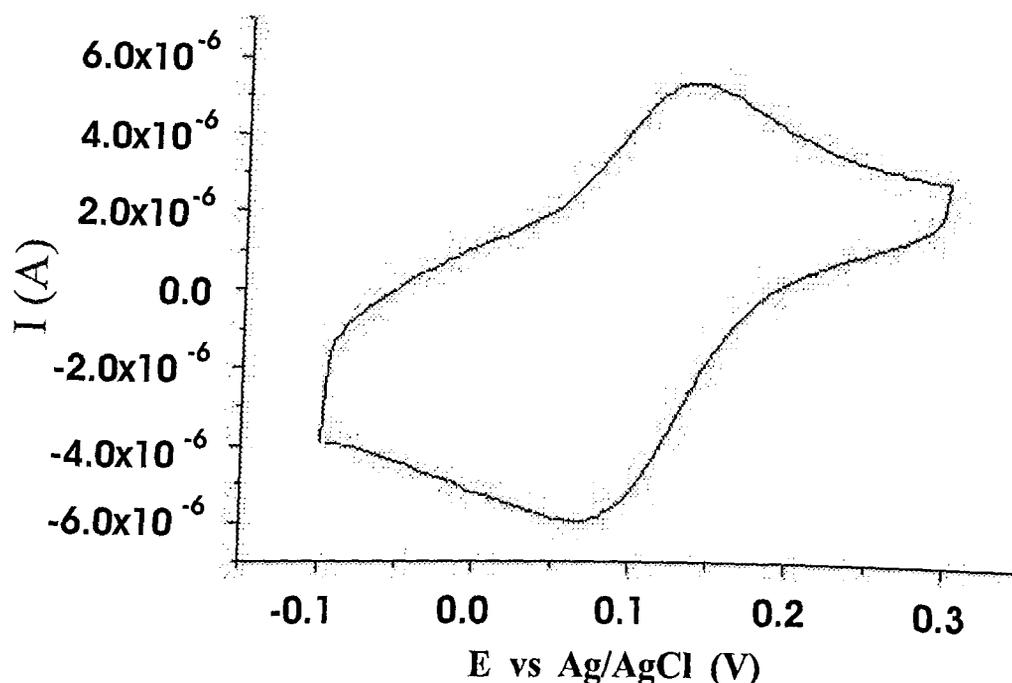


Figura 4.7: Voltamograma cíclico do composto  $[Ru(NH_3)_5(py)](BF_4)_2$ , com concentração igual a  $1,0 \cdot 10^{-4} mol \cdot dm^{-3}$  e KCl a  $0,1 mol \cdot dm^{-3}$  e velocidade de  $100 mV \cdot s^{-1}$ .

As figuras 4.7 e 4.8 mostram como exemplo os voltamogramas cíclicos dos monômeros de 4-pic e py sintetizados.

Nos voltamogramas, observa-se apenas um pico anódico e um pico catódico, referentes ao par Ru(II)/Ru(III), na mesma região observada na literatura pelas pentaaminas de rutênio.

De modo geral, os dados de voltametria cíclica para os compostos, se encaixam nos critérios de reversibilidade empregados, que dentro do erro experimental, independem da velocidade de varredura dos potenciais, indicando um dos critérios de reversibilidade do sistema investigado.

A tabela 4.2 apresenta os valores do potencial formal (Ef) vs EPH e (TCML) para os compostos de coordenação sintetizados. Os valores observados para o potencial formal (Ef) dos complexos variam de 261 a 398 mV vs EPH.

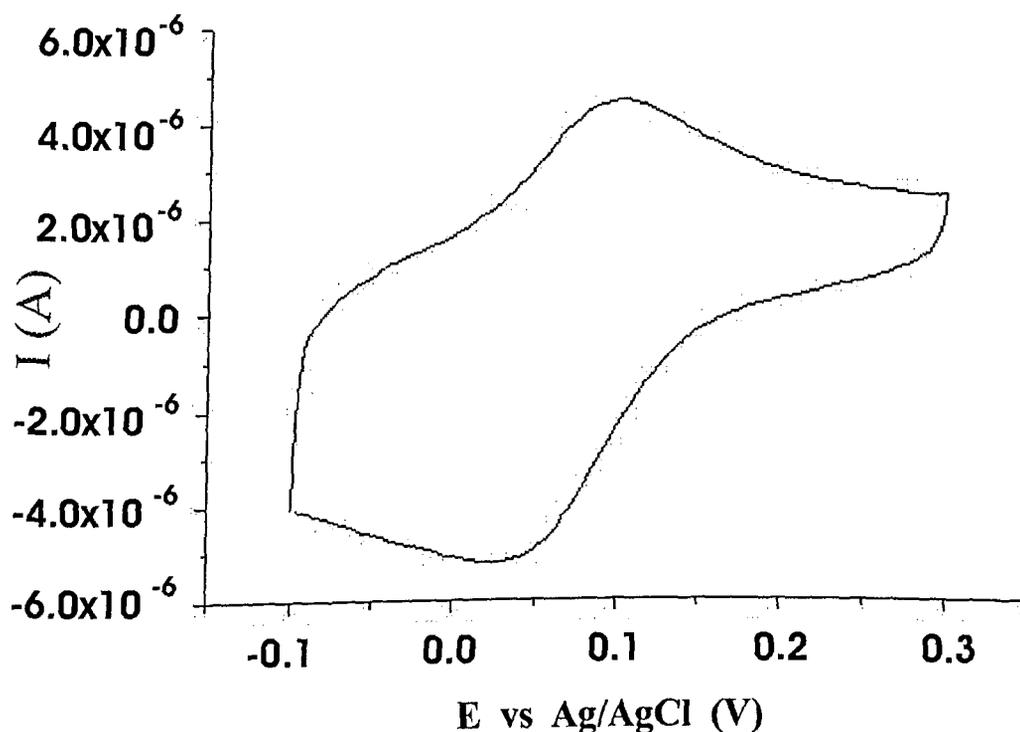


Figura 4.8: Voltamograma cíclico do composto  $[Ru(NH_3)_5(4-pic)](BF_4)_2$ , com concentração igual a  $1,0 \cdot 10^{-4} mol \cdot dm^{-3}$  e KCl a  $0,1 mol \cdot dm^{-3}$  e velocidade de  $100 mV \cdot s^{-1}$ .

Analisando-se a tabela 4.2, nota-se que há uma diminuição no potencial formal ( $E_f$ ), semelhante à diminuição da energia observada nos espectros eletrônicos dos monômeros.

A medida que aumenta a capacidade de captura de elétrons dos substituintes nos anéis aromáticos dos ligantes, menor é a energia da respectiva banda de TCML e maior o valor de  $E_f$ .

Tabela 4.2: Os potenciais formal de redução do par Ru(II)/Ru(III)

Ligante (L)	$E_f$ vs EPH (mV)	TMCL (nm)
<i>4-pic</i>	261	397
<i>py</i>	302	407
<i>isn</i>	306	479
<i>4-acpy</i>	398	523

### 4.3 Atividade Antimicrobiana

#### 4.3.1 Atividade Inibitória dos Compostos de Coordenação de Rutênio(II/III)

As tabelas 4.4, a 4.6, referem-se à atividade inibitória do crescimento das bactérias, isto é, se a bactéria foi sensível ou resistente aos compostos de coordenação rutênio(II/III) utilizado. Se a bactéria foi sensível quer dizer que o composto de coordenação agiu no crescimento desta bactéria, caso contrário, o complexo não foi suficiente para inibir o seu crescimento.

Na figura 4.9, são mostrados os halos de inibição em mm, isto é, a ação dos compostos de coordenação sobre a bactéria, em função da concentração, que variou de 10 a 40 $\mu$ g, por disco.

Na figura 4.9, é apresentada uma foto dos experimentos realizados, utilizando o método de difusão, com a bactéria Gram positiva *Staphylococcus aureus*, com discos contendo o composto de coordenação  $[RuCl(NH_3)_5]^{2+}$ , em concentrações que variaram de 10 à 40 $\mu$ g como mostrado na tabela 4.3. Na placa há quatro discos, que foram enumerados de 1 a 4 correspondendo às concentrações do complexo contido em cada disco.

Tabela 4.3: Concentrações dos discos do composto de coordenação  $[RuCl(NH_3)_5]^{2+}$

Disco	Concentração do composto de coordenação $\mu$ g
1	10
2	20
3	30
4	40

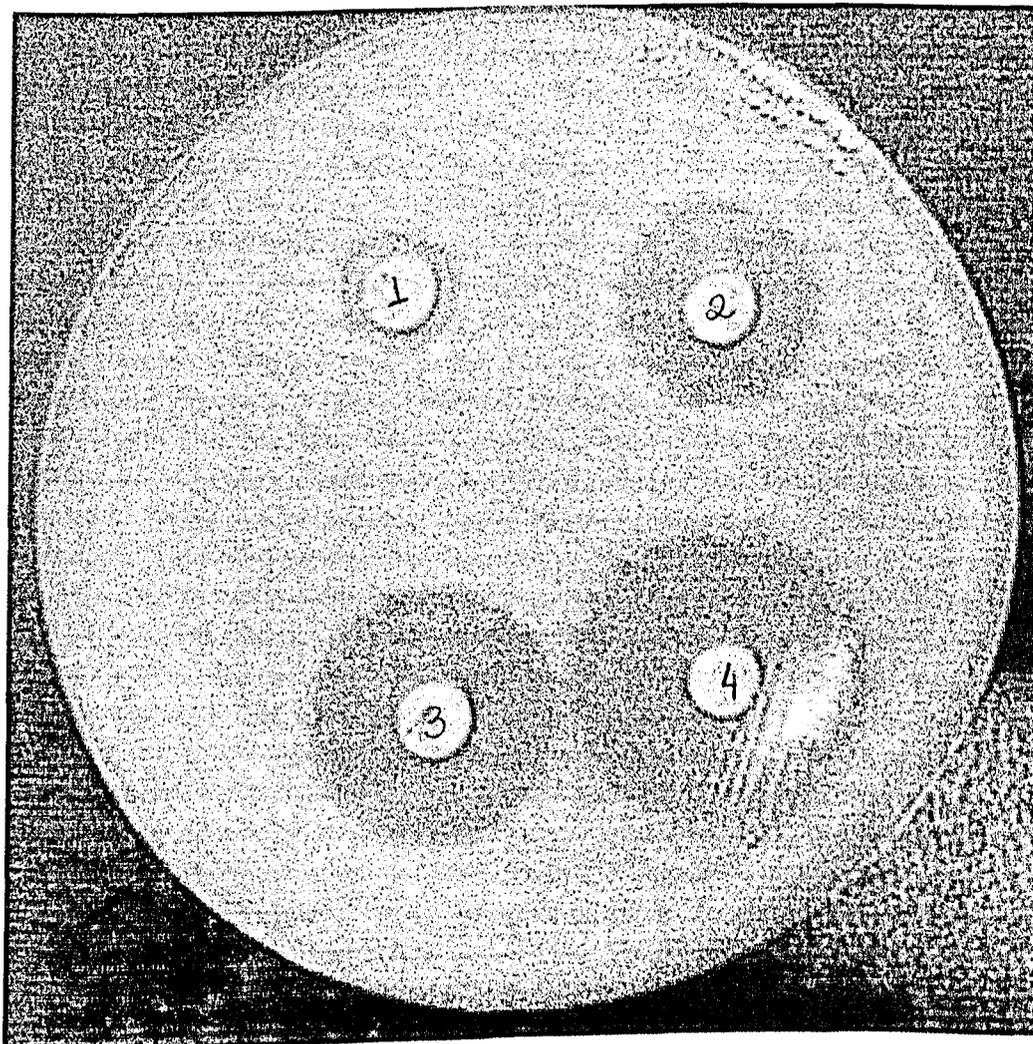


Figura 4.9: Foto de uma placa de petri, utilizando o método de difusão com *Staphylococcus aureus*, com disco contendo  $[RuCl(NH_3)_5]Cl_2$ , nas concentrações de  $10\mu g$  à  $40\mu g$ , por disco.

A figura 4.9, mostra que o aumento da concentração do complexo, em disco, atuou de forma linear, isto é, com o aumento da concentração em disco houve uma aumento no halo de inibição sobre a bactéria Gram positiva *Staphylococcus aureus*.

Tabela 4.4: Atividade inibitória dos compostos de coordenação de Rutênio(II/III), sobre as bactérias Gram positivas, em função da concentração em disco

Complexo	<i>Staphylococcus aureus</i>				<i>Enterococcus faecium</i>				<i>Enterococcus faecalis</i>			
	10 $\mu$ g	20 $\mu$ g	30 $\mu$ g	40 $\mu$ g	10 $\mu$ g	20 $\mu$ g	30 $\mu$ g	40 $\mu$ g	10 $\mu$ g	20 $\mu$ g	30 $\mu$ g	40 $\mu$ g
$[RuCl(NH_3)_5]^{2+}$	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
$[Ru(NH_3)_5(4-acpy)]^{2+}$	+	+	±	±	+	+	+	±	+	+	±	±
$[Ru(NH_3)_5(py)]^{2+}$	+	-	-	±	+	+	+	+	+	+	-	-
$[Ru(NH_3)_5(4-pic)]^{2+}$	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
$[Ru(NH_3)_5(isn)]^{2+}$	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-

- Inibição do crescimento das bactérias

+ Crescimento das bactérias e ausência de inibição, pelo complexo

± Presença de bactérias resistentes no halo de inibição

Tabela 4.5: Atividade inibitória dos compostos de coordenação de Rutênio(II/III), sobre as bactérias Gram positivas, em halo de inibição (mm)

Complexo	<i>Staphylococcus aureus</i>				<i>Enterococcus faecium</i>				<i>Enterococcus faecalis</i>			
	10 $\mu$ g	20 $\mu$ g	30 $\mu$ g	40 $\mu$ g	10 $\mu$ g	20 $\mu$ g	30 $\mu$ g	40 $\mu$ g	10 $\mu$ g	20 $\mu$ g	30 $\mu$ g	40 $\mu$ g
$[RuCl(NH_3)_5]^{2+}$	6	12	20	20	-	-	10	15	-	-	20	23
$[Ru(NH_3)_5(4-acpy)]^{2+}$	-	-	11	11	-	-	10	15	-	-	15	15
$[Ru(NH_3)_5(py)]^{2+}$	-	6	8	8	-	-	-	-	-	-	10	15
$[Ru(NH_3)_5(4-pic)]^{2+}$	8	6	15	15	-	-	-	-	-	-	10	15
$[Ru(NH_3)_5(isn)]^{2+}$	-	6	8	10	-	-	-	-	-	-	10	15

- Crescimento das bactérias e ausência de inibição, pelo complexo

Tabela 4.6: Atividade inibitória dos compostos de coordenação de Rutênio(II/III), sobre as bactérias Gram negativas

Complexo	<i>Escherichia coli</i>				<i>Serratia marcescens</i>				<i>Samonella sp</i>			
	10 $\mu$ g	20 $\mu$ g	30 $\mu$ g	40 $\mu$ g	10 $\mu$ g	20 $\mu$ g	30 $\mu$ g	40 $\mu$ g	10 $\mu$ g	20 $\mu$ g	30 $\mu$ g	40 $\mu$ g
$[RuCl(NH_3)_5]^{2+}$	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
$[Ru(NH_3)_5(4-acpy)]^{2+}$	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
$[Ru(NH_3)_5(py)]^{2+}$	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
$[Ru(NH_3)_5(4-pic)]^{2+}$	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
$[Ru(NH_3)_5(isn)]^{2+}$	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-

- Inibição do crescimento das bactérias

+ Crescimento das bactérias e ausência de inibição, pelo complexo

Tabela 4.7: Atividade inibitória dos compostos de coordenação de Rutênio(II/III), sobre as bactérias Gram negativas, em halo de inibição (mm)

Complexo	<i>Escherichia coli</i>				<i>Serratia marcescens</i>				<i>Salmonella sp</i>			
	10 $\mu$ g	20 $\mu$ g	30 $\mu$ g	40 $\mu$ g	10 $\mu$ g	20 $\mu$ g	30 $\mu$ g	40 $\mu$ g	10 $\mu$ g	20 $\mu$ g	30 $\mu$ g	40 $\mu$ g
$[RuCl(NH_3)_5]^{2+}$	-	14	27	27	-	-	21	24	-	-	21	22
$[Ru(NH_3)_5(4-acpy)]^{2+}$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15	16
$[Ru(NH_3)_5(py)]^{2+}$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9	10
$[Ru(NH_3)_5(4-pic)]^{2+}$	-	10	10	10	-	-	10	12	-	-	9	10
$[Ru(NH_3)_5(isn)]^{2+}$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9	10

- Crescimento das bactérias e ausência de inibição, pelo complexo

Nas tabelas 4.4 e 4.5, é mostrado a atividade inibitória dos compostos de coordenação de rutênio(II/III), para as bactérias Gram positivas, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*. Observa-se que o complexo  $[RuCl(NH_3)_5]^{2+}$  se mostrou sensível, isto é, inibiu significativamente o crescimento de todas as bactérias Gram positivas estudadas.

Para o *Staphylococcus aureus*, em todas as concentrações, o compostos de coordenação de  $[RuCl(NH_3)_5]^{2+}$  e  $[Ru(NH_3)_5(4-pic)]^{2+}$ , conseguiram ser sensíveis, apesar de apresentar halos de inibição diferentes, permaneceu constante o halo de inibição nas concentrações de 30 e 40  $\mu g$  por disco.

Para os compostos de coordenação  $[Ru(NH_3)_5(py)]^{2+}$  e  $[Ru(NH_3)_5(isn)]^{2+}$ , houve inibição para concentrações acima de 20  $\mu g$  por disco, embora pouco significativa.

O complexo  $[Ru(NH_3)_5(4-acpy)]^{2+}$ , ocorreu inibição pouco significativa para 30 e 40  $\mu g$ , por disco, e o halo de inibição permaneceu o mesmo para ambas concentrações. Surgiram bactérias que resistiram à ação do compostos de coordenação  $[Ru(NH_3)_5(4-acpy)]^{2+}$ , dentro do halo de inibição.

Para as bactérias *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis*, não ocorreu inibição do crescimento nas concentrações de 10 e 20  $\mu g$  por disco, mas para as concentrações de 30 e 40  $\mu g$  por disco foi observada a inibição do crescimento da *Enterococcus faecalis* para todos os compostos de coordenação, sendo que a inibição mais significativa foi para o composto de coordenação  $[RuCl(NH_3)_5]^{2+}$ .

A *Enterococcus faecium* apresentou sensibilidade para os compostos de coordenação  $[RuCl(NH_3)_5]^{2+}$  e  $[Ru(NH_3)_5(4-acpy)]^{2+}$ .

Nas tabelas 4.6 e 4.7 é mostrada a atividade inibitória dos complexos de rutênio(II/III), para as bactérias Gram negativas, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Salmonella sp.*

Observa-se que os compostos de coordenação  $[RuCl(NH_3)_5]^{2+}$ , inibiram significativamente o crescimento todas as bactérias Gram negativas estudadas, mas para concentrações superiores de 10  $\mu g$  por disco.

Para a *Escherichia coli*, em concentrações acima de 20  $\mu g$  por disco, é inibida pelos compostos de coordenação  $[RuCl(NH_3)_5]^{2+}$  e  $[Ru(NH_3)_5(4-pic)]^{2+}$ .

O  $[RuCl(NH_3)_5]^{2+}$  nas concentrações de 30 e 40  $\mu g$  por disco, atuam sobre a bactéria, mas o halo de inibição permaneceu constante. O aumento da concentração do composto em disco não interferiu na atividade inibitória.

O  $[Ru(NH_3)_5(4-pic)]^{2+}$  apresentou atividade inibitória, mas pouco significativo.

A *Serratia marcescens*, também apresentou atividade inibitória para os compostos de coordenação  $[RuCl(NH_3)_5]^{2+}$  e  $[Ru(NH_3)_5(4-pic)]^{2+}$ , nas concentrações de 30 e 40  $\mu g$  por disco, sendo que para o  $[RuCl(NH_3)_5]^{2+}$ , a bactéria se mostrou mais sensível, inclusive com halos de inibição expressivos.

O composto de coordenação  $[Ru(NH_3)_5(4-pic)]^{2+}$ , apresentou atividade inibitória, mas pouco significativa.

A *Salmonella sp.*, para concentrações de 30 e 40  $\mu g$  por disco, apresentou atividade inibitória para todos os compostos de coordenação estudados e os halos mais significativos foram para o complexo  $[RuCl(NH_3)_5]^{2+}$ , para os demais complexos a atividade inibitória foi pouco significativa.

O composto de coordenação  $[RuCl(NH_3)_5]^{2+}$ , possui atividade inibitória de crescimento mais efetiva, para as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, (tabelas 4.5, 4.7) alcançando a eficiência de drogas padronizadas e disponíveis comercialmente, em discos padronizados, para serem utilizados em testes de difusão.

Tabela 4.8: Padrão para testes de disco de susceptibilidade antimicrobiana, aprovado pela ASM-2, Villanova, Pa., 1976, The National Committee for Clinical Laboratory Standards.

Reprinted with permission.

Agente Antimicrobial <i>Escherichia coli</i> (ATCC25922)	Concentração do disco	Halo de inibição(mm)
Cephatothin	30 $\mu$ g	18-23
Chloramphenicol	30 $\mu$ g	21-27
Kanamycin	30 $\mu$ g	17-25
Neomycin	30 $\mu$ g	17-25
Tetracycline	30 $\mu$ g	18-25
[RuCl(NH <sub>3</sub> ) <sub>5</sub> ] <sup>2+</sup>	30 $\mu$ g	27
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC25923)		
Chloramphenicol	30 $\mu$ g	19-26
Kanamycin	30 $\mu$ g	19-26
Neomycin	30 $\mu$ g	18-26
Tetracycline	30 $\mu$ g	19-28
Vancomycin	30 $\mu$ g	15-19
[RuCl(NH <sub>3</sub> ) <sub>5</sub> ] <sup>2+</sup>	30 $\mu$ g	20

Fonte: The National Committee for Clinical Laboratory Standards

Na tabela 4.8 são apresentados os antibióticos que são classificados como sensível para as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, e que não sofrem resistência à sua ação para concentrações acima de 30 $\mu$ g disco, e também a atividade inibitória do composto de coordenação [RuCl(NH<sub>3</sub>)<sub>5</sub>]<sup>2+</sup>, para estas mesmas bactérias.

Os compostos de coordenação, [Ru(NH<sub>3</sub>)<sub>5</sub>(4-pic)]<sup>2+</sup>, [Ru(NH<sub>3</sub>)<sub>5</sub>(4-acpy)]<sup>2+</sup>, [Ru(NH<sub>3</sub>)<sub>5</sub>(py)]<sup>2+</sup> e [Ru(NH<sub>3</sub>)<sub>5</sub>(isn)]<sup>2+</sup> apresentaram atividade inibitória, mas não alcançaram a eficiência das drogas já padronizadas, como por exemplo para as bactérias gram positivas *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* e para a bactéria gram negativa *Serratia marcescens*. Em alguns casos como a *Salmonella sp* e *Enterococcus faecalis*,

a atividade inibitória destes complexos, para os compostos de coordenação  $[Ru(NH_3)_5(4-pic)]^{2+}$ ,  $[Ru(NH_3)_5(py)]^{2+}$  e  $[Ru(NH_3)_5(isn)]^{2+}$  não aumenta o halo de inibição com o aumento da concentração do complexo em disco.

Karvembu et al(2002) [33], fizeram estudos da atividade bactericida em complexos de rutênio(II) contendo tiobis( $\beta$  - dicetonas) e trifenilfosfina, semelhantes aos realizados neste trabalho, mas Karvembu et al testou a atividade dos compostos de coordenação de rutênio(II) e de seus ligantes livres, observaram que os compostos de coordenação de rutênio(II) se mostraram mais eficientes do que os ligantes livres, mostrando que a função antimicrobiana é em função do metal.

A atividade deste complexos, sobre estas bactérias, pode ser atribuída à teoria de quelação de Tweedy [61]. De acordo com sua teoria a quelação reduz principalmente a polaridade do átomo metálico central, dividindo a carga positiva com o grupo doador e, possivelmente, deslocando os elétrons  $\pi$ , situados sobre o anel.

Possivelmente, o caráter lipofílico do quelato, favorece a permeabilidade através da camada de lipídio da membrana celular, e essas bactérias (*Bacillus sp*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas sp*) devem possuir uma membrana que permite com maior facilidade a passagem desses complexos, podendo assim, atuarem em seu metabolismo, inibindo o seu crescimento [33].

Como se observou para o composto de coordenação  $[RuCl(NH_3)_5]^{2+}$ , o composto de coordenação de rutênio(III), se mostrou mais eficiente do que os compostos de coordenação de rutênio(II), isto mostra que a carga do metal influencia de forma diferente na atuação destes compostos em seres vivos, possivelmente devido ao  $Ru^{3+}$  não possuir orbitais vazios para executar a retrodoação e interagindo mais facilmente do que o Ru(II), que possui orbitais vazios, ocorrendo a transferência de carga para o ligante (MLCT).

Uma outra teoria, que também se refere à atividade dos compostos de coordenação na atuação na atividade inibitória do crescimento das bactérias e da ação sobre células tumorais, que é a hipótese de redução por ativação [13].

Esta hipótese sugere de redução por ativação, sugerindo que os complexos de Ru(III) são reduzidos "in vivo" para coordenar as biomoléculas mais rapidamente [13] [34].

Os tumores e as bactérias aeróbicas necessitam de uma grande quantidade de oxigênio e outros nutrientes para se desenvolverem; frequentemente, há um retardo no crescimento dos tumores e das bactérias quando submetidas à uma diminuição na taxa de oxigênio, conhecida por hipoxia, conseqüentemente as células cancerígenas dependem da glicólise para se manterem vivas e o excesso de ácido láctico favorece uma diminuição do pH entre as células tumorais (como os compostos estudados neste trabalho apresentam atividade antitumoral, possivelmente pode estar agindo de modo semelhante em bactérias).

A ausência de transição  $\pi$  e a baixa carga do Ru(II), deveria causar efeito substituinte maior do que o Ru(III) em condições de coordenação desta natureza.

Como na redução de Ru(III) para  $Ru^{2+}$  são preenchidos os orbitais  $d_{\pi}(t_{2g})$ , os ligantes doadores  $\pi$  coordenados fortemente ao Ru(III), não fazem o mesmo com o Ru(II), e conseqüentemente se ligam mais fortemente.

Espera-se que com a oxidação do Ru(II) para Ru(III), nas células tumorais, ocorra um aumento nas ligações intracelulares e por isso aumenta a seletividade e a toxicidade.

A glutationa (GHS) e várias proteínas redox são capazes de reduzir os complexos de Ru(III) in vivo [12].

O Ru(III) pode estar sendo reduzido na mitocôndria, no sistema de transferência de elétrons, captando esses elétrons, sendo que esta captação é mais eficiente com o  $[RuCl(NH_3)_5]^{2+}$ , um outro caminho, pode ser, os compostos de coordenação de aminas de rutênio serem reduzidos pelo sistema de transporte de elétrons da transmembrana, não sendo necessário o complexo entrar dentro da célula para ser reduzido.

A oxidação de Ru(II) para Ru(III) pode ocorrer pelo oxigênio molecular [54], citocromo oxidase [53] e outros oxidantes, mas assim relativamente ocorre uma hipoxia entre as células tumorais e no meio onde se encontra as bactérias.

O efeito da hipoxia aumenta a ligação dos complexos com o DNA acentuando a toxicidade dos agentes anticancerígenos tais como:

- *cis*[ $RuCl_2(NH_3)_4$ ]Cl
- *trans*[ $Ru(Im)_2(Cl_4)$ ]

A ativação por redução é a primeira evidência da ação dos complexos de rutênio em terapia clínica, principalmente como os compostos de coordenação do tipo  $[Ru(DMSO)(Im)Cl_4]$  [38].

O composto de coordenação  $[RuCl(NH_3)_5]Cl_2$  possui ligantes saturados de cloreto e amina, possivelmente pode apresentar o mesmo tipo de mecanismo de ação nas bactérias estudadas, neste trabalho.

O importante é salientar que os compostos de coordenação de rutênio não apresentam atividade citotóxica, isto é, não atacam tecidos das membranas celulares [23] [24].

Estas são especulações sobre o mecanismo de ação dos complexos de rutênio em bactérias e/ou células tumorais, pois não há um fator relevante que indique a ação efetiva dos composto de coordenação de rutênio.

O certo, é que existe as evidências experimentais, da eficiência do rutênio(II/III), mas não sua forma de agir sobre esses seres vivos, mas a geometria octaédrica dos compostos de coordenação de Ru(III) e Ru(II), provavelmente os compostos de coordenação de rutênio agem de forma diferente do que a cisplatina (possui geometria quadrado planar), pois estudos mostram que os compostos de coordenação de rutênio, se aderem na guanina adjacente do DNA no processo de reticulação das proteínas do sítio ativo do DNA [20] [26] [30], isto é válido para estudos somente em células tumorais, mas um estudo mais detalhado deverá mostrar estes mecanismos e se ocorre o mesmo com as bactérias.

Um fator relevante que deve ser levado em consideração aos compostos de coordenação de rutênio(II/III), estudados neste trabalho, é que todos são solúveis em água, como os seres vivos em sua maior parte possui água em seus organismos, estes complexos pode agir de forma que não prejudique os demais tecidos.

A grande maioria dos complexos de rutênio, são solúveis em solventes não aquosos, como por exemplo DMSO, acetona, acetonitrila, etc.

A presença destes solventes em organismos vivos, pode ser muito prejudicial à saúde dos mesmos, o efeito do complexos é muito menor do que a toxicidade destes solventes em organismos vivos.

Isto faz com que os nossos compostos possam ser usados sem maiores prejuízos para outros órgãos ou tecidos do ser vivo.

---

*Utilização de Compostos de Coordenação de Rutênio (II/III) como Bactericidas*

Propor um mecanismo de ação dos compostos de coordenação de rutênio para as bactérias é muito prematuro, pois há necessidade de estudos mais detalhados para se afirmar como estes compostos de coordenação agem sobre as bactérias estudadas.

Estes resultados vem corroborar com os estudos realizados por Karvembu et al(2002) [33].

## Referências Bibliográficas

- [1] ALLARDYCE, C. S.; DYSON, P. J.; ELLIS, D. J.; SALTER, P. A. & SCOPEL-LITI, R. Synthesis and characterisation of some water soluble ruthenium(II)-arene complexes and an investigation of their antibiotic and antiviral properties. *Journal of Organometallic Chemistry*, vol. 668, no. pag. 35-42, 2003.
- [2] ALLARDYCE, C. S. & DYSON, P. J. Uses and future prospects. *Platinum Metals*, vol. 45, no. pag. 62, 2001.
- [3] BAILEY, V. M.; LACHANCE-GALANG, K. J.; DOAN, P. E. & CLARKE, M. J. *Inorganic Chemistry*, vol. 36, no. pag 1973, 1997.
- [4] BENENSON, A. S. *Control of Communicable Diseases Manual*. 16 ed., 1995.
- [5] BENTO, M. L.; PAVANIN, L. A.; BACELAR, W. K. & SANTOS, W. B. *XI Encontro Regional da SBQ*, vol. 61, no., 1997.
- [6] BENTO, M. L. & TFOUNI, E. *Inorganic Chemistry*, vol. 27, no. , 1988.
- [7] BENTO, M. L. & TFOUNI, E. *Inorganic Chemistry*, vol. 27, no. pag 3410, 1988.
- [8] BENTO, M. L. & TFOUNI, E. Spectra reduction potentials and coordinated pyrazine basicities in ruthenium(II) complexes [*trans* -  $Ru(NH_3)_4LL$ ]<sup>n+</sup>. *Inorganic Chemistry*, vol. 27, no. pag 3410-4, 1988.
- [9] BOER, E. & ZEE, H. V. Salmonella in foods of animal origin in the netherlands. *In: Salmonella and Salmonellosis Symposium, Ploufragan, França.*, 1992.

- [10] CARY, R. C.; DARROW, C. B.; LANE, S. M.; PEYSER, T. A.; SATCHER, J. H.; ANTWERP, W. P. V.; NELSON, A. J. & REYNOLDS, J. G. Ruthenium bipyridine complexes for the recognition of glucose. *Sensors and Actuators B Chemical*, vol. 87, no. B, 2002.
- [11] CENTINKAYA, B.; CENTINKAYA, E.; KUCUKBAY, H. & DURMAZ, R. *Arzneimittel-Forschung/Drug Res.*, vol. 46, no. pag 821, 1996.
- [12] CLARKE, M. J.; BITLER, S.; RENNERT, D. & BUCHBINDER, M. *Journal Inorganic Chemistry*, vol. 12, no. page 1036, 1980.
- [13] CLARKE, M. J.; ZHU, F. & FRASCA, D. *Chemistry Reviews*, vol. 99, no. pag 2511, 1999.
- [14] CLARKE, M. J. Ruthenium metallopharmaceuticals. *Coordination Chemistry Reviews*, vol. 232, no. pag 69, 2002.
- [15] COTTON, F. A. & WILKINSON, G. *Adv, Inorg. Chem. Interscienc.*, vol. terceira edição, no., 1972.
- [16] DE LIMA, R. G. Efeito da coordenação de rutênio nas propriedades físico-químicas e biológicas de catecolaminas. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, 2001.
- [17] DOS SANTOS, W. B. Síntese, caracterização, estudos químicos e fotoquímicos de sistemas supramoleculares. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Uberlândia, 2001.
- [18] DWYER, D. S.; GORDON, K. & JONES, B. *Int J Immunophar*, vol. 17, no. pag 935, 1995.
- [19] ENRIGHT, B.; REDMOND, G. & FITZMAURICE, D. *J. Inorg. Chem.*, vol. 98, no. , 1994.

- [20] FARRELL, N.; QU, Y. & ROBERTS, J. D. *Topics Biological Chemistry*, vol. 1, no. page 99, 1999.
- [21] FORD, P. C. & SUTTON, C. Synthesis of cis and related pentaamin ruthenium complexes of aromatic nitrogen heterocyclic. *Inorganic Chemistry*, vol. 8, no. pag. 1544, 1968.
- [22] FORSTER, R. D. & MEAD, G. C. Effect of temperature and added polyphosphate on the survival of salmonellae in poultry meat during cold storage. *J. Appl. Bacteriol.*, vol. 41, no. , 1976.
- [23] FRANCO, C. V.; PAULA, M. M. S.; CALIXTO, J. B. & CRECZYNSKI-PASA, T. B. Synthesis and biological activity of *trans* -  $[RuCl_2(pyridin - 4 - carboxilicacid)_4]$ . *Journal of Inorganic Biochemistry*, no. 67 (1-4), 1997.
- [24] FRANCO, C. V.; PAULA, M. M. S.; CALIXTO, J. B. & ET ALL, T. B. C.-P. Complexes *trans* -  $[RuCl_2(nic)_4]$  and *trans* -  $[RuCl_2(i - nic)_4]$  as free radical scavengers. *Journal of Inorganic Biochemistry*, vol. 86, no. , 2001.
- [25] FRASCA, D. R.; GEHRING, L. E. & CLARKE, M. J. Cellular effects of transferring coordinated to  $[Ru(NH_3)_5Ru]Cl_2$ . *Journal of Inorganic Biochemistry*, vol. 83, no. pag. 139, Issue 2-3, 2001.
- [26] GELASCO, A. & LIPPARD, S. J. *Topics Biological Inorganic Chemistry*, vol. 1, no. page 1, 1999.
- [27] GRAY, H. B. & WINKLER, J. R. Electron transfer in proteins. *Annual Reviews Biochemistry*, vol. 65, no. pag 537, 1996.
- [28] [HTTP://WWW.ABCDASAUDE.COM.BR/ARTIGO.PHP?484](http://www.abcdasaude.com.br/artigo.php?484).
- [29] ISIED, S. & TAUBE, H. *Inorganic Chemistry*, vol. 15, no. pag 3070, 1976.
- [30] JAMIESON, E. R. & LIPPARD, S. J. *Chemistry Reviews*, vol. 99, no. page 2467, 1999.

- [31] JONES, R. N. Impact of changing pathogens and antimicrobial susceptibility patterns in the treatment of serious infections in hospitalized patients. *American Journal Medicine*, vol. 100, no. suppl 6A, 1996.
- [32] JONES, R. N. Can antimicrobial activity be sustained? an appraisal of orally administered drugs used for respiratory tract infections. *American Journal Medicine*, vol. 27, no. , 1997.
- [33] KARVEMBU, R. & NATARAJAN, K. Synthetic catalytic and biological studies of new binuclear ruthenium(II) complexes containing thiobis ( $\beta$ -diketones) and triphenylphosphine. *Polyhedron*, vol. 21, no. , 2002.
- [34] KELMAN, A. D.; CLARKE, M. J.; EDMONDS, S. D. & PERESIE, H. J. *Journal Clin Hematol Oncol*, vol. 7, no. page 274, 1977.
- [35] KLOOS, W. E. & SCHLEIFER, K. H. *The genus Staphylococcus*, vol. Cap 125. Berlin Heidelberg Springer Verlag, 1981.
- [36] LEWIS, G. N. *J. Franklin Inst.*, vol. 226, no. 293, 1938.
- [37] MESSORI, L.; VILCHEZ, F. G.; VILAPLANA, R.; PICCIOLI, F.; ALESSIO, E. & KEPLER, B. Binding of antitumor Ru(III) complexes to plasma proteins. *Methods Based Drugs*, vol. 7, no. page 335, 2000.
- [38] MESTRONI, G. *Metal-Based Drugs*, vol. 1, no. p 41, 1994.
- [39] MISHRA, L.; SINHA, R. & ITOKAWA, H. Anti-hiv and cytotoxic activities of Ru(II) Ru(III)pyridyl complexes containing 2 6-(2-benzimidazolyl)-pyridinechalcone as co-ligand. *Bioorganic & Medical Chemistry*, vol. 9, no. pag. 1667, 2001.
- [40] MULLIKEN, R. S. *J. Amer. Chem. Soc.*, vol. 74, no. , 1952.
- [41] OTERO, L.; NOBLIA, P.; GAMBINO, D.; CERECETTO, H.; GONZÁLEZ, M.; EL-LENA, J. A. & PIRO, O. E. Synthesis and characterization of new ruthenium com-

- plexes with active ligands against chagas' disease. *Inorganica Chimica Acta*, vol. 344, no. pag. 85-94, 2002.
- [42] PAULING, L. The nature of chemical bond. *Cornell Univ. Press.*, vol. terceira edição, no., 1960.
- [43] PAVANIN, L. A. & GIESBRECHT, E. Synthesis and properties of ruthenium(II) complexes  $[cis - Ru(NH_3)_4(isnL)]^{2+}$  spectra and reduction potentials. *Inorganic Chemistry*, vol. 24, no. pag 4444, 1995.
- [44] PEARSON, R. G. *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 85, no. , 1963.
- [45] PFALLER, M. A.; JONES, R. N.; DOERN, G. V. & =, K. K. T.
- [46] PICAZO, J. J. Procedimientos en microbiología clínica. *Hemocultivos*, vol. 3, no. , 1993.
- [47] PRATT, W. B. & FEKETY, R. The antimicrobial drugs. *Oxford University Press*, no. pag 21, 1986.
- [48] RODRIGUE, D. C.; TAUXE, R. V. & ROWE, B. International increase in salmonella enteritidis: a new pandemic? *Epidemiol.Infect.*, vol. 105, no. , 1990.
- [49] ROSENBERG, B.; VANCAMP, L. & KRIGAS, T. Platinum compounds: A new class of potent antitumor agents. *Nature*, vol. 222, no. pag. 385, 1969.
- [50] SAVA, G.; PACOR, S.; BERGAMO, A.; COCCHIETTO, M.; MESTRONI, G. & ALESSIO, E. Effects of ruthenium complexes on experimental tumors: irrelevance of cytotoxicity for metastasis inhibition. *Chemico Biological Interactions*, vol. 95, no. pag 109, 1995.
- [51] SCUDERI, G.; FANTASIA, M.; FILETICI, E. & ANASTASIO, M. P. Foodborne outbreaks caused by salmonella in italy, 1991-1994. *Epidemiol. Infect.*, vol. 116, no. , 1996.

- [52] SHIVER, D. F. *Accounts Chem. Res.*, vol. 3, no. , 1970.
- [53] STANBURY, D. M.; GASWICK, D.; TAUBE, H. & BROWN, G. M. *Journal Inorganic Chemistry*, vol. 22, no. page 1975, 1983.
- [54] STANBURY, D. M.; HAAS, O. & TAUBE, H. *Journal Inorganic Chemistry*, vol. 12, no. page 79, 1980.
- [55] STEMP, E. D. A.; HOLMIN, R. E. & BARTON, J. K. Electron transfer between metal complexes bound to dna: variations in sequence, donor and metal binding mode. *Inorganic Chimica Acta*, vol. 297, no. pag. 203, 2000.
- [56] TAUBE, H. & ENDICOTT, J. F. Oxidation-reduction reactions of complexes amines of ruthenium. *Journal America Chemical Society*, vol. 84, no. pag. 4984, 1962.
- [57] TAUBE, H. *Coord. Chem. Rev.*, vol. 26, no. , 1978.
- [58] TAVECHIO, A. T.; FERNANDES, S. A.; NEVES, B. C.; DIAS, A. M. G. & IRINO, K. Changing patterns of salmonella serovars: increase of salmonella enteritidis in são paulo, brazil. *Revta Inst. Med. Trop.*, vol. 38, no. 5, 1996.
- [59] TFOUNI, E. & FORD, P. C. Thermal and photochemical proprieties some trans-disubstuted tretaamin ruthenium(II) complexes of aromatic nitrogen heterocyclices trans-[Ru(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>LL]<sup>n+</sup>. *Inorganic Chemistry*, vol. 19, no. , 1980.
- [60] TORTORA, G. J.; FUNKI, B. R. & CASE, C. L. *Microbiology an introduction*. 5th edition ed., 1995.
- [61] TWEEDY, B. G. *Phytopathology*, vol. 55, no. , 1964.
- [62] VOLLANO, J. P.; BOSSARD, G. E. & MARTELLUCCI, S. A. The synthesis and in vitro photodynamic activity of a series of novelruthenium (II)-2-3-naphthalocyanines. *Journal Photochemistry and Photobiology*, vol. 37, no. pag. 230, Issue 3, 1997.

- [63] WARD, L. R. & THRELFALL, E. J. Human salmonellosis in england and wales - current situation. *In: Salmonella and Salmonellosis Symposium, Ploufragan, França., 1997.*
- [64] *Revista Ciência Hoje*, vol. 23. 1998.
- [65] <http://www.if.ufrj.br/teaching/elem/e004410.html>.
- [66] <http://www.if.ufrj.br/teaching/elem/e004420.html>.
- [67] <http://www.if.ufrj.br/teaching/elem/e004430.html>.