

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA – UFSM
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**SÍNTESE, ESTRUTURAS DE TRIAZENO 1-ÓXIDO E
COMPLEXO DE K^+ , E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
BIOLÓGICA DE 1-METILTRIAZENO 1-ÓXIDO E
1,3-BIS(ARIL)TRIAZENOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aline Joana Rolina Wohlmuth Alves dos Santos

**Santa Maria, RS, Brasil
2005**

**SÍNTESE, ESTRUTURAS DE TRIAZENO 1-ÓXIDO E
COMPLEXO DE K⁺, E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
BIOLÓGICA DE 1-METILTRIAZENO 1-ÓXIDO E
1,3-BIS(ARIL)TRIAZENOS**

por

Aline Joana Rolina Wohlmuth Alves dos Santos

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós Graduação
em Química, Área de concentração Química Inorgânica,
da Universidade Federal de Santa Maria,(UFSM, RS),
como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Química

Orientador: Prof. Dr. Manfredo Hörner

**Santa Maria, RS, Brasil
2005**

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Química**

A Comissão Examinadora abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**SÍNTESE, ESTRUTURAS DE TRIAZENO 1-ÓXIDO E
COMPLEXO DE K⁺, E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE
1-METILTRIAZENO 1-ÓXIDO E 1,3-BIS(ARIL)TRIAZENOS**

elaborada por
Aline Joana Rolina Wohlmuth Alves dos Santos

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Química

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Dr. Manfredo Hörner (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Prof^a. Dra. Rosmari Hörner (UFSM)
(Co-orientadora)

Prof. Dr. Herton Fenner (UFSM)

Santa Maria, 19 de dezembro de 2005.

TENTE OUTRA VEZ

Veja, não diga que a canção está perdida
tenha fé em Deus tenha fé na vida.
Tente outra vez.

Beba, pois a água viva ainda está na fonte
(tente outra vez), você tem dois pés para cruzar a ponte,
nada acabou, não, não, não.

Tente, levante sua mão sedenta e recomece a andar
não pense que a cabeça agüenta se você parar,
não, não, não, não, não, não.

Há uma voz que canta, uma voz que dança,
uma voz que gira bailando no ar.

Queira (queira), não basta ser sincero e desejar
profundo, você será capaz de sacudir o mundo.

Vai, tente outra vez (tente), e não diga
que a vitória está perdida,
se é de batalhas que se vive a vida.

Tente outra vez.

(Raul Seixas / Paulo Coelho / Marcelo Motta)

Aos meus pais João Lademir e Reni, e irmão Lucas
que acreditaram no meu potencial e sempre me apoiaram;
por isso e pelo amor oferecido a mim, dedico a vocês este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Às pessoas que, da sua maneira, para mim, toda especial, apoiaram, acreditaram, vivenciaram e compartilharam os momentos que antecederam a conclusão desta etapa em minha vida, em particular:

* Ao Prof. Dr. Manfredo Hörner que além de orientar, participa e compartilha sua sabedoria, competência e entusiasmo, oportunizando conquistas para todo o grupo.

* A Prof^a. Dra. Rosmari Hörner que além de co-orientar, com todo seu conhecimento e generosidade, incentivou em mim o gosto pela pesquisa, fundamentado desde a iniciação científica, e que hoje serve de estímulo para prosseguir.

* Ao Prof. Dr. Herton Fenner que sempre esteve pronto a ajudar e que muito me ajudou.

* Aos colegas de laboratório que proporcionam o ambiente necessário para o desenvolvimento deste trabalho e, mais do que isto, foram amigos compreensíveis e atenciosos.

* As funcionárias Maria de Fátima e Rosângela, pelas conversas e atenção.

* Aos alunos de iniciação científica Luiz Gustavo e Tiago pela ajuda.

* Aos colegas de trabalho no Dep. de Microbiologia e Parasitologia, sempre muito generosos e compreensíveis.

* Aos familiares e amigos que, distantes ou próximos, sempre torceram por mim.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Química
Universidade Federal de Santa Maria

SÍNTESE, ESTRUTURAS DE TRIAZENO 1-ÓXIDO E COMPLEXO DE K⁺, E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE 1-METILTRIAZENOS 1-ÓXIDO E 1,3-BIS(ARIL)TRIAZENOS

AUTORA: ALINE JOANA ROLINA WOHLMUTH ALVES DOS SANTOS
ORIENTADOR: PROF. DR. MANFREDO HÖRNER

Santa Maria, 19 de dezembro de 2005.

Este trabalho apresenta a determinação da estrutura cristalina/molecular de dois compostos triazenos livres e um complexo de K⁺ com ligante triazeno 1-óxido protonado.

O composto 1-metil-3-(*p*-carboxifenil)triazeno 1-óxido (**1**) cristaliza no sistema monoclinico, grupo espacial $C2/c$, com parâmetros de cela $a = 27,2046(8)\text{Å}$, $b = 5,0218(1)\text{Å}$, $c = 14,4503(5)\text{Å}$, $\beta = 113,13(1)^\circ$, $V = 1815,47(9)\text{Å}^3$, $Z = 8$, $R_1 = 0,0325$, $wR_2 = 0,0977$. A estrutura cristalina do pró-ligante (**1**) revela que a molécula é praticamente plana (r.m.s. $0,0192\text{Å}$) e que, o conjunto de moléculas unidas por ligações de hidrogênio, na cela elementar, formam cadeias independentes na direção cristalográfica [100], sendo que estas cadeias independentes unem-se, também, por ligações de hidrogênio na direção cristalográfica [001]. Estas ligações são do tipo clássicas N–H---O e O–H---O, e se relacionam por operações de simetria formando um arranjo bidimensional.

O composto 1,3-bis(4-carboxifenil)triazeno (**2**) cristaliza no sistema monoclinico, grupo espacial $P2_1/c$, com parâmetros de cela $a = 23,168(2)\text{Å}$, $b = 3,7398(4)\text{Å}$, $c = 19,751(2)\text{Å}$, $\beta = 100,912(6)^\circ$, $V = 1680,3(3)\text{Å}^3$, $Z = 4$, $R_1 = 0,0764$, $wR_2 = 0,2425$. A estrutura cristalina do pró-ligante (**2**) revela que a molécula não é planar (r.m.s. $0,2071\text{Å}$) e que, as moléculas unem-se por ligações de hidrogênio na direção cristalográfica [010] e com as moléculas de água na direção cristalográfica [001]. As ligações de hidrogênio são do tipo clássicas N–H---O, O–H---O, O–H---N, que se relacionam por operações de simetria formando uma arranjo bidimensional.

O complexo 3-(4-carboxilatofenil)-1-metiltriazeno 1-óxido de potássio tetraidratado (**4**) cristaliza no sistema monoclinico, grupo espacial $P2_1/c$, com parâmetros de cela $a = 12,695\text{Å}$, $b = 8,123\text{Å}$, $c = 13,520\text{Å}$, $\beta = 106,71^\circ$, $V = 1335,3\text{Å}^3$, $Z = 4$, $R_1 = 0,0554$, $wR_2 = 0,1705$. Na estrutura cristalina do complexo (**4**), a esfera de coordenação do íon K⁺ é formada por oito átomos de oxigênio, um do ligante triazeno 1-óxido protonado, um da molécula de água terminal e seis das moléculas de água em ponte. O polímero originado, com número de coordenação oito, apresenta uma distorção da estrutura semelhante ao enxofre elementar S₈ na conformação de barco com a simetria ideal C_{2v}.

Além das análises estruturais em monocristal, o pró-ligante (**1**) foi caracterizado adicionalmente por ponto de fusão, espectrometria no infravermelho, ressonância magnética nuclear de ¹H e ¹³C e também na região do ultravioleta, o pró-ligante (**2**) ponto de fusão, e o complexo (**4**) por ponto de fusão e espectrometria na região do infravermelho e ultravioleta.

Em relação à atividade biológica, o pró-ligante (**1**) revela capacidade bacteriostática na concentração de 16µg/mL e bactericida em 32µg/mL frente a bactéria *S. agalactiae*, e o pró-ligante 1-(4-etoxifenil)-3-(4-carboxifenil)triazeno (**3**) é capaz de clivar o DNA plasmidial pUC18, na proporção de 17,03%, com a concentração de 1,25mM.

Palavras-chaves: triazeno 1-óxido, complexo de K⁺, atividade biológica.

ABSTRACT

Master Dissertation in Chemistry
Graduated Chemistry Program
Federal University of Santa Maria

SYNTHESIS, STRUCTURE OF TRIAZENE 1-OXIDE AND COMPLEX OF K^+ , AND EVALUATION OF BIOLOGICAL ACTIVITY OF 1-METILTRIAZENES 1-OXIDE AND 1,3-BIS(ARIL)TRIAZENES

AUTHOR: ALINE JOANA ROLINA WOHLMUTH ALVES DOS SANTOS

ACADEMIC SUPERVISOR: PROF. DR. MANFREDO HÖRNER

Santa Maria, december, 19th, 2005.

This work is associated with the crystal and molecular structure analysis of two free triazene 1-oxide molecules and a complex with K^+ involving a *p*-carboxyphenil-substituted single protonated triazene 1-oxide ligand.

1-metil-3-(*p*-carboxyphenyl)triazene 1-oxide (**1**) crystallizes in the monoclinic system, space group $C2/c$, with cell parameters $a = 27.2046(8) \text{ \AA}$, $b = 5.0218(1) \text{ \AA}$, $c = 14.4503(5) \text{ \AA}$, $\beta = 113.13(1)^\circ$, $V = 1815.47(9) \text{ \AA}^3$, $Z = 8$, $R_1 = 0.0325$, $wR_2 = 0.0977$. The crystal structure demonstrate that the molecule deviate slightly from planarity (r.m.s. 0.0192 \AA). The molecules are associated in form of a bidimensional supramolecular array in the [100] and [001] crystallographic directions *via* classic hydrogen bonds, $N-H \cdots O$ e $O-H \cdots O$.

1,3-bis(4-carboxyphenyl)triazene (**2**) crystallizes in the monoclinic system, space group $P2_1/c$, with cell parameters $a = 23.168(2) \text{ \AA}$, $b = 3.7398(4) \text{ \AA}$, $c = 19.751(2) \text{ \AA}$, $\beta = 100.912(6)^\circ$, $V = 1680.3(3) \text{ \AA}^3$, $Z = 4$, $R_1 = 0.0764$, $wR_2 = 0.2425$. The crystal structure show that the molecule deviates significantly from planarity (r.m.s. 0.2071 \AA). Also in this case, the molecules (**2**) are associated in form of a bidimensional supramolecular array constituted by helix chains including classic hydrogen bonds with water molecules, operated by a 2_1 axial screw-axis along the [010] crystallographic direction, and a c axial glide-plane in the [001] crystallographic direction.

The complex 3-(4-carboxyphenyl)-1-metiltriazene 1-oxide of potassium tetrahydratade (**4**) crystallizes in the monoclinic system, space group $P2_1/c$, with cell parameters $a = 12.695 \text{ \AA}$, $b = 8.123 \text{ \AA}$, $c = 13.520 \text{ \AA}$, $\beta = 106.71^\circ$, $V = 1335.3 \text{ \AA}^3$, $Z = 4$, $R_1 = 0.0554$, $wR_2 = 0.1705$. The single crystal structure analysis demonstrate that the coordination sphere of the K^+ ion include eight oxygen atoms belonging to the carboxyphenyl deprotonated triazene ligand, and seven water molecules. The coordination geometry identified correspond an S_8 molecule with a distorted boat conformation.

Additionally, molecule (**1**) were characterized by melting point and spectroscopic methods (IR, UV/VIS and multinuclear NMR), molecule (**2**) by melting point and complex (**4**) by melting point and spectroscopic methods (IR and UV/VIS).

In connection with biological activity, molecule (**1**) demonstrate bacteriostatic activity (concentration of $16 \mu\text{g/mL}$), and acts as bactericide (concentration of $32 \mu\text{g/mL}$) in relation to the bacterium *S. agalactiae*. 1-(4-etoxyphenyl)-3-(4-carboxyphenyl)triazene (**3**) (concentration of $1,25 \text{ mM}$) demonstrate 17,03% cleavage ability in relation to the plasmidial DNA pUC18.

Keywords: triazene 1-oxide, complex of K^+ , biological activity.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	6
RESUMO	7
ABSTRACT	8
SUMÁRIO	9
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS	16
LISTA DE ABREVIATURAS	18
1. INTRODUÇÃO	19
1.1 Triazenos	20
1.1.1 Triazenos 1-óxido.....	21
1.2. Química de Coordenação	22
1.3 Ligações de Hidrogênio	23
2. OBJETIVOS	25
3. REVISÃO DA LITERATURA	26
3.1. Triazenos de Importância Farmacológica	26
3.2. Triazenos 1-óxido	33
3.3. Complexos de Coordenação com Triazenos 1-óxido	35
3.4. Complexo de Coordenação entre Triazeno e Potássio	37
4. MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1. Aparelhagem e Materiais Utilizados	39
4.2. Síntese e Caracterização dos Pró-ligantes Triazenos	40
4.2.1. Pró-ligante 1-metil-3-(<i>p</i> -carboxifenil)triazeno 1-óxido (1).....	40
4.2.2. Pró-ligante 1,3-bis(4-carboxifenil)triazeno (2).....	41
4.2.3. Pró-ligante 1-(4-etoxifenil)-3-(carboxifenil)triazeno (3).....	42
4.3. Síntese e Caracterizações do Complexo	43
4.3.1. Complexo 3-(4-carboxilatofenil)-1-metiltriazeno 1-óxido de potássio tetraidratado (4)	43
4.4. Avaliação da Atividade Biológica	44
4.4.1. Pró-ligante 1-metil-3-(<i>p</i> -carboxifenil)triazeno 1-óxido (1).....	44
4.4.1.1. Atividade Bacteriostática e Bactericida.....	44
4.4.1.2. Capacidade de Clivagem de DNA Plasmidial Dupla Fita.....	44
4.4.2. Pró-ligante 1,3-bis(4-carboxifenil)triazeno (2).....	45
4.4.2.1. Atividade Bacteriostática.....	45

4.4.3. Pró-ligante 1-(4-etoxifenil)-3-(carboxifenil)triazeno (3).....	46
4.4.3.1. Atividade Bacteriostática.....	46
4.4.3.2. Capacidade de Clivagem de DNA Plasmidial Dupla Fita.....	46
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
5.1. Pró-ligante 1-metil-3-(<i>p</i>-carboxifenil)triazeno 1-óxido (1).....	47
5.1.1. Espectrometria de Infravermelho.....	47
5.1.2. Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear.....	48
5.1.3. Espectrometria no Ultravioleta-Visível.....	50
5.1.3.1. Determinação da Pureza da Amostra.....	53
5.1.4. Atividade Bacteriostática e Bactericida.....	54
5.1.5. Capacidade de Clivagem de DNA Plasmidial Dupla Fita.....	56
5.1.6. Análise Estrutural por Difração de Raios-X em Monocristal.....	57
5.2. Pró-ligante 1,3-bis(4-carboxifenil)triazeno (2).....	65
5.2.1. Atividade Bacteriostática.....	65
5.2.2. Análise Estrutural por Difração de Raios-X em Monocristal.....	66
5.3. Pró-ligante 1-(4-etoxifenil)-3-(carboxifenil)triazeno (3).....	73
5.3.1. Atividade Bacteriostática.....	73
5.3.2. Capacidade de Clivagem de DNA Plasmidial Dupla Fita.....	77
5.4. Complexo 3-(4-carboxilatofenil)-1-metiltriazeno 1-óxido de potássio tetraidratado (4).....	77
5.4.1. Espectrometria no Infravermelho.....	77
5.4.2. Espectrometria no Ultravioleta-Visível.....	79
5.4.3. Análise Estrutural por Difração de Raios-X em Monocristal.....	81
6. CONCLUSÕES.....	92
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- Composto triazeno genérico, sendo R = alquil, fenil, aril; $R_1 = R_2$; $R_1 \neq R_2$	20
FIGURA 2- Composto 1,3-bis(feniltriazeno).....	20
FIGURA 3- Fórmula estrutural de um anel quelato inorgânico entre triazeno 1-óxido e centro metálico M^{+n} , sendo R = alquil, fenil, aril.....	21
FIGURA 4- Representação estrutural da tautomeria existente entre triazeno 1-óxido (I) e 3-hidroxitriazeno (II).....	22
FIGURA 5- Principais modos de coordenação dos compostos triazenos. (a)Coordenação monodentada e protonada, (b)Coordenação monodentada e desprotonada, (c)Quelante bidentado, (d)Coordenação em ponte, (e)Coordenação simultânea como quelante bidentado e como ponte $\eta^1(N1), \eta^1(N3)$	23
FIGURA 6- Ligações de hidrogênio.(a)doador bifurcado, (b)acceptor bifurcado.....	24
FIGURA 7- Fórmula estrutural da Dacarbazina® [5-(3,3-dimetil-1- triazeno) imidazol-4-carboxamida].....	26
FIGURA 8- Desmetilação oxidativa para 1 - aril - 3,3 - dimetiltriazenos, considerando X= -CN, -COOEt, -CH ₃ ,	27
FIGURA 9- Hidrólise da TEM®.....	28
FIGURA 10- Hidrólise de ZCRM5.....	29
FIGURA 11- Fórmula estrutural do Berenil® [4,4'-(1-triazeno-1,3-diil) dibenzamina-bis(N-acetilglicinato)].....	30
FIGURA 12- Interação do complexo Berenil-(CGATCGATCG) ₂ no DNA . (a) e (b)Intercalação parcial da droga entre os sítios GC, (c) e (d)Pseudointercalação do Berenil no maior sulco da dupla fita	

de DNA.....	30
FIGURA 13- Intercalação no DNA promovida pelo intercalador clássico Brometo de Etídio.....	31
FIGURA 14- Fórmula estrutural do complexo Pt-Berenil, $[Pt_2Cl_4(berenil)_2]Cl_4$	32
FIGURA 15- Fórmula estrutural dos compostos (a)1,3-bis(4-carboxifenil)triazeno e (b)3-(4-carboxifenil)-1-(4- amidinofenil)triazeno.....	32
FIGURA 16- Fórmula estrutural do composto 3-(<i>o</i> -carboxifenil)-1-feniltriazeno 1-óxido.....	33
FIGURA 17- Fórmula estrutural do composto 3-(<i>o</i> -carboxifenil)-1-metiltriazeno 1-óxido.....	33
FIGURA 18- Fórmula estrutural do composto 3-(<i>o</i> -carboxifenil)-1-etiltriazeno 1-óxido.....	34
FIGURA 19- Fórmula estrutural dos compostos (a)3- hidroxi-3- <i>o</i> -toluil-1-(<i>o</i> -carboxifenil)triazeno e (b)3-hidroxi-3- <i>p</i> -toluil-1-(<i>o</i> -carboxifenil) triazeno.....	34
FIGURA 20- Fórmula estrutural do composto 3-(<i>p</i> -nitrofenil)-1- metiltriazeno 1-óxido.....	35
FIGURA 21- Fórmula estrutural do composto 3 - (<i>p</i> -etilcarboxifenil) -1-feniltriazeno 1-óxido.....	35
FIGURA 22- Fórmula estrutural do composto 3-(<i>p</i> -carboxifenil)-1-feniltriazeno 1-óxido.....	35
FIGURA 23- Projeção da estrutura cristalina do complexo 3,3'-dimetoxi-4,4'-bis(3- metiltriazeno- 3-óxido)-difetil-di- cobre(II).....	36
FIGURA 24- Projeção da estrutura cristalina do complexo envolvendo íon cobre(II), tioéter, triazeno 1-óxido e uma molécula de cristalização de diclorometano.....	37
FIGURA 25- Projeção da estrutura cristalina do complexo formado entre 1,3-bis (4-metilfenil)triazeno e o íon potássio.....	38
FIGURA 26- Espectro no Infravermelho do pró-ligante (1), em KBr, na região de 400 a 4000 cm^{-1}	47
FIGURA 27- Espectro de RMN de 1H (300 MHz) do pró-ligante (1), em DMSO- d_6	49
FIGURA 28- Espectro de RMN de ^{13}C (75,53 MHz) do pró - ligante (1), em DMSO- d_6	50
FIGURA 29- Espectro no UV-VIS do pró-ligante (1), em etanol, na região de 200	

a 500nm.....	51
FIGURA 30- Espectro no UV-VIS do ácido <i>p</i> -aminobenzóico, em etanol, na região de 200 a 500nm.....	51
FIGURA 31- Espectro no UV-VIS da <i>n</i> -metil-hidroxilamina-hidroclorato, em etanol, na região de 200 a 500nm.....	52
FIGURA 32- Espectro no UV-VIS da anilina, em etanol, na região de 200 a 500nm.....	52
FIGURA 33- Espectro no UV-VIS do pró-ligante (1), em etanol, na região de 200 a 500nm.....	53
FIGURA 34- Espectro no UV-VIS do pró-ligante (1) da Figura 33 contaminado com mínima quantidade de ácido <i>p</i> -aminobenzóico, na região de 200 a 500nm.....	53
FIGURA 35- Espectro no UV-VIS do pró-ligante (1) da Figura 33 contaminado com mínima quantidade de <i>n</i> -metil-hidroxilamina-hidroclorato, na região de 200 a 500nm.....	54
FIGURA 36- Eletroforese em gel de agarose do pró-ligante (1) utilizando DNA plasmidial pBSKII. Da esquerda para a direita, conforme os números 1 a 6, tem-se as concentrações: 0; 3,15; 1,88; 1,25; 0,75; 0,375mM.....	57
FIGURA 37- Fórmula estrutural do pró-ligante 1-metil-3-(<i>p</i> -carboxifenil)triazeno 1-óxido (1) no estado sólido.....	62
FIGURA 38- Projeção da estrutura molecular do pró – ligante 1-metil-3-(<i>p</i> -carboxifenil)triazeno 1-óxido (1) (ORTEP ⁷²).....	62
FIGURA 39- Projeção de uma cadeia independente de moléculas de pró-ligante (1) na direção [010]. As ligações intermoleculares N–H-----O e O–H-----O estão representadas por linha pontilhadas (DIAMOND ⁷³).....	64
FIGURA 40- Projeção na direção cristalográfica [010] evidenciando a disposição das moléculas de pró-ligante (1) na cela unitária na forma de cadeias independentes unidas através de centros de inversão (DIAMOND ⁷³).....	65
FIGURA 41- Fórmula estrutural do pró-ligante 1,3-bis(4-carboxifenil)triazeno (2).....	70
FIGURA 42- Projeção da estrutura molecular do 1,3-bis(4-carboxifenil)triazeno (2) incluindo uma molécula de água de cristalização (ORTEP ⁷²).....	71
FIGURA 43- Projeção da estrutura molecular do pró-ligante (2), incluindo	

ligações de hidrogênio, representadas por linhas pontilhadas, entre as moléculas de trizenos e água mais próximas (DIAMOND ⁷³)	74
FIGURA 44- Projeção do corte do arranjo bidimensional na direção cristalográfica [010], evidenciando as ligações de hidrogênio entre as moléculas de pró-ligante (2) e os operadores de simetria 2_1 em: $1/2, 0, 1/4$ e $1/2, 0, 3/4$, e -1 em $1/2, 0, 0$; $1/2, 0, 1/2$ e $1/2, 0, 1$ (DIAMOND ⁷³).....	75
FIGURA 45- Projeção do corte do arranjo bidimensional na direção cristalográfica [100], evidenciando as ligações de hidrogênio entre as moléculas de pró-ligante (2) e os operadores de simetria 2_1 em: $0, 0, 3/4$, e c em $0, 0, 1/4$ (DIAMOND ⁷³).....	76
FIGURA 46- Eletroforese em gel de agarose do pró-ligante (3) utilizando DNA plasmidial pBSKII. Da esquerda para a direita, conforme os números 1 a 4, tem-se as concentrações: 0; 0,375; 0,75; 1,25mM	77
FIGURA 47- Espectro no Infravermelho do complexo (4), em KBr, na região de 400 a 4000cm ⁻¹	78
FIGURA 48- Espectro no UV -VIS do pró-ligante (1) desprotonado, em metanol, na região de 200 a 500nm.	79
FIGURA 49- Espectro no UV - VIS do pró - ligante (1) protonado, em metanol, na região de 200 a 500nm.....	80
FIGURA 50- Espectro no UV-VIS do complexo (4), em metanol, na região de 200 a 500nm.....	80
FIGURA 51- Espectro no UV-VIS do hidróxido de potássio, em metanol, na região de 200 a 500nm.....	81
FIGURA 52- Fórmula estrutural do complexo 3-(4-carboxilatofenil)-1-metiltriazeno 1-óxido de potássio tetraidratado (4) ([C ₈ H ₈ N ₃ O ₃] ⁻ K ⁺ ·4H ₂ O)	86
FIGURA 53- Projeção da estrutura molecular do par iônico (ligante ⁻ e K ⁺) do complexo (4) ([C ₈ H ₁₆ N ₃ O ₇] ⁻ K ⁺ ·4H ₂ O), incluindo a interação de quatro moléculas de água e do átomo de oxigênio do ligante 3-(4-carboxilatofenil)-1-metiltriazeno 1-óxido com o íon potássio (ORTEP ⁷²).....	87
FIGURA 54- Projeção do complexo [C ₈ H ₁₆ N ₃ O ₇] ⁻ K ⁺ ·4H ₂ O (4) na direção cristalográfica [001], evidenciando o eixo de rotação-translação 2_1	

paralelo ao eixo cristalográfico b (DIAMOND ⁷³).....	90
FIGURA 55- Geometria de coordenação do íon potássio no complexo (4) ([C ₈ H ₉ N ₃ O ₃] ⁻ K ⁺ ·4H ₂ O), análoga ao S ₈ (conformação tipo barco) (DIAMOND ⁷³).....	91

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- Principais bandas para o pró-ligante (1) , observadas no espectro de infravermelho da Figura 26.....	48
TABELA 2- Determinação do CIM e CBM do pró - ligante (1) frente a diversas bactérias.....	54
TABELA 3- Condições de reflexão observadas para a rede com simetria monoclinica do pró- ligante (1) , pertencente ao grupo espacial $C2/c$	58
TABELA 4- Coordenadas atômicas e parâmetros de deslocamentos térmicos isotrópicos equivalentes dos átomos não hidrogenóides, (U_{eq}) ($\text{Å}^2 \times 10^3$), do pró - ligante (1) ($C_8N_3O_3H_9$). Desvio-padrão entre parênteses.....	59
TABELA 5- Dados da coleta de intensidade e do refinamento da estrutura cristalina/molecular do pró-ligante (1) ($C_8N_3O_3H_9$). Desvio - padrão entre parênteses.....	61
TABELA 6- Ângulos interplanares ($^\circ$) entre os principais fragmentos da molécula 1-metil-3-(<i>p</i> -carboxifenil)triazeno 1-óxido (1)	62
TABELA 7- Comprimentos de ligação (Å) e ângulos de ligação ($^\circ$) selecionados para o pró - ligante (1) ($C_8 H_9 N_3 O_3$). Desvio – padrão entre parênteses.....	63
TABELA 8- Condições de reflexão observadas para a rede com simetria monoclinica do pró - ligante (2) , pertencente ao grupo espacial $P2_1/c$	66
TABELA 9- Coordenadas atômicas e parâmetros de deslocamentos térmicos isotrópicos equivalentes dos átomos não hidrogenóides, (U_{eq})	

($\text{\AA}^2 \times 10^3$) do pró-ligante (2) ($\text{C}_{14} \text{H}_{11} \text{N}_3 \text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) . Desvio-padrão entre parênteses.....	67
TABELA 10- Dados da coleta de intensidades e do refinamento da estrutura cristalina/molecular do pró-ligante (2) ($\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$). Desvio-padrão entre parênteses.....	69
TABELA 11-Ângulos interplanares ($^\circ$) entre os principais fragmentos da molécula 1,3-bis(4-carboxifenil)triazeno (2)	71
TABELA 12- Comprimentos de ligação (\AA) e ângulos de ligação ($^\circ$)selecionados para o pró-ligante (2) ($\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$). Desvio - padrão entre parênteses.....	72
TABELA 13- Principais bandas para o complexo (4) , observadas no espectro de infravermelho da Figura 47.....	78
TABELA 14- Condições de reflexão observadas para a rede com simetria monoclinica do complexo (4) , pertencente ao grupo espacial $P2_1/c$	82
TABELA 15- Coordenadas atômicas e parâmetros de deslocamentos térmicos isotrópicos equivalentes dos átomos não-hidrogenóides, (U_{eq}) ($\text{\AA}^2 \times 10^3$), do complexo (4) ($[\text{C}_8 \text{H}_8 \text{N}_3 \text{O}_3]^- \text{K}^+ \cdot 4\text{H}_2\text{O}$). Desvio-padrão entre parênteses.....	83
TABELA 16-Dados da coleta de intensidades e do refinamento da estrutura cristalina / molecular do complexo (4) ($[\text{C}_8 \text{H}_8 \text{N}_3 \text{O}_3]^- \text{K}^+ \cdot 4\text{H}_2\text{O}$). Desvio-padrão entre parênteses.....	85
TABELA 17-Comprimentos de ligação (\AA) e ângulos de ligação ($^\circ$) selecionados para o complexo (4) ($[\text{C}_8 \text{H}_8 \text{N}_3 \text{O}_3]^- \text{K}^+ \cdot 4\text{H}_2\text{O}$). Desvio-padrão entre parênteses.....	87
TABELA 18-Dados geométricos que descrevem a interação do íon K_1 com os seus vizinhos mais próximos, K_{1_1} e K_{1_2} , através das ligações em ponte e terminais formadas pelas moléculas de água com as moléculas do complexo (4) . Desvio-padrão entre parênteses.....	89

LISTA DE ABREVIATURAS

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

TEM – Temozolamida®

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CBM – Concentração Bactericida Mínima

DME – Dimetoxietano

DMSO – Dimetilsufóxido

Py – Piridina

THF – Tetrahydrofurano

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

UV-VIS – Região no Ultravioleta-visível

HUSM – Hospital Universitário de Santa Maria

ATCC – American Type Culture Collection

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute

NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards

ESBL – Betalactamases de Espectro Ampliado

ϵ – Coeficiente de Absortividade Molar

A – Adenina

C – Citosina

T – Timina

G – Guanina

Å – Angström ($1\text{Å} = 10^{-8}\text{cm}$)

bp – pares de bases (de nucleotídeos)

1. INTRODUÇÃO

Desde quando os compostos inorgânicos começaram a serem estudados, e a partir do momento em que os métodos de análise propiciaram a realização de estudos mais detalhados, uma preocupação com relação às ações e funções destes compostos nos organismos vivos foi gerada. Assim, a partir de 1960, surgiu a Química Bioinorgânica, uma área independente e de alta disciplinaridade¹.

Essa disciplinaridade envolve a física através de técnicas de detecção e caracterização, várias áreas da biologia pelo fornecimento dos materiais e detecção das reações mutagênicas celulares, agricultura e ciências nutricionais através do estudo dos efeitos dos elementos inorgânicos na interdependência mútua, farmacologia no estudo da interação entre as drogas e as substâncias inorgânicas endógenas ou exógenas, medicina através do diagnóstico de doenças e quimioterapia, toxicologia pelo potencial tóxico de compostos inorgânicos, microbiologia através de experimentos *in vitro*, bioquímica pelo estudo da função biológica e especificidade, e fisiologia pela determinação do mecanismo de ação *in vivo*¹.

Neste trabalho, a interdisciplinaridade será evidenciada através da química do nitrogênio, isto é, através dos grupos aminos formadores de cadeias triazenídicas, e através de metais estratégicos complexados a estes grupos.

Aminas primárias, secundárias e terciárias são grupos fisiológicos de extrema importância, sendo constituintes de aminoácidos que são unidades estruturais das proteínas, de bases nucleotídeas que em conjunto com grupos fosfatos e açúcares formam os nucleotídeos, de enzimas e também de neurotransmissores.

Os grupos aminos são amplamente utilizados em sínteses experimentais de novos compostos, aproveitando-se do fato de possuírem sítios específicos de ação nas membranas celulares e capacidade de formarem ligações de hidrogênio.

Devido a isso, as aminas estão presentes, por exemplo, em medicamentos antineoplásicos, podendo-se citar os agentes alquilantes, dos quais fazem parte os triazenos², que são o foco principal deste trabalho. Esta classe de medicamentos transfere, sob condições fisiológicas, grupos alquil aos sítios eletrofílicos no DNA.

Os antineoplásicos são medicamentos utilizados no tratamento contra o câncer, sendo esse, um termo genérico utilizado para descrever uma coleção de cerca de 150 doenças diferentes, caracterizadas por uma rápida e anormal divisão celular do tecido e pela migração de células cancerígenas (metástase) para partes do corpo distantes da origem. Com a rápida e

desnecessária divisão celular, logo forma-se um excesso de tecido, conhecido como tumor, podendo este, ser benigno ou maligno³.

Compostos triazenos apresentam ampla aplicação terapêutica, com propriedades antitumorais, antimetastáticas, imunossupressoras⁴, antitripanossômicas^{5,6} e antilinfomas⁷. São bastante agressivos às células, sendo também relatados pela literatura, como citotóxicos⁸, mutagênicos⁹, teratogênicos¹⁰ e carcinogênicos^{11,12}.

Triazenos também são alvo de estudos químicos e cristalográficos envolvendo diversos metais estratégicos, principalmente com papel bioinorgânico importante, assim, neste momento serão abordados alguns aspectos de importância dos triazenos, que mais se aproximam dos resultados a serem discutidos neste trabalho.

1.1. Triazenos

Os triazenos são espécies químicas que envolvem cadeias abertas contendo três átomos de nitrogênio interligados em seqüência¹³, como observado na Figura 1. Estas cadeias de nitrogênio podem ser facilmente estabilizadas através da derivação com substituintes orgânicos nos nitrogênios terminais, levando à formação de diversos análogos.

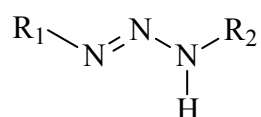


Figura 1. Composto triazeno genérico, sendo R = alquil, fenil, aril; $\text{R}_1 = \text{R}_2$; $\text{R}_1 \neq \text{R}_2$ ¹³.

O primeiro triazeno descrito pela literatura foi o 1,3-bis(feniltriazeno), em 1859¹⁴, sendo a fórmula estrutural visualizada pela Figura 2.

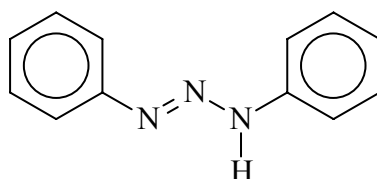


Figura 2. Composto 1,3-bis(feniltriazeno)¹⁴.

Substituintes aromáticos contribuem para a estabilização da cadeia nitrogenada através dos efeitos indutivos e mesoméricos, porém, na literatura também são descritos compostos triazenos com substituintes alifáticos¹⁴ e heteroátomos¹⁵.

Triazenos são geralmente sintetizados por diazotação de uma amina primária aromática, seguido do acoplamento do sal de diazônio correspondente com uma amina secundária, formando o produto desejado com rendimento considerável: $\text{ArN}_2^+ + \text{Ar}'\text{NH}_2 \rightarrow \text{ArN}=\text{N}-\text{N}(\text{H})\text{Ar}'$ ¹⁶.

A química contemporânea dos triazenos tem sido revisada, e a importância dos triazenos tem se destacado devido à versatilidade das sínteses orgânicas que dão origem a estes compostos¹⁶.

1.1.1. Triazenos 1-óxido

Triazenos 1-óxido são moléculas que apresentam um átomo de oxigênio vinculado ao átomo N₁ da cadeia diazoamínica através de uma ligação covalente dativa. São uma classe de pró-ligantes bidentados que formam “anéis quelatos inorgânicos” (sem carbono), de cinco membros e estáveis, quando coordenados a centros metálicos¹⁷, como evidenciado pela Figura 3.

A obtenção dos triazenos 1-óxido ocorre por rotas sintéticas relativamente simples, envolvendo o acoplamento de hidroxilaminas N-substituídas e sais de diazônio¹⁸. Assim, torna-se possível a alteração dos grupamentos R e X, no sistema ligante, por substituintes com diferentes tamanhos e efeitos polares.

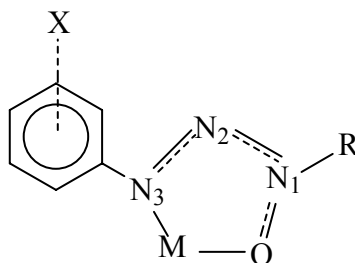


Figura 3. Fórmula estrutural evidenciando um anel quelato inorgânico formado entre triazeno 1-óxido e centro metálico M^{+n} , sendo R = alquil, fenil, aril¹⁷.

O efeito polar dos substituintes R e X dos pró-ligantes pode influenciar suas propriedades eletrônicas. Já o tamanho do grupamento R e a presença de grupamento *o*-metílico controlam convenientemente a possibilidade de interações intermoleculares¹⁹ e intramoleculares.

Os triazenos 1-óxido sofrem efeitos de tautomeria. Pela Figura 4 observam-se estes efeitos, sendo que no estado sólido adquirem preferencialmente a forma tautômera (I) de triazenos 1-óxido e em solução podem adquirir a forma tautômera (II) de 3-hidroxitriazenos.

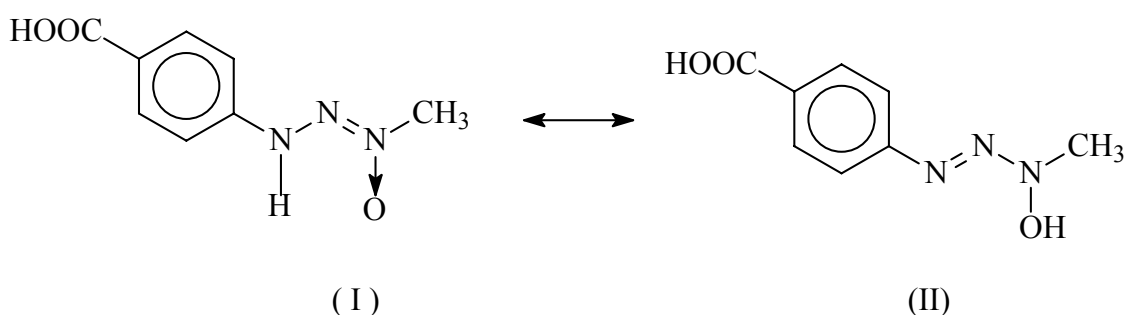


Figura 4. Representação estrutural da tautomeria existente entre triazeno 1-óxido (I) e 3-hidroxitriazeno (II).

A obtenção do primeiro complexo metálico envolvendo um ligante do tipo triazeno 1-óxido foi relatado em 1938²⁰. Desde então, o interesse em torno da formação e propriedades destes compostos têm aumentado, o que se evidencia pela síntese de novos pró-ligantes²¹.

1.2. Química de Coordenação

Os triazenos permitem diversos modos de coordenação devido à geometria molecular e presença de sítios doadores de elétrons (basicidade de Lewis), que viabilizam a obtenção de um grande número de complexos com diferentes cátions metálicos.

Pela Figura 5, constata-se que as moléculas de triazeno podem coordenar-se aos centros metálicos de diferentes maneiras.

Os ligantes triazenos atuam mais frequentemente como ponte $\eta^1(N1)$, $\eta^1(N3)$, conforme Figura 5(d), entre dois centros metálicos. A coordenação em ponte favorece a

formação de complexos com ligação intermetálica, sendo estudada em espécies homo e heterometálicas, que resultam na formação de complexos multinucleados.

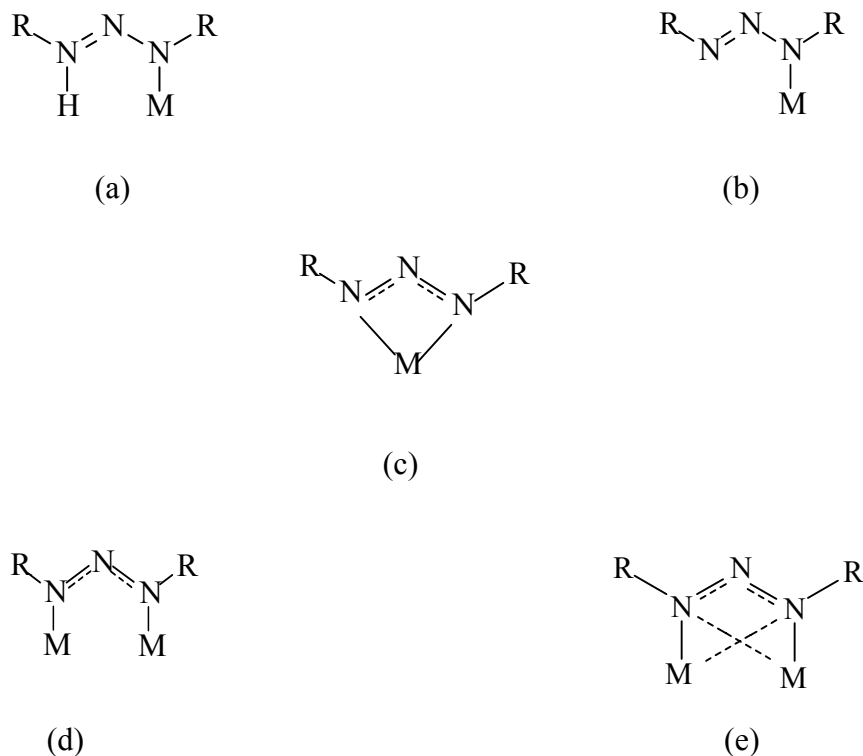


Figura 5. Principais modos de coordenação dos compostos triazenos. (a)Coordenação monodentada e protonada, (b)Coordenação monodentada e desprotonada, (c)Quelante bidentado, (d)Coordenação em ponte²², (e) Coordenação simultânea como quelante bidentado e em ponte²³.

1.3. Ligações de Hidrogênio

As estruturas cristalinas obtidas neste trabalho apresentam ligações de hidrogênio clássicas formando arranjos supramoleculares. Por isso faz-se necessário uma breve explicação sobre este tipo de ligação.

Ligações de hidrogênio são consideradas atrações eletrostáticas fracas entre um par isolado de elétrons de um elemento químico eletronegativo e um átomo de hidrogênio ligado covalentemente e que tenha uma carga parcial positiva²⁴. São de grande importância para os organismos, pois através delas ocorrem as interações entre as moléculas necessárias à sobrevivência celular. Dentre essas, pode-se citar as ligações entre as bases nucleotídeas nos

ácidos nucleicos e também, as ligações dos grupos ativos dos medicamentos nos sítios de ação celulares, manifestando a ação terapêutica.

A evidência destas ligações se dá, preferencialmente, através de estudos de difração de raios-X, difração de nêutrons, espectros de ressonância magnética nuclear e também, de espectros de absorção no infravermelho²⁵.

São constituídas, em geral, por um grupo doador (X-H) e por um grupo receptor (A), sendo referida pela forma (X-H·····A). Podem ser classificadas, de acordo com parâmetros geométricos, em ligações de hidrogênio com doador bifurcado e com acceptor bifurcado, como observado na Figura 6(a) e (b), respectivamente.

A distância da interação H·····A é dependente da natureza de R₁ (átomo ligado ao doador X), de X e de Y^{25, 26}. Estas interações são mais intensas quando X e Y forem N, O ou F, sendo as ligações de hidrogênio mais comuns aquelas, que acontecem da seguinte maneira O-H·····O e N-H·····O. Quando ligados ao H, átomos de P, S, Cl, Br e C, também podem atuar como doadores de prótons, desde que a ligação seja relativamente polar²⁷.

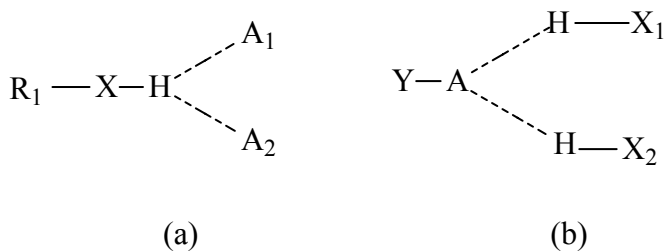


Figura 6. Ligações de hidrogênio.(a)Doador bifurcado e (b)Aceptor bifurcado²⁶.

As ligações de hidrogênio podem ocorrer na forma de ligações intramoleculares e intermoleculares, sendo essas últimas, responsáveis por propriedades físicas como: altos pontos de fusão, ebulição, entalpias de vaporização e sublimação,²⁴ contribuindo também, na formação de compostos supramoleculares^{28,29}.

Assim, a química supramolecular pode ser considerada como a química dos arranjos moleculares e das ligações intermoleculares, sendo portanto, uma generalização da química de coordenação, passível de diferenciação em três níveis de organização estrutural: a estrutura primária a nível molecular, a estrutura secundária que consiste na associação de moléculas e a estrutura terciária que se relaciona ao empacotamento das entidades supramoleculares.

2. OBJETIVOS

O interesse desta pesquisa nos compostos triazenos, mais precisamente nos triazenos 1-óxido, justifica-se pela sua aplicação nos estudos de química de coordenação, isto é, no planejamento e desenvolvimento de novos triazenos que estabilizem complexos, e no potencial biológico, seja pelo estudo da sua capacidade bacteriostática e bactericida ou pelo estudo da sua capacidade em clivar o Ácido Desoxirribonucléico (DNA), com o intuito de revelar novas drogas que apresentem potencial antibiótico e/ou antineoplásico.

Portanto este trabalho possui como objetivos:

- 1) síntese e caracterização do pró-ligante 1-metil-3-(*p*-carboxifenil)triazeno 1-óxido;
- 2) avaliação do modo de coordenação do ligante 1-metiltriazeno 1-óxido com o íon potássio;
- 3) análise por difração de raios-X em monocristal do 1-metil-3-(*p*-carboxifenil)triazeno 1-óxido e do 1,3-bis(4-carboxifenil)triazeno;
- 4) avaliação dos pró-ligantes em relação à atividade bacteriostática e bactericida, e à capacidade de clivagem do DNA plasmidial dupla fita.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Triazenos com Importância Farmacológica

Na década de 60, Shealy, Krauth e Montgomery³⁰ sintetizaram e caracterizaram o primeiro triazeno com comprovada atividade biológica, a Dacarbazina® observada na Figura 7.

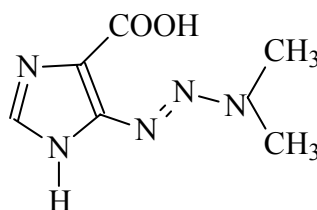


Figura 7. Fórmula estrutural da Dacarbazina® [5-(3,3-dimetil-1-triazeno)imidazol-4-carboxamida]³⁰.

Existem vários mecanismos propostos para elucidar o potencial biológico dos triazenos. Sabe-se que o mecanismo de ação depende necessariamente da estrutura do triazeno, sendo que, derivações nos grupamentos diretamente ligados a cadeia de nitrogênios proporcionam alterações no comportamento destas espécies químicas. É importante lembrar que o meio reacional onde o composto deve atuar, a presença de determinados metabólitos e outras condições fisiológicas, também influenciam na sua atividade³¹.

Diversos estudos foram realizados na tentativa de elucidar o mecanismo de ação da Dacarbazina®, bem como minimizar os efeitos colaterais e aumentar sua biodisponibilidade³². Estes fatores levaram à busca de análogos estruturais da Dacarbazina®, os 1-aryl-3,3-dimetiltriazenos.

Dacarbazina® é prescrita como quimioterápico para melanoma maligno metastático e também para doença de Hodgkin's³³. Sua ação biológica e, em geral dos antineoplásicos 1-aryl-3,3-dimetiltriazenos (**1**), visualizados pela Figura 8, é decorrente da sua capacidade em alquilar o DNA. É uma pró-droga, pois somente após a oxidação metabólica pelas enzimas do citocromo P450 é que se origina o hidroximetiltriazeno (**2**), o qual, com a perda do formaldeído, forma o monometiltriazeno (**3**), que é justamente, a droga ativa³⁴. O inconveniente da necessidade de oxidação metabólica está no fato de que ela diminui o nível da droga no plasma, diminuindo a atividade. A Dacarbazina® é capaz de atacar o DNA e

alquilar suas bases, prevenindo a multiplicação e o crescimento das células tumorais, além de dificultar a síntese de proteínas necessárias à sobrevivência destas células³³.

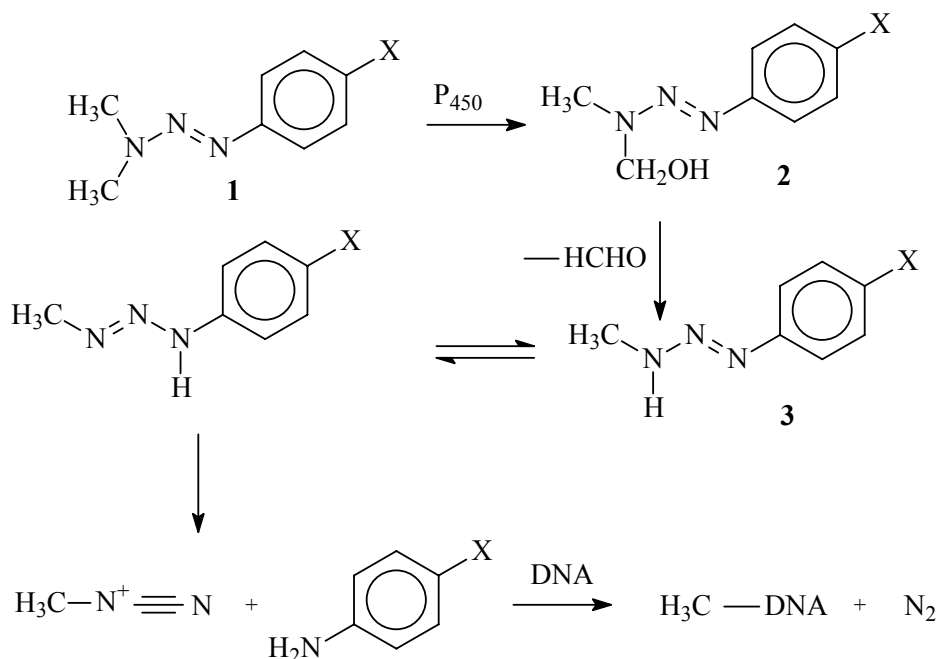


Figura 8. Desmetilação oxidativa para 1-aryl-3,3-dimetiltriazenos, considerando X= -CN, -COOEt, -CH₃, -Br³⁴.

Experimentos envolvendo a administração oral de 1,3-bis(feniltriazeno) em ratos e camundongos, e a análise de amostras de sangue, fezes e urina, evidenciaram que a degradação leva à formação de anilina e benzeno¹¹. Este fato reforça a idéia de que derivados de triazenos com substituintes alquila, como o 1-aryl-3,3-dimetiltriazeno, degradam-se formando agentes alquilantes do DNA, como já demonstrado na Figura 8.

Algumas bases alquiladas causam mutações que podem levar à indução de tumores, assim, para diferenciar os efeitos terapêuticos dos efeitos mutagênicos, Sanada et al.³³ investigaram a ação da Dacarbazina® sobre células humanas e de ratos com genes Mgmt e Mlh1 defeituosos. Estes genes são responsáveis pela codificação da enzima de reparação do DNA chamada de metiltransferase, portanto erros na codificação desta enzima induzem à apoptose celular. Células Mgmt defeituosas são hipersensíveis à ação antineoplásica da Dacarbazina®, já as células defeituosas para ambos os genes, Mgmt e Mlh1, sofrem ações mutagênicas pelo uso da Dacarbazina®. Assim, comprovou-se que a manifestação dos efeitos terapêuticos da Dacarbazina® é controlada pelo gene Mgmt, enquanto que a manifestação dos efeitos mutagênicos é controlada por ambos os genes Mgmt e Mlh1³³.

De acordo com o estudo dos mecanismos de ação dos agentes alquilantes, pode-se afirmar que a obtenção de novas pró-drogas potencialmente ativas como antineoplásicos^{35,36}, genericamente $[(ArN_1N_2N_3(R_1)(R_2))]$, está intimamente relacionada com a estrutura destes compostos. Moléculas deste tipo devem ser quimicamente estáveis, capazes de hidrolisarem-se sob condições fisiológicas e apresentarem, ligado ao N_3 , dois substituintes alquila ($R_1 = R_2$ ou $R_1 \neq R_2$), sendo um deles metabolicamente removível^{37,38}.

Partindo disto, durante a década de 80, na busca por drogas com melhor atividade, o estudo de monometiltriazenos derivados da Dacarbazina® levou ao desenvolvimento da Temozolamida® (TEM)³⁹, que se revelou um efetivo antineoplásico. A Temozolamida® é comercializada na União Européia para pacientes com tumores cerebrais.

Temozolomida® (TEM) (**1**), é um triazeno cíclico capaz de gerar a espécie monometiltriazeno (**2**), por hidrólise em condições levemente alcalinas, sem necessidade de oxidação metabólica, como se visualiza pela Figura 9^{17,34,40}.

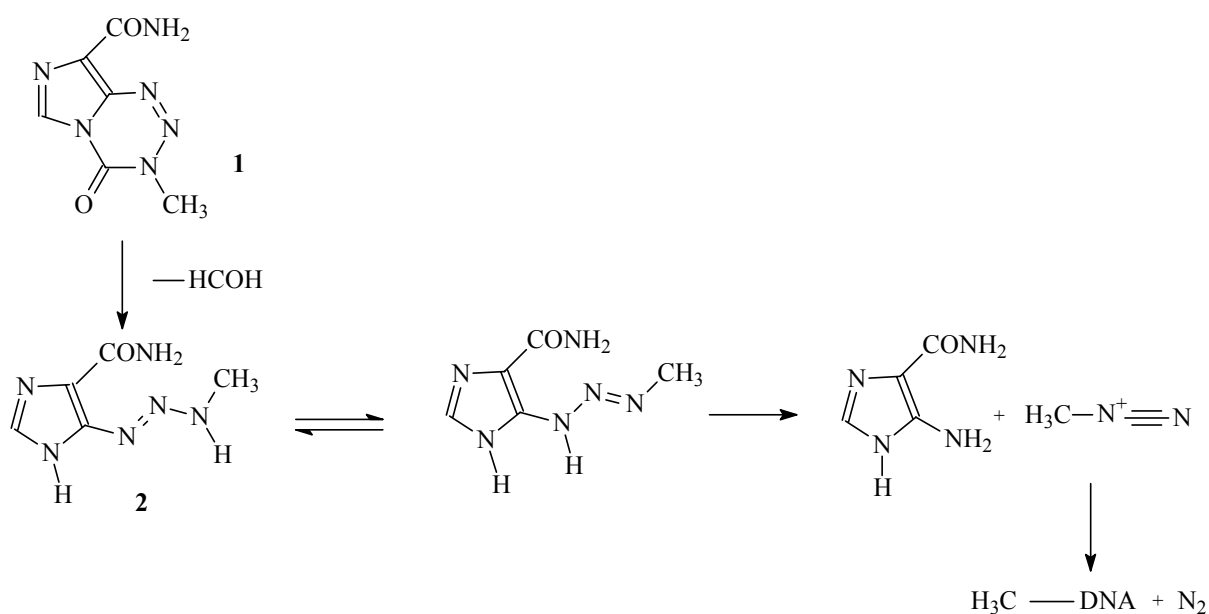


Figura 9. Hidrólise da TEM®¹⁷.

ZRCM5 (**1**), observado na Figura 10, é um hidroximetiltriazeno que também não requer oxidação metabólica para gerar a espécie ativa, a perda do formaldeído já forma o monometiltriazeno (**2**)¹⁷.

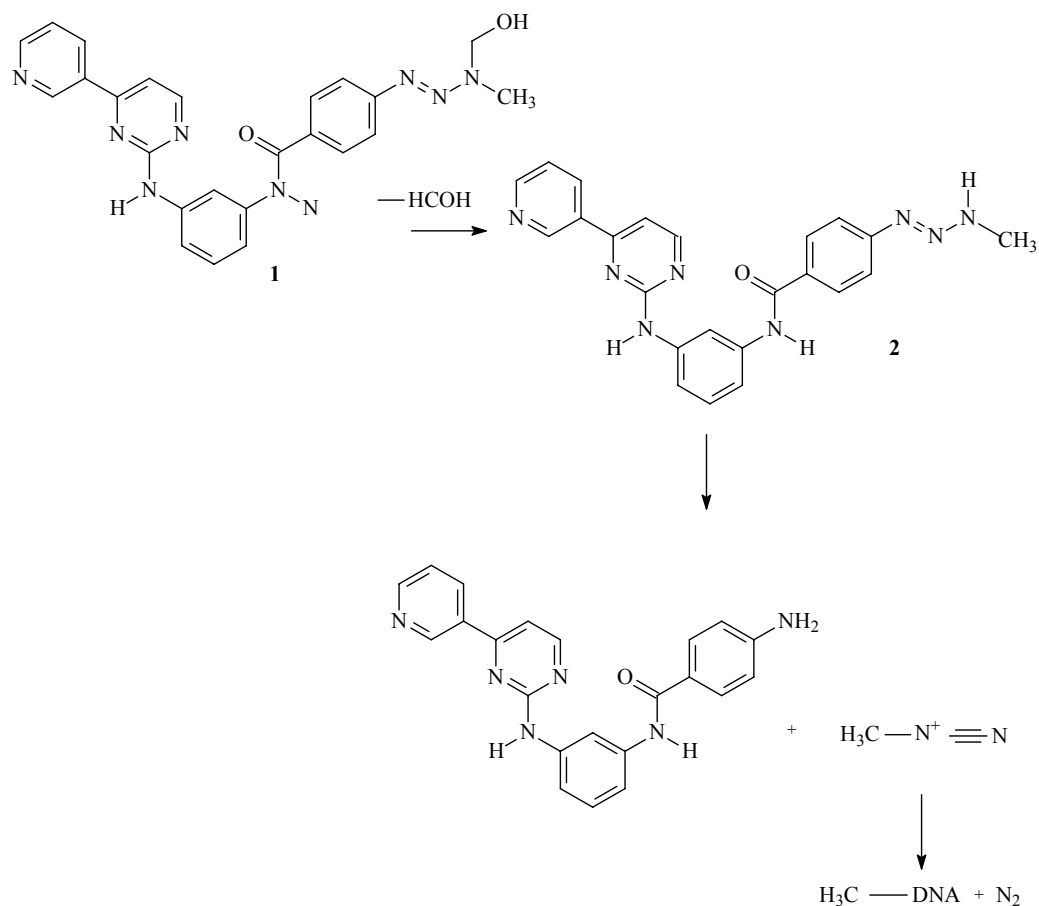


Figura 10. Hidrólise de ZRCM5¹⁷.

Um outro mecanismo de atuação biológica dos triazenos tem como base de estudo o reconhecimento de pequenas seqüências de nucleotídeos, cuja seletividade de interação, muitas vezes, é atribuída à combinação de fatores estéreos, eletrostáticos e de ligações de hidrogênio⁴¹.

Um típico exemplo de composto que atua por interação, ou melhor, intercalação no DNA, observado pela Figura 11, é o 4,4'-(1-triazeno-1,3-diil)dibenzamina-bis(N-acetilglicinato), conhecido como Berenil®. As interações ocorrem entre os grupos amidínicos terminais do Berenil® e sítios específicos do DNA, sem que haja a degradação da cadeia triazenídica⁵. Esta droga tem sido empregada com sucesso no tratamento, de casos na fase inicial, da doença do sono na África causada pelo *Trypanossoma rhodesiense*⁶.

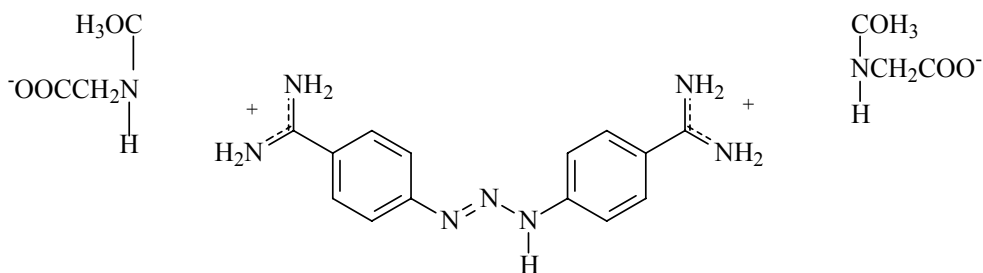


Figura 11. Fórmula estrutural do Berenil® [4,4'-(1-triazeno-1,3-diil)dibenzamina-bis(N-acetilglicinato)]⁵.

O Berenil® atua ligando, preferencialmente, através de ligações de hidrogênio, o seu grupo amidínico aos sítios Adenina-Timina (AT), no sulco menor da dupla fita de DNA⁴². Esta interação interfere com a abertura das fitas de DNA, num processo necessário e fundamental para a transcrição e replicação do material genético⁴³, podendo, também, mascarar os sítios de ação de enzimas, o que inibe as funções do DNA e causa a morte celular (apoptose)⁶.

Além dos sítios AT, de acordo com a Figura 12, o Berenil® também pode apresentar-se como intercalador parcial ou pseudointercalador nos sítios Citosina-Guanina (CG)⁴², o que pode ser observado pela comparação com a intercalação proporcionada por um intercalador clássico, que é o caso do Brometo de Etídio⁴⁴ na Figura 13.

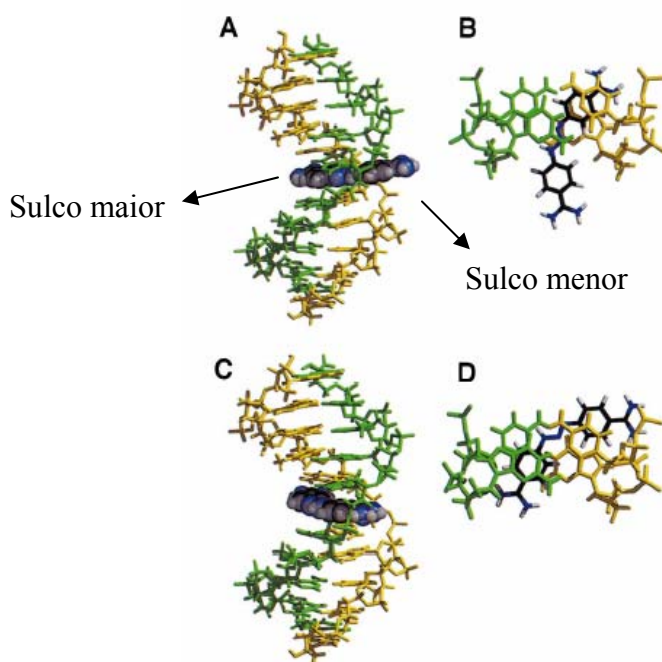


Figura 12. Interação do complexo Berenil-(CGATCGATCG)₂ no DNA. (a) e (b) Intercalação parcial da droga entre os sítios GC, (c) e (d) Pseudointercação do Berenil no maior sulco da dupla fita de DNA⁴².

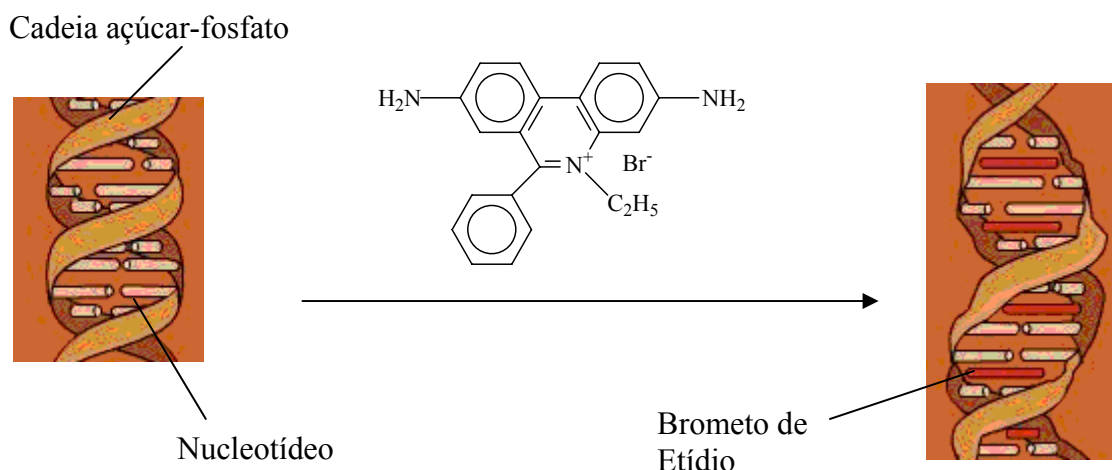


Figura 13. Intercalação no DNA proporcionada pelo intercalador clássico Brometo de Etídio⁴⁴.

Apesar da ação do Berenil® em diferentes sítios no DNA, o *Trypanossoma evansi* já apresenta resistência a este medicamento. O mecanismo de resistência ainda não está totalmente esclarecido, no entanto acredita-se que esteja associado à incapacidade do seu gene *TevAT1* em codificar o P2-transportador-nucleosídeo, que é o responsável pelo transporte do Berenil® para o interior do seu corpo⁴⁵.

Assim, uma série de novos compostos triazenos vem sendo desenvolvidos como protótipos para intercalação no DNA,⁴⁶ objetivando-se uma alternativa aos atuais tratamentos, seja como quimioterápicos, antitripanossômicos ou antimicrobianos, bem como à atual resistência enfrentada por muitas drogas comercializadas hoje.

Complexos envolvendo precursores com atividade comprovada também estão sendo testados, é o caso do complexo formado entre a Cisplatina®, *cis*-diaminodicloroplatina II (antineoplásico) e o Berenil® (antitripanossomal)^{47, 48}. Este complexo Pt-Berenil [Pt₂Cl₄(berenil)₂]Cl₄ da Figura 14, apresenta, *in vitro*, elevada atividade antitumoral e menores efeitos colaterais quando comparado à Cisplatina®.

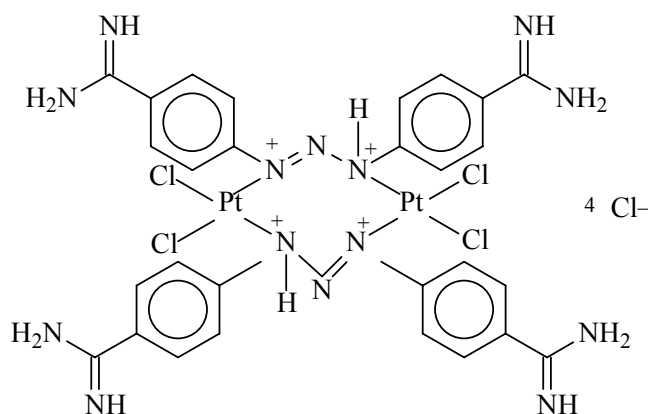


Figura 14. Fórmula estrutural do complexo Pt-Berenil, $[Pt_2Cl_4(berenil)_2]Cl_4$ ⁴⁷.

Hörner⁴⁹ e em seu trabalho de doutorado realizou experimentos que avaliaram a capacidade de clivagem de vários compostos inorgânicos e orgânicos frente ao DNA plasmidial. Concluiu que os compostos, 1,3-bis(4-carboxifenil)triazeno e 3-(4-carboxifenil)-1-(4-amidinofenil)triazeno, Figura 15 (a) e (b) respectivamente, foram aptos a clivar o DNA plasmidial dupla fita.

O triazeno 1,3-bis(4-carboxifenil)triazeno da Figura 14(a) foi sintetizado por Bresolin²³ e Casagrande⁵⁰, e sua estrutura cristalina inédita, determinada por difração de raios - X, será detalhada como parte dos estudos envolvendo minha dissertação.

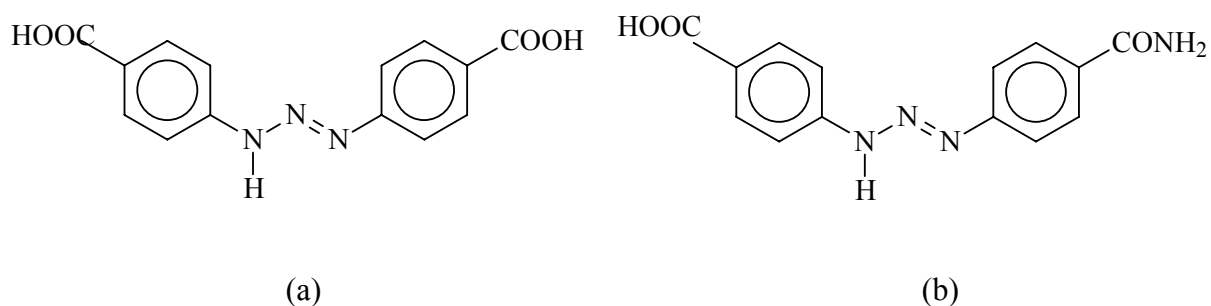


Figura 15. Fórmula estrutural dos compostos (a)1,3-bis(4-carboxifenil)triazeno e (b)3-(4-carboxifenil)-1-(4-amidinofenil)triazeno ²³.

Atualmente, não é raro o isolamento de microrganismos resistentes a todos os antibióticos existentes no comércio, decorrente, em grande parte, do uso indevido destes medicamentos,¹² o que justifica a síntese constante de novos compostos triazenos, que através da avaliação da atividade biológica, podem apresentar resultados satisfatórios no campo da

medicina, como antimicrobianos, quimioterápicos, ou até mesmo como nucleases com ação específica para que possam ser utilizadas como ferramenta nas técnicas Biologia Molecular.

3.2. Trizenos 1-óxido

Como trizenos 1-óxido são os trizenos alvos deste trabalho, serão relatados, a seguir, dois estudos envolvendo atividade biológica, além de diversas sínteses de representantes desta classe de trizenos.

Sarkar et al.⁵¹ em 1983, relataram a síntese do 3-(*o*-carboxifenil)-1-feniltriazeno 1-óxido observado pela Figura 16.

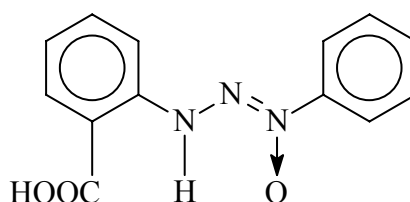


Figura 16. Fórmula estrutural do composto 3-(*o*-carboxifenil)-1-feniltriazeno 1-óxido⁵¹.

Samanta, Saha e Mukherjee⁵² em 1997 e Garcia, Romeno e Panneerselvam⁵³ em 1996, relataram a síntese do 3-(*o*-carboxifenil)-1-metiltriazeno 1-óxido da Figura 17, que apresenta grande semelhança estrutural com o triazeno 1-óxido sintetizado neste trabalho.

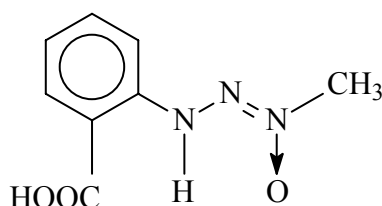


Figura 17. Fórmula estrutural do composto 3-(*o*-carboxifenil)-1-metiltriazeno 1-óxido^{52,53}.

Já em 1998, Samanta, Mukherjee e Mukherjee⁵⁴ relataram a síntese do 3-(*o*-carboxifenil)-1-etiltriazeno 1-óxido visualizado pela Figura 18.

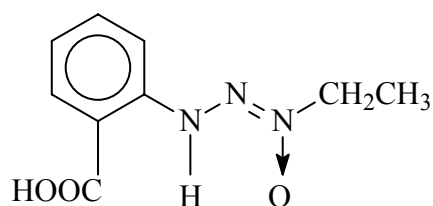


Figura 18. Fórmula estrutural do composto 3-(*o*-carboxifenil)-1-etiltriazeno 1-óxido⁵⁴.

Em 2001, Goswami e Purohit⁵⁵ apresentaram hidoxitriazenos com atividade antimicrobiana, caracterizando uma nova classe de compostos biologicamente ativos. Relatam que os hidoxitriazenos testados possuem eficiente atividade antimicrobiana frente a bactérias Gram-positivas. O mecanismo de ação estaria relacionado com a influência do triazeno sobre a parede celular destas bactérias.

Dentre os compostos analisados por Goswami e Purohit⁵⁵ destacam-se os dois triazenos da Figura 19(a) e (b).

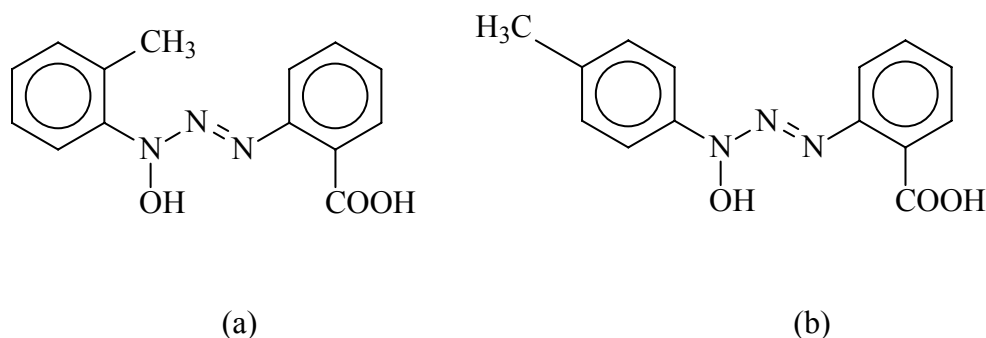


Figura 19. Fórmula estrutural dos compostos (a)3-hidroxi-3-*o*-toluil-1-(*o*-carboxifenil)triazeno e (b)3-hidroxi-3-*p*-toluil-1-(*o*-carboxifenil)triazeno⁵⁵.

A concentração inibitória mínima (CIM), para os compostos da Figura 19 (a) e (b) , foi relatada como sendo 25µg/mL para a bactéria *Enterococcus faecalis* e menor que 12,5µg/mL para a bactéria *Staphylococcus aureus*⁵⁵.

Em 2002, Oliveira⁵⁶ sintetizou o 3-(*p*-nitrofenil)-1-metiltriazeno 1-óxido, demonstrado pela Figura 20.

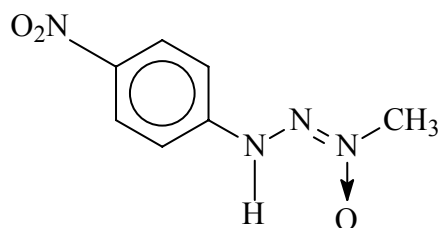


Figura 20. Fórmula estrutural do composto 3-(*p*-nitrofenil)-1-metiltriazeno 1-óxido⁵⁶.

Ainda, no mesmo ano, Dahmer⁵⁷ sintetizou o 3-(*p*-etilcarboxifenil)-3-feniltriazeno 1-óxido representado na Figura 21.

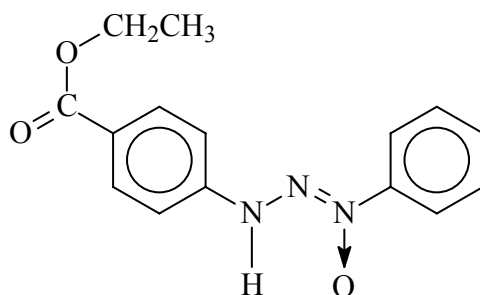


Figura 21. Fórmula estrutural do composto 3-(*p*-etilcarboxifenil)-1-feniltriazeno 1-óxido⁵⁷.

E, para finalizar, em 2003 Hörner⁴⁹ relatou que o composto 3-(*p*-carboxifenil)-1-feniltriazeno 1-óxido da Figura 22, sintetizado por Bresolin²³, apresenta capacidade de clivar o DNA plasmidial dupla fita.

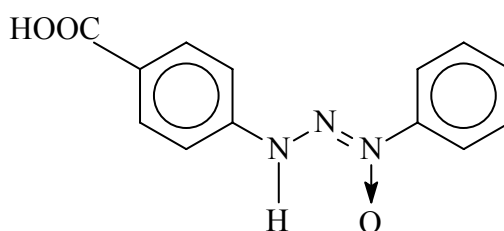


Figura 22. Fórmula estrutural do composto 3-(*p*-carboxifenil)-1-feniltriazeno 1-óxido²³.

3.3. Complexos de Coordenação com Triazenos 1-óxido

Triazenos são capazes de complexar diversos íons metálicos, principalmente os pertencentes ao grupo d. Neste trabalho serão enfatizados alguns complexos envolvendo triazenos 1-óxido e o metal cobre(II), a fim de demonstrar o principal modo de coordenação deste tipo de triazeno, que é a formação de “anéis quelatos inorgânicos” com cinco membros.

Em 1983, Hodgson⁵⁸ sintetizou o 3,3'-dimetoxi-4,4'-bis(3-metiltriazeno-3-óxido)-difênil-di-cobre(II). Pela Figura 23 observa-se que este complexo é binuclear, sendo que os íons de Cu(II) apresentam geometria quadrada planar distorcida. Para uma maior clareza os átomos de hidrogênio foram omitidos.

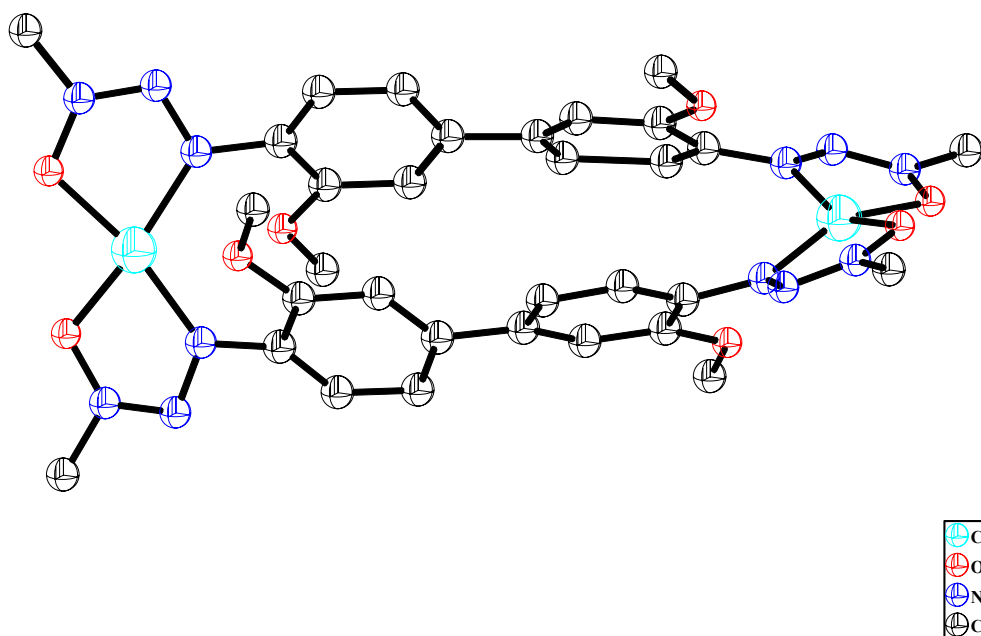


Figura 23. Projeção da estrutura cristalina do complexo 3,3'-dimetoxi-4,4'-bis(3-metiltriazeno-3-óxido)-difênil-di-cobre(II)⁵⁸.

Pattanayak et al.⁵⁹ em 1996, obtiveram um complexo de cobre(II), com ligantes tioéter e triazeno 1-óxido, além da presença de uma molécula de diclorometano como solvato de cristalização. A geometria de coordenação do íon metálico é pseudo-octaédrica distorcida. Para uma maior clareza os átomos de hidrogênio foram omitidos.

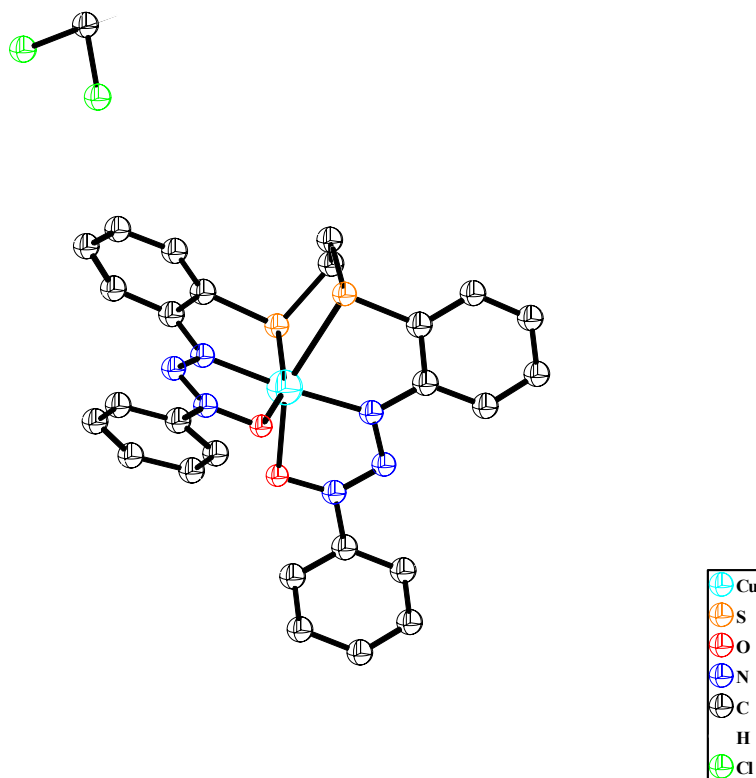


Figura 24. Projeção da estrutura cristalina do complexo envolvendo íon cobre(II), tioéter, triazeno 1-óxido e uma molécula de cristalização de diclorometano⁵⁹.

3.4. Complexo de Coordenação entre Triazeno e Potássio

O complexo obtido e que será apresentado nesta dissertação, envolve triazeno e potássio.

Partindo disto, através da literatura apenas o exemplo da Figura 25 foi encontrado. É uma estrutura polimérica com subunidade $[M(N_3)]_2$, publicada por Gantzel e Walsh⁶⁰, na qual moléculas de dimetoxietano (DME) fazem parte da esfera de coordenação formando pontes que ligam as unidades estruturais. Para uma maior clareza os átomos de hidrogênio foram omitidos.

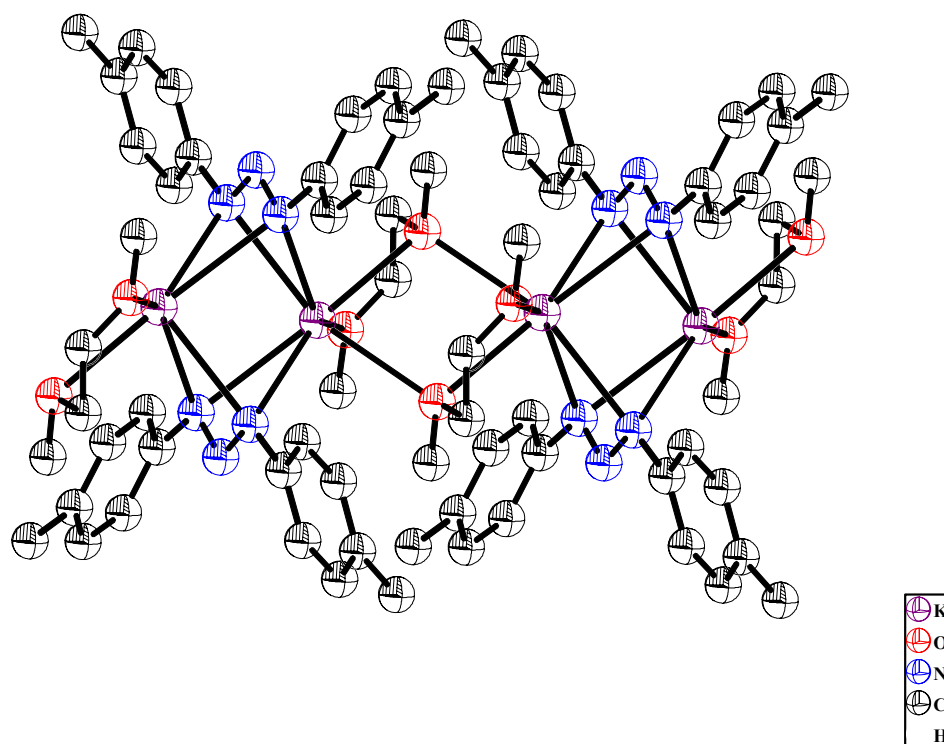


Figura 25. Projeção da estrutura cristalina do complexo formado entre 1,3-bis(4-metilfenil)triazeno e o íon potássio⁶⁰.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Aparelhagem e Materiais Utilizados

Determinação dos Pontos de Fusão: realizada em um aparelho do tipo MEL-TEMP II, pertencente ao Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

Espectrometria no Infravermelho: realizada em um espectrofotômetro NICOLET – MAGNA IR 760, em colaboração com o Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C : realizada em um aparelho multinuclear BRUKER 400 MHz, em colaboração com a Universidade Federal de Juiz de Fora.

Espectrometria no Ultravioleta-Visível: realizada em espectrofotômetro UV-1650 PC – SHIMADZU, pertencente ao Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

Análise Estrutural por Difração de Raios-X: realizada em um difratômetro BRUKER APEX II – CCD, pertencente ao Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

Determinação da Atividade Biológica: autoclave, estufa de esterilização FANEN, estufa para incubação FANEN, centrífugas FANEN e HSIANGTAI CCB-200, transiluminador HOEFER MACROVUE UV-20, cuba de eletroforese AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH, fonte AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH - EPS 301 e micropipetadores, em colaboração com o Setor de Microbiologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

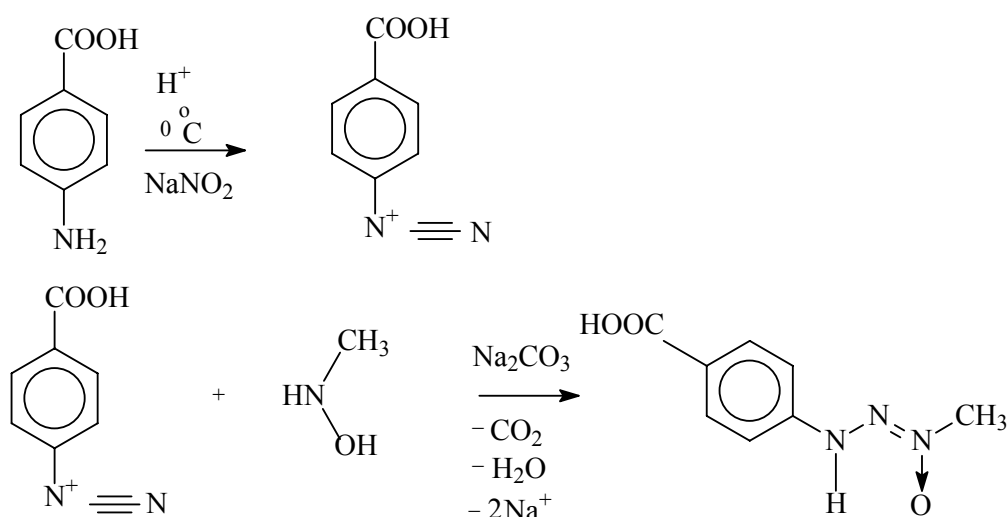
Reagentes e Solventes: foram utilizados sem purificação prévia e adquiridos das empresas: VETEC, SYNTH, ISOFAR, DINAMICA, ALDRICH e AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH.

4.2. Síntese e Caracterização dos Pró-ligantes Trizenos

4.2.1. Pró-ligante 1-metil-3-(*p*-carboxifenil)triazeno 1-óxido (1)

A síntese deste pró-ligante será descrita pela primeira vez neste trabalho. Foi obtido a partir da diazotação do ácido *p*-aminobenzóico com nitrito de sódio na proporção estequiométrica de 1:1.

Síntese



Prepara-se uma solução contendo 1,0g (7,3mmol) de ácido *p*-aminobenzóico, dissolvido em 30mL de ácido clorídrico e 20mL de água desionizada. Esta solução é mantida a uma temperatura entre 0-5°C, sobre ela adiciona-se lentamente uma solução contendo 0,6g (7,3mmol) de nitrito de sódio e 2mL de água desionizada gelada. O meio reacional é agitado por 50 minutos na temperatura indicada anteriormente. Após tratou-se o sal de diazônio formado com uma solução aquosa de 0,6g (7,3mmol) de *n*-metil-hidroxilamina-hidrocloreto. Mantendo-se a temperatura, após 40 minutos, a solução é neutralizada até pH 6,0 com uma solução saturada de Acetato de Sódio. Decorridos 15 minutos, o precipitado formado de coloração amarelo-róseo é filtrado e lavado com 200mL de água deionizada gelada e posteriormente seco em dessecador sob vácuo contendo cloreto de cálcio anidro. O produto foi isolado sem purificação adicional.

Rendimento: Foram obtidas 0,642g, o que corresponde a 45% do valor teórico esperado.

Caracterizações

Ponto de Fusão do Cristal: 205-206°C, seguido de decomposição.

Infravermelho: Em KBr, as principais bandas encontradas foram: 3207cm⁻¹(F), 1693cm⁻¹(MF), 1606cm⁻¹(MF), 1529 cm⁻¹(F), 1425cm⁻¹(F) e 1296cm⁻¹(MF), 1219 cm⁻¹(MF) e 1163 cm⁻¹(MF).

RMN¹H: Em DMSO-d₆, os principais sinais encontrados foram: δ 11,50, δ 7,84, δ 7,29, δ 3,95, e δ 1,90.

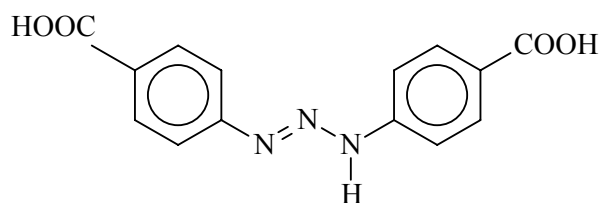
RMN¹³C: Em DMSO-d₆, os principais sinais encontrados foram: δ 167,71, δ 144,08, δ 125,17, δ 130,81, δ 113,25, e δ 50,63.

Ultravioleta-visível: Em etanol, as principais absorções encontradas foram: em 318nm, em 226,50nm e em 202nm.

Análise Estrutural por Difração de Raios-X: monocristais de coloração amarela foram obtidos pela evaporação lenta, durante nove meses, de uma solução contendo 0,05g (0,2548mmol) do pró-ligante **(1)** em 10mL de dimetilsulfóxido e 10ml de tolueno. Dentre estes monocristais obtidos, o monocristal escolhido e adequado para a difração de raios-X, com dimensões 0,45 x 0,21 x 0,08mm, foi fixado em fio de vidro e os dados de intensidade foram coletados com difratômetro com detector de área APEX II – CCD⁶¹. A estrutura foi resolvida com a utilização de programas intrínsecos do equipamento e pacotes de programas de domínio público.

4.2.2. Pró-ligante 1,3-bis(4-carboxifenil)triazeno **(2)**

Este pró-ligante foi sintetizado conforme a metodologia descrita por Casagrande⁵⁰.



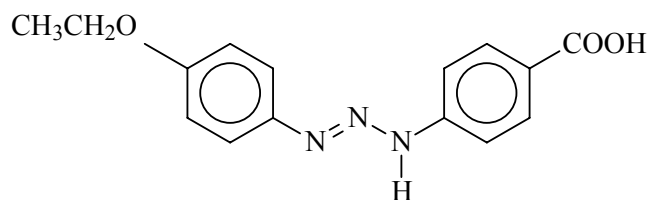
Caracterizações

Ponto de Fusão do Cristal: 196°C, seguido de decomposição. Este valor não confere com a literatura, pelo fato do ponto de fusão obtido neste trabalho ter sido feito com o cristal e não com o pó que devia conter impurezas. As demais caracterizações já foram descritas na literatura por Bresolin²³ e Casagrande⁵⁰.

Análise Estrutural por Difração de Raios-X: monocristais de coloração vermelha foram obtidos pela evaporação lenta, durante dois meses, de uma solução contendo 0,10g (0,3144mmol) do pró-ligante em uma mistura de solventes, sendo 5mL de dimetilsulfóxido (DMSO), 5mL de tolueno, 4mL de acetonitrila, 4ml de tetrahidrofurano (THF) e 1mL de piridina (Py). Dentre estes monocristais obtidos, o monocristal escolhido e adequado para a difração de raios-X apresentava dimensões de 0,34 x 0,07 x 0,05mm.

4.2.3. Pró-ligante 1-(4-etoxifenil)-3-(4-carboxifenil)triazeno (**3**)

A síntese e caracterizações deste pró-ligante (**3**) serão descritas por Bilibio⁶² na sua Dissertação de Mestrado.

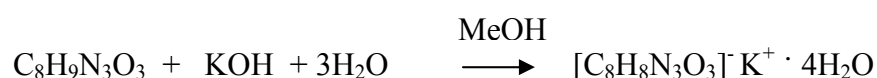


4.3. Síntese e Caracterização do Complexo

4.3.1. Complexo 3-(4-carboxilatofenil)-1-metiltriazeno 1-óxido de potássio tetraidratado (**4**)

Este complexo foi obtido pela reação do pró-ligante 1-metil-3-(*p*-carboxifenil)triazeno 1-óxido (**1**) com hidróxido de potássio na proporção estequiométrica de 1:1.

Síntese



Prepara-se uma solução contendo 0,098g (0,5mmol) do pró-ligante 1-metil-3-(*p*-carboxifenil)triazeno 1-óxido (**1**) e 0,03g (0,5mmol) de hidróxido de potássio em 10ml de metanol hidratado e 1mL de piridina, agita-se, com o auxílio de um agitador magnético, durante oito horas. Após decorrido este tempo, a solução é filtrada e deixada em repouso em recipiente parcialmente fechado e protegido da luz durante três semanas. Pela evaporação lenta da solução, houve a formação de monocristais de coloração levemente amarelada que foram isolados sem purificação adicional.

Caracterizações

Ponto de Fusão do Cristal: decomposição a partir de 200°C.

Infravermelho: Em KBr, as principais bandas encontradas foram: 3384cm⁻¹ (F), 1693cm⁻¹ (f), 1606cm⁻¹ (MF), 1523cm⁻¹ (F), 1373cm⁻¹ (F), 1296cm⁻¹ (MF), 1219cm⁻¹ (MF) e 1163cm⁻¹ (F).

Ultravioleta-Visível: Em metanol, as principais absorções encontradas foram: em 316nm, em 250,5nm e em 243,5nm.

Análise Estrutural por Difração de Raios-X: dentre estes monocristais obtidos, o monocristal escolhido e adequado para a difração de raios-X apresentava dimensões de 0,52 x 0,13 x 0,13mm.

4.4. Avaliação da Atividade Biológica

Convém lembrar que os reagentes, os meios de cultura e os materiais necessários para os experimentos biológicos foram anteriormente esterilizados, em autoclave (121°C, 1 atm por 15 minutos) ou em estufa de esterilização (180°C por 2 horas).

4.4.1. Pró-ligante 1-metil-3-(*p*-carboxifenil)triazeno 1-óxido (**1**)

A amostra utilizada para o estudo da atividade biológica apresenta pureza comprovada através de espectros UV-VIS comparativos entre o pró-ligante (**1**) e amostras de pró-ligante (**1**) contaminadas com cada um dos precursores.

4.4.1.1. Atividade Bacteriostática e Bactericida

Para este estudo foram utilizadas cepas provenientes do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM) e cepas *American Type Culture Collections (ATCC)*.

A partir de uma solução estoque etanólica 65%, contendo 12800µg/mL do pró-ligante (**1**), foram realizadas diluições seriadas em etanol para o emprego da técnica de diluição em caldo Müeller Hinton preconizada pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*⁶³, antigo *National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)*⁶⁴.

Os precursores (ácido *p*-amonibenzóico e *n*-metil-hidroxilamina hidrocloreto) do pró-ligante (**1**) também foram testados nas mesmas concentrações e condições que o produto.

4.4.1.2. Capacidade de Clivagem de DNA Plasmidial Dupla Fita

É uma técnica minuciosa, com diversas etapas. A primeira etapa é a preparação das bactérias competentes através do método do cloreto de cálcio gelado, assim as membranas bacterianas passam a ser mais permeáveis para que na próxima etapa o plasmídeo seja inserido. A segunda etapa é justamente, a transformação das bactérias, isto é, a inserção do plasmídeo de interesse através do choque térmico. E por último, após o repique e o

crescimento da bactéria transformada, procede-se à extração do DNA plasmidial dupla fita empregando-se a técnica da lise alcalina.

Para a análise de clivagem foram utilizados os plasmídeos pUC18 (com 2690pb - pares de bases, ou melhor, nucleotídeos) e pBSKII (com 2960pb) extraídos da cepa *Escherichia coli* XLBlue. Para o preparo das amostras, além dos plasmídeos, também foram utilizados alguns reagentes com pH controlado e diluições crescentes do pró-ligante **(1)**. Após, as alíquotas foram incubadas. Decorrido o tempo de incubação, as amostras já coradas, foram inseridas no gel de agarose que, por sua vez, continha um corante intercalante e fluorescente só, então, procedeu-se à separação das frações de DNA plasmidial por eletroforese, sendo a Forma I (circular superenovelado) mais rápida que a Forma III (linear) e a Forma III mais rápida que a Forma II (circular aberto)⁴⁹.

O pró-ligante **(1)** foi testado nas concentrações 0,375; 0,75; 1,25; 1,88 e 3,75mM com o DNA plasmidial dupla fita pUC18 e pBSKII.

4.4.2. Pró-ligante 1,3-bis(4-carboxifenil)triazeno **(2)**

A amostra utilizada para a determinação da atividade biológica foi purificada através de recristalizações em tolueno à quente.

4.4.2.1. Atividade Bacteriostática

Para este estudo também foram utilizadas cepas provenientes do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM) e cepas *ATCC*.

Com esta amostra também foi preparada uma solução estoque etanólica 65%, contendo 12800µg/mL do pró-ligante **(2)** e, a partir desta solução foram realizadas diluições seriadas em etanol para o emprego da técnica de diluição em caldo Müeller Hinton preconizada pelo *CLSI*^{63, 64}.

O precursor (ácido *p*-aminobenzóico) do pró-ligante **(2)** é também um dos precursores do pró-ligante **(1)**.

Em relação à capacidade de clivagem de DNA plasmidial dupla fita, experimentos envolvendo este pró-ligante **(2)** foram realizados em 2003 por Hörner⁴⁹, como já descrito na parte de Revisão Bibliográfica.

4.4.3. Pró-ligante 1-(4-etoxifenil)-3-(4-carboxifenil)triazeno (**3**)

4.4.3.1. Atividade Bacteriostática

Para este estudo também foram utilizadas cepas provenientes do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM) e cepas *ATCC*.

Como para as amostras anteriores, a partir de uma solução estoque etanólica 65%, contendo 12800µg/mL do pró-ligante (**3**), foram realizadas diluições seriadas em etanol para o emprego da técnica de diluição em caldo Müller Hinton preconizada pelo *CLSI*^{63,64}.

4.4.3.2. Capacidade de Clivagem de DNA Plasmidial Dupla Fita

O pró-ligante (**3**) foi testado nas concentrações 0,375; 0,75 e 1,25mM com o DNA plasmidial dupla fita pUC18.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo estão descritas as caracterizações do pró-ligante 1-metil-3-(*p*-carboxifenil)triazeno 1-óxido (**1**) e do complexo 3-(4-carboxilatofenil)-1-metiltriazeno 1-óxido de potássio tetraidratado (**1**), que foram identificadas no capítulo de Materiais e Métodos, e também as discussões sobre os dados obtidos pela difração de raios-X em monocristal.

Além disso, este capítulo ainda contém a avaliação da atividade biológica dos pró-ligantes 1-metil-3-(*p*-carboxifenil)triazeno 1-óxido (**1**), 1,3-bis(4-carboxifenil)triazeno (**2**) e 1-(4-etoxifenil)-3-(carboxifenil)triazeno (**3**), e a discussão da estrutura cristalina do pró-ligante 1,3-bis(4-carboxifenil)triazeno (**2**) obtida através da difração de raios-X.

5.1. Pró-ligante 1-metil-3-(*p*-carboxifenil)triazeno 1-óxido (**1**)

5.1.1. Espectrometria no Infravermelho

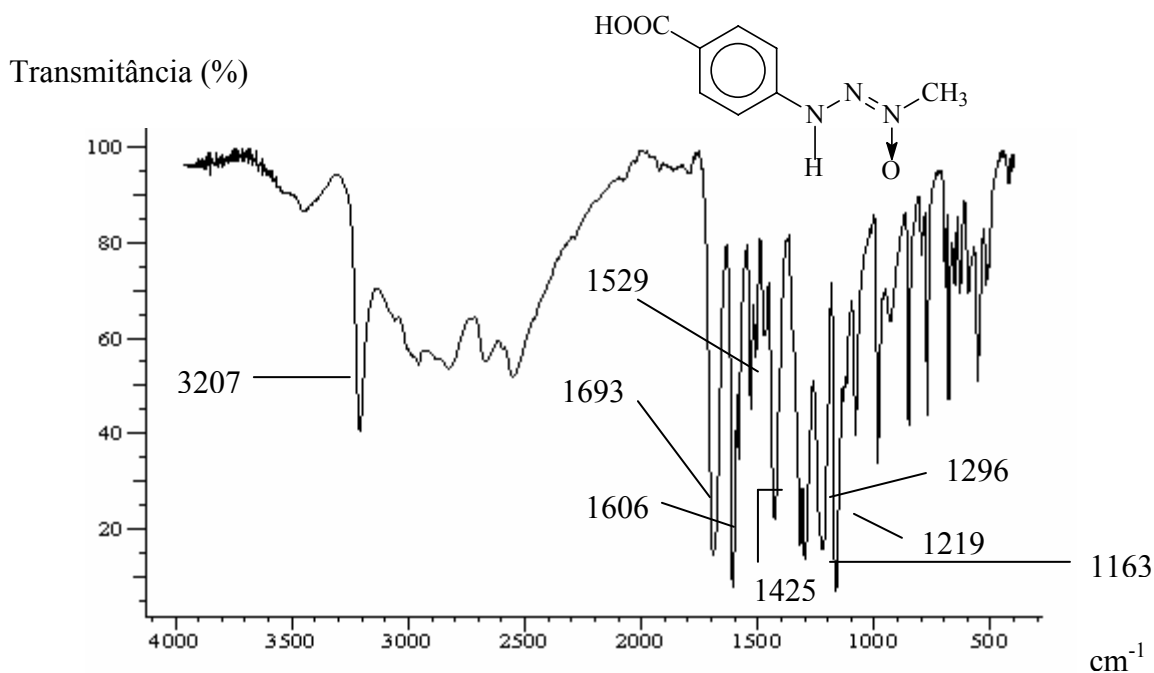


Figura 26. Espectro no Infravermelho do pró-ligante (**1**), em KBr, na região de 400 a 4000cm⁻¹.

As vibrações determinadas para o pró-ligante (**1**) conferem com a literatura e estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Principais bandas para o pró-ligante (**1**) observadas no espectro de infravermelho da Figura 26.

Atribuição	Intensidade Relativa	Número de Ondas (cm ⁻¹)
ν_{as} (N-H)	F	3207
ν (C=O)	MF	1693
ν (C=C)	MF	1606
δ (N-H)	F	1529
ν_{as} (N=N)	MF	1425
ν_s (N→O)	MF	1296
ν (N-N)	MF	1219
ν_{as} (N→O)	MF	1163
δ (C-H) no plano, correspondentes ao anel aromático	F	1300-900
δ (C-H) fora do plano, correspondentes ao anel aromático	F	900-500

O ν_{as} (N-H) na frequência de 3209cm⁻¹, observada pela Figura 26, sugere que o pró-ligante (**1**), em condições sólidas, existe preferencialmente na forma tautômera (I), demonstrada anteriormente pela Figura 4.

Além disso, a presença ligações de hidrogênio envolvendo a função carboxílica é evidenciada pela banda larga de absorção entre 3452 e 2551cm⁻¹.

5.1.2. Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear

Através do espectro de RMN¹H da Figura 27, observa-se um sinal em δ 11,50 referente a um hidrogênio podendo ser proveniente do grupo -COOH. Em δ 7,84 (2H, H3, H5, $J_{3-2} = J_{5-6} = 8,79\text{Hz}$), bem como em δ 7,29 (2H, H2, H6, $J_{2-3} = J_{6-5} = 8,79\text{Hz}$) observa-se dois dupletos referentes aos hidrogênios do anel aromático. Em δ 3,95 destaca-se um simpleto que corresponde aos três hidrogênios do grupo -CH₃ sendo esta frequência

bastante alta pelo fato do grupo estar diretamente ligado ao nitrogênio da cadeia triazenídica, já em δ 1,90 destaca-se o simpleto do hidrogênio do grupo -OH indicando que o pró-ligante **(1)**, nesta solução, existe preferencialmente, na forma tautômérica (II) demonstrada anteriormente pela Figura 4. O sinal em δ 2,50 corresponde ao solvente DMSO- d_6 .

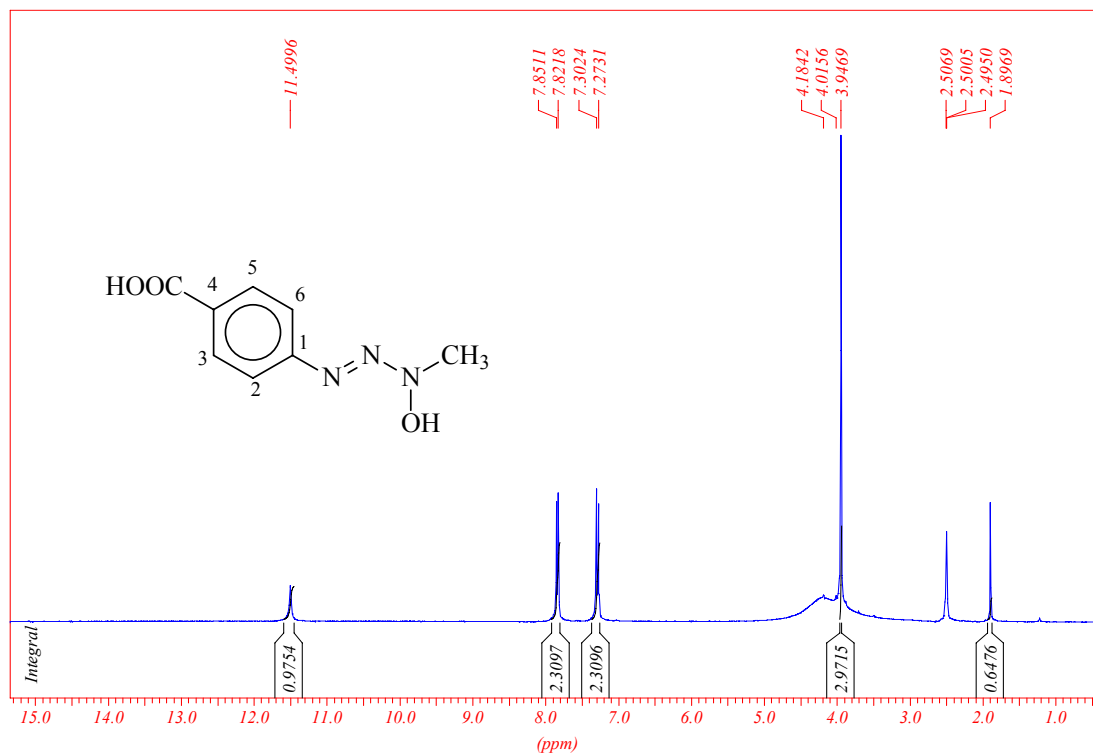


Figura 27. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz) do pró-ligante **(1)** em DMSO- d_6 .

Analisando-se o espectro de RMN ^{13}C da Figura 28, observam-se cinco sinais de ressonância entre δ 100 e 180. O sinal em δ 167,61 corresponde ao carbono do grupo -COOH, já os sinais em δ 144,08 e δ 125,17 correspondem aos carbonos quaternários C1 e C4, respectivamente. Em adição, os sinais mais intensos em δ 130,81 e δ 113,25 referem-se aos carbonos (C3, C5) e (C2, C6), respectivamente. Em δ 50,63 destaca-se o sinal referente ao carbono do grupo - CH_3 , este sinal está em frequência alta pois a metila está diretamente ligada ao nitrogênio da cadeia triazenídica. O hepteto centrado em δ 39,50 corresponde ao solvente DMSO- d_6 .

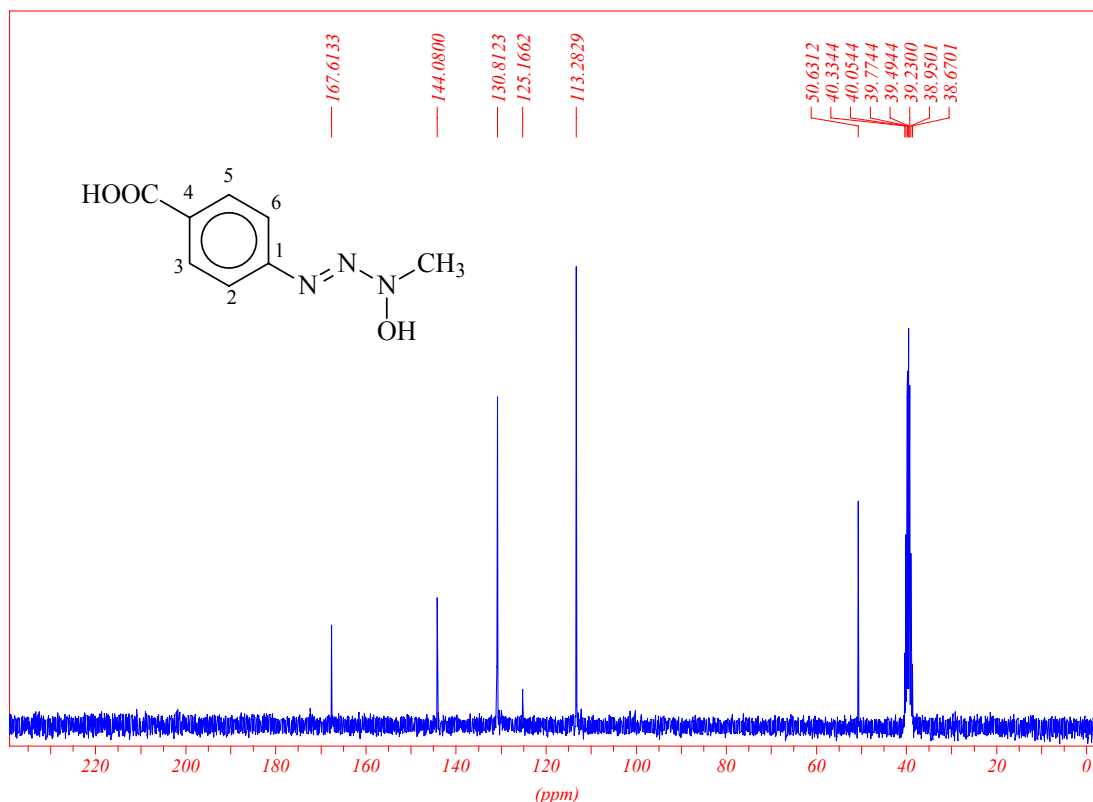
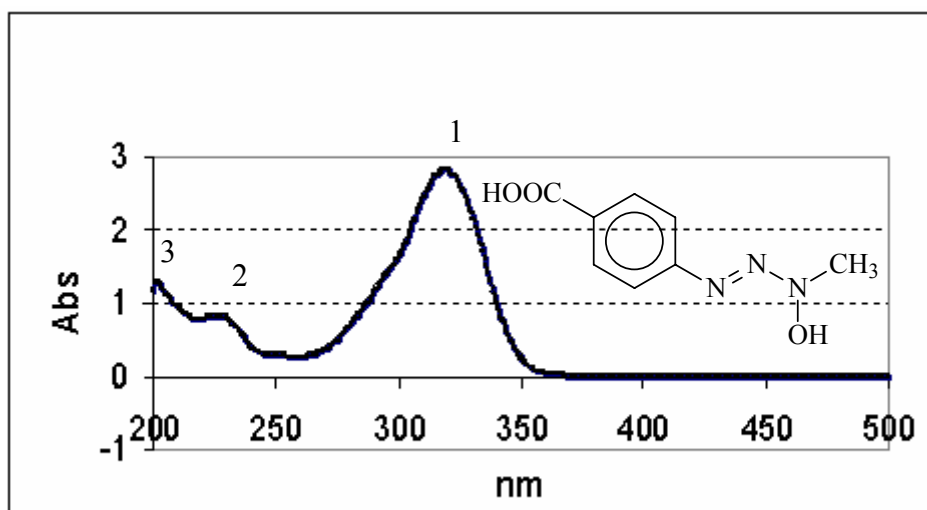


Figura 28. Espectro de RMN de ^{13}C (75,53 MHz) do pró-ligante **(1)**, em $\text{DMSO-}d_6$.

5.1.3. Espectrometria no Ultravioleta-Visível

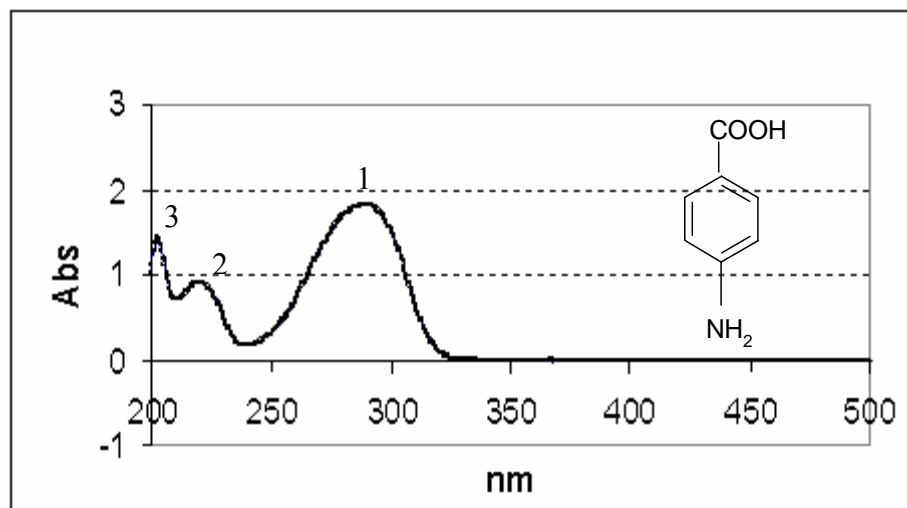
No espectro ultravioleta-visível da Figura 29, a banda larga entre 350 e 270nm é decorrente da sobreposição de picos absorptivos de grupos cromóforos ($-\text{N}=\text{N}-$ e $-\text{C}=\text{O}$) e auxocromo ($-\text{OH}$). O pico desta banda larga localiza-se em 318nm, sendo portanto, decorrente das absorções do grupo $-\text{N}=\text{N}-$ ($\pi \rightarrow \pi^*$); do grupo $-\text{COOH}$ ($n \rightarrow \pi^*$) ligado ao anel aromático, e quando este pico é comparado ao espectro do ácido *p*-aminobenzóico na Figura 30 e da anilina na Figura 32 evidencia-se um deslocamento batocrômico que é, justamente, devido a sua ligação a um anel aromático ($\pi \rightarrow \pi^*$) substituído com um grupo $-\text{N}=\text{N}-\text{N}-$ ($\pi \rightarrow \pi^*$); e do grupo $-\text{OH}$, e quando este pico é comparado ao espectro da *n*-metil-hidroxilamina-hidrocloreto da Figura 31, observa-se também um deslocamento batocrômico que é devido a sua ligação com o grupo $-\text{N}=\text{N}-$ ($\pi \rightarrow \pi^*$) formando a cadeia triazenídica. O pico em 226,50nm, e o pico em 202nm, são considerados, por comparação ao espectro do ácido *p*-aminobenzóico na Figura 30 e da anilina na Figura 32, como absorções do anel aromático ($\pi \rightarrow \pi^*$).



Pico	Absorbância	Comprimento de Onda (λ)	Absortividade Molar (ϵ_{\max})*
1	2,799	318,00	7424
2	0,826	226,50	2191
3	1,292	202,00	3427

* $A=\epsilon.c.b$ (A=absorbância, ϵ =absortividade molar, c=concentração do soluto em moles por litro, b=comprimento do caminho ótico em centímetros).

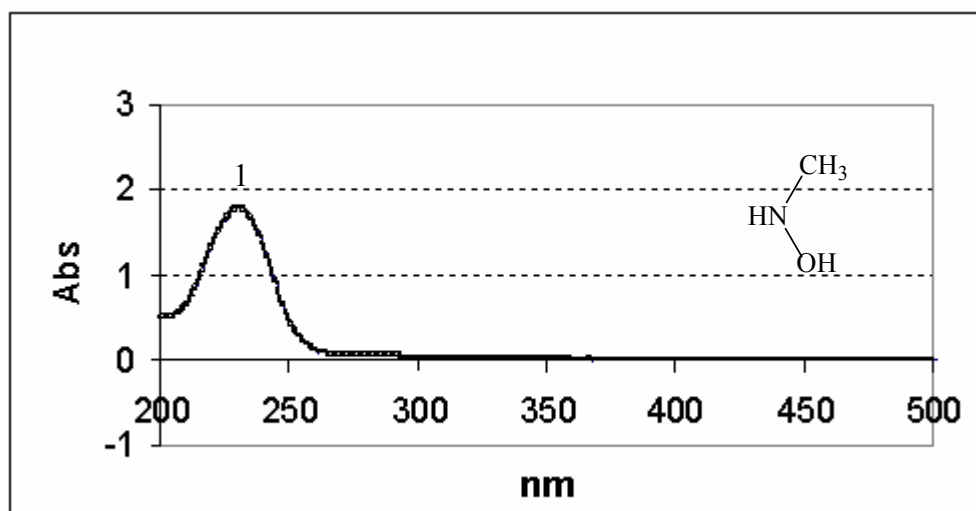
Figura 29. Espectro no UV-VIS do pró-ligante (**1**), em etanol, na região de 200 a 500nm.



Picos	Absorbância	Comprimento de Onda (λ)	Absortividade Molar (ϵ_{\max})*
1	1,825	290,00	6759
2	0,910	220,00	3370
3	1,443	202,50	5344

* $A=\epsilon.c.b$ (A=absorbância, ϵ =absortividade molar, c=concentração do soluto em moles por litro, b=comprimento do caminho ótico em centímetros).

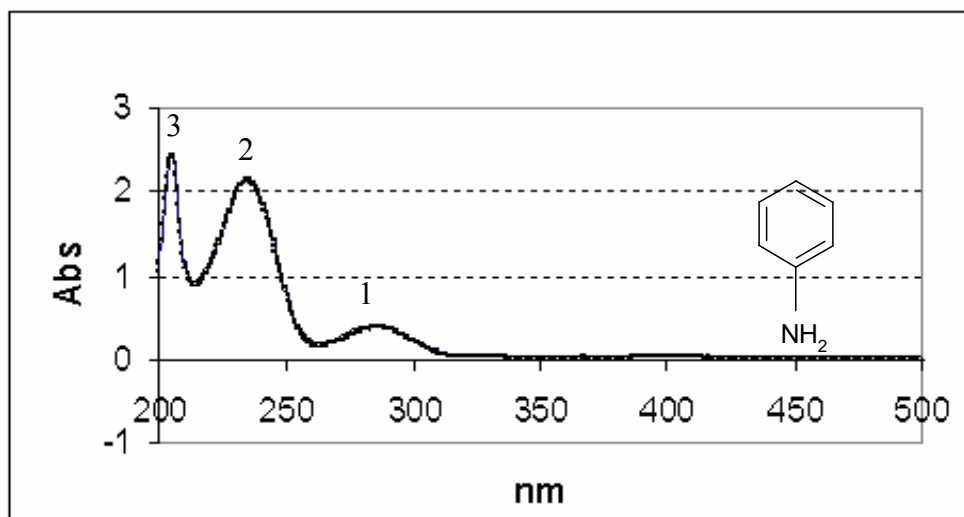
Figura 30. Espectro no UV-VIS do ácido *p*-aminobenzóico, em etanol, na região de 200 a 500nm.



Picos	Absorbância	Comprimento de Onda (λ)	Absortividade Molar (ϵ_{\max})*
1	1,787	230,50	450

* $A = \epsilon \cdot c \cdot b$ (A=absorbância, ϵ = absortividade molar, c=concentração do soluto em moles por litro, b=comprimento do caminho ótico em centímetros).

Figura 31. Espectro no UV-VIS da n-metil-hidroxilamina-hidrocloreto, em etanol, na região de 200 a 500nm.



Picos	Absorbância	Comprimento de Onda (λ)	Absortividade Molar (ϵ_{\max})*
1	0,379	286,00	2297
2	2,128	234,50	12897
3	2,422	205,00	14679

* $A = \epsilon \cdot c \cdot b$ (A=absorbância, ϵ = absortividade molar, c=concentração do soluto em moles por litro, b=comprimento do caminho ótico em centímetros).

Figura 32. Espectro no UV-VIS da anilina, em etanol, na região de 200 a 500nm.

5.1.3.1. Determinação da Pureza da Amostra

A amostra do pró-ligante (**1**) utilizada para a atividade biológica estava pura. Ao comparar o espectro do pró-ligante (**1**) da Figura 33 com os espectros das amostras deste pró-ligante (**1**) contaminadas com seus precursores, ácido *p*-aminobenzóico na Figura 34 e *n*-metil-hidroxilamina-hidroclorato na Figura 35, observa-se que qualquer resquício de contaminação pelos precursores seria detectada pelo espectrofotômetro na região do ultravioleta-visível. Esta análise fez-se necessária, pois a pureza é muito importante para as amostras testadas quanto à atividade biológica, uma vez que, contaminantes podem induzir a resultados errôneos.

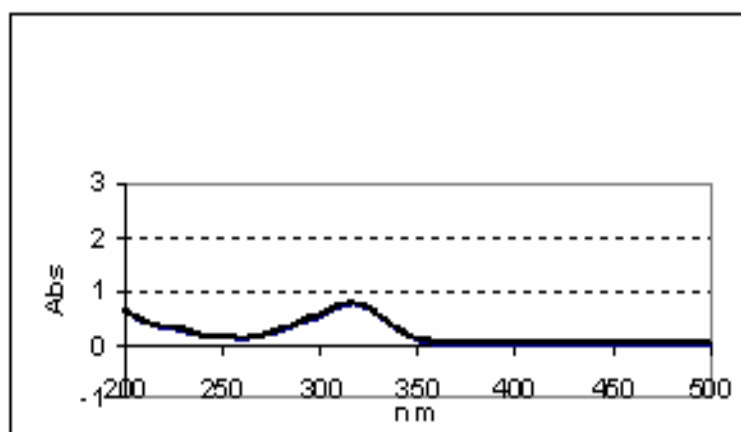


Figura 33. Espectro no UV-VIS do pró-ligante (**1**), em etanol, na região de 200 a 500nm.

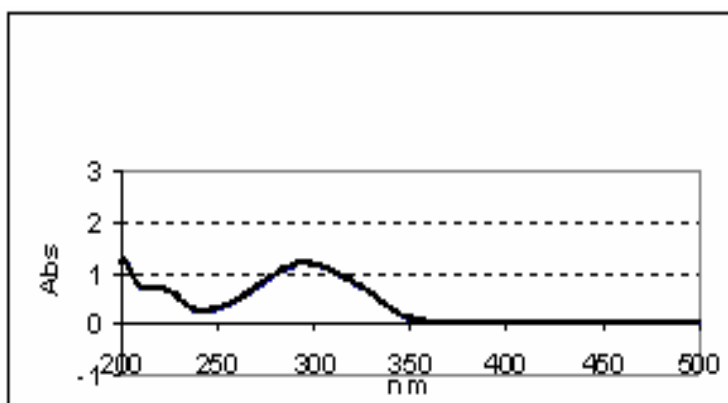


Figura 34. Espectro no UV-VIS do pró-ligante (**1**) da Figura 33 contaminado com mínima quantidade de ácido *p*-aminobenzóico, na região de 200 a 500nm.

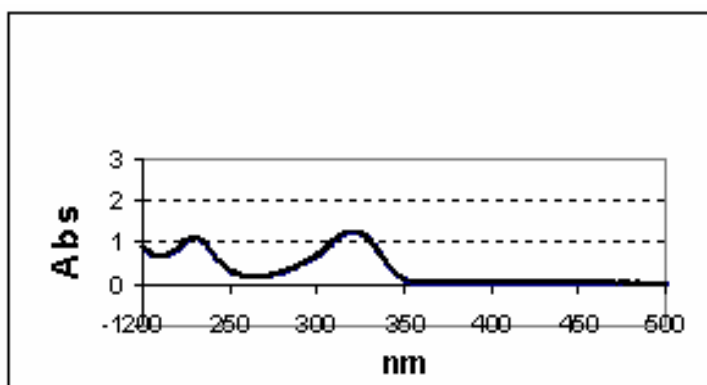


Figura 35. Espectro no UV-VIS do pró-ligante **(1)** da Figura 33 contaminado com mínima quantidade de n-metil-hidroxilamina-hidroclorato, na região de 200 a 500nm.

5.1.4. Atividade Bacteriostática e Bactericida

Com amostras puras, conforme verificado, a concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) foram determinadas. O resultado encontra-se na Tabela 2.

Tabela 2. Determinação do CIM e CBM do pró-ligante **(1)** frente a diversas bactérias.

Nº	Bactéria	CIM ($\mu\text{g/mL}$)**	CBM ($\mu\text{g/mL}$)**
1.	<i>S. aureus</i> β -hemolítico	$\geq 128 \mu\text{g/mL}$	-----
2.	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	$\geq 128 \mu\text{g/mL}$	-----
3.	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	$\geq 128 \mu\text{g/mL}$	-----
4.	<i>Enterococcus faecalis</i>	$\geq 128 \mu\text{g/mL}$	-----
5.	<i>Micrococcus</i> spp.	$\geq 128 \mu\text{g/mL}$	-----
6.	<i>Streptococcus agalactiae</i>	16 $\mu\text{g/mL}$	32 $\mu\text{g/mL}$
7.	<i>Streptococcus pyogenes</i>	$\geq 128 \mu\text{g/mL}$	-----
8.	<i>Enterobacter aerogenes</i>	$\geq 128 \mu\text{g/mL}$	-----
9.	<i>Enterobacter cloacae</i>	$\geq 128 \mu\text{g/mL}$	-----
10.	<i>Enterobacter</i> spp.	$\geq 128 \mu\text{g/mL}$	-----
11.	<i>E. coli</i> ATCC 25922	$\geq 128 \mu\text{g/mL}$	-----
12.	<i>Salmonella</i> spp.	$\geq 128 \mu\text{g/mL}$	-----
13.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	$\geq 128 \mu\text{g/mL}$	-----
14.	<i>Ralstonia pickettii</i>	$\geq 128 \mu\text{g/mL}$	-----
15.	<i>Acinetobacter baumannii</i>	$\geq 128 \mu\text{g/mL}$	-----
16.	<i>Bacillus cereus</i>	$\geq 128 \mu\text{g/mL}$	-----
17.	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ESBL 18*	$\geq 128 \mu\text{g/mL}$	-----
18.	<i>K. pneumoniae</i> ESBL 22*	$\geq 128 \mu\text{g/mL}$	-----
19.	<i>K. pneumoniae</i> ESBL 23*	$\geq 128 \mu\text{g/mL}$	-----
20.	<i>K. pneumoniae</i> ESBL 24*	$\geq 128 \mu\text{g/mL}$	-----

Continuação da Tabela 2

21.	<i>K. pneumoniae</i> ESBL 25*	≥128µg/mL	-----
22.	<i>K. pneumoniae</i> ESBL 27*	≥128µg/mL	-----
23.	<i>K. pneumoniae</i> ESBL 31*	≥128µg/mL	-----
24.	<i>K. pneumoniae</i> ESBL 33*	≥128µg/mL	-----
25.	<i>K. pneumoniae</i> ESBL 34*	≥128µg/mL	-----
26.	<i>Klebsiella oxitoca</i> ESBL 14*	≥128µg/mL	-----
27.	<i>E. coli</i> ESBL 26*	≥128µg/mL	-----
28.	<i>E. coli</i> ESBL 32*	≥128µg/mL	-----

* Cepas produtora de betalactamase de espectro ampliado (ESBL) com teste screening e confirmatório realizados conforme *CLSI*⁶³.

** O pró-ligante (**1**) foi testado em concentrações crescentes de 2 – 128µg/mL em etanol PA e incubado a 37°C por 24 horas. CIM= concentração inibitória mínima e CBM= concentração bactericida mínima.

A concentração mais alta empregada nas diluições de pró-ligante (**1**) foi 128µg/mL, pois concentrações maiores poderiam ser tóxicas aos organismos hospedeiros e não apenas aos microorganismos parasitas em questão.

As bactérias produtoras de betalactamase de espectro ampliado (ESBL) representam um dos mais importantes problemas de resistência bacteriana nos hospitais brasileiros⁶⁵.

As enzimas betalactamases são enzimas mediadas por genes plasmidiais, capazes de hidrolizar a cadeia oximina-beta-lactâmica presente na estrutura química da droga⁶⁶, o que faz com que seu espectro de ação se estenda aos antimicrobianos β-lactâmicos de amplo espectro, como as cefalosporinas de 3ª geração (ceftazidima, cefotaxima, etc) e monobactâmicos (aztreonam). Apesar disso, as enzimas ESBL não conferem resistência às cefamicinas (cefoxetina e cefaletan) e aos carbapenens (imipenem e meropenem).

As ESBL foram descobertas na Alemanha, em 1983, mas o primeiro problema clínico foi relatado na França em 1985, envolvendo cepas que produziam “surto”. Posteriormente, foram descritos surtos em toda Europa e Américas.

Atualmente, a produção destas enzimas ocorrem predominantemente no gênero *Klebsiella*, sendo este tipo de resistência considerada uma emergência, acompanhando os casos de imunodeficiência. Assim, a detecção laboratorial de cepas ESBL, atualmente, é imprescindível, uma vez que, este tipo de resistência não é detectada através de antibiogramas de rotina.

Neste trabalho, as bactérias produtoras de ESBL utilizadas são cepas hospitalares isoladas no ano de 2005 no Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM), sendo a grande maioria proveniente de amostras de urina; as demais foram isoladas de culturas de escaras, secreção de fistula e lavado broncoalveolar. Estas bactérias são resistentes a inúmeros antibióticos, sendo a *K. pneumoniae* um dos bacilos Gram-negativos mais frequentemente

isolados como causa de infecções hospitalares. Dentre as bactérias testadas, as cepas representadas pela *K. pneumoniae* ESBL 33, *K. pneumoniae* ESBL 34, *E. coli* ESBL 32, por exemplo, apresentam resistência a ampicilina com CIM >128µg/mL e ao sulfametoxazol com CIM >256µg/mL.

Já a bactéria *S. agalactiae*, que apresentou sensibilidade ao pró-ligante **(1)** na concentração de 16µg/mL, é um coco Gram-positivo presente como comensal, principalmente no trato genital feminino. Nas crianças as principais infecções causadas por esta bactéria são: pneumonia, meningite, septicemia neonatal, otite e adenite⁶⁶. Nos adultos as infecções mais frequentes são: pneumonia, faringite e meningite, sendo que os pacientes imunocomprometidos são as principais vítimas⁶⁶.

Portanto, partindo do fato de que a atividade antimicrobiana deu-se apenas sobre bactéria Gram-positiva, acredita-se que a ação esteja ligada às diferenças entre as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas principalmente em relação às membranas e à parede celular.

Os precursores (ácido *p*-amonibenzóico e *n*-metil-hidroxilamina hidrocloreto) do pró-ligante **(1)** também foram testados nas mesmas concentrações e condições que o produto frente as seguintes bactérias: *S. aureus* ATCC 25923, *S. saprophyticus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus spp.*, *Micrococcus spp.*, *S. agalactiae*, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 25922 e *B. cereus*. Para todas as bactérias a CIM foi $\geq 128\mu\text{g/mL}$.

5.1.5. Capacidade de Clivagem de DNA Plasmidial Dupla Fita

Já em relação ao estudo da clivagem do DNA plasmidial pBSKII, pode-se observar através da eletroforese em gel, que o pró-ligante **(1)** não apresentou capacidade de clivagem, pelo fato de não terem ocorrido alterações nas Formas I (circular superenovelado) e II (circular aberto) quando as diferentes diluições do composto são comparadas ao padrão (0mM) como observa-se na Figura 36.

Bem como para o DNA plasmidial pBSKII, o composto em questão ainda foi testado com o DNA plasmidial pUC18, sendo que também não apresentou capacidade de clivagem.

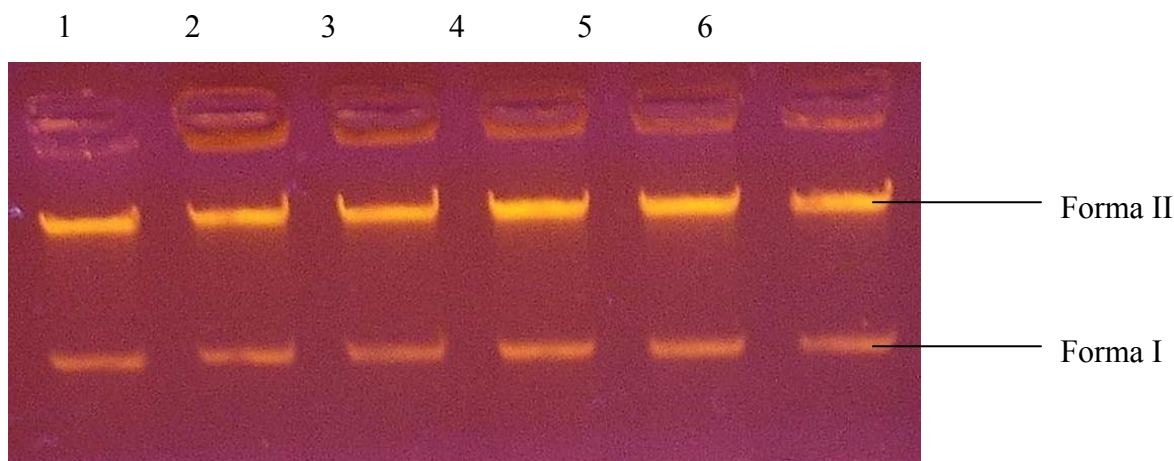


Figura 36. Eletroforese em gel de agarose, do pró-ligante **(1)**, utilizando DNA plasmidial pBSKII. Da esquerda para a direita, conforme os números 1 a 6, tem-se as concentrações: 0; 3,15; 1,88; 1,25; 0,75; 0,375mM.

5.1.6. Análise Estrutural por Difração de Raios-X em Monocristal

Após a redução dos dados coletados a partir do monocristal, através do programa SAINT⁶¹ com o difratômetro de raios-X APEX II - CCD⁶¹, correspondentes a uma rede cristalina recíproca monoclinica, um arquivo contendo 8515 reflexões indexadas e corrigidas quanto aos efeitos de Lorentz e polarização foi gerado. Deste número total de reflexões coletadas, foram separadas as simetricamente dependentes, resultando em 1688 reflexões simetricamente independentes, com índice de discordância interno $R_{int} = 0,0172$.

As reflexões simetricamente independentes foram submetidas a uma análise em função das condições de reflexão e/ou extinção, através do uso do programa WinGX⁶⁷, para confirmar o tipo de Bravais e os elementos de simetria componentes do grupo espacial. O grupo espacial confirmou-se como $C2/c$ (nº 15 – *International Tables for Crystallography*⁶⁸).

Na Tabela 3 reúnem-se: a condição de reflexão observada e relacionada ao tipo de Bravais; a condição de reflexão observada para a classe zonal; e as condições de reflexão observadas para as classes seriais, sendo as duas últimas correspondentes aos operadores de simetria cristalográficos 2_I e c

O grupo espacial $C2/c$ é centrossimétrico em função da simetria de Laue $2/m$, que é equivalente a operação $\bar{1}$. Esta operação de inversão é apresentada como um dos elementos de simetria que descreve o conteúdo da cela elementar.

Tabela 3. Condições de reflexão observadas para a rede com simetria monoclinica do pró-ligante (**1**), pertencente ao grupo espacial $C2/c$.

Classe	Reflexão	Condição geral observada	Informação Rede/operador	Direção Cristalográfica
hkl (integral)	$h+k$	$2n$	Tipo de Bravais C	
$h0l$ (zonal)	l	$2n$	c	[010]
$h00$ (serial)	h	$2n$	2_1	[100]
$0k0$ (serial)	k	$2n$	2_1	[010]
$00l$ (serial)	l	$2n$	2_1	[001]

Solução da estrutura molecular

Da fórmula geral e empírica

$$N_{AM} = V_{CE} / Z \cdot 18$$

previu-se o número de átomos não-hidrogenóides (N_{AM}) que compõem a estrutura molecular.

Considerando-se que, para efeito da solução da estrutura, todos os átomos situem-se em posições cristalográficas gerais no grupo espacial $C2/c$ com um número de fórmulas elementares (Z) igual a oito, a previsão do número de átomos não-hidrogenóides constituintes da parte assimétrica da estrutura molecular do pró-ligante (**1**) resulta em:

$$N_{AM} = 1815,5 \text{ \AA}^3 / 8 \cdot 18$$

$$N_{AM} = 12,61 \sim 13 \text{ átomos}$$

Incluindo-se um erro experimental permitido próximo a $\pm 10\%$, este valor levou a uma previsão da parte assimétrica da fórmula elementar empírica muito próxima a $C_8 N_3 O_3$.

A solução primária da estrutura foi obtida via Métodos Diretos. A solução e o refinamento via SIR2004⁶⁹.

Os átomos não-hidrogenóides da molécula de pró-ligante (**1**) foram localizados a partir de Sínteses de Fourier diferenças e refinados em cada etapa com parâmetros térmicos isotrópicos, sendo que os dados são observados na Tabela 4. Após o ciclo final do refinamento isotrópico de todos os átomos não-hidrogenóides do esqueleto da molécula do pró-ligante (**1**), incluindo 57 parâmetros, os índices de discordância não-ponderado R e ponderado wR alcançados foram de 13,4% para 1477 reflexões observadas com $[I > 2\sigma(I)]$ e 14,28% para 1688 reflexões simetricamente independentes, respectivamente.

Tabela 4. Coordenadas atômicas e parâmetros de deslocamentos térmicos isotrópicos equivalentes dos átomos não-hidrogenóides, (U_{eq}) ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) do pró-ligante (**1**) ($\text{C}_8\text{N}_3\text{O}_3\text{H}_9$). Desvio-padrão ente parênteses.

Átomos	x	y	z	U_{eq}
C(1)	725(1)	12884(3)	2642(1)	44(1)
C(2)	2074(1)	211(2)	258(1)	38(1)
C(11)	1081(1)	6035(2)	799(1)	33(1)
C(12)	1602(1)	5696(3)	1496(1)	42(1)
C(13)	1923(1)	3805(3)	1321(1)	43(1)
C(14)	1734(1)	2244(2)	458(1)	36(1)
C(15)	1210(1)	2582(2)	-226(1)	38(1)
C(16)	883(1)	4444(2)	-58(1)	36(1)
N(11)	571(1)	11113(2)	1773(1)	36(1)
N(12)	922(1)	9472(2)	1749(1)	36(1)
N(13)	735(1)	7892(2)	939(1)	37(1)
O(1)	95(1)	11245(2)	1103(1)	53(1)
O(21)	1901(1)	-1135(2)	-522(1)	52(1)
O(22)	2553(1)	-60(2)	938(1)	54(1)

Como parte final do refinamento isotrópico dos átomos não-hidrogenóides do esqueleto molecular do pró-ligante (**1**), foram localizados os átomos de hidrogênio ligados ao anel aromático e ao grupo metila. A localização geométrica dos hidrogênios envolveu o cálculo das coordenadas fracionárias dos átomos de hidrogênio a partir das coordenadas

fracionárias dos átomos não-hidrogenóides localizados e refinados com parâmetros térmicos isotrópicos.

Os átomos de hidrogênio vinculados ao anel aromático foram refinados com parâmetros térmicos isotrópicos correspondentes a 1,2 vezes o valor do parâmetro térmico do átomo não-hidrogenóide (carbono) associado a ele, considerando-se uma distância de ligação constante $C(sp^2)-H=0,93\text{\AA}$. Já os átomos de hidrogênio vinculados ao grupo metila foram refinados com parâmetros térmicos isotrópicos correspondentes a 1,5 vezes o valor do parâmetro térmico do átomo não-hidrogenóide (carbono) associado a ele, considerando-se uma distância de ligação constante $C(sp^3)-H=0,96\text{\AA}$.

É importante salientar que a ligação N(13)-H(1) entre o hidrogênio e o nitrogênio da cadeia triazenídica apresenta $0,880(17)\text{\AA}$ e a ligação O(22)-H(2) entre o oxigênio e o hidrogênio do grupo carboxílico apresenta $0,98(3)\text{\AA}$, evidenciando-se que estes valores foram encontrados experimentalmente pelo refinamento dos átomos com parâmetros térmicos isotrópicos através de Fourier diferenças, e que a molécula do pró-ligante (**1**) apresenta-se na forma tautômera (I).

A inclusão dos átomos de hidrogênio no refinamento, considerando-se os parâmetros térmicos isotrópicos para todos os átomos do esqueleto molecular do pró-ligante (**1**), reunindo 65 parâmetros, conduziram aos índices de discordância não-ponderado R e ponderado wR de 12,5% para 1477 reflexões observadas com $[I>2\sigma(1)]$ e 13,52% para 1688 reflexões simetricamente independentes, respectivamente.

Para finalizar a estrutura molecular do pró-ligante (**1**), incluindo parâmetros térmicos isotrópicos para os átomos de hidrogênio e anisotrópicos para todos os átomos não-hidrogenóides, as correções de intensidade dos dados de reflexão em função de processos de absorção pelo método semi-empírico SADABS⁷⁰ (correção feita apesar do pequeno coeficiente de absorção linear observado de $0,112\text{mm}^{-1}$), e a inclusão do fator de extinção, reunindo 136 parâmetros, levaram aos índices de discordância não-ponderado R e ponderado wR de 3,25% para 1447 reflexões observadas com $[I>2\sigma(1)]$ e 3,74% considerando-se 1688 reflexões simetricamente independentes, respectivamente, observados pela Tabela 5. Nesta etapa final do refinamento, foi observada a equação de ponderação, $w = 1/[s^2(Fo^2) + (0,0600P)^2 + 0,4298P]$ onde $P = (Fo^2 + 2Fc^2)/3$, e a razão máxima deslocamento/desvio padrão estimado (maximal shift/e.s.d.) que ficou em 0,000.

Os parâmetros de cela foram determinados a partir de 3963 reflexões obtidas em quadrantes aleatórios da Esfera de Ewald, incluindo a região de varredura angular de

2,85 a 29,21° e refinadas pelo método dos mínimos quadrados⁷¹. A coleta de intensidades envolveu técnicas de varredura φ e ω .

Tabela 5. Dados da coleta de intensidades e do refinamento da estrutura cristalina/molecular do pró-ligante (**1**) (C₈N₃O₃H₉). Desvio-padrão entre parênteses.

Fórmula Empírica	C ₈ H ₉ N ₃ O ₃
Peso molecular (g)	195,18
Temperatura (K)	293(2)
Radiação empregada (Å)	0,71073 Mo-K α
Sistema cristalino	Monoclínico
Grupo espacial	C2/c
Parâmetros de cela (Å)	$a = 27,2046(8)$ $b = 5,02180(10)$ $\beta = 113,13(1)^\circ$ $c = 14,4503(5)$
Volume (Å ³)	1815,47(9)
Número de fórmulas elementares (Z)	8
Densidade calculada (Mg/m ³)	1,428
Coefficiente linear de absorção (mm ⁻¹)	0,112
F(000)	816
Tamanho do cristal (mm ³)	0,45 x 0,21 x 0,08
Região de varredura 2 θ (°)	1,63 a 25,49
Região de índices	$-32 \leq h \leq 30, -6 \leq k \leq 6, -17 \leq l \leq 17$
Número de reflexões coletadas	8515
Número de reflexões independentes	1688 [R(int) = 0,0172]
Região de varredura alcançada 2 θ (°)	25,49, 99,9 %
Transmissão máx. e mín.	0,9911 e 0,9510
Método de refinamento	Matriz completa, mínimos quadrados sobre F ²
Dados/Restrições/Parâmetros refinados	1688 / 0 / 136
Goodness-of-fit on F ²	1,126
Índices de discordância finais [I>2 σ (I)]	$R_1 = 0,0325, wR_2 = 0,0977$
Índices de discordância (todos os dados)	$R_1 = 0,0374, wR_2 = 0,1016$
Densidade eletrônica residual (e.Å ⁻³)	0,162 e -0,193

A fórmula estrutural do pró-ligante (**1**) é evidenciada na Figura 37.

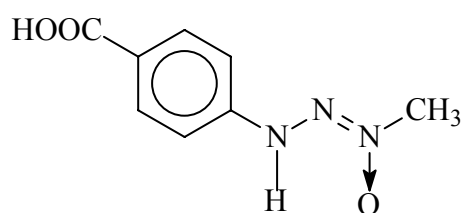


Figura 37. Fórmula estrutural do pró-ligante 1-metil-3-(*p*-carboxifenil)triazeno 1-óxido (**1**) no estado sólido.

A estrutura cristalina deste pró-ligante reúne oito moléculas discretas na cela elementar, cuja unidade molecular está representada na Figura 38, sendo que nenhum átomo encontra-se desordenado.

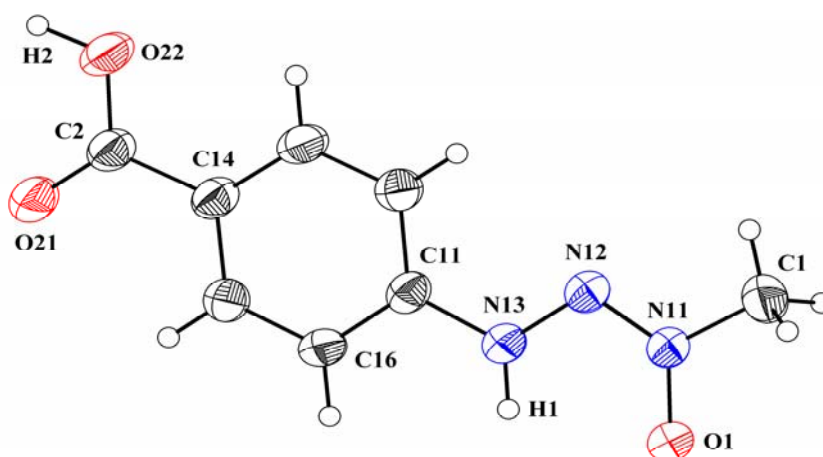


Figura 38. Projeção da estrutura molecular do pró-ligante 1-metil-3-(*p*-carboxifenil)triazeno 1-óxido (**1**) (ORTEP⁷²).

A molécula de pró-ligante (**1**) é praticamente plana (r.m.s. 0,0192Å), sendo que esta planaridade se confirma pela análise dos ângulos interplanares entre os principais fragmentos da estrutura molecular indicados na Tabela 6.

Tabela 6. Ângulos interplanares (°) entre os principais fragmentos da molécula 1-metil-3-(*p*-carboxifenil)triazeno 1-óxido (**1**).

Fragmento	Planaridade (r.m.s. Å)	Ângulo interplanar (°)
O ₂₂ , C ₂ , O ₂₁ / C ₁₁ – C ₁₆	0,0000 / 0,0064	1,6(2)
C ₁₁ – C ₁₆ / N ₁₃ , N ₁₂ , N ₁₁ , O ₁ , C ₁	0,0064 / 0,0093	1,0(1)
N ₁₃ , N ₁₂ , N ₁₁ , O ₁ , C ₁ / toda a molécula	0,0093 / 0,0192	0,8(1)

Detalhes adicionais da geometria do pró-ligante (**1**) podem ser obtidos na Tabela 7.

Tabela 7. Comprimentos de ligação (Å) e ângulos de ligação (°) selecionados para o pró-ligante (**1**) (C₈H₉N₃O₃). Desvio-padrão entre parênteses.

C(1)-N(11)	1,4598(15)
C(2)-O(21)	1,2380(15)
C(2)-O(22)	1,2949(14)
C(2)-C(14)	1,4795(16)
C(11)-N(13)	1,3939(15)
N(11)-N(12)	1,2718(13)
N(11)-O(1)	1,2769(12)
N(12)-N(13)	1,3389(14)
N(13)-H(1)	0,880(17)
O(22)-H(2)	0,98(3)
O(21)-C(2)-O(22)	122,93(11)
O(21)-C(2)-C(14)	120,67(11)
O(22)-C(2)-C(14)	116,40(10)
C(16)-C(11)-N(13)	117,73(11)
C(15)-C(14)-C(2)	119,39(11)
C(13)-C(14)-C(2)	121,65(11)
N(12)-N(11)-O(1)	124,13(10)
N(12)-N(11)-C(1)	116,93(10)
O(1)-N(11)-C(1)	118,92(9)
N(11)-N(12)-N(13)	112,12(10)
N(12)-N(13)-C(11)	118,52(10)
N(12)-N(13)-H(1)	118,1(10)
C(11)-N(13)-H(1)	122,5(10)
C(2)-O(22)-H(2)	113,0(14)

As moléculas na cela elementar polimerizam-se unidimensionalmente na direção cristalográfica [100] através de ligações de hidrogênio, formando cadeias independentes. Estas cadeias independentes também apresentam ligações de hidrogênio na direção cristalográfica [001], como se visualiza na Figura 39. Estas ligações são do tipo clássicas $\text{N}_{13}\text{-H}_1\text{---O}_1'$, código de simetria (') $-x, 2-y, -z$; $\text{O}_{22}\text{-H}_2\text{---O}_{21}''$, código de simetria (") $\frac{1}{2}-x, -\frac{1}{2}-y, -z$, e formam um arranjo bidimensional.

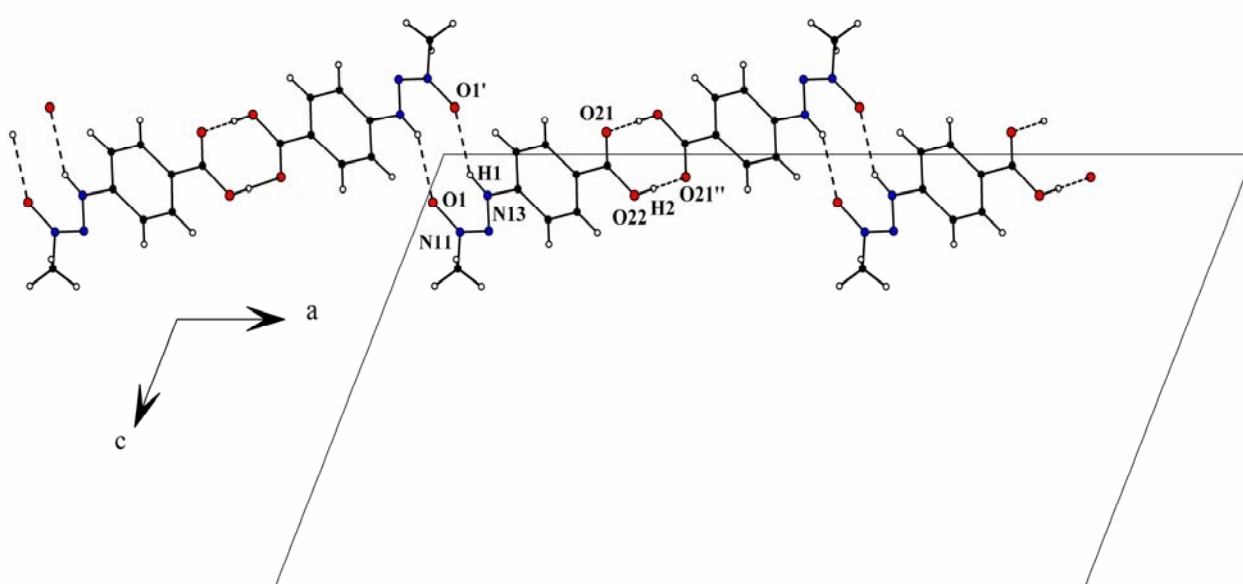


Figura 39. Projeção de uma cadeia independente de moléculas de pró-ligante (1) na direção cristalográfica [010]. As ligações intermoleculares $\text{N-H}\text{---O}$ e $\text{O-H}\text{---O}$ estão representadas por linha pontilhadas (DIAMOND⁷³).

Em relação aos elementos de simetria, é possível identificar pela Figura 40, a presença de centros de inversão no centro da cela unitária e no centro das ligações de hidrogênio formadas entre as moléculas nas direções cristalográficas [100] e [001].

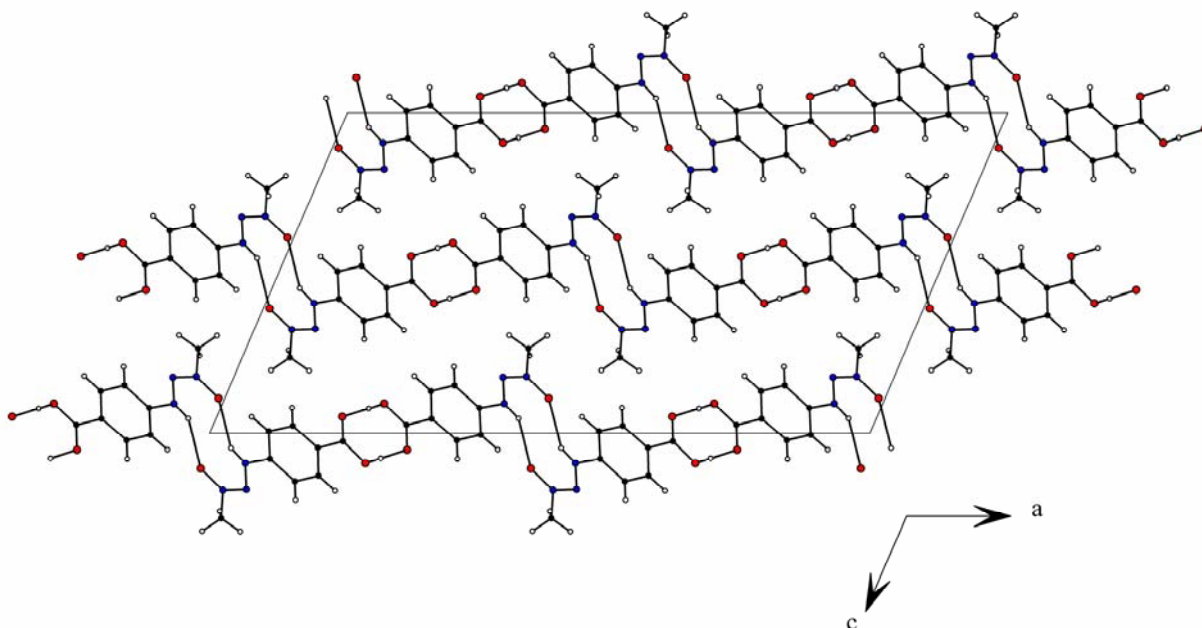


Figura 40. Projeção na direção cristalográfica [010] evidenciando a disposição das moléculas de pró-ligante **(1)** na célula unitária na forma de cadeias independentes unidas através de centros de inversão (DIAMOND⁷³).

5.2. Pró-ligante 1,3-bis(4-carboxifenil)triazeno (**2**)

5.2.1. Atividade Bacteriostática

Para a determinação da CIM, o pró-ligante **(2)** foi testado nas mesmas concentrações e condições que as relatadas para o pró-ligante **(1)** frente as seguintes bactérias: *S. aureus* β -hemolítico, *S. aureus* ATCC 25923, *S. saprophyticus*, *Enterococcus spp.*, *Micrococcus spp.*, *S. agalactiae*, *E. aerogenes*, *E. cloacae*, *E. coli* ATCC 25922, *Salmonella spp.*, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *A. baumannii*, *Bordetella bronchiseptica* e *B. cereus*.

Para este pró-ligante **(2)** a concentração mais alta empregada nas diluições também foi 128 μ g/mL, sendo que nas concentrações testadas o composto não foi capaz de inibir o crescimento bacteriano, portanto CIM foi $\geq 128\mu$ g/mL

O precursor do pró-ligante **(2)** é o ácido *p*-aminobenzóico, cujo resultado da CIM, frente a diversas bactérias, foi descrito anteriormente para o pró-ligante **(1)**.

5.2.2. Análise Estrutural por Difração de Raios-X em Monocristal

Após a redução dos dados coletados a partir do monocristal, através do programa SAINT⁶¹ com o difratômetro de raios-X APEX II – CCD⁶¹, correspondentes a uma rede cristalina recíproca monoclinica, um arquivo contendo 28115 reflexões indexadas e corrigidas quanto aos efeitos de Lorentz e polarização foi gerado. Deste número total de reflexões coletadas, foram separadas as simetricamente dependentes, resultando em 3147 reflexões simetricamente independentes, com índice de discordância interno $R_{int} = 0,0528$.

As reflexões simetricamente independentes foram submetidas a uma análise em função das condições de reflexão e/ou extinção, através do uso do programa WinGX⁶⁷, para confirmar o tipo de Bravais e os elementos de simetria componentes do grupo espacial. O grupo espacial confirmou-se como $P2_1/c$ (nº 14 – *International Tables for Crystallography*⁶⁸). Da ausência de uma regularidade nas condições gerais de reflexão para a classe integral dos índices hkl , confirmou-se o tipo de Bravais P para a rede cristalina tridimensional.

Na Tabela 8 reúnem-se: a condição de reflexão observada e relacionada ao tipo de Bravais; a condição de reflexão observada para a classe zonal; e as condições de reflexão observadas para as classes seriais, sendo as duas últimas correspondentes aos operadores de simetria cristalográficos 2_1 e c .

O grupo espacial $P2_1/c$ é centrossimétrico em função da simetria de Laue $2/m$, que é equivalente a operação $\bar{1}$. Esta operação de inversão é apresentada como um dos elementos de simetria que descreve o conteúdo da cela elementar.

Tabela 8. Condições de reflexão observadas para a rede com simetria monoclinica do pró-ligante (2), pertencente ao grupo espacial $P2_1/c$.

Classe	Reflexão	Condição geral observada	Informação Rede/operador	Direção Cristalográfica
hkl (integral)	$h+k+l$	Nenhuma	Tipo de Bravais P	
$h0l$ (zonal)	H	$2n$	C	[010]
$0k0$ (serial)	K	$2n$	2_1	[010]
$00l$ (serial)	L	$2n$	2_1	[001]

Solução da estrutura molecular

Da fórmula geral e empírica

$$N_{AM} = V_{CE} / Z \cdot 18$$

previu-se o número de átomos não-hidrogenóides (N_{AM}) que compõem a estrutura molecular.

Considerando-se que, para efeito da solução da estrutura, todos os átomos situem-se em posições cristalográficas gerais no grupo espacial $P2_1/c$ com um número de fórmulas elementares (Z) igual a quatro (máximo neste grupo), a previsão do número de átomos não-hidrogenóides constituintes da parte assimétrica da estrutura molecular do pró-ligante (**2**) resulta em:

$$N_{AM} = 1680,3 \text{ \AA}^3 / 4 \cdot 18$$

$$N_{AM} = 23,34 \sim 23 \text{ átomos}$$

Incluindo-se um erro experimental permitido próximo a $\pm 10\%$, este valor levou a uma previsão da parte assimétrica da fórmula elementar empírica muito próxima a $C_{14} N_3 O_5$, ou seja, uma molécula de pró-ligante (**2**) e uma molécula de água como solvato de cristalização.

A solução primária da estrutura foi obtida via Métodos Diretos. A solução e o refinamento via SIR2004⁶⁹.

Os átomos não-hidrogenóides da molécula de pró-ligante (**2**) foram localizados a partir de Sínteses de Fourier diferenças e refinados em cada etapa com parâmetros térmicos isotrópicos, sendo que os dados são observados na Tabela 9. Após o ciclo final do refinamento isotrópico de todos os átomos não-hidrogenóides do esqueleto da molécula do pró-ligante (**2**), incluindo 92 parâmetros, os índices de discordância não-ponderado R e ponderado wR alcançados foram de 16,52% para 1819 reflexões observadas com $[I > 2\sigma(1)]$ e 19,74% para 3147 reflexões simetricamente independentes, respectivamente.

Tabela 9. Coordenadas atômicas e parâmetros de deslocamentos térmicos isotrópicos equivalentes dos átomos não-hidrogenóides, (U_{eq}) ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) do pró-ligante (**2**) ($C_{14}H_{11}N_3O_4 \cdot H_2O$). Desvio-padrão entre parênteses.

Átomo	x	y	z	$U(eq)$
C(1)	4265(1)	1951(9)	4517(2)	66(1)
C(2)	1094(1)	14043(8)	-521(2)	50(1)
C(11)	2624(1)	5978(8)	3475(2)	48(1)
C(12)	3049(1)	5057(9)	3100(2)	61(1)
C(13)	3590(1)	3746(10)	3447(2)	66(1)
C(14)	3701(1)	3377(8)	4158(2)	59(1)
C(15)	3266(1)	4269(9)	4519(2)	63(1)
C(16)	2732(1)	5574(9)	4182(2)	59(1)
C(21)	1402(1)	10518(7)	1565(1)	44(1)
C(22)	836(1)	10915(9)	1203(1)	52(1)
C(23)	733(1)	12044(8)	527(2)	54(1)
C(24)	1191(1)	12830(7)	198(1)	46(1)
C(25)	1758(1)	12523(9)	569(2)	58(1)
C(26)	1871(1)	11372(9)	1244(2)	59(1)
N(11)	2080(1)	7332(7)	3155(1)	50(1)
N(12)	1990(1)	8214(6)	2495(1)	47(1)
N(13)	1476(1)	9387(6)	2261(1)	48(1)
O(1)	4351(1)	1626(8)	5167(2)	95(1)
O(2)	4645(1)	1059(8)	4166(2)	94(1)
O(3)	545(1)	14181(8)	-838(1)	77(1)
O(4)	1489(1)	14873(8)	-810(1)	87(1)
O(5)	412(1)	5960(9)	7815(1)	89(1)

Como parte final do refinamento isotrópico dos átomos não-hidrogenóides do esqueleto molecular do pró-ligante (**2**), foram localizados os átomos de hidrogênio ligados aos anéis aromáticos. A localização geométrica envolveu o cálculo das coordenadas fracionárias dos átomos de hidrogênio a partir das coordenadas fracionárias dos átomos não-hidrogenóides localizados e refinados com parâmetros térmicos isotrópicos. Os átomos de hidrogênio vinculados aos anéis aromáticos foram refinados com parâmetros térmicos isotrópicos, correspondentes a 1,2 vezes o valor do parâmetro térmico do átomo não-hidrogenóide (carbono) associado a ele, considerando-se uma distância de ligação constante $C(sp^2)-H=0,93\text{Å}$.

É importante salientar que a ligação N(11)-H(1), entre o hidrogênio e o nitrogênio da cadeia triazenídica apresenta $0,97(4)\text{Å}$, as ligações O(2)-H(2) e O(3)-H(3), nos grupos

carboxílicos apresentam 1,082(2)Å e 1,101(2)Å respectivamente, e as ligações O(5)-H(51) e O(5)-H(52), nas moléculas de água apresentam 1,077(3)Å e 0,936(3)Å respectivamente, evidenciando-se que estes valores foram encontrados experimentalmente pelo refinamento dos átomos com parâmetros térmicos isotrópicos através de Fourier diferenças.

A inclusão dos átomos de hidrogênio no refinamento, considerando-se os parâmetros térmicos isotrópicos para todos os átomos do esqueleto molecular do pró-ligante (**2**), reunindo 96 parâmetros, conduziram aos índices de discordância não-ponderado R e ponderado wR de 14,90% para 1819 reflexões observadas com $[I > 2\sigma(1)]$ e 18,16% para 3147 reflexões simetricamente independentes, respectivamente.

Para finalizar a estrutura molecular do pró-ligante (**2**), incluindo parâmetros térmicos isotrópicos para os átomos de hidrogênio e anisotrópicos para todos os átomos não-hidrogenóides, as correções de intensidade dos dados de reflexão em função de processos de absorção pelo método semi-empírico SADABS⁷⁰ (correção feita apesar do pequeno coeficiente de absorção linear observado de 0,093mm⁻¹), e a inclusão do fator de extinção, reunindo 206 parâmetros, levaram aos índices de discordância não-ponderado R e ponderado wR de 7,64% para 1819 reflexões observadas com $[I > 2\sigma(1)]$ e 10,50% considerando-se 3147 reflexões simetricamente independentes, respectivamente, observados pela Tabela 10. Nesta etapa final do refinamento, foi observada a equação de ponderação, $w = 1/[s^2(\text{Fo}^2) + (0,1923P)^2 + 0,0000P]$ onde $P = (\text{Fo}^2 + 2\text{Fc}^2)/3$, e a razão máxima deslocamento/desvio padrão estimado (maximal shift/e.s.d.) que ficou em 0,000.

Os parâmetros de cela foram determinados a partir do refinamento de 4080 reflexões obtidas em quadrantes aleatórios da Esfera de Ewald, incluindo a região de varredura angular de 2,96 a 28,02° e refinadas pelo método dos mínimos quadrados⁷¹. A coleta de intensidades envolveu técnicas de varredura φ e ω .

Tabela 10. Dados da coleta de intensidades e do refinamento da estrutura cristalina/molecular do pró-ligante (**2**) (C₁₄H₁₁N₃O₄ · H₂O). Desvio-padrão entre parênteses.

Fórmula Empírica	C ₁₄ H ₁₁ N ₃ O ₄ · H ₂ O
Peso molecular (g)	303,27
Temperatura (K)	293(2)
Radiação empregada (Å)	0,71073/ Mo-K α
Sistema cristalino	Monoclínico

Continuação da Tabela 10

Grupo espacial	$P2_1/c$
Parâmetros de cela (Å)	$a = 23,168(2)$ $b = 3,7398(4)$ $\beta = 100,912(6)^\circ$ $c = 19,751(2)$
Volume (Å ³)	1680,3(3)
Número de fórmulas elementares(Z)	4
Densidade calculada (Mg/m ³)	1,199
Coefficiente linear de absorção (mm ⁻¹)	0,093
F(000)	632
Tamanho do cristal (mm ³)	0,34 x 0,07 x 0,05
Região de varredura 2 θ (°)	0,90 a 25,49
Região de índices	$-28 \leq h \leq 27, -4 \leq k \leq 4, -23 \leq l \leq 23$
Número de reflexões coletadas	28115
Número de reflexões independentes	3147 [$R(\text{int}) = 0,0528$]
Região de varredura alcançada 2 θ (°)	25,49 , 100,0 %
Transmissão máx. e mín.	0,9954 e 0,9691
Método de refinamento	Matriz completa, mínimos quadrados sobre F^2
Dados/Restrições/Parâmetros refinados	3147 / 0 / 206
Goodness-of-fit on F^2	0,969
Índices de discordância finais [$I > 2\sigma(I)$]	$R_1 = 0,0764, wR_2 = 0,2425$
Índices de discordância (todos os dados)	$R_1 = 0,1050, wR_2 = 0,2651$
Coefficiente de extinção	0,011(4)
Densidade eletrônica residual (e.Å ⁻³)	0,505 e -0,351

A fórmula estrutural do pró-ligante (2) é evidenciada na Figura 41.

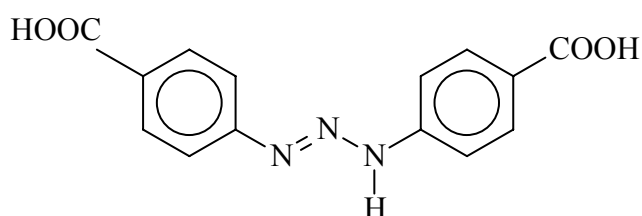


Figura 41. Fórmula estrutural do pró-ligante 1,3-bis(4-carboxifenil)triazeno (2).

A estrutura cristalina deste pró-ligante reúne quatro moléculas discretas na cela elementar, cuja unidade molecular está representada na Figura 42, sendo que nenhum átomo encontra-se desordenado.

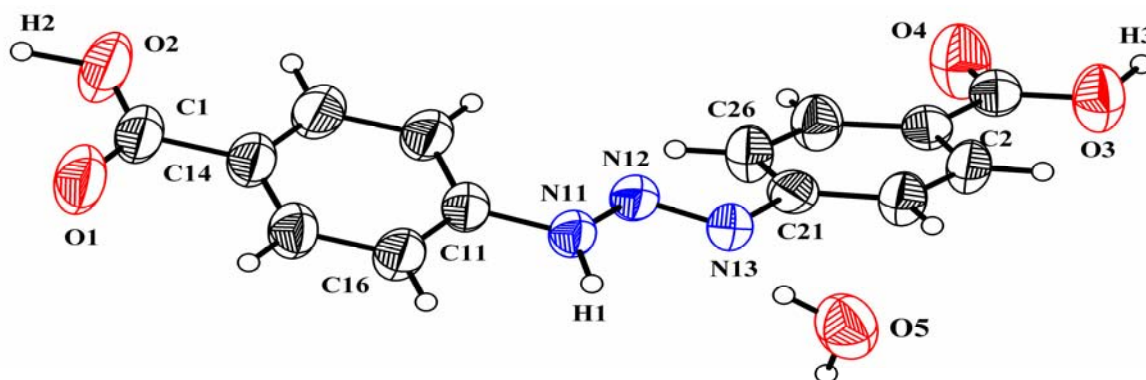


Figura 42. Projeção da estrutura molecular do 1,3-bis(4-carboxifenil)triazeno (**2**), incluindo uma molécula de água de cristalização (ORTEP⁷²).

A molécula de pró-ligante (**2**) não é planar (r.m.s. 0,2071Å), sendo que isto se confirma pela análise comparativa dos ângulos interplanares, na Tabela 11, entre os principais fragmentos da estrutura molecular, apesar dos átomos destes fragmentos serem praticamente planares entre si. É importante evidenciar que a quebra da planaridade da molécula de pró-ligante (**2**) ocorre devido a uma considerada distorção no anel C₂₁–C₂₆ em relação à cadeia diazoamínica.

Tabela 11. Ângulos interplanares (°) entre os principais fragmentos da molécula 1,3-bis(4-carboxifenil)triazeno (**2**).

Fragmento	Planaridade (r.m.s. Å)	Ângulo interplanar (°)
C ₂ , O ₃ , O ₄ , H ₃ / C ₂₁ –C ₂₆	0,0192 / 0,0078	4,8(1)
C ₂₁ –C ₂₆ / H ₁ , N ₁₁ , N ₁₂ , N ₁₃	0,0078 / 0,0264	24,3(6)
H ₁ , N ₁₁ , N ₁₂ , N ₁₃ / C ₁₁ –C ₁₆	0,0264 / 0,0044	5,6(8)
C ₁₁ –C ₁₆ / C ₁ , O ₁ , O ₂ , H ₂	0,0044 / 0,0014	1,9(2)
C ₂ , O ₃ , O ₄ , H ₃ / toda a molécula	0,0192 / 0,2071	23,5(1)

Detalhes adicionais da geometria do pró-ligante (**2**) podem ser obtidos na Tabela 12.

Tabela 12. Comprimentos de ligação (Å) e ângulos de ligação (°) selecionados para o pró-ligante (**2**) (C₁₄H₁₁N₃O₄ · H₂O). Desvio-padrão entre parênteses.

C(1)-O(2)	1,265(4)
C(1)-O(1)	1,267(4)
C(1)-C(14)	1,463(4)
C(2)-O(4)	1,206(4)
C(2)-O(3)	1,309(3)
C(2)-C(24)	1,467(4)
C(11)-N(11)	1,395(3)
C(21)-N(13)	1,417(4)
N(11)-N(12)	1,322(3)
N(11)-H(1)	0,97(4)
N(12)-N(13)	1,271(3)
O(2)-H(2)	1,082(2)
O(3)-H(3)	1,101(2)
O(5)-H(51)	1,077(3)
O(5)-H(52)	0,936(3)
O(2)-C(1)-O(1)	122,5(3)
O(2)-C(1)-C(14)	118,7(3)
O(1)-C(1)-C(14)	118,8(3)
O(4)-C(2)-O(3)	121,3(3)
O(4)-C(2)-C(24)	123,2(3)
O(3)-C(2)-C(24)	115,6(3)
C(16)-C(11)-N(11)	118,3(3)
C(12)-C(11)-N(11)	121,3(3)
C(15)-C(14)-C(1)	120,6(3)
C(13)-C(14)-C(1)	120,3(3)
C(22)-C(21)-N(13)	117,7(2)
C(26)-C(21)-N(13)	123,2(2)
C(23)-C(24)-C(2)	122,2(3)
C(25)-C(24)-C(2)	119,5(3)
N(12)-N(11)-C(11)	119,9(3)
N(12)-N(11)-H(1)	125(2)

Continuação da Tabela 12

C(11)-N(11)-H(1)	115(2)
N(13)-N(12)-N(11)	113,9(2)
N(12)-N(13)-C(21)	112,8(2)
C(1)-O(2)-H(2)	114,4(3)
C(2)-O(3)-H(3)	109,2(2)
H(51)-O(5)-H(52)	108,2(2)

Na estrutura cristalina, ligações de hidrogênio estão presentes, sendo do tipo clássicas $\text{N}_{11}-\text{H}_1-\cdots-\text{O}_4'$, código de simetria (') $x, -y+5/2, z+1/2$; $\text{O}_2-\text{H}_2-\cdots-\text{O}_1''$, código de simetria (') $1-x, -y, 1-z$; $\text{O}_3-\text{H}_3-\cdots-\text{O}_5'''$ código de simetria (') $x, 1+y, -1+z$; $\text{O}_5'''-\text{H}_5-\cdots-\text{N}_{13}$, código de simetria $x, 3/2-y, -1/2+z$, como observa-se na Figura 43.

Além disso, pela Figura 44 na direção cristalográfica [010], observa-se que, através justamente, das ligações de hidrogênio é que as moléculas de 1,3-bis(4-carboxifenil)triazeno (**2**) e de água, na cela elementar, polimerizam-se bidimensionalmente, destacando-se os operadores de simetria 2_1 (eixo axial de rotação-translação) e -1 (inversão). Já pela projeção na direção cristalográfica [100], na Figura 45, destacam-se os elementos de simetria 2_1 (eixo axial de rotação-translação) e c (plano axial de reflexão-translação).

5.3. Pró-ligante 1-(4-etoxifenil)-3-(4-carboxifenil)triazeno (**3**)

5.3.1. Atividade Bacteriostática

Para a determinação da CIM o pró-ligante (**3**) foi testado nas mesmas concentrações e condições que as relatadas para os pró-ligantes (**1**) e (**2**) frente as seguintes bactérias: *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *A. baumannii*, *Burkholderia cepacia*, *E. coli* entero-invasora, *P. aeruginosa* ESBL e *Enterobacter spp.*

Para o pró-ligante (**3**) a concentração mais alta empregada nas diluições também foi 128 $\mu\text{g/mL}$, sendo que nestas concentrações testadas, o composto não foi capaz de inibir o crescimento bacteriano, portanto CIM foi $\geq 128\mu\text{g/mL}$.

5.3.2. Capacidade de Clivagem de DNA Plasmidial Dupla Fita

Já em relação ao estudo da clivagem de DNA plasmidial, pode-se observar, através da eletroforese em gel, que o pró-ligante 1-(4-etoxifenil)-3-(4-carboxifenil)triazeno (**3**) apresentou capacidade de clivagem, pelo fato de ter aumentado a quantidade de DNA plasmidial na Forma II (circular aberto) e diminuído a quantidade na Forma I (circular superenovelado), quando as diferentes diluições do composto são comparadas ao padrão (0mM), de acordo com a Figura 46.

A capacidade do pró-ligante (**3**) em clivar o DNA plasmidial pUC18 foi de 3,17% para a concentração 0,375mM, 15,33% para a concentração 0,75mM e 17,03% a concentração 1,25mM.

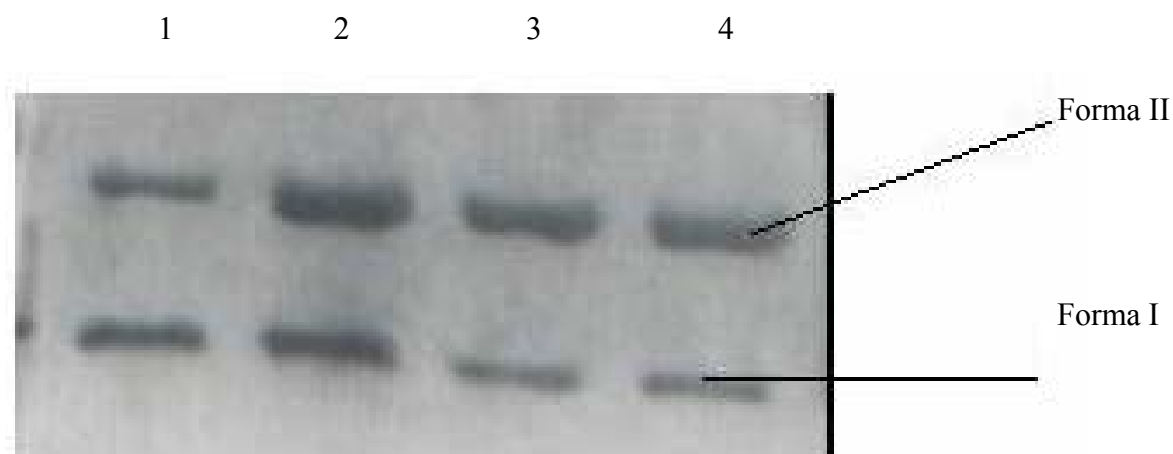


Figura 46. Eletroforese em gel de agarose do pró-ligante (**3**) utilizando DNA plasmidial pUC18. Da esquerda para a direita, conforme os números 1 a 4, tem-se as concentrações: 0; 0,375; 0,75; 1,25mM.

5.4. Complexo 3-(4-carboxilatofenil)-1-metiltriazeno 1-óxido de potássio tetraidratado (**4**)

5.4.1. Espectrometria no Infravermelho

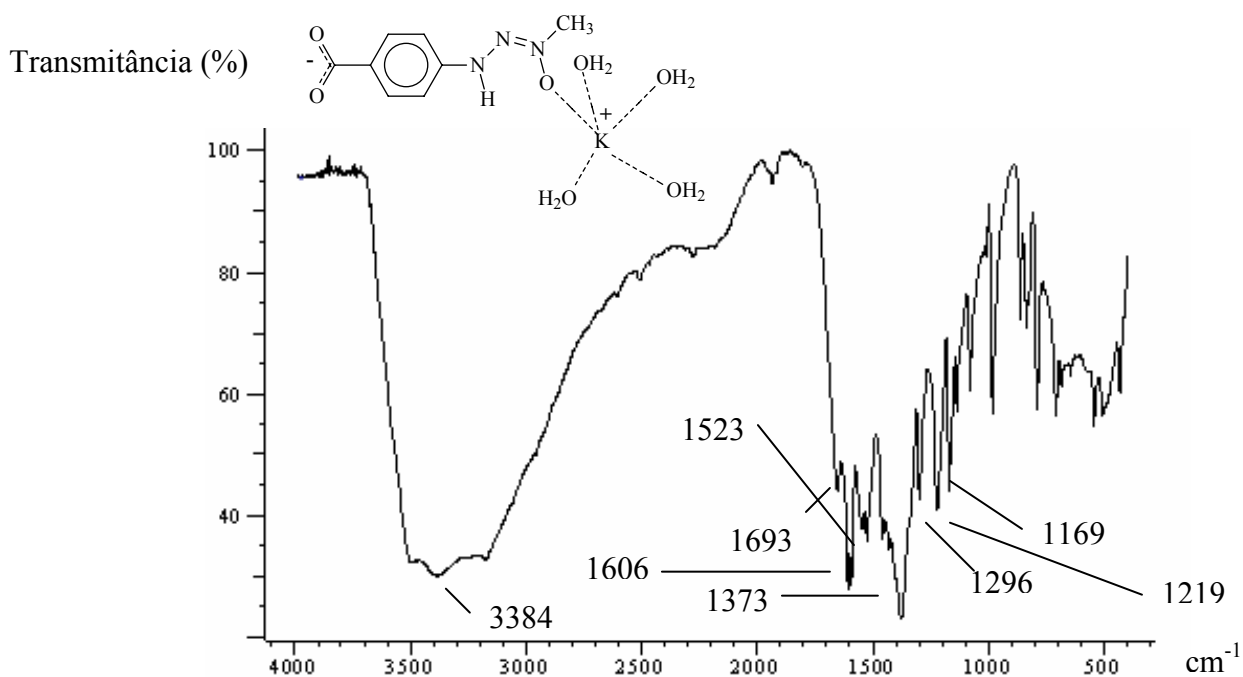


Figura 47. Espectro no Infravermelho do complexo (4), em KBr, na região de 400 a 4000cm^{-1} .

As vibrações observadas para o complexo (4), descritas na Tabela 13, conferem com a literatura e com as bandas características obtidas para o pró-ligante (1).

Tabela 13. Principais bandas para o complexo (4), observadas no espectro de infravermelho da Figura 47.

Atribuição	Intensidade Relativa	Número de Ondas (cm^{-1})
$\nu_{\text{as}}(\text{N-H})$	MF	3384
$\nu(\text{C=O})$	F	1693
$\nu(\text{C=C})$	MF	1606
$\delta(\text{N-H})$	F	1523
$\nu_{\text{as}}(\text{N=N})$	MF	1373
$\nu_{\text{s}}(\text{N}\rightarrow\text{O})$	F	1296
$\nu(\text{N-N})$	F	1219
$\nu_{\text{as}}(\text{N}\rightarrow\text{O})$	F	1163
$\delta(\text{C-H})$ no plano, correspondentes ao anel aromático	F	1300-900

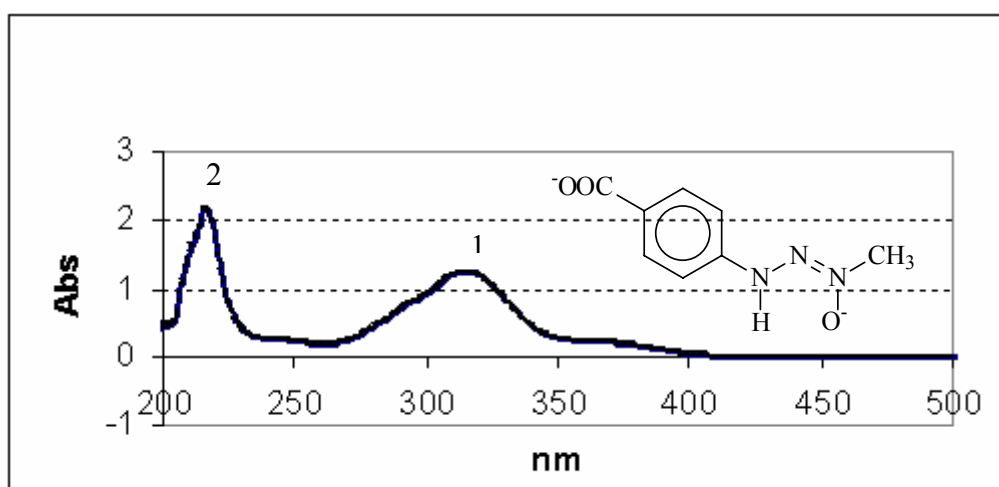
Continuação da Tabela 13

δ (C-H) fora do plano, correspondentes ao anel aromático	F	900-500
---	---	---------

A presença de ligações de hidrogênio envolvendo a função carboxílica e as quatro moléculas de água de hidratação no complexo (**4**) é evidenciada pela banda larga de absorção entre 3600 e 3000 cm^{-1} .

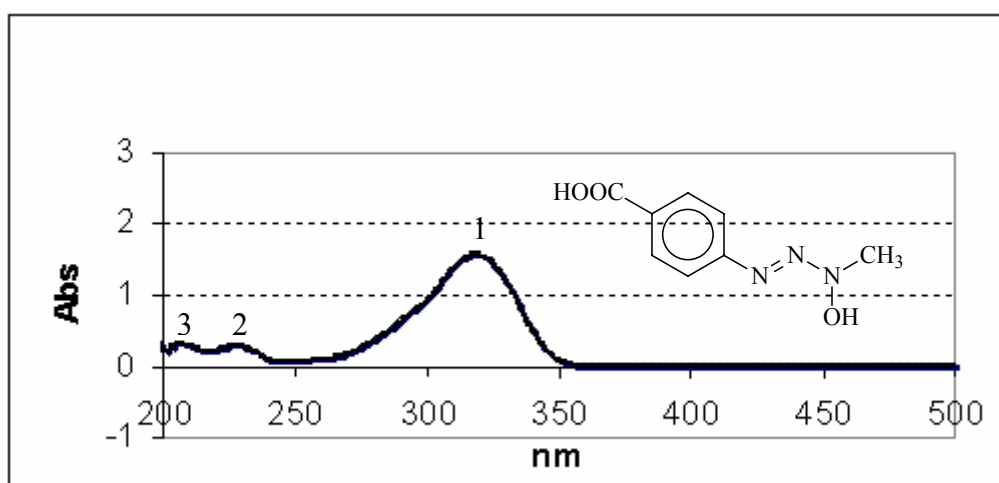
5.4.2. Espectrometria no Ultravioleta-Visível

Pelo espectro no ultravioleta-visível, na Figura 48, observa-se que a desprotonação do pró-ligante (**1**), isto é, a perda de H^+ , é evidente em 215nm, com a adição de hidróxido de potássio, através de um efeito hiperacrômico. É ainda perceptível um efeito hipocrômico e um leve deslocamento hipsocrômico nas absorções dos grupos -OH, -N=N- e -COOH formadores da banda larga, cujo pico localiza-se em 315nm, evidenciada pela comparação com o espectro do pró-ligante (**1**) protonado na Figura 49. Ainda pela Figura 48, observa-se que as absorções referentes ao anel aromático, na região entre 230 e 200nm, ficam encobertas pelo pico que indica a desprotonação. Pelo espectro da Figura 50, que evidencia a complexação com potássio, observa-se um efeito hiperacrômico da absorção na região em 200nm em relação ao pró-ligante (**1**) protonado na Figura 49 que, por comparação com o espectro do hidróxido de potássio na Figura 51, indica ser a presença do metal na esfera de coordenação.



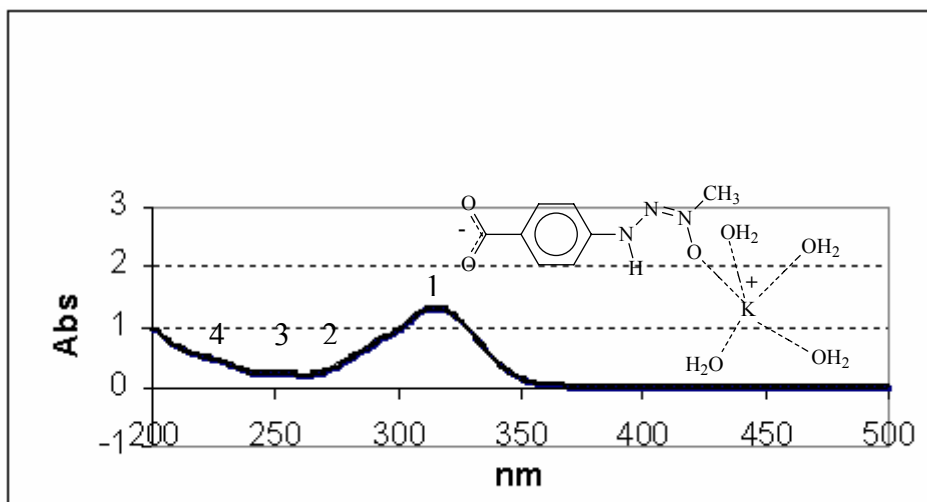
Picos	Absorbância	Comprimento de Onda (λ)
1	1,254	315,00
2	2,167	215,50

Figura 48. Espectro no UV-VIS do pró-ligante (1) desprotonado, em metanol, na região de 200 a 500nm.



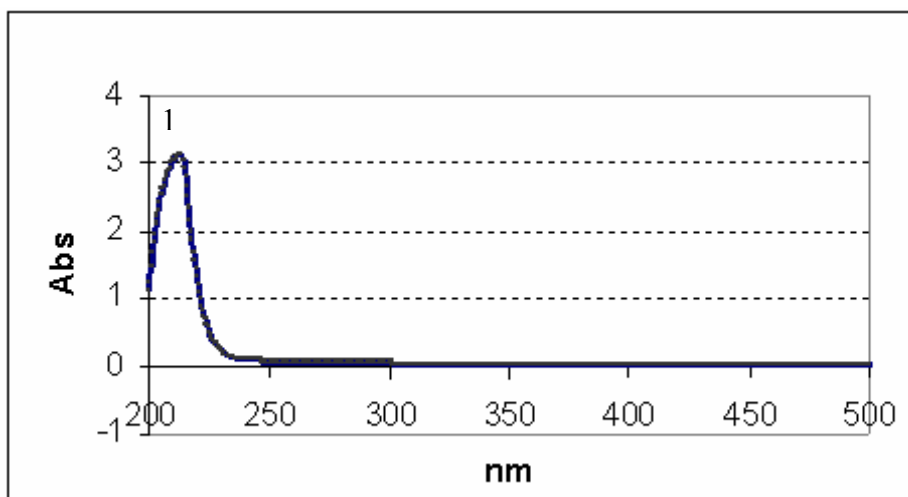
Picos	Absorbância	Comprimento de Onda (λ)
1	1,278	317,00
2	0,220	227,00
3	0,186	218,00

Figura 49. Espectro no UV-VIS do pró-ligante (1) protonado, em metanol, na região de 200 a 500nm.



Picos	Absorbância	Comprimento de Onda (λ)
1	1,312	316,00
2	0,185	261,50
3	0,213	250,50
4	0,208	243,50

Figura 50. Espectro no UV-VIS do complexo (4), em metanol, na região de 200 a 500nm.



Picos	Absorbância	Comprimento de Onda (λ)
1	3,135	212,00

Figura 51. Espectro no UV-VIS do hidróxido de potássio, em metanol, na região de 200 a 500nm.

5.4.3. Análise Estrutural por Difração de Raios-X em Monocristal

Após a redução dos dados coletados a partir do monocristal, através do programa SAINT⁶¹ com o difratômetro de raios-X APEX II – CCD⁶¹, correspondentes a uma rede cristalina recíproca monoclinica, um arquivo contendo 9772 reflexões indexadas e corrigidas quanto aos efeitos de Lorentz e polarização foi gerado. Deste número total de reflexões coletadas, foram separadas as simetricamente dependentes, resultando em 2473 reflexões simetricamente independentes, com índice de discordância interno $R_{int} = 0,0186$.

As reflexões simetricamente independentes foram submetidas a uma análise em função das condições de reflexão e/ou extinção, através do uso do programa WinGX⁶⁷, para

confirmar o tipo de Bravais e os elementos de simetria componentes do grupo espacial. O grupo espacial confirmou-se como $P2_1/c$ (nº 14 – *International Tables for Crystallography*⁶⁸). Da ausência de uma regularidade nas condições gerais de reflexão para a classe integral dos índices hkl , confirmou-se o tipo de Bravais P para a rede cristalina tridimensional.

Na Tabela 14 reúnem-se: a condição de reflexão observada e relacionada ao tipo de Bravais; a condição de reflexão observada para a classe zonal; e as condições de reflexões observadas para as classes seriais, sendo as duas últimas correspondentes aos operadores de simetria cristalográficos 2_1 e c .

O grupo espacial $P2_1/c$ é centrossimétrico em função da simetria de Laue $2/m$, que é equivalente a operação -1 . Esta operação de inversão é apresentada como um dos elementos de simetria que descreve o conteúdo da cela elementar.

Tabela 14. Condições de reflexão observadas para a rede com simetria monoclinica do complexo (4), pertencente ao grupo espacial $P2_1/c$.

Classe	Reflexão	Condição geral observada	Informação Rede/operador	Direção Cristalográfica
hkl (integral)	$h+k+l$	Nenhuma	Tipo de Bravais P	
$H00$ (zonal)	h	$2n$	c	[010]
$0k0$ (serial)	k	$2n$	2_1	[010]
$00l$ (serial)	l	$2n$	2_1	[001]

Solução da estrutura molecular

Da fórmula geral e empírica

$$N_{AM} = V_{CE} / Z \cdot 18$$

previu-se o número de átomos não-hidrogenóides (N_{AM}) que compõem a estrutura molecular.

Considerando-se que, para efeito da solução da estrutura, todos os átomos situem-se em posições cristalográficas gerais no grupo espacial $P2_1/c$ com um número de fórmulas elementares (Z) igual a quatro (máximo neste grupo), a previsão do número de átomos não-hidrogenóides constituintes da parte assimétrica da estrutura molecular do complexo (4) resulta em:

$$N_{AM}=1335,3\text{\AA}^3/4.18$$

$$N_{AM}=18,54 \sim 18 \text{ átomos}$$

Considerando-se um erro experimental permitido próximo a $\pm 10\%$, este valor levou a uma previsão da parte assimétrica da fórmula elementar empírica muito próxima a $C_8 K N_3 O_7$, incluindo 4 moléculas de água de hidratação.

A solução primária da estrutura foi obtida via Métodos Diretos. A solução e o refinamento via SIR2004⁶⁹.

Os átomos não-hidrogenóides do complexo **(4)** foram localizados a partir de Sínteses de Fourier diferenças e refinados em cada etapa com parâmetros térmicos isotrópicos, sendo que os dados são observados na Tabela 15. Após o ciclo final do refinamento isotrópico de todos os átomos não-hidrogenóides do esqueleto do complexo **(4)**, incluindo 77 parâmetros, os índices de discordância não-ponderado R e ponderado wR alcançados foram de 11,82% para 2132 reflexões observadas com $[I > 2\sigma(1)]$ e 13,40% para 2473 reflexões simetricamente independentes, respectivamente.

Tabela 15. Coordenadas atômicas e parâmetros de deslocamentos térmicos isotrópicos equivalentes dos átomos não-hidrogenóides, (U_{eq}) ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) do complexo **(4)** ($[C_8H_8N_3O_3]^- K^+ \cdot 4H_2O$). Desvio-padrão entre parênteses.

Átomo	x	y	z	U_{eq}
C(1)	2730(2)	630(3)	929(2)	24(1)
C(2)	7297(3)	-5326(4)	-1057(3)	40(1)
C(11)	5241(2)	-2525(3)	766(2)	26(1)
C(12)	4510(2)	-2026(3)	-202(2)	27(1)
C(13)	3714(2)	-994(3)	-143(2)	26(1)
C(14)	3614(2)	-448(3)	866(2)	24(1)
C(15)	4349(2)	-963(3)	1820(2)	27(1)
C(16)	5152(2)	-1990(3)	1778(2)	29(1)
N(11)	7053(2)	-4798(3)	-60(2)	30(1)
N(12)	6222(2)	-3972(3)	-194(2)	30(1)
N(13)	6073(2)	-3531(3)	768(2)	31(1)
O(1)	7666(2)	-5174(3)	879(2)	42(1)
O(2)	11401(2)	-6880(3)	2738(2)	45(1)

Continuação da Tabela 15

O(3)	8925(2)	-8260(3)	1122(2)	52(1)
O(4)	10348(3)	-7208(4)	69(3)	63(1)
O(5)	11079(3)	-1308(4)	1900(3)	74(1)
O(11)	2052(2)	983(3)	41(2)	35(1)
O(12)	2692(2)	1086(3)	1857(2)	35(1)
K(1)	9932(1)	-4547(1)	1813(1)	48(1)

Como parte final do refinamento isotrópico dos átomos não-hidrogenóides do esqueleto molecular do complexo (4), foram localizados os átomos de hidrogênio ligados ao anel aromático e ao grupo metila. A localização geométrica dos hidrogênios envolveu o cálculo das coordenadas fracionárias dos átomos de hidrogênio a partir das coordenadas fracionárias dos átomos não-hidrogenóides localizados e refinados com parâmetros térmicos isotrópicos.

Os átomos de hidrogênio vinculados ao anel aromático foram refinados com parâmetros térmicos isotrópicos correspondentes a 1,2 vezes o valor do parâmetro térmico do átomo não-hidrogenóide (carbono) associado a ele, considerando-se uma distância de ligação constante $C(sp^2)-H=0,93\text{\AA}$. Já os átomos de hidrogênio vinculados ao grupo metila foram refinados com parâmetros térmicos isotrópicos correspondentes a 1,5 vezes o valor do parâmetro térmico do átomo não-hidrogenóide (carbono) associado a ele, considerando-se uma distância de ligação constante $C(sp^3)-H=0,96\text{\AA}$.

É importante salientar que ligação N(13)-H(1), entre o hidrogênio e o nitrogênio da cadeia triazenídica apresenta $0,78(4)\text{\AA}$, e as ligações O(2)-H(21), O(2)-H(22), O(4)-H(41), O(4)-H(42), O(5)-H(51), O(5)-H(52), entre as moléculas de água apresentam $0,90(5)\text{\AA}$, $0,93(5)\text{\AA}$, $0,61(4)\text{\AA}$, $0,97(6)\text{\AA}$, $1,12(7)\text{\AA}$, $1,0(2)\text{\AA}$ respectivamente, evidenciando-se que estes valores foram encontrados experimentalmente pelo refinamento dos átomos com parâmetros térmicos isotrópicos através de Fourier diferenças.

A inclusão dos átomos de hidrogênio no refinamento, considerando-se os parâmetros térmicos isotrópicos para todos os átomos do esqueleto molecular do complexo (4), reunindo 105 parâmetros, conduziram aos índices de discordância não-ponderado R e ponderado wR de 10,81% para 2132 reflexões observadas com $[I>2\sigma(1)]$ e 12,32% para 2473 reflexões simetricamente independentes, respectivamente.

Para finalizar a estrutura molecular do complexo (4), incluindo parâmetros térmicos isotrópicos para os átomos de hidrogênio e anisotrópicos para todos os átomos não-hidrogenóides, as correções de intensidade dos dados de reflexão em função de processos de absorção pelo método semi-empírico SADABS⁷⁰ (correção feita apesar do pequeno coeficiente de absorção linear observado de $0,431\text{mm}^{-1}$), e a inclusão do fator de extinção, reunindo 195 parâmetros, levaram aos índices de discordância não-ponderado R e ponderado wR de 5,54% para 2132 reflexões observadas com $[I > 2\sigma(I)]$ e 5,61% considerando-se 2473 reflexões simetricamente independentes, respectivamente, observados pela Tabela 16. Nesta etapa final do refinamento, foi observada a equação de ponderação, $w = 1/[s^2(\text{Fo}^2) + (0,1236P)^2 + 0,8583P]$ onde $P = (\text{Fo}^2 + 2\text{Fc}^2)/3$, e a razão máxima deslocamento/desvio padrão estimado (maximal shift/e.s.d.) que ficou em 0,000.

Os parâmetros de cela foram determinados a partir do refinamento de 4080 reflexões obtidas em quadrantes aleatórios da Esfera de Ewald, incluindo a região de varredura angular de $2,96$ a $28,02^\circ$ e refinadas pelo método dos mínimos quadrados⁷¹. A coleta de intensidades envolveu técnicas de varredura φ e ω .

Tabela 16. Dados da coleta de intensidades e do refinamento da estrutura cristalina/molecular do complexo (4) ($[\text{C}_8\text{H}_8\text{N}_3\text{O}_3]^- \text{K}^+ \cdot 4\text{H}_2\text{O}$). Desvio-padrão entre parêntese.

Fórmula Empírica	$([\text{C}_8\text{H}_8\text{N}_3\text{O}_3]^- \text{K}^+ \cdot 4\text{H}_2\text{O})$
Peso Molecular (g)	305,34
Temperatura (K)	293(2)
Radiação empregada (Å)	0,71073 Mo-K α
Sistema cristalino	Monoclínico
Grupo espacial	$P2_1/c$
Parâmetros de cela (Å)	$a = 12,695$ $b = 8,123$ $\beta = 106,71^\circ$ $c = 13,520$
Volume (Å ³)	1335,3
Número de fórmulas elementares(Z)	4
Densidade calculada (Mg/m ³)	1,519
Coeficiente linear de absorção (mm ⁻¹)	0,431
$F(000)$	640
Tamanho do cristal (mm ³)	0,52 x 0,13 x 0,13

Continuação da Tabela 16

Região de varredura $2\theta(^{\circ})$	1,67 a 25,50
Região de índices	$-15 \leq h \leq 15, -9 \leq k \leq 9, -16 \leq l \leq 15$
Número de reflexões coletadas	9772
Número de reflexões independentes	2473 [R(int) = 0,0186]
Região de varredura alcançada $2\theta(^{\circ})$	25,50, 99,6 %
Transmissão máx. e mín.	0,9461 e 0,8070
Método de refinamento	Matriz completa, mínimos quadrados sobre F^2
Dados/Restrições/Parâmetros refinados	2473 / 0 / 195
Goodness-of-fit on F^2	1,141
Índices de discordância finais [$I > 2\sigma(I)$]	$R_1 = 0,0554, wR_2 = 0,1705$
Índices de discordância (todos os dados)	$R_1 = 0,0661, wR_2 = 0,1892$
Densidade eletrônica residual ($e.\text{\AA}^{-3}$)	0,712 e -1,057

A estrutura molecular do complexo (1) é observada pela Figura 52 e evidencia que a cadeia diazoamínica 1-óxido se mantém protonada.

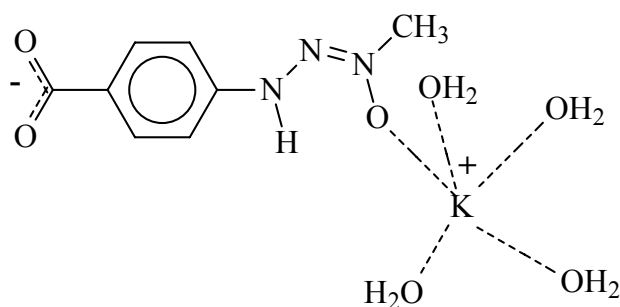


Figura 52. Fórmula estrutural do complexo 3-(4-carboxilatofenil)-1-metiltriazeno 1-óxido de potássio tetraidratado (4) ($[C_8 H_8 N_3 O_3]^- K^+ \cdot 4H_2O$).

A estrutura cristalina deste complexo (4) reúne quatro moléculas discretas na cela elementar, cuja unidade molecular está representada na Figura 53, sendo que nenhum átomo encontra-se desordenado.

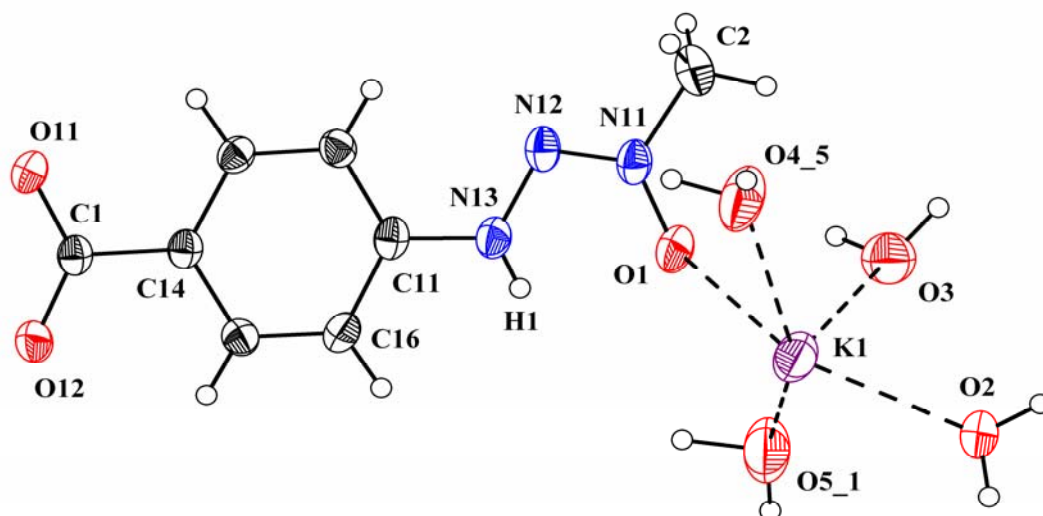


Figura 53. Projeção da estrutura molecular do par iônico (ligante⁻ e K⁺) do complexo **(4)** ([C₈H₁₆N₃O₇]⁻ K⁺ · 4H₂O), incluindo a interação de quatro moléculas de água e do átomo de oxigênio do ligante 3-(4-carboxilatofenil)-1-metiltriazeno 1-óxido com o íon potássio (ORTEP⁷²).

Detalhes adicionais em relação à geometria do complexo **(4)** podem ser obtidos pela Tabela 17.

Tabela 17. Comprimentos de ligação (Å) e ângulos de ligação (°) selecionados para o complexo **(4)** ([C₈H₈N₃O₃]⁻ K⁺ · 4H₂O). Desvio-padrão entre parênteses.

C(1)-O(11)	1,292(3)
C(1)-O(12)	1,323(3)
C(1)-C(14)	1,445(3)
C(2)-N(11)	1,529(4)
C(11)-N(13)	1,336(3)
N(11)-N(12)	1,218(3)
N(11)-O(1)	1,320(3)
N(12)-N(13)	1,413(3)

Continuação da Tabela 17

N(13)-H(1)	0,78(4)
O(2)-H(21)	0,90(5)
O(2)-H(22)	0,93(5)
O(4)-H(41)	0,61(4)
O(4)-H(42)	0,97(6)
O(5)-H(51)	1,12(7)
O(5)-H(52)	0,99(19)
O(11)-C(1)-O(12)	128,5(2)
O(11)-C(1)-C(14)	113,7(2)
O(12)-C(1)-C(14)	117,8(2)
N(13)-C(11)-C(12)	118,7(2)
N(13)-C(11)-C(16)	116,9(2)
C(15)-C(14)-C(1)	116,4(2)
C(1)-C(14)-C(13)	120,(2)
N(12)-N(11)-O(1)	121,1(2)
N(12)-N(11)-C(2)	114,2(2)
O(1)-N(11)-C(2)	124,7(2)
N(11)-N(12)-N(13)	110,0(2)
C(11)-N(13)-N(12)	118,0(2)
C(11)-N(13)-H(1)	116(3)
N(12)-N(13)-H(1)	126(3)
H(41)-O(4)-H(42)	95(5)
H(51)-O(5)-H(52)	96(10)

Na Figura 54, pela direção cristalográfica [001], observa-se uma seqüência de seis unidades de complexos **(4)** $[\text{C}_8\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_3]^- \text{K}^+ \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, sendo operadas por um eixo de rotação-translação 2_1 paralelo ao eixo cristalográfico b .

Ainda pela Figura 54 é possível identificar os dados da Tabela 18, que reúne os comprimentos de ligação (Å) e ângulos de ligação (°) selecionados para o íon K_1 e seus vizinhos mais próximos.

Tabela 18. Dados geométricos que descrevem a interação do íon K_1 com os seus vizinhos mais próximos K_{1_1} e K_{1_2} através das ligações em ponte e terminais formadas pelas moléculas de água no complexo (4). Desvio-padrão entre parênteses.

Fragmento	Distância (Å)	Ângulo (°)
$K_1 - O_1$	2,836(2)	-----
$K_1 - O_{5_1}$	2,830(3)	-----
$K_{1_1} - O_{5_1}$	2,993(3)	-----
$K_1 - O_3$	3,304(3)	-----
$K_{1_1} - O_3$	2,943(2)	-----
$K_1 - O_2$	2,700(2)	-----
$K_{1_1} - O_2$	2,919(3)	-----
$K_1 - O_5$	2,993(3)	-----
$K_{1_2} - O_5$	2,830(3)	-----
$K_1 - O_{3_2}$	2,943(2)	-----
$K_{1_2} - O_{3_2}$	3,304(3)	-----
$K_1 - O_{2_2}$	2,919(3)	-----
$K_{1_2} - O_{2_2}$	2,700(2)	-----
$K_1 - O_{4_3}$	2,848(3)	-----
$K_1 - O_{5_1} - K_{1_1}$	-----	99,6(9)
$K_1 - O_3 - K_{1_1}$	-----	90,6(1)
$K_1 - O_2 - K_{1_1}$	-----	104,6(1)
$K_1 - O_5 - K_{1_2}$	-----	99,6(1)
$K_{1_2} - O_{3_2} - K_1$	-----	90,6(1)
$K_{1_2} - O_{2_2} - K_1$	-----	104,6(1)

No complexo (4), o íon potássio apresenta número de coordenação oito e sua geometria de coordenação envolve uma distorção semelhante à estrutura do enxofre elementar S_8 na conformação de barco com simetria ideal C_{2v} , sendo observada na Figura 55. Para maior clareza, foram omitidas as linhas tracejadas que representam a interação entre as moléculas de água e o triazeno 1-óxido com o íon potássio.

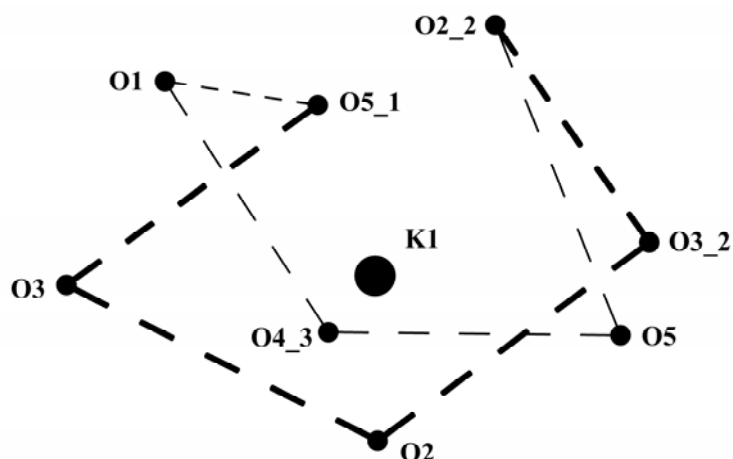


Figura 55. Geometria de coordenação do íon potássio no complexo (4) ($[C_8H_9N_3O_3]^-K^+ \cdot 4H_2O$), análoga ao S_8 (conformação tipo barco) (DIAMOND⁷³).

6. CONCLUSÕES

De acordo com os objetivos propostos para este trabalho em relação à síntese e cristaloquímica de triazeno 1-óxido e complexo com o metal alcalino potássio, difração de raios-X de 1,3-bis(aril)triazeno e atividade biológica de pró-ligantes triazenos, pode-se concluir que:

1- a síntese do pró-ligante 1-metil-3-(*p*-carboxifenil)triazeno 1-óxido (**1**) é descrita pela primeira vez neste trabalho, entretanto a metodologia de síntese para o 1,3-bis(4-carboxifenil)triazeno (**2**) já consta na literatura;

2- a difração de raios-X em monocristal, dos pró-ligantes (**1**) e (**2**), possibilita a visualização de ligações de hidrogênio intermoleculares que resultam na formação de polímeros;

3- no complexo 3-(4-carboxilatofenil)-1-metiltriazeno 1-óxido de potássio tetraidratado (**4**), o íon metálico K^+ , coordenado pelo ligante 1-metil-3-(*p*-carboxifenil)triazeno 1-óxido e por moléculas de água, apresenta geometria de coordenação que envolve uma distorção semelhante à estrutura do enxofre elementar S_8 . Este ligante está protonado e unido ao metal através do oxigênio ligado ao nitrogênio da cadeia diazoamínica e que, apesar do ligante ser um triazeno 1-óxido, não há a formação de anel quelato inorgânico de cinco membros, que é justamente, o principal modo de coordenação desta classe de triazenos;

4- pró-ligantes triazenos estratégicos revelam ação biológica, seja pela atividade bacteriostática e bactericida, como é o caso do 1-metil-3-(*p*-carboxifenil)triazeno 1-óxido (**1**), ou pela capacidade de clivagem de DNA plasmidial dupla fita, como é o caso do 1-(4-etoxifenil)-3-(4-carboxifenil)triazeno (**3**).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. KAIM, W.; SCHWEDERSKI, B. **Bioinorganic Chemistry: Inorganic Elements in the Chemistry Life**, 1st ed., Stuttgart: Wiley, 1991.
2. ALBUQUERQUE, F. F.; KOROLKOVAS, A. **Dicionário Terapêutico Guanabara**, ed.2001/2001, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
3. PIL, P.; LIPPARD, S.J. **In Encyclopedia of Cancer**, San Diego: Academic Press, v. 1, p. 392-410, 1997.
4. TENTORI, L. et al. **Leukemia**, 9(11), p. 1888-1895, 1995.
5. PILCH, D.S. et al. **Biochemistry**, 34(31), p. 9962-9976, 1995.
6. FARREL, N. et al. **Inorg. Chem.**, 26(9), p. 1426, 1987.
7. CONNORS, T.A. **Topics Curr. Chem.**, 52, p. 160, 1974.
8. ROUZER, C.A. et al. **Chem. Res. Toxicol.**, 9, p. 172-178, 1996.
9. SIEH, D.H.; ANDREWS, A.W.; MICHEJIA, C.J. **Mutat. Res.**, 73, p. 227-235, 1980.
10. GADJEVA, V.G. **International Journal of Pharmaceutics**, 247, p. 39, 2002.
11. MATHEWS, J.M.; COSTA, K. **Drug Metabolism and Disposition**, 27(12), p. 1499-1504, 1999.
12. DRUCKREY, H. et al. **Experientia**, 23, p. 1042, 1967.
13. BISHINOI, I.R.; PUROHIT, D.N.; BHATNAGAR, R. **Acta Ciencia Indica**, 16, p. 17, 1990.
14. MOORE, D.S.; ROBINSON, S.D. **Adv. Inorg. Chem. Radiochem.**, 30, p. 1-68, 1986.
15. GRIESS, P. **Proc. Roy. Soc. London.**, 9, p.594, 1859.
16. ZHAO, S. et al. **Talanta**, 45, p. 13-17, 1997.
17. KATSOULAS, A. et al. **Leukemia Research**, 29, p. 603-700, 2005.
18. HAIDUC, I.; DUMISTRESCU, I. S. **Coord. Chem. Rev.**, 73, p. 127, 1986.
19. BAMBERGER, E.; BUSDORF **Chem. Ber.**, 30, p. 2278, 1897.
20. WOLNY, J. A. et al. **J. Chem. Soc. Dalton Trans.**, p. 1611, 1993.
21. ELKINS, M.; HUNTER, L. **J. Chem. Soc.**, p. 1346, 1938.

22. PEREGUDOV, A. S. et al. **Journal of Organometallic Chemistry**, 597, p. 164, 2000.
23. BRESOLIN, L. Síntese, estrutura e propriedades de complexos de Cu(II) e Tl(I) com ligantes triazenos monocatenados, **Tese de Doutorado**, Santa Maria, UFSM-RS, 2003.
24. LEE, J.D. **Química Inorgânica não tão concisa**, 5^a ed., São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 1996.
25. CARRATÚ, V. S. Síntese, propriedades e avaliações intermoleculares no estado sólido de triazenos e complexos com cádmio(II), **Tese de Doutorado**, Santa Maria, UFSM-RS, 2004.
26. DESIRAJU, G.R.; STEINER, T. **The Weak Hydrogen Bond**, EUA:Oxford University Press, p.6, 2001.
27. COTTON, F.A.; WILKINSON, G. **Química Inorgânica Avanzada**, 4^a ed., México: Limusa Noriega Editores, 1996.
28. DUMITRESCU, L. S. et al. **J. Organomet. Chem.**, 517, p. 101-106, 1996.
29. HÖRNER, M. et al. **Acta Crystallographica Section C**, C58, p. 193, 2002.
30. SHEALY, Y.F.; KRAUTH, C.A.; MONTGOMERY, J.A. **J. Org. Chem.**, 27(6), p. 2150, 1962.
31. RAJASKI, S.R.; WILLIAMS, R.M. **Chem. Rev.**, 98(8), p. 2723-2795, 1998.
32. CARVALHO, E. et al. **Pharm. Res.**, 15(6), p. 931-935, 1998.
33. SANADA, M. et al. **DNA Repair**, 3, p. 413-420, 2004.
34. CARVALHO, E. et al. **Bioorg. Med. Chem.**, 8, p. 1719-1725, 2000.
35. TONTINI, A. et al. **Eur. J. Méd. Chem.**, 31, p. 735-740, 1996.
36. CHAN, D.C.M. et al. **Bioorg. & Medicinal Chem.**, 10, p. 3001-3010, 2002.
37. GECSHER, A.; THREADGILL, M. **Pharma. Ther.**, 32, p. 191, 1987.
38. KROEGER, S.M.B. et al. **Chem. Res. Toxicol.**, 9(1), p. 341-348, 1996.
39. BULLERWELL, W.L. et al. **Acta Cryst.**, 51, p. 2624-2627, 1995.
40. VAUGHAN, K.; LITTLE, V.R. **Can. J. Chem.**, 82, p. 1294-1303, 2004.
41. HURSPHOUSE, M.B. et al. **Polyedron**, 12, p. 563, 1993.
42. BARCELÓ, F.; LOMBARDÍA, M. O.; PORTUGAL, J. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1519, 175-184, 2001.

- 43.COATES, L. et al. **Plasmid**, 47, p. 120-128, 2002.
- 44.ZAHA, A. et al. **Biologia Molecular Básica**, 3^a ed., Porto Alegre: Mercado Aberto, 2001.
- 45.WITOLA, W.H. et al. **Experimental Parasitology**, 107, p. 47-57, 2004.
- 46.McCONNAUGHIE, A.W.; JENKINS, T.C. **J.Med.Chem.**, 38(18), p. 3488-3501, 1995.
- 47.GONZÁLEZ, V. M.; PÉREZ, J. M.; ALONSO, C. **Journal of Inorganic Biochemistry**, 68, p. 283-287, 1997.
- 48.GONZÁLEZ, V. M. et al. **Journal of Inorganic Biochemistry**, 63, p. 57-68, 1996.
- 49.HÖRNER, R. Estudo de compostos capazes de clivar o DNA, **Tese de Doutorado**, Florianópolis, UFSC-SC, 2003.
- 50.CASAGRANDE, I. C. Síntese e cristalquímica de complexos de Pd(II) e Au(I) com o ligante 1,3-bis(4-nitrofenil)triazeno, **Dissertação de Mestrado**, Santa Maria, UFSM-RS, 2000.
- 51.SARKAR, S. B. et al. **Acta Crystallogr., Sect. C, Cryst. Struct. Comum**, 39, p. 1075, 1983.
- 52.SAMANTA, C.; SAHA, S. C.; MUKHERJEE, A. K. **Acta Crystallogr., Sect. C, Cryst. Struct. Comum**, 53, p. 1657, 1997.
- 53.GARCIA, M. S.; ROMENO, A. R.; PANNEERSELVAM, K. A. **Anal. Sci.**, 12, p. 539, 1996.
- 54.SAMANTA, C.; MUKHERJEE, A. K.; MUKHERJEE, M. **Acta Crystallogr., Sect. C, Cryst. Struct. Comum**, 54, p. 1544, 1998.
- 55.GOSWAMI, A. K.; PUROHIT, D.N. **Analytical Sciences**, 17, p. 1789-1791, 2001.
- 56.OLIVEIRA, J. S. Síntese e estrutura cristalina e molecular de complexos de Cu(I), Ni(II), Co(II) e Co(III) com 3-(*p*-nitrofenil)-1-metiltriazeno 1-óxido, **Tese de Doutorado**, Santa Maria, UFSM-RS, 2002.
- 57.DAHMER, M. Síntese, caracterizações e cristalquímica de complexos de cobalto(II) com ligantes triazenos, **Dissertação de Mestrado**, UFSM-RS, 2002.
- 58.HODGSON, D. J. **Inorg. Chem. Acta**, 35, p. 225, 1983.
- 59.PATTANAYAK, S. et al. **Polyhedron**, 15, p. 1121-1127, 1996.
- 60.GANTZEL, P.; WALSH, P.J. **Inorg. Chem.**, 37, p. 3450-3451, 1998.
- 61.BRUKER AXS INC. MADISON, WISCONSIN 53711-5373, *SAINT* V7.06A, - **Bruker Nonius area detector scaling and absorption correction** - V2.10, 2005.

62. BILIBIO, A. **Dissertação de Mestrado**, UFSM-RS, 2006, ainda não concluída.
63. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI); **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**, 15th Informational Supplement Table M100-S15, Wayne, PA, 2005.
64. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS); **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**, 8th Informational Supplement Table M100-S12 (M7), Wayne, PA, 2002.
65. PEREIRE, A. S. et al. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, 39, p. 301-308, 2003.
66. TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**, 6^a ed.; Porto Alegre: Artmed, 2003.
67. FARRUGIA, L. J. J. Appl. Cryst WinGX – **An Integrated System of Windows Programs for Solution, Refinement and Analysis of Single Crystal X-Ray Diffraction Data**, 32, 837-838, Vers. 1.64.04, 1999.
68. HAHN, T. **International Tables for Crystallography**, Space Group Symmetry, 2nd ed., The International Union of Crystallography, Vol. A, D. Reidel Publishing Company, Dordrecht, Holland, 1987.
69. BURLA, M. C. et al. **SIR2004 – An Improved Tool for Crystal Structure Determination and Refinement**, J. Appl. Cryst, 38, 381-388, 2005.
70. SHELDRIK, G. M. **SADABS, Program for Empirical Absorption Correction of Area Detector Data**, University of Göttingen, Germany, 1996.
71. SHELDRIK, G.; **SHELXL-97, Program for Crystal Structure Refinement**, Release 97-2, University of Göttingen, Germany, 1997.
72. FARRUGIA, L. J. **ORTEP-3 for Windows**, J. Appl. Cryst. 30, 565, 1997.
73. BRANDENBURG, K. **DIAMOND – Informatiossystem für Kristallstrukturen**, Versão 2.1C para Windows 95/98, Alemanha, 1999.
74. SILVERSTEIN, R.; M.; WEBSTER, F. X.; **Identificação de Espectrométrica de Compostos Orgânicos**, 5^a ed., Rio de Janeiro: LTC, 1998.
75. SILVERSTEIN, R.; M.; WEBSTER, F. X.; **Identificação de Espectrométrica de Compostos Orgânicos**, 6^a ed., Rio de Janeiro: LTC, 2000.
76. PATRICK, G.L. **An Introduction to Medicinal Chemistry**, 2nd ed., New York – USA: Oxford, 2001.

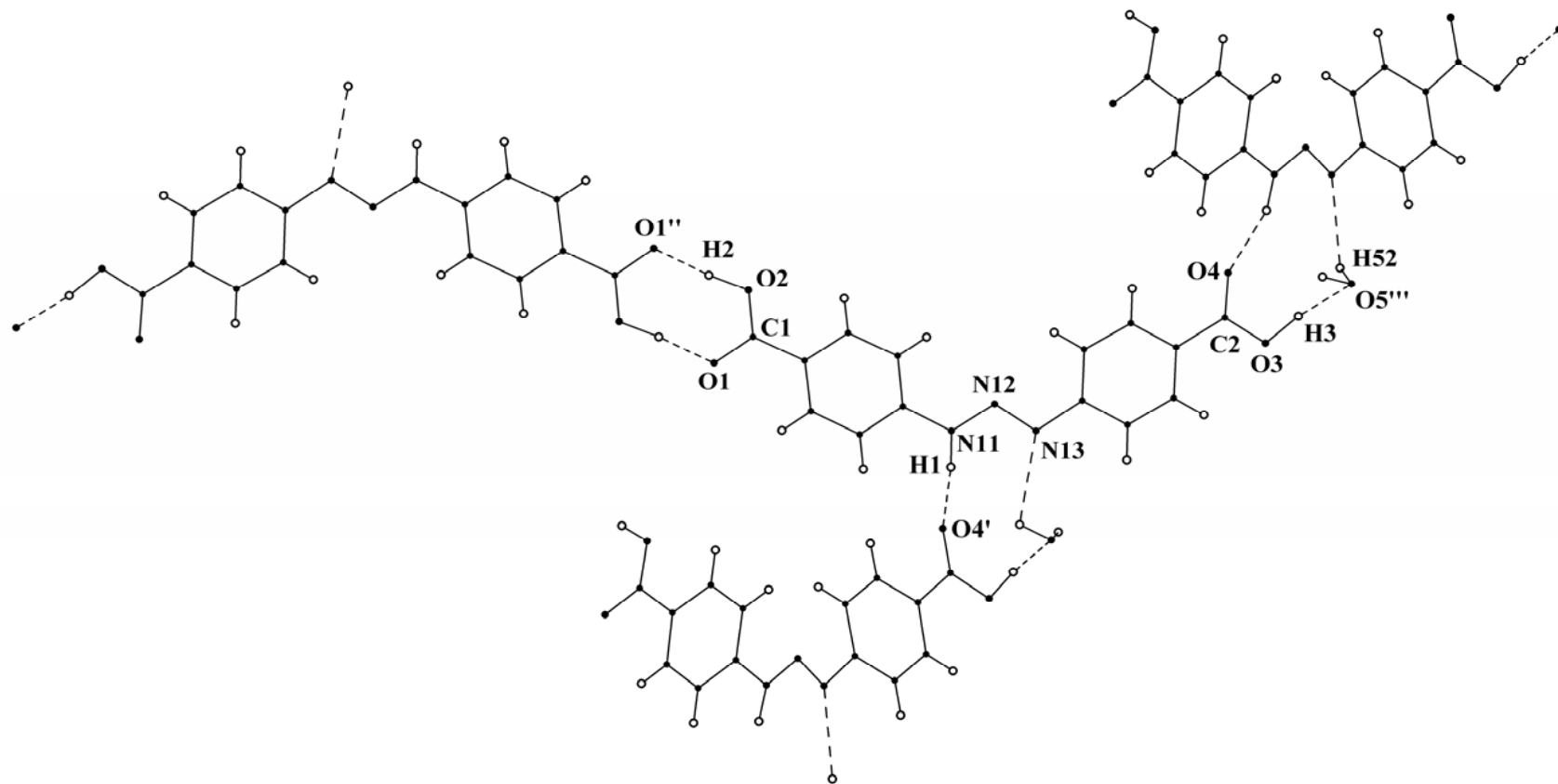


Figura 43. Projeção da estrutura molecular do pró-ligante (2), incluindo ligações de hidrogênio, representadas por linhas pontilhadas, entre as moléculas de triazeno e água mais próximas. (DIAMOND⁷³).

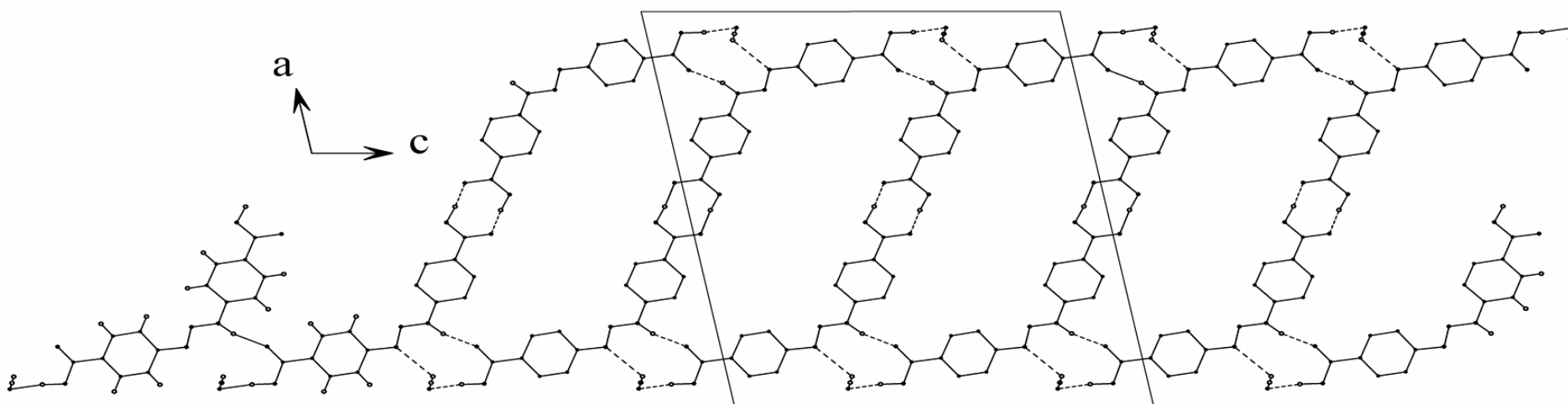


Figura 44. Projeção do corte do arranjo bidimensional na direção cristalográfica [010], evidenciando as ligações de hidrogênio entre as moléculas de pró-ligante (**2**) e os operadores de simetria 2_1 em: $\frac{1}{2}, 0, \frac{1}{4}$ e $\frac{1}{2}, 0, \frac{3}{4}$, e -1 em $\frac{1}{2}, 0, 0$; $\frac{1}{2}, 0, \frac{1}{2}$ e $\frac{1}{2}, 0, 1$ (DIAMOND⁷³).

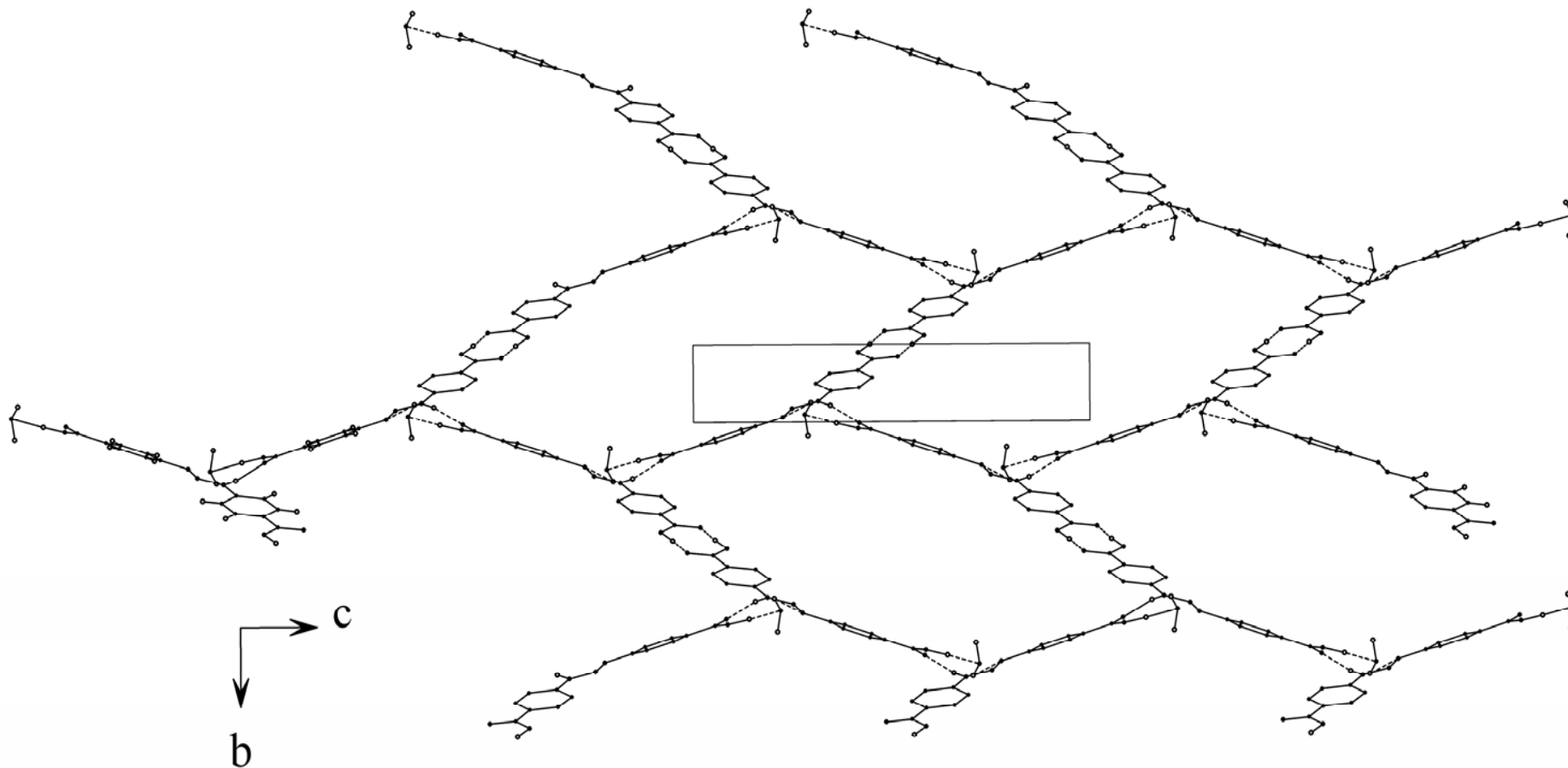


Figura 45. Projeção do corte do arranjo bidimensional na direção cristalográfica [100], evidenciando as ligações de hidrogênio entre as moléculas de pró-ligante (**2**) e os operadores de simetria 2_1 em: $0, 0, \frac{3}{4}$, e c em $0, 0, \frac{1}{4}$ (DIAMOND⁷³).

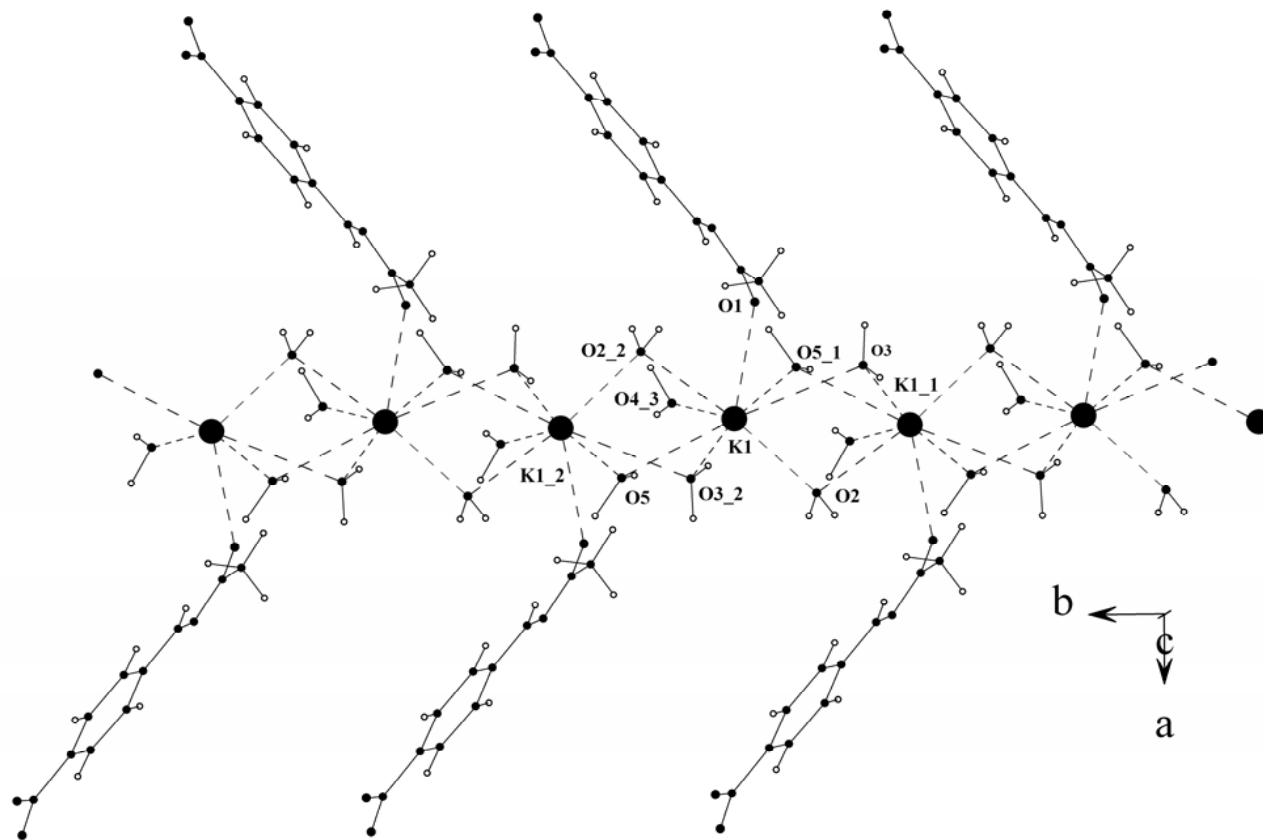


Figura 54. Projeção com seis unidades do complexo $[\text{C}_8\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_3]^- \text{K}^+ \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1) na direção $[001]$, evidenciando a formação de uma cadeia independente ao longo da direção cristalográfica $[010]$, através de um eixo de rotação-translação 2_1 paralelo ao eixo cristalográfico b (DIAMOND⁷³).