



UNIVERSIDADE CEUMA
REITORIA
PRO-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA E EXTENSÃO
MESTRADO EM MEIO AMBIENTE

JOSÉ COSTA SAMPAIO FILHO

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE TRIAZENO**

Orientador (a): Prof. Dr. Paulo Cesar Mendes Villis
Co-orientador (a) Prof. Dra. Patrícia de Maria Silva Figueiredo

São Luís, MA
2018

JOSÉ COSTA SAMPAIO FILHO

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE BIOLÓGICA DE TRIAZENO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Meio Ambiente da Universidade CEUMA, como requisito para obtenção do grau de Mestre (a) em Meio Ambiente.

Orientador: Dr. Paulo Cesar Mendes Villis

Co-orientadora: Dra. Patrícia de Maria Silva Figueiredo

São Luís, MA
2018

UNIVERSIDADE CEUMA
REITORIA
PRO-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA E EXTENSÃO
MESTRADO EM MEIO AMBIENTE

**Folha de aprovação da Dissertação de José Costa Sampaio Filho
defendida e aprovada pela Comissão Julgadora em 19/07/2018**

José Costa Sampaio Filho

Dra. Patrícia de Maria Silva Figueiredo
1º Titular

Dra. Julliana Ribeiro Alves dos Santos
2º Titular

Dra. Wolia Costa Gomes
3º Titular

Dr. Paulo Cesar Mendes Villis
Presidente da Comissão

Prof. Dr. Valério Monteiro Neto
Pró-Reitor de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão

Resumo

Os compostos químicos inéditos utilizados neste trabalho foram os 1,3-*bis*(2-metoxi-4-nitrofenil)triazeno **(1)** e 1,3-*bis*(2-metoxi-5-nitrofenil)triazeno **(2)** pertencentes à classe dos triazenos, espécie química envolvendo cadeias abertas com três ou mais átomos de nitrogênio ligados em sequência, caracterizados pelo grupo diazoamínico. Muitos triazenos têm atividade biológica, uma vez que as aminas presentes nestes compostos têm locais específicos de ação nas membranas celulares e a capacidade de formar ligações de hidrogênio. Os triazenos são amplamente utilizados em sínteses experimentais de novos compostos. Este trabalho descreve a síntese, a caracterização molecular e a avaliação da atividade biológica e o potencial antimicrobiano dos triazenos 1,3-*bis*(2-metoxi-X-nitrofenil)triazeno [X= 4; 5]. Foram realizados testes das atividades antimicrobianas de **(1)** e **(2)**, mediante avaliação da sensibilidade da solução dos compostos frente às bactérias ATCC's (*American Type Culture Collection*, ATCC) e isolados clínicos, aplicando-se ensaios microbiológicos padronizados. O potencial antimicrobiano foi determinado pela Concentração Inibitória Mínima (CIM), exibindo resultados promissores, com atividade diante de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, com baixos valores de CIM. Os resultados mostraram a potencialidade dos triazenos, frente à resistência das cepas bacterianas selecionadas.

Palavras-chave: triazeno, atividade antimicrobiana, gram-positivos e gram-negativos

ABSTRACT

The unpublished chemical compounds used in this work were 1,3-*bis*(2-methoxy-4-nitrophenyl)triazene **(1)** and 1,3-*bis*(2-methoxy-5-nitrophenyl)triazene **(2)**, belonging to the class of triazenes, a chemical species involving open chains with three or more nitrogen atoms connected in sequence, characterized by the diazoaminic group. Many triazenes have biological activity, since the amines present in these compounds have specific sites of action on cell membranes and the ability to form hydrogen bonds. Triazenes are widely used in experimental syntheses of novel compounds. This work describes the synthesis, molecular characterization and evaluation of the biological activity and antimicrobial potential of triazenes 1,3-*bis*(2-methoxy-X-nitrophenyl)triazene [X = 4; 5]. Antimicrobial activity tests of **(1)** and **(2)** were performed by evaluating the sensitivity of the solution of the compounds to the ATCC's (American Type Culture Collection, ATCC) and clinical isolates, applying standardized microbiological assays. The antimicrobial potential was determined by the Minimum Inhibitory Concentration (MIC), showing promising results, with activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria, with low MIC values. The results showed the potentiality of the triazenes, against the resistance of the bacterial strains selected.

KEYWORDS: triazene, antimicrobial activity, gram-positive and gram-negative

A Deus Pai que, por toda a minha vida, sempre me mostrou fisicamente seu abraço de amor, e que me deu a vida mais feliz que um ser humano pode ter. À minha Esposa e meu filho, por estarem comigo e sempre escolherem a mim e por mim. Aos meus amigos que já se foram, mas que permanecerão para sempre em meu coração.

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer ao meu Deus que, pela sua infinita misericórdia, me acompanhou até aqui, me estendeu a mão nos momentos de desespero e conduziu esta etapa da melhor maneira possível. Eu sinto todo seu amor tocando em mim, cada vez que vejo ou falo com cada uma das pessoas aqui citadas. Sou a mais sortuda pessoa do universo!

A minha Esposa e Pedro meu filho que sempre é comigo, sempre escolheu por mim, no que foi para o meu melhor. A pessoa que é o amor da minha vida, o motor da minha caminhada, meu orgulho e exemplo que luta e vitória.

À professora Patrícia, a disposição em estar sempre presente e por aceitar fazer parte da banca examinadora. Muito obrigada!

Por último, mas não menos importante, a meu orientador, Paulo Willis. Sempre tão inteligente, me tratou como amigo e compreendeu minhas limitações, minha personalidade, meus erros, e meus acertos. Também sabe o que espera de mim e me aponta a direção a seguir, mesmo eu não conseguindo jamais acompanhar a velocidade dos seus pensamentos, tão inovadores e assertivos. Muito obrigada por esses meses tão ricos e tão proveitosos de orientação e amizade. Serei eternamente grato.

Agradecer às professoras Rita de Cassia, Juliana e Wolia que sempre estiveram à disposição para tirar dúvidas.

A todos os alunos dos laboratórios de microbiologia da UFMA como Alzirene e outros como técnica do laboratório.

Ao Ceuma que me deu oportunidade de cursa este mestrado

Os amos muito. Vocês são a expressão do amor que Deus tem por mim. São meu trevo de quatro folhas.

Lista de Tabelas

Tabela 1	18
-----------------------	-----------

Lista de Figuras

Figura 1.....	13
Figura 2.....	13
Figura 3.....	14
Figura 4.....	15
Figura 5.....	18
Figura 6.....	21

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REFERENCIAL TEÓRICO	11
2.1 Compostos Nitrogenados	12
2.2.1 A química de coordenação dos triezenos	13
2.2.2 Importancia dos triezenos	15
2.2.3 Revisão Bibliografica dos triezenos	20
2.2.4 Referencias	22
3 CAPÍTULO I: Artigo Submetido à Revista	26
4 CONCLUSÕES	28
5 REFERÊNCIAS	28
Atividades Desenvolvidas no período	30
ANEXO A: Normas para submissão na Revista	X

1. FUNDAMENTAÇÃO TEORICA

INTRODUÇÃO

Compostos Nitrogenados

Os compostos orgânicos nitrogenados são moléculas orgânicas que apresentam em sua constituição o heteroátomo nitrogênio.

Os compostos nitrogenados têm grande destaque na química de coordenação como espécies ligantes, onde atuam como grupos doadores de pares de elétrons, apresentando uma química estrutural, molecular e cristalina altamente diversificada e interessante para o estudo.

Quando estes compostos nitrogenados são coordenados a centros metálicos (grupos deficientes de elétrons), formam complexos com um variado número de cátions metálicos, devido a facilidade com que o nitrogênio se coordena, resultando em compostos metálicos que apresentam diversas características, propriedades e funções, podendo assim ser estudados nas mais diversas áreas (BEHM et al., 2006).

A química dos compostos de coordenação é uma das áreas mais investigadas da química inorgânica. Dentro dela, destacam-se os triazenos (MOORE, 1986).

Os triazenos são grupos orgânicos, pertencentes à família dos compostos orgânicos nitrogenados de cadeia aberta (alifáticas), evidenciado pelo grupo diazoamínico, e formado por três átomos de nitrogênio ligados em sequência (MOORE, 1986), conforme representa a Figura 1.

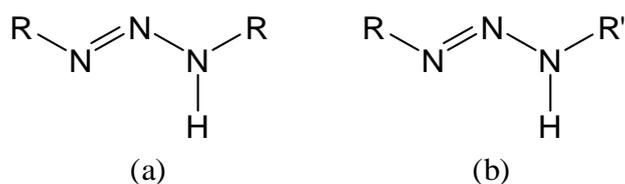


Figura 1. Representação estrutural genérica de triazeno simétrico (a) e assimétrico (b)

Um triazeno pode ser representado genericamente em (c) e um hidroxitriazeno em (d), onde um átomo de hidrogênio é substituído por um grupo hidroxila, no qual “R” representa grupamentos aromáticos (anéis aromáticos) ou alifáticos (cadeia aberta), que podem ou não conter heteroátomos, conforme a Figura 2.

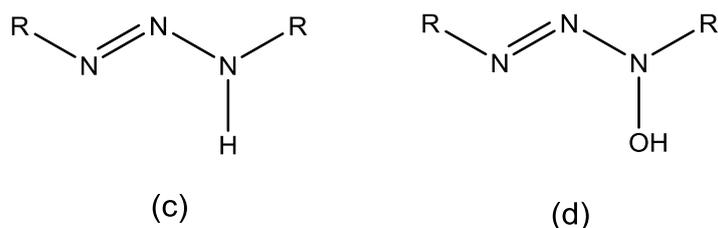


Figura 2. Representação estrutural genérica de triazeno (c) e hidroxitriazeno (d)

Estas cadeias nitrogenadas, que apresentam 3, 4, 5 ou mais átomos de nitrogênio em sequência, podem ser facilmente estabilizadas por substituintes estrategicamente (R, R'), permitindo assim várias possibilidades de coordenação, por proporcionarem uma grande possibilidade eletrônica em função da geometria molecular e da presença de doadores. Na Figura 1, quando os radicais mostrados são substituídos por anéis aromáticos, estes compostos conferem uma maior estabilidade a estas cadeias, uma vez que permitem a deslocalização da densidade eletrônica.

A Química de coordenação dos triazenos

A química de coordenação com ligantes catenados de nitrogênio data de 1859, quando *Griess* sintetizou o primeiro triazeno simétrico, 1,3-*bis*(fenil)triazeno, como mostra a Figura 3. Apenas em 1972, com o desenvolvimento da difração de Raios-X, *Gladkova* e *Kdrashev*, determinaram a estrutura cristalina e molecular do 1,3-*bis*(fenil)triazeno. A descrição desta molécula foi relatada por *Berson*, no livro *The High Nitrogen compounds* em 1984 (VILLIS, 2007).

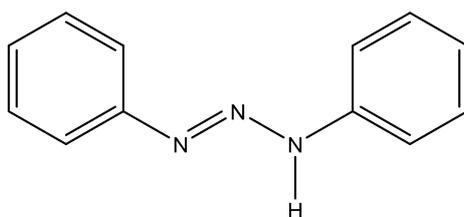


Figura 3. Representação estrutural do 1,3-bis(fenil)triazeno

O início de uma investigação da química da coordenação decorrente do 1,3-bis(fenil)triazeno foi realizado em 1887 por Meldola. Grupos de triazenos ligados a grupo arilas (diariltriazenos) ou grupos alquilas (alquilaril e/ou dialquiltriazenos), como substituintes (Ar-N=N-NH-Ar), estão sendo intensamente estudadas durante as últimas décadas.

A existência destes substituintes orgânicos nos nitrogênios terminais da cadeia triazenídica, a atuação na maior ou menor preservação da cadeia, através de efeitos indutivos e mesoméricos; proporcionam uma química estrutural bastante rica pelas reações de complexação com diversos íons metálicos. Os alquilaril e dialquiltriazenos, menos estáveis que os diariltriazenos, foram sintetizados e caracterizados pela primeira vez por Dimronth em 1903 e 1906, respectivamente.

Numerosos exemplos de compostos triazenídicos coordenados a íons metálicos, elucidados por estudos de difração de Raios-X, demonstram diferentes modos de coordenação destes complexos sólidos, como mostrado na Figura 1.3. Em (a) e (b) estão representados os modos monodentados terminais ligantes na forma neutra ou aniônica, respectivamente. Em (c) tem-se a representação da forma bidentada do tipo quelato (formando anéis de quatro membros). A coordenação em ponte entre dois centros metálicos (formado anéis de cinco membros) são mostrados em (d) e (e), sendo esta última do $\text{syn sy n- n}^1\text{:n}^1\text{: } \mu_2$

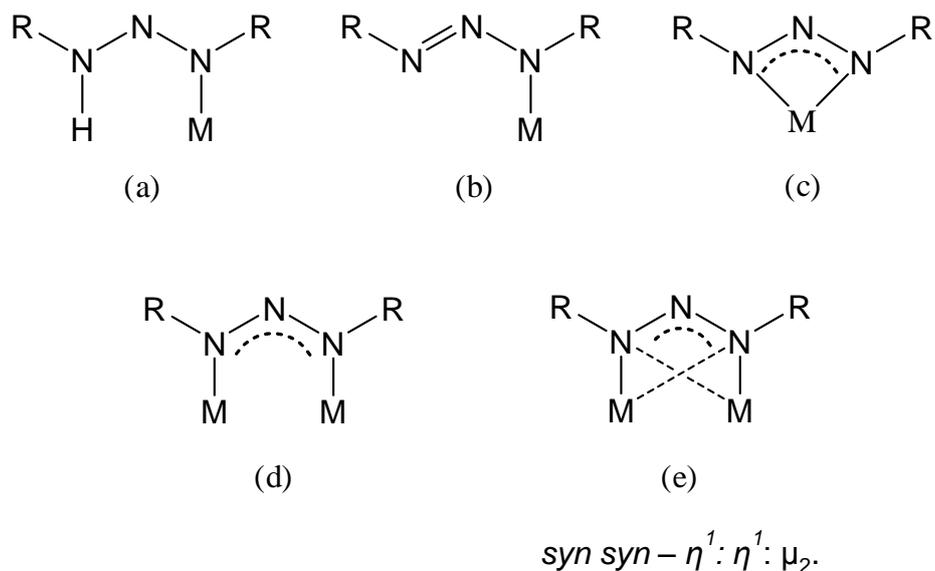


Figura 4. Principais modos de coordenação dos triazenos no estado sólido

A importância dos triazenos

A relevância da química dos triazenos é oposto dos demais ramos da ciência pelos seus inúmeros propósitos nos mais diversas áreas da química. Recentemente, os compostos triazenídicos estão sendo investigados, impelido variedade de aplicações nas áreas da químicas, microbiológica, bioquímica Inorgânica e da química da coordenação (VILLIS, 2007).

Os compostos triazenídicos mostraram-se bastante eficazes no desenvolvimento de compostos ou substâncias com atividades biológicas. Um dos usos mais prevalentes de triazenos está no desenvolvimento de moléculas antimicrobiana, antifúngica e antineoplásico.

Segundo KOEHLER et al. (2007) essa atividade biológica pode ser justificada, pois o grupo das aminas presentes nesses compostos são amplamente utilizadas em sínteses experimentais de novos compostos por possuírem sítios específicos de ação

nas membranas celulares e capacidade de formar ligações de hidrogênio. (KOEHLER, 2007; SANTOS, 2005).

O potencial terapêutico de uma variedade de triazenos tem sido amplamente explorado, bem como a sua ação metabólica específica. Para aril e alquil triazenos, a decomposição proteolítica ocorre sob condições fisiológicas para dar compostos de alquil diazônio reativos capazes de alquilar DNA. Conseqüentemente, estes compostos são cancerígenos e/ou mutagênicos. Vários Triazenos, no entanto, mostram toxicidade animal baixa enquanto retêm a sua potência contra linhas de células tumorais específicas (KIMBALL; HALEY, 2002).

O descobrimento de sulfonamidas e β -lactama anti-Biotics na década de 30 teve uma influência profunda na saúde permitindo o método rápido para doentes com infecção bacteriana, depois disso visto como a “era dourada” Antibióticos, sendo que a maioria dos antimicrobianos foram descobertos nesta época (BUTLER; BLASKOVICH; COOPER, 2013).

No entanto, o surgimento de multirresistência entre bactérias, incluindo *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) e outros membros dos agentes patogênicos da ESKAPE, e a recente resistência aos fármacos nestes e *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*, XDRTB), desafiou a eficácia dos antibióticos.

No advento da medicina moderna, a resistência aos antibióticos tornou-se um dos mais graves problemas de saúde no mundo (DEUREBERG; STOBBERING, 2008). Isto tem sido exacerbado por um colapso na descoberta de antibióticos pela farmacêutica global P&D, e resultou na falta de novos antibióticos que chegam ao mercado (NORRBY et al.; 2005). A resistência surge por alterações no alvo do antibiótico, pela

aquisição de enzimas modificadoras de antibióticos ou pela Local de antibiótico através de alterações na permeabilidade ou efluxo da parede celular.

Considerando o exposto, há uma necessidade urgente de desenvolver Agentes antibacterianos eficazes que evitam a emergência de resistência (Ling. et al. 2005). Com base em nossa pesquisa recente (VAJS et al.; 2014), fomos levados a explorar mais a atividade antimicrobiana de 1,3-diariltriazenos. Os triazenos possuem uma série de propriedades biológicas, incluindo antifúngicos (OMBAKA, 2012), anoréxicos e atividade anticancerígena (KIEFER et al., 2015). O mecanismo de ação dos alquiltriazenos está geralmente ligado à formação de espécies reativas de diazônio que são capazes de alquilar o DNA (MARCHESI et al., 2007).

Sendo que resultado, vários triazenos foram identificados como possuindo potente atividade antimicrobiana em relação a *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) e *M. Smegmatis* - um modelo micobacteriano representante de *M. tuberculosis* (VAJS et al., 2017).

A atividade antibacteriana de compostos triazenos tem sido pouco estudada e alguns autores avaliaram a atividade dos triazenos frente a bactérias e fungos. PARAGINSKI *et al.* (2014) avaliaram a atividade de 15 (quinze) compostos triazenídicos, incluindo um complexo de vanádio e um sal de potássio de um hidroxitriazeno, frente a várias bactérias, incluindo cepas ESBL (β -lactamases de espectro ampliado). Tais compostos foram ativos frente a bactérias multirresistentes, incluindo cepas produtoras de ESBL, MBL (metalo- β -lactamases) e do gene AmpC. Essas evidências tiveram grande impacto na atualidade, uma vez que esses mecanismos de resistência bacteriana estão entre os mais prevalentes.

Um dos usos mais difundidos dos triazenos é no desenvolvimento de moléculas que apresentem atividade biológica na terapia contra o câncer, como por exemplo o fármaco Dacarbazina®, Figura 5, 5-(3,3-dimetil-1-triazeno)imidazol-4-carboxiamida, conhecido como DTIC, que foi o primeiro triazeno a apresentar atividade antitumoral, relatado em 1962 por *Shealy et al.* (NEVES, 2011).

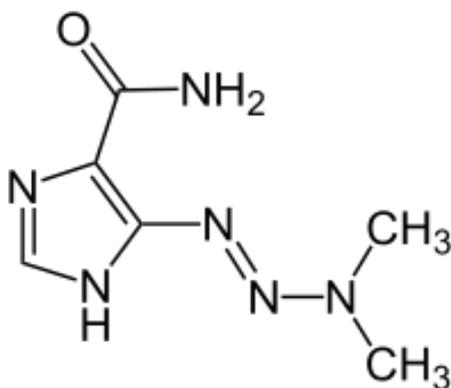


Figura 5. Representação da estrutura molecular do fármaco Dacarbazina

Destacam-se alguns compostos triazenídicos conhecidos comercialmente, tais como: *Dacarbazina*® (RACHID, Z. et al., 2003) e derivados, (RACHID, Z. ,2003; NISHIWAKI, K 2007) *Berenil*® (GIGLIO, V. F et al. 2006) e *Termozolomida*®. (–PAYEHGHADR, M. et al. 2007). Recentemente foi atribuído ao composto triazenídico 3,3-dialquil-1-ariltriazeno, um potencial nas atividades antimalárico (PAYEHGHADR, M. et al. 2007).

Tabela 1 - Alguns fármacos análogos aos triazenos utilizados em atividades biológicas. (LOW, J. W.; SING H, R 1982; PAYEHGHADR, M 2007)

Nome	Nome Comercial	Propriedades
5-(3,3-dimetil-1-triazenil)imidazol-4-carboxamida	Dacarbazina® (DTIC)	antineoplásicos
5-[3,3-bis(2-cloroetil-1-triazenil)imidazol-4-carboxamida	Dacarbazina® (BTIC)	antineoplásicos
3-metil-4-oxo-3,4-dihidroimidazol[5,1-d][1,2,3,5]Tetrazina-8-carboxiamida	Termozolomida® (TEM)	antineoplásicos
[bis(4-amidinofenil)-1,3-triazeno]	Berenil®	antitripanossômicos

A transformação da Dacarbazina® (DTIC) em compostos alquilantes depende da estimulo hepática inicial pelo citocromo P-450, funciona através de alquilação do DNA. Na célula alvo, a quebra espontânea do metabolito libera um componente alquilante, o diazometano. Este triazeno é adequado para o tratamento de: melanoma maligno metastático, adenocarcinoma renal, sarcomas de tecidos moles, fibrossarcomas, carcinoma medular da tireóide, neuroblastoma, tumores sólidos, linfoma maligno e doença de Hodgkin (ALMEIDA, 2005; CARMO, 2013).

Já o Temozolomida® (TEM) não necessita de estimulo metabólica para produzir as espécies alquilantes, pois é transformada espontaneamente em metabólico ativo em pH fisiológico e pode ser administrada por via oral. Este triazeno é vendido na União Europeia sendo usado no tratamento contra tumores cerebrais como glioblastoma multiforme e astrocitona anaplástico, recentes pesquisas mostram que pode ser também eficaz nos casos de leucemia aguda. Os resultados citotóxicos e mutagênicos destes fármacos são baseados na capacidade de alquilar as bases do DNA, precavendo a multiplicação e o crescimento das células tumorais, além de dificultar a síntese de proteínas necessárias à sobrevivência destas células (CARMO, 2013).

O Berenil® *bis*(4-amidinofenil)-1,3-triazeno efetiva por alternância no DNA, a influência ocorre entre os grupos amidínicos terminais do Berenil® e sítios específicos do DNA, interferindo com a abertura das fitas de DNA, num processo necessário e primordial para a reprodução e replicação do material genético, sem que haja a degradação da cadeia triazenídica, podendo também, mascarar os sítios de ação de enzimas, o que inibe as funções do DNA e causa a morte celular (apoptose). Está droga tem sido empregada com sucesso no tratamento, de casos na fase inicial, da

doença do sono na África causada pelo Trypanossoma rhodesiense (COASTS, 2002; FARREL, 1987; PILCH1995 apud SANTOS, 2005).

Revisão Bibliográfica dos trizenos

Os primeiros exemplos de pré-ligantes trizenos (triazenos livres), elucidados estruturalmente por Difração de Raios-X em monocristal. Alguns compostos selecionados estão omitidos os átomos de hidrogênio, devido à ausência de parâmetros térmicos e geométricos no CCDC (CAMBRIDGE CRYTALLOGRAPHIC DATA CENTRE).

O trizeno foi sintetizado pelo acoplamento de um sal de diazônio com uma amina aromática livre, descrito por HARTMAN et al. (1943), conforme a Figura 6.

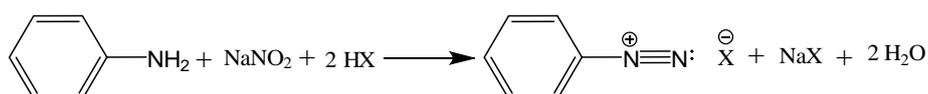


Figura 6. Um mecanismo proposto para a diazotação (VERNIN, 1977).

A síntese dos compostos trizenos representa um papel importante em todas as áreas da química, principalmente na Química de coordenação, por proporciona grande versatilidade eletrônica e geometria aos centros metálicos.

Independentemente da química envolvendo os produtos trizenos ter ocorrido na metade do século XIX, foi a partir da década de 60 que foram definidas as primeiras estruturas cristalinas e moleculares de alguns compostos de trizenos, devido ao surgimento de equipamentos capazes de esclarecer estruturalmente tais moléculas, outorgando assim, um melhor estudo das formas de coordenação destes compostos (BEHM et al., 2006).

O projeto de pequenas moléculas para melhor tratamento de doenças tornou-se um importante objetivo terapêutico, dada a amplos efeitos colaterais das moléculas existentes e resistência rápida desenvolvidos para eles.

O núcleo benzotiazol encontra-se muitas destas moléculas promissoras de moléculas pequenas anticancerígenas e antibacterianas, fatores que foram avaliados até o nível pré-clínico. Entre as moléculas pequenas com um núcleo benzotiazol, o estudo de 2-fenilo substituído benzotiazole é de corrente considerável devido à sua diferença biológica e biológica Propriedades. Eles são relatados para possuir antitumor , antibacterianos (BANDYOPADHYAY et al., 2011), antifúngicos (DUTTA GUPTA et al., 2010), antiparasitário e atividade antioxidante.

Mais distante tem um perfil de atividade forte como agentes de formação de imagens para a *b*-amilóide Proteína que auxilia no diagnóstico não-invasivo da doença de Alzheimer.

O anel de benzodioxol, que é um isômero de benzotiazole, também é estudado como antitumoral, antibacteriano, antifúngicos, antiparasitário, antipalúdico e agentes antioxidantes. Além disso, alguns derivados de benzodioxol também são usados Como pesticidas ou intermediários de pesticidas e herbicidas.

O sistema 1,3-benzodioxol também é parte integrante de muitos produtos naturais como o sesamol e Piperina. A extensa revisão da literatura revelou que o sistema de anel benzodioxole 2-fenilo substituído é ainda a ser explorado para várias atividades biológicas.

O descobrimento e a evolução de uma nova molécula de longo e caro que pode conduzir a sufocar a inovação.

Além disso, a contaminação ambiental envolvida no processo de descoberta de novos produtos químicos, é uma preocupação global. Portanto, a química pesquisa para síntese rápida de pequenas moléculas com acréscimo da eficácia e efeitos secundários menores do que os já existentes de uma forma simples, eficaz e ambientalmente amigável. A partir dos fatos acima mencionados e com base no princípio de bioisoterismo, catorze compostos pertencentes a 2-fenil 1,3-benzodioxole e 2-fenil-1,3-benzodioxol-4-ol foram sintetizadas utilizando a abordagem de química verde. E subsequentemente, avaliadas para efeitos anticancerígenos e antibacterianos atividade. (DUTTA; BALAJI; KUMAR, 2016).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A.O. Ombaka, A.T. Muguna, J.M. Gichumbi, Antibacterial and antifungal activities of novel hydroxytriazenes, *J. Environ. Chem. Ecotoxicol.*, 4 , 133e136, 2012

BUTLER, M. S.; BLASKOVICH, M. A; COOPER, M. A. Antibiotics in the clinical pipeline in 2013. *The Journal of antibiotics*, v. 66, n. 10, p. 571–91, 2013

BEHM, M. B. et al. SÍNTESE E CRISTALOQUÍMICA DE COMPLEXOS DE Hg (II) E Ni (II) COM O LIGANTE. n. li, 1–95, 2006

BLATT, J. M.; MIRANDA, M. do C.; *Ver. Panam. Infectol.*, 7(4):10-14, 2005

CAMBRIDGE CRYSTALLOGRAPHIC DATA CENTRE – CCDC. Banco de Dados. Disponível em: <www.ccdc.cam.ac.uk/conts/retrieving.html>. Acesso em: 16 jul., 2018

Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI. Disponível em: <<http://www.clsi.org/>>. Acesso em: 16 jul., 2018

CARMO, Erick do. Síntese e Avaliação de Propriedades de Triazenos. Santo André, p. 5. (Trabalho de conclusão de curso. Universidade Federal do ABC), 2013

CRESPAN, E. R.; Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Maria, 2002

DUTTA, S.; BALAJI, G.; KUMAR, M. Eco-sustainable synthesis and biological evaluation of 2-phenyl 1, 3-benzodioxole derivatives as anticancer, DNA binding and antibacterial agents. *Arabian Journal of Chemistry*, v. 9, p. S1875–S1883, 2016

Cappoen, J. Vajs, C. Uythethofken, A. Virag, V. Mathys, M. Ko_cevar, L. Verschaeve, M. Gazvoda, S. Polanc, K. Huygen, J. Ko_smlj, Anti-mycobacterial activity of 1,3-diaryltriazenes, *Eur. J. Med. Chem.* 77, 193 e 203, 2014

F. Marchesi, M. Turriziani, G. Tortorelli, G. Avvisati, F. Torino, L. De Vecchis, Triazene compounds: mechanism of action and related DNA repair systems, *Pharmacol. Res.* 56, 275e287, 2007

FARREL, N. et al.; *Inorg. Chem.*; 26: 9, 1426-1429, 1987

GIGLIO, V. F.; *Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Maria*, 2006.

G. Kiefer, T. Riedel, P.J. Dyson, R. Scopelliti, K. Severin, Synthesis of triazenes with nitrous oxide, *Angew. Chem. Int. Ed.* 54, 302e305, 2015

GOSWAMI, A. K.; PUROHIT, D. N. *Anal. Sci.*, v.17, p.1789-1791, 2001.

GRIESS, P.; *Proc. Roy. Soc. London*; 9: 594; 1859.

GLADKOVA, V. F.; KONDRASHEV, Y. D., 17: 33, 1972.

HARTMAN, W. W; DICKEY, J. B.; *Organic Syntheses, Coll. II*, 163, 1943.

KOEHLER, E. G.; *Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Maria*, 2007.

KIMBALL, D. B.; HALEY, M. M. Triazenes : A Versatile Tool in Organic Synthesis WIN A. *Angewandte Chemie International Edition*, v. 41, p. 3339–3351, 2002.

LOW, J. W.; SING H, R.; *Biochem. Pharm.*; 31: 7, 1257-1266, 1982.

L.L. Ling, T. Schneider, A.J. Peoples, A.L. Spoering, I. Engels, B.P. Conlon,

A. Mueller, T.F. Sch€aberle, D.E. Hughes, S. Epstein, M. Jones, L. Lazarides,

V.A. Steadman, D.R. Cohen, C.R. Felix, K.A. Fetterman, W.P. Millett, A.G. Nitti,

A.M. Zullo, C. Chen, K. Lewis, A new antibiotics kills pathogens without detectable resistance, *Nature* 517, 455e459, 2015

MOORE, D.S.; ROBINSON, S.D.; *Adv. Inorg. Radiochem.*; 30, 1-68, 1986

MURRAY, P. R. et al. *Manual of clinical microbiology*. 8. ed. Washington: ASM Press, 2113, 2003

NEVES, A. P.; VARGAS, M. D.; *Rev. Virtual Quim.*; v. 3, p. 196-209, 2011

NISHIWAKI, K. et al.; *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15: 2856–2859, 2007

PARAGINSKI, G. L. et al.; *Quím. Nova*; 37: 7, p. 1138-1144, 2014

PAYEHGHADR, M. et al.; *Inorganica Chimica Acta*, 360, 6: 1792-1798, 2007

R.H. Deurenberg, E.E. Stobberingh, The evolution of *Staphylococcus aureus*, *Infect. Genet. Evol.* 8, 747 e763, 2008

RACHID, Z. et al.; *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 13: 2297-3300, 2003

SANTOS, A. J. R. W. A.; *Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Maria, 2005*

SOLOMONS, T. W. G.; *Organic Chemistry, Sixth Edition, Ed. John Wiley & Sons, Inc., USA, 1996*

VERNIN, G.; SIV, C.; METZGER, J.; *Synthesis*, 691, 1977.

VILLIS, P. C. M. Avaliação da Auto -Associação Molecular de complexos metalicos com ligantes triazenidos derivados do 1,3-bis(FENIL)TRIAZENOS 2007

VAJS, J. et al. Diaryltriazenes as antibacterial agents against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and *Mycobacterium smegmatis*. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 127, p. 223–234, 2017

Atividades Desenvolvidas no período



16/11/2017 870170088477
16:06



29409161710478445

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2017 024611 6

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): NOVOS TRIAZENOS, ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E SEU USO

Resumo: A presente invenção destina-se a descrever o processo de obtenção composto inéditos pertencentes a classe dos triazenos(TZC): 1,3-bis(2-metoxi-5-nitrofenil)triazeno e 1,3-bis(2-metoxi-4-nitrofenil)triazeno, sua atividade antimicrobiana frente a bactérias como S. aureus, E. coli, P. aeruginosa e fungos como C. albicans de interesse na clínica e multiresistentes e sua utilização para controle de infecção em ambientes hospitalares.



Universidade do CEUMA – UniCEUMA

Credenciada pela Portaria Ministerial n° 239, de 27 de março de 2012, publicado no DOU n° 62, Seção I, de 29 de março de 2012

CERTIFICADO

Certificamos que SAMPAIO FILHO JC apresentou o trabalho intitulado “SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE TRIAZENOS”, tendo como autores: SAMPAIO FILHO JC, GONÇALVES IS, CASTRO EJM, ROCHA ES, FIGUEIREDO PM e VILLIS PCM, durante o I FÓRUM DE MEIO AMBIENTE DO ESTADO DO MARANHÃO, realizado pela UNIVERSIDADE CEUMA, no período de 31 de maio a 03 de junho de 2017.

São Luís - MA, 03 de junho de 2017.


Valério Monteiro Neto
Gerente de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão.

Please find below the confirmation for your abstract(s) submitted to the IUPAC 2017.

Registration	Title	Submitted
2098	SYNTHESIS, MOLECULAR CHARACTERIZATION AND EVALUATION OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF TRIAZENES	03/02/2017

*INGRID SANTOS GONÇALVES¹; JOSÉ COSTA SAMPAIO FILHO¹; RODRIGO VIEIRA BLASQUES²; EMMELINE DE CUNHA SÁ²; ALZIRENE DE JESUS SALES SODRE²; WOLIA COSTA GOMES¹; MARIA RAIMUNDA CHAGAS SILVA¹; RITA DE CÁSSIA MENDONÇA DE MIRANDA¹; GILVANDA SILVA NUNES²; PATRÍCIA DE MARIA FIGUEIREDO²; PAULO CESAR MENDES VILLIS¹.
1.UNIVERSITY OF CEUMA - UNICEUMA, SÃO LUÍS - MA - BRASIL; 2.FEDERAL UNIVERSITY OF MARANHÃO - UFMA, SÃO LUÍS - MA - BRASIL.*

If you want to see your abstract, please access the link below and type in the given code and Password.

[ACCESS](#)

Síntese, Caracterização Molecular e Avaliação da Atividade

Antimicrobiana de 1,3-*bis*(2-metoxi-X-nitrofenil)triazeno [X = 4; 5]

Synthesis, Molecular Characterization and Evaluation of the Antimicrobial Activity of
1,3-*bis*(2-methoxy-X-nitrofenyl)triazene [X = 4; 5]

José Costa Sampaio Filho^{a,*}, Patricia de Maria Figueiredo^c e Paulo Cesar Mendes Willis^a

^aLaboratório de Materiais e Eletroquímica - LME, Universidade de CEUMA - UNICEUMA, 65.065-470, São Luís, MA, Brasil – j.sampaio@ceuma.br

^bLaboratório de Microbiologia Clínica, Universidade Federal do Maranhão - UFMA, 65.080-040, São Luís, MA, Brasil – figueiredo.patricia@gmail.com

RESUMO

Os compostos químicos inéditos utilizados neste trabalho foram os 1,3-*bis*(2-metoxi-4-nitrofenil)triazeno (**1**) e 1,3-*bis*(2-metoxi-5-nitrofenil)triazeno (**2**) pertencentes à classe dos triazenos, espécie química envolvendo cadeias abertas com três ou mais átomos de nitrogênio ligados em sequência, caracterizados pelo grupo diazoamínico. Muitos triazenos têm atividade biológica, uma vez que as aminas presentes nestes compostos têm locais específicos de ação nas membranas celulares e a capacidade de formar ligações de hidrogênio. Os triazenos são amplamente utilizados em sínteses experimentais de novos compostos. Este trabalho descreve a síntese, a caracterização molecular e a avaliação da atividade biológica e o potencial antimicrobiano dos triazenos 1,3-*bis*(2-metoxi-X-nitrofenil)triazeno [X= 4; 5]. Foram realizados testes das atividades antimicrobianas de (**1**) e (**2**), mediante avaliação da sensibilidade da solução dos compostos frente às bactérias ATCC's (*American Type Culture Collection*, ATCC) e isolados clínicos, aplicando-se ensaios microbiológicos padronizados. O potencial antimicrobiano foi determinado pela Concentração Inibitória Mínima (CIM), exibindo resultados promissores, com atividade diante de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, com baixos valores de CIM. Os resultados mostraram a potencialidade dos triazenos, frente à resistência das cepas bacterianas selecionadas.

Palavras-chave: triazeno, atividade antimicrobiana, gram-positivos e gram-negativos

ABSTRACT

The unpublished chemical compounds used in this work were 1,3-*bis*(2-methoxy-4-nitrophenyl)triazene (**1**) and 1,3-*bis*(2-methoxy-5-nitrophenyl)triazene (**2**), belonging to the class of triazenes, a chemical species involving open chains with three or more nitrogen atoms connected in sequence, characterized by the diazoaminic group. Many triazenes have biological activity, since the amines present in these compounds have specific sites of action on cell membranes and the ability to form hydrogen bonds. Triazenes are widely used in experimental syntheses of novel compounds. This work describes the synthesis, molecular characterization and evaluation of the biological activity and antimicrobial potential of triazenes 1,3-*bis*(2-methoxy-X-nitrophenyl)triazene [X = 4; 5]. Antimicrobial activity tests of (**1**) and (**2**) were performed by evaluating the sensitivity of the solution of the compounds to the ATCC's (*American Type Culture Collection*, ATCC) and clinical isolates, applying standardized microbiological assays. The antimicrobial potential was determined by the Minimum Inhibitory Concentration (MIC), showing promising results, with activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria, with low MIC values. The results showed the potentiality of the triazenes, against the resistance of the bacterial strains selected.

KEYWORDS: triazene, antimicrobial activity, gram-positive and gram-negative

1 Introdução

Os compostos nitrogenados são moléculas orgânicas que apresentam em sua constituição o heteroátomo N (nitrogênio). O conjunto de átomos que possui o N como heteroátomo é o grupo funcional, constituindo um grupo polar funcional da molécula (Moore and Robinson, 1986).

Os triazenos são grupos orgânicos, pertencentes à família dos compostos orgânicos nitrogenados de cadeia aberta (alifáticas), evidenciado pelo grupo funcional insaturado diazoamínico [-N=N-N=], e formado por 3 (três) átomos de nitrogênio interligados em sequência (M. Hörner, V. F. Giglio, A. J. R. W. A. dos Santos, A. B. Westphalen, B. A. Iglesias, P. R. Martins, C. H. do Amaral, T. M. Michelot, L. G. B. Reetz, C. de M. Bertonchel, 2008), podendo ser simétrico (a) ou assimétrico (b), conforme representa a Figura 1.

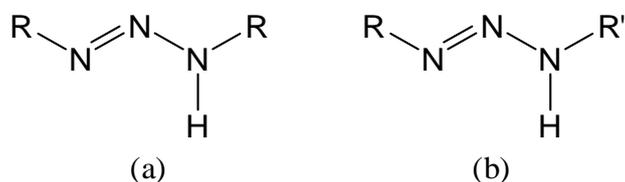


Figura 1 - Representação estrutural genérica de triazeno simétrico (a) e assimétrico (b)

Johann Peter Griess em 1859 relatou a síntese do primeiro composto triazeno simétrico, o 1,3-*bis*(fenil)triazeno, onde sintetizou o primeiro triazeno orgânico em seus estudos na preparação de sais de diazônio (Moore and Robinson, 1986).

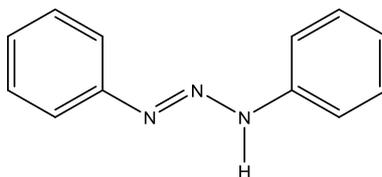


Figura 2 - Representação estrutural do 1,3-*bis*(fenil)triazeno

Estas cadeias nitrogenadas, que apresentam 3 (três), 4 (quatro), 5 (cinco) ou mais átomos de nitrogênio em sequência, também chamados de compostos catenados, podem ser facilmente estabilizadas por substituintes estrategicamente (R, R'), permitindo assim várias possibilidades de coordenação, por proporcionarem uma grande possibilidade eletrônica em função da geometria molecular e da presença de doadores (GLADKOVA, V. F.; KONDRASHEV, 1972; Moore and Robinson, 1988). Quando os radicais são substituídos por anéis aromáticos, estes compostos conferem uma maior estabilidade a estas cadeias, uma vez que permitem a deslocalização da densidade eletrônica.

A relevância da química dos triazenos é oposto dos demais ramos da ciência pelos seus inúmeros propósitos e reconhecida versatilidade nas mais diversas áreas da química. Recentemente, os compostos triazenídicos estão sendo investigados, impelido variedade de aplicações nas áreas da química, microbiológica, bioquímica Inorgânica (bioinorgânica) e da química da coordenação (Ombaka A. O., Muguna, A. T. and Gichumbi, 2012). Os compostos triazenídicos mostraram-se bastante eficazes no desenvolvimento de compostos ou substâncias com atividades biológicas. Um dos usos mais prevalentes de triazenos está no desenvolvimento de moléculas com atividade antimicrobiana, antifúngica e antineoplásico (M. Hörner, V. F. Giglio, A. J. R. W. A. dos Santos, A. B. Westphalen, B. A. Iglesias, P. R. Martins, C. H. do Amaral, T. M. Michelot, L. G. B. Reetz, C. de M. Bertonchel, 2008; Vajs *et al.*, 2017).

Segundo KOEHLER *et al.* (KOEHLER, 2007), essa atividade biológica pode ser justificada, pois o grupo das aminas presentes nesses compostos são amplamente utilizadas em sínteses experimentais de

novos compostos por possuírem sítios específicos de ação nas membranas celulares e capacidade de formar ligações de hidrogênio.

No advento da medicina moderna, a resistência aos antibióticos tornou-se um dos mais graves problemas de saúde no mundo (Deurenberg and Stobberingh, 2008). A resistência surge por alterações no alvo do antibiótico, pela aquisição de enzimas modificadoras de antibióticos ou pelo antibiótico através de alterações na permeabilidade ou Bombas de efluxo da parede celular.

Considerando o exposto, há uma necessidade urgente de desenvolver agentes antibacterianos eficazes que evitam a emergência de resistência (Ling *et al.*, 2015). Com base em pesquisa recente (Cappoen *et al.*, 2014), fomos levados a explorar mais a atividade antimicrobiana dos 1,3-diariltriazenos, pois os triazenos possuem uma série de propriedades biológicas, incluindo atividade antifúngica (Ombaka A. O., Muguna, A. T. and Gichumbi, 2012), como anoréxicos e atividade anticancerígena (Vajs *et al.*, 2017) muito interessantes. O mecanismo de ação dos alquiltriazenos está geralmente ligado à formação de espécies reativas de diazônio que são capazes de alquilar o DNA (Marchesi *et al.*, 2007).

Recentemente, vários triazenos foram identificados com potencial na atividade antimicrobiana em relação a *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) e *M. Smegmatis* (Vajs *et al.*, 2017).

A atividade antibacteriana de compostos triazenos tem sido pouco estudada e alguns autores avaliaram a atividade dos triazenos frente a bactérias e fungos. PARAGINSKI *et al.* (Paraginski *et al.*, 2014) avaliaram a atividade de 15 (quinze) compostos triazenídicos, incluindo um complexo de vanádio e um sal de potássio de um hidroxitriazeno, frente a várias bactérias, incluindo cepas ESBL (β -lactamases de espectro ampliado). Tais compostos foram ativos frente a bactérias multirresistentes, incluindo cepas produtoras de ESBL, MBL (metalo- β -lactamases) e do gene AmpC. Essas evidências tiveram grande impacto na atualidade, uma vez que esses mecanismos de resistência bacteriana estão entre os mais prevalentes.

Deste modo, se faz necessária o relato de novos agentes efetivos contra microrganismos, de modo que equilibrem a demanda que compense o baixo número de antimicrobianos disponíveis e o arsenal de mecanismos de resistência adquiridos pelos patógenos (Guimarães, Da Silva Momesso and Pupo, 2010).

O descobrimento e a evolução de uma nova molécula, são longos e caros, pode conduzir a dificultar a inovação. Além disso, a contaminação ambiental envolvida no processo de descoberta de novos produtos químicos ou moléculas, é uma preocupação global. Portanto, a química necessita de síntese rápida de pequenas moléculas com acréscimo da eficácia e efeitos secundários menores do que os já existentes de uma forma simples, eficaz e ambientalmente amigável. A partir dos fatos acima mencionados e com base no princípio de bioisoterismo, 14 (catorze) compostos pertencentes a 2-fenil-1,3-benzodioxole e 2-fenil-1,3-benzodioxol-4-ol foram sintetizadas utilizando a abordagem de química verde. E subsequentemente, avaliadas para efeitos anticancerígenos e antibacterianos (Dutta Gupta *et al.*, 2016).

Este trabalho descreve pela primeira vez a síntese, a caracterização molecular e a avaliação das atividades biológicas e antimicrobianas de triazenos de interesse clínico, utilizando, para isso, ensaios microbiológicos padronizados

2 Material e Métodos

2.1 Local de estudo e local da pesquisa

Este trabalho consiste em um estudo experimental descritivo com testes quantitativos e qualitativos, realizados no Laboratório de Eletroquímica e Biotecnologia – LEB da Universidade do CEUMA – UNICEUMA e Laboratório de Microbiologia Clínica da Universidade Federal do Maranhão – UFMA.

2.2 Sínteses dos triazenos

Os triazenos foram sintetizados pela reação com nitrito isoamílico em meio aprótico, descrito por VERNIN et al. (VERNIN, G.; SIV, C.; METZGER, 1977), como demonstrado na Figura 3.

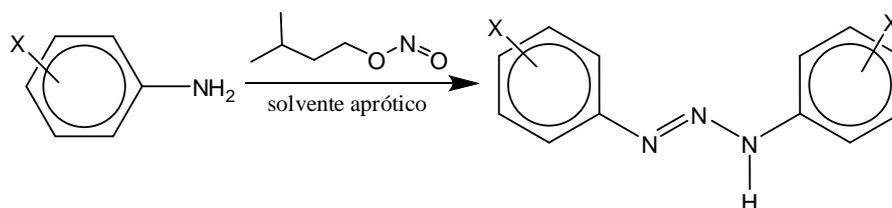


Figura 3 - Modelo Genérico das Reações com nitrito isoamílico

2.3 Caracterização estrutural dos triazenos

As medidas de Análise Elementar CHN (AE CHN), para detecção dos teores de carbono, hidrogênio e nitrogênio contidos na amostra de (1) e (2), foram determinadas no Analisador Elementar da Leco Instrumentos LTDA - modelo *TruSpec* CHNS-O.

Para a determinação do Ponto de Fusão (P.F.) foi utilizado um aparelho Mel-Temp II.

Os espectros de Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (IV) de (1) e (2) foram obtidos utilizando o equipamento da marca *Shimadzu*, modelo FT-IR-*Prestige-21*, *Beam Splitter* KBr (escala de varredura no IV de 7800 a 350 cm⁻¹, detector DLATGS, resolução 0,85; 1; 2,4; 8 e 16 cm⁻¹, interferômetro selado de *Michelson* com alinhamento dinâmico.

O espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ¹H (RMN ¹H) foi obtido em um espectrofotômetro *Bruker* (Modelo DPX-400), localizado na Universidade Federal de Santa Maria – UFSM. O espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ¹³C (RMN ¹³C) foi obtido em um espectrofotômetro *Bruker* (Modelo AC 300P) que opera a 75,5 MHz para ¹³C. O tetrametilsilano (TMS), Si (CH₃)₄, foi utilizado como referência externa para as mudanças químicas, localizado na Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP. Para todos os deslocamentos químicos (δ) foram registrados em ppm.

2.4 Atividade Antibacteriana

Na análise da atividade antimicrobiana de (1) e (2) foram realizadas conforme as normas M7-A6, do *Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI)* (CLSI Supplement., 2013).

2.5 Seleção de cepas bacterianas

Para realização dos testes foram utilizados micro-organismos padrão *American Type Culture Collection – ATCC* e isolados clínicos. As amostras bacterianas são:

- *Shigella flexneri* (Amostra de fezes 278)
- *Streptococcus agalactiae* (Secreção vaginal 12092294)
- *Acinetobacter baumannii* (Secreção traqueal 12337641)
- *Staphylococcus haemolyticus* (Amostra de sangue 13084879)
- *Proteus mirabilis* (Secreção traqueal 557691)
- *Staphylococcus epidermidis* (Amostra de sangue 13079158)
- *Enterobacter cloacae* (12330175)
- *Morganella morganii* (5721529)
- *Staphylococcus saprophyticus* (13087266)
- *Serratia marcescens* (12285366)
- *Salmonella spp.* (Amostra de fezes 7855729)
- *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853)
- *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)
- *Escherichia coli* (ATCC 2592)

2.5 Preparo da solução (1)

Uma solução de **(1)** (Figura 4; 0,863 mg/mL em isopropanol) foi preparado e denominada de **STZC 1**.

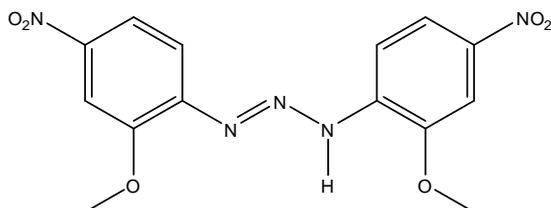


Figura 4 - Representação estrutural do 1,3-bis(2-metoxi-4-nitrofenil)triazeno

2.6 Preparo da solução (2)

Uma solução de **(2)** (Figura 5; 0,785 mg/mL em etanol) foi preparada e denominada de **STZC 2**.

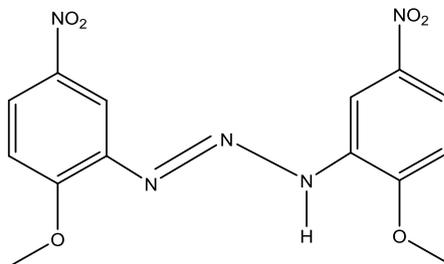


Figura 5 - Representação estrutural do 1,3-bis(2-metoxi-5-nitrofenil)triazeno

2.7 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Em placas de plástico de 96 poços, próprias para este fim, foram colocados 150 µL de caldo *Mueller Hinton*. Logo após, foram iniciadas diluições seriadas, a partir do acréscimo do mesmo volume de **STZC 1** e **STZC 2**, diluição, e transferência do mesmo volume da mistura para o poço seguinte.

Após isolamento de colônias no meio adequado, foram selecionadas aquelas de padrão morfológico semelhante para o preparo de suspensão em solução salina (0,9%), de modo que a turbidez da mesma seja semelhante ao da escala de *Mac Farland* padrão 0,5. Foram inoculados 5 µL de suspensão bacteriana em cada poço.

O controle positivo foi realizado a partir da aplicação de 20µL de substância padrão ouro de atividade antimicrobiana no poço com o caldo *Mueller Hinton*, seguido da aplicação da suspensão bacteriana. As placas foram incubadas por, no mínimo, 16 horas, a 35°C.

2.8 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Para a verificação de CBM, as diluições de atividade inibitória positiva foram semeadas em placas de Ágar Nutriente, para observar se houve ou não formação de colônias, que significariam novo crescimento bacteriano. Resultados positivos para crescimento bacteriano na placa caracterizaram a atividade de **STZC 1** e **STZC 2** como bacteriostático. Resultados negativos para crescimento bactericida na placa caracterizaram a atividade do produto como bactericida (Simonetti *et al.*, 2016).

2.9 Determinação da potência antibiótica

Em placas de plástico de 96 poços, próprias para este fim, foram colocados 150 µL de caldo *Mueller Hinton*. Logo após, foram iniciadas diluições seriadas, pelo acréscimo do mesmo volume de Cloranfenicol (concentração inicial 20 µg/mL), depois de realizada a mistura, o mesmo volume foi transferido para o poço seguinte.

Das bactérias que apresentaram melhor resultado na determinação da Concentração Inibitória Mínima foram isoladas colônias, no meio adequado, e selecionadas aquelas de padrão morfológico semelhante. As colônias foram suspensas em solução salina 0,9%, previamente preparadas, de modo que a turbidez da mesma seja semelhante ao da escala de *Mac Farland* padrão 0,5. Foram inoculados 5 µL de suspensão bacteriana em cada poço (Lourenço, 2009).

2.10 Verificação da Irritabilidade de (2)

Reproduzindo a metodologia descrita por ALVES (Alves, 2003; ANVISA BRASIL, 2003), o ensaio *in vitro* de lesão em hemácias de sangue de carneiro ocorreu conforme o descrito a seguir.

Foram coletados 2,0 mL de sangue de carneiro desfibrinado, em seguida, transferidos para um tubo com tampa, e centrifugados a 3000 rpm por 15 minutos. Após descarte do sobrenadante, a papa de hemácias passou por três lavagens consecutivas com Tampão Fosfato Salino para retirada dos resquícios de plasma.

Foram realizadas diluições seriadas de **STZC 2** em solução tampão Fosfato Salino, com mistura de 975 µL de tampão e mesmo volume de produto-teste, e transferência para os tubos seguintes, com descarte do volume final excedente.

Foram adicionados à mistura 25 µL da suspensão de hemácias (completando o volume para 1000 µL). Ao final desta etapa, a suspensão formada pela mistura do produto com o tampão e as hemácias foi incubada à temperatura ambiente por 10 minutos, seguida de centrifugação em 10.000 rpm por um

minuto. O sobrenadante foi transferido para uma cubeta 1cm³, e medida a absorbância em espectrofotômetro de massas, nos comprimentos de onda 540 e 575nm. A suspensão controle foi composta por Tampão Fosfato Salino e o produto-teste; o branco foi apenas o PBS, de modo que minimizasse a interferência do mesmo na leitura dos dados.

O composto **STZC 2** foi caracterizado pelo seu potencial de Irritabilidade, segundo os parâmetros demonstrados na Tabela 1.

Tabela 1 - Classificação do potencial de Irritação determinado pelo quociente da concentração que provoca 50% de hemólise (H₅₀) e o índice de desnaturação (ID):

Grau de Irritabilidade	Tipo de Irritação
< 0,1	Irritante Máximo
0,1 ≤ x* ≤ 1	Irritante Severo
1 ≤ x ≤ 10	Irritante Moderado
10 ≤ x ≤ 100	Irritante leve
> 100	Não irritante

X = quociente entre a concentração que provoca 50% de hemólise (H₅₀) e o índice de desnaturação (ID)

2.11 Teste de Atividade Hemolítica

A atividade hemolítica foi realizada através da incubação de **STZC 1** e **STZC 2** com 1% de eritrócitos (cavalo e carneiro) adquirido comercialmente, as hemácias foram lavadas três vezes com PBS (solução salina de tampão fosfato), pH 7,2, após a lavagem foram diluídos 200 µL das hemácias em 20 mL de solução de PBS para preparo da suspensão, a suspensão de hemácias foi adicionada aos tubos logo após foi adicionado o produto triazeno seguido de diluições seriadas. Foi utilizado como controle positivo 50 µl de água destilada e 50µl de hemácias e como controle negativo foi utilizado 50 µl de solução de PBS com 50µl de hemácias. A atividade hemolítica foi expressa como a concentração máxima da solução de triazeno que não causou hemólise.

2.12 Avaliação da citotoxicidade

Para esse estudo, foi utilizada linhagem de macrófagos RAW 264.7 de camundongos, previamente obtida da Coleção Americana de cultura de células (ATCC). As células foram mantidas em RPMI a -80 °C em solução de congelamento. Para os ensaios in vitro as células foram descongeladas à temperatura ambiente e expandidas em frascos de cultura celular de 750 cm² (Corning Glass Workers, NY, EUA), à temperatura de 37°C, em estufa incubadora umidificada contendo 95% de ar e 5% de CO₂. Assim, ocorreu a proliferação dos macrófagos que, progressivamente, colonizaram a superfície das garrafas, formando uma monocamada celular contínua.

A citotoxicidade do extrato foi avaliada utilizando-se o ensaio colorimétrico baseado no sal de tetrazólio, MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H tetrazólio) (MOSMANN, 1983).

Para isso, as células RAW 264.7 foram cultivadas em placas de 96 poços e fundo chato a uma concentração de 1×10^6 células/mL, e incubadas por uma hora em meio RPMI, a 37 °C, com atmosfera contendo 5% de CO₂. Após esse período inicial de incubação, as células aderentes foram tratadas com diferentes concentrações dos triazenos. Após vinte e quatro horas, foi retirado o meio e adicionado uma solução de MTT (5 mg/mL), e após 3 h de incubação com o MTT foram acrescentados 100 µL de SDS a 10%, diluído em HCl (0,01 N). A quantificação da DO foi medida a 540 nm em espectrofotômetro (Molecular Devices, SpectraMax® Plus 384). Os resultados foram expressos em porcentagem de citotoxicidade celular, e esta foi calculada a partir da seguinte equação:

$$\% \text{ Citotoxicidade} = [1 - (\text{Absorbância do teste}/\text{Absorbância do branco})] * 100$$

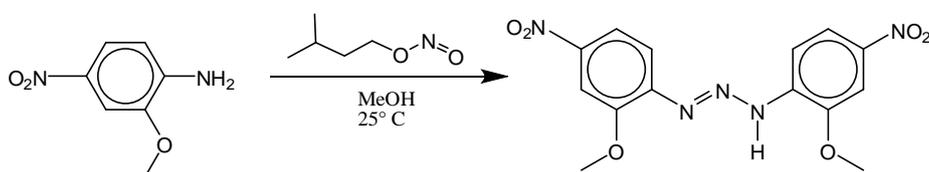
A citotoxicidade foi expressa em porcentagem e comparada e todos os dados obtidos foram comparados com o grupo controle negativo, constituído apenas de meio RPMI completo e macrófagos, e com o grupo controle positivo, ao qual fora acrescentado Triton X100 (1%).

3 Resultados e Discussões

3.1 Sínteses dos triazenos

3.1.1 Triazeno 1,3-*bis*(2-metoxi-4-nitrofenil)triazeno

A síntese do ligante triazeno 1,3-*bis*(2-metoxi-4-nitrofenil)triazeno foi realizado, de acordo com o Esquema 1.



O composto 1,3-*bis*(2-metoxi-4-nitrofenil)triazeno foi obtido a partir da diazotação da 2-metoxi-4-nitroanilina (PF: 139 -142° C) com nitrito isoamílico, na proporção de 2:1.

Preparou-se uma solução contendo 0,5 g (2,97 mmol) de 2-metoxi-4-nitroanilina, dissolvidos em 30,0 mL de metanol, o qual adicionou-se sob agitação magnética e temperatura ambiente, uma solução de nitrito isoamílico (C₅H₁₁NO₂, D = 0,872g/mL) com 0,20 mL (1,48 mmol).

Observou-se a formação de um precipitado laranja, conforme mostra a Figura 6. Separou-se o produto por filtração à vácuo e lavou-se o precipitado repetidas vezes com etanol. Por fim, secou-se o produto sólido laranja amorfo à temperatura ambiente.



Figura 6 - Composto 1,3-*bis*(2-metoxi-4-nitrofenil)triazeno

Recristalização em uma mistura de etanol/THF (etanol/tetrahidrofurano; 10 mL/30 mL).

O produto sólido obtido é solúvel em solventes de uso comum em laboratório de síntese como acetona e THF; parcialmente solúvel em acetonitrila e acetato de etila. Insolúvel em metanol, etanol e éter etílico

3.1.2 Caracterização do triazeno 1,3-*bis*(2-metoxi-4-nitrofenil)triazeno

Rendimento Exp.: 0,3508g (60%)

Rendimento Teor.: 0,5848g

Análise Elementar (%): C₁₆H₁₉N₅O₇: C, 48,85; H, 4,87; N, 17,80. Experimental: C, 48,82; H, 4,37; N, 18,30.

P.F.: 203 – 205 °C

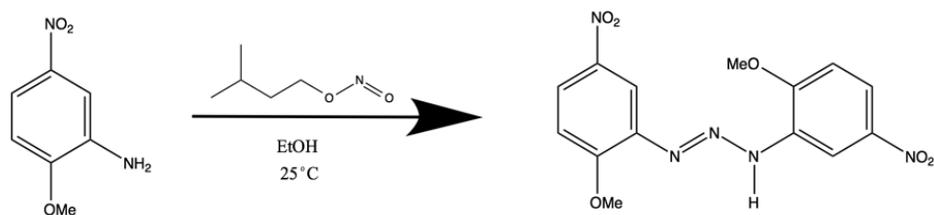
Espectroscopia de Infravermelho (KBr, cm⁻¹): Principais bandas observadas nas regiões $\nu_{\text{as}}(\text{NH}) = 3324 \text{ cm}^{-1}$; $\nu(\text{O-H}_{\text{etanol}}) = 3448 \text{ cm}^{-1}$; $\nu_{\text{sim}}(\text{C-O-C}) = 1086 \text{ cm}^{-1}$; $\nu_{\text{as}}(\text{C-O-C}) = 1254 \text{ cm}^{-1}$; $\nu(\text{NO}_2) = 1519 \text{ cm}^{-1}$; $\nu(\text{C=C}) = 1592 \text{ cm}^{-1}$; $\nu(\text{N=N}) = 1467 \text{ cm}^{-1}$; $\nu(\text{N-N}) = 1164 \text{ cm}^{-1}$; $\nu(\text{C-N}) = 863 \text{ cm}^{-1}$.

Ressonância Magnética Nuclear (RMN ¹H, 300 MHz, (CD₃)CO, ppm): δ 1,82-1,75 (s, CH₃), 2,85-2,282 (d, CH₂), 3,66-3,59 (m, -OCH₃), 4,10 (s, 1H, NH), 3,96-3,95 (s, 1H, OH), 7,93-7,88 (m, 6H, ArH).

Ressonância Magnética Nuclear (RMN ¹³C, 75,43 MHz, CDCl₃, ppm): 56,73(s, C1, C2, OCH₃), 107,27(s, C16, C26, O₂NC₆H₃), 117,66 (s, C13, C15, C23, C25, O₂NC₆H₃).

3.2.1 Triazeno 1,3-*bis*(2-metoxi-5-nitrofenil)triazeno

A síntese do ligante triazeno 1,3-*bis*(2-metoxi-5-nitrofenil)triazeno foi realizado, de acordo com o Esquema 2.



O composto 1,3-*bis*(2-metoxi-5-nitrofenil)triazeno (Figura 7) foi obtido a partir da desnitrificação da amina 2-metoxi-5-nitroanilina com nitrito de isoamílico (2:1).

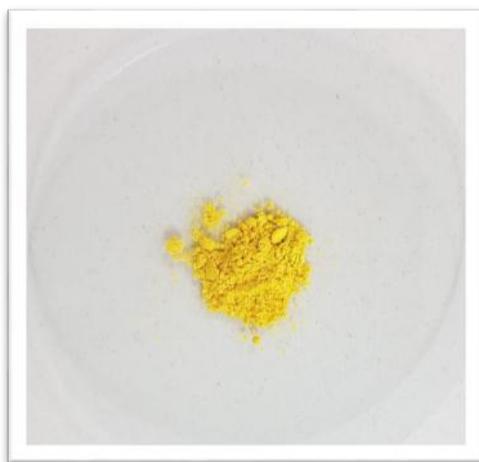


Figura 7 - Composto 1,3-*bis*(2-metoxi-5-nitrofenil)triazeno

Recristalização em uma mistura de THF/DMF (tetrahydrofurano/dimetilformida; 30,0mL/10,0mL).

O produto sólido obtido foi solúvel em THF e DMF; parcialmente solúvel em CH₂Cl₂. Insolúvel em metanol, etanol, acetonitrila, acetato de etila e éter etílico.

3.2.2 Caracterização do triazeno 1,3-*bis*(2-metoxi-5-nitrofenil)triazeno

Rendimento Exp.: 0,3508 g (60%)

Rendimento Teor.: 0,5848 g

Análise Elementar (%): C₁₆H₁₉N₅O₇: C, 48,85; H, 4,87; N, 17,80. Experimental: C, 48,84; H, 4,57; N, 17,75.

P.F.: 210-212 °C

Espectroscopia de Infravermelho (KBr, cm⁻¹): $\nu_{as}(\text{NH}) = 3324 \text{ cm}^{-1}$; $\nu_s(\text{C-O-C}) = 1086 \text{ cm}^{-1}$; $\nu_{as}(\text{C-O-C}) = 1254 \text{ cm}^{-1}$; $\nu(\text{NO}_2) = 1519 \text{ cm}^{-1}$; $\nu(\text{C=C}) = 1592 \text{ cm}^{-1}$; $\nu(\text{N=N}) = 1467 \text{ cm}^{-1}$; $\nu(\text{N-N}) = 1164 \text{ cm}^{-1}$; $\nu(\text{C-N}) = 863 \text{ cm}^{-1}$.

3.3 Atividade Antibacteriana de STZC 1 e STZC 2

3.3.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Na determinação da concentração inibitória mínima, pelo método de microdiluição, o **STZC 1** apresentou potencial antibacteriano frente a todos os microrganismos testados, especialmente, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus mirabilis* ATCC 7002 e *Enterobacter cloacea* IC 12330175, sendo inibida a partir da concentração 26,97 µg/mL; o **STZC 2** apresentou potencial antibacteriano contra todos os microrganismos testados, especialmente, *Staphylococcus haemolyticus* IC 13084879, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, sendo inibida a partir da concentração 24,53 µg/mL, como mostra a Tabela 2.

Tabela 2 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) *in vitro* de STZC 1 e STZC 2, sobre cepas bacteriana de referência e isolados clínicos

Microrganismo	CIM ^{1,2} STZC 1	CIM ^{1,3} STZC 2
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	53,94	49,06
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> IC 13084879	53,94	24,53
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	26,97	49,06
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	26,97	49,06
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	26,97	24,53
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	53,94	24,53
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 7002	26,97	49,06
<i>Enterobacter cloacea</i> IC 12330175	26,97	49,06
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606	53,94	98,12

¹CIM em µg/mL;

C¹: Cloranfenicol

²C: Isopropanol

³C: Etanol

Os resultados apresentados corroboram com os estudos de RAMPELOTTO *et al.* (R. F. Rampelotto, V. V. Lorenzoni, G. A. de Moraes, M. Tizotti, M. Horner, 2016), que demonstram que os compostos triazenos apresentam efetividade na inibição do crescimento de bactérias Gram-Positivas e Gram-Negativas.

3.3.2 Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A partir dos resultados de inibição bacteriana positiva, determinados na CIM, o conteúdo dos poços foi inoculado em Ágar Nutriente para reativação de possíveis colônias de bactérias, estáticas à presença do triazeno diluído. Deste modo, para verificação da atividade, se bactericida ou bacteriostática, a concentração bactericida mínima está relacionada com a menor concentração que provocou morte das colônias de bactérias, resultando na impossibilidade de novo crescimento na placa, conforme a Tabela 3.

Tabela 3 - Concentração Bactericida Mínima (CBM) *in vitro* de **STZC 1** e **STZC 2**, sobre cepas bacteriana de referência e isolados clínicos

Microrganismo	CBM^{1,2} STZC 1	CBM^{1,3} STZC 2
<i>Staphylococcus aureus</i> ATTC 25923	215,75	196,06
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> IC 13084879	107,87	98,12
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	26,97	98,12
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	53,94	98,12
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	53,94	98,12
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	53,94	24,53
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 7002	53,94	196,06
<i>Enterobacter cloacea</i> IC 12330175	53,94	98,12
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606	215,75	98,12

¹CBM em µg/mL;

C⁺: Cloranfenicol

²C: Isopropanol

³C: Etanol

Para **STZC 1**, a menor CBM encontrada foi de 26,97 µg/mL para *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 e para as amostras de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Proteus mirabilis* ATCC 7002 e *Enterobacter cloacea* IC 12330175 foi de 53,94 µg/mL.

Para **STZC 2**, a menor CBM encontrada foi de 24,53 µg/mL para *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 e para as amostras de *Staphylococcus haemolyticus* IC 13084879, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterobacter cloacea* IC 12330175 e *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 foi de 98,12 µg/mL. A CBM determina a atividade bactericida ou bacteriostática para estas amostras. Mostrando a importância desta solução como uma possível opção terapêutica, visto que estas bactérias são de alta prevalência entre as bactérias multirresistentes encontradas em ambiente hospitalar.

A Tabela 3 demonstra a atividade bactericida de **STZC 1** e **STZC 2** contra as espécies *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 e *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, visto que a concentração que provocou inibição do crescimento bacteriano (CIM, descrito Tabela 2) não permitiu sua reativação em meio nutritivo.

A atividade bactericida do composto contra *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 é semelhante à descrita por PARAGINSKI et al. (Paraginski *et al.*, 2014), no composto de mesma classe.

Importante ressaltar que os resultados aparecem de maneira semelhante, porém o produto é sintético e inédito, podendo ser comparado a outros de sua classe, porém, passivo de resultados diferenciados.

3.3.3 Teste de Atividade Hemolítica

O teste de hemólise faz uma avaliação preliminar da toxicidade de uma substância de forma a avaliar a viabilidade de uso do mesmo. Este ensaio permite quantificar os efeitos adversos de ingredientes isolados e de produtos acabados sobre a membrana plasmática das hemácias e a consequente liberação da hemoglobina (hemólise) (Alves, 2003).

Tabela 4 - Concentração de **STZC 1** e **STZC 2** não hemolítica em sangue de Carneiro desfibrinado

Triazeno	Concentração Inicial ¹	Concentração mínima hemolítica ¹
STZC 1	863	34,52
STZC 2	785	31,40

¹ CMH (Concentração Mínima onde não houve Hemólise) em µg/mL

² Controle Negativo – isopropanol e etanol a 100%

Os **STZC 1** e **STZC 2**, em baixas concentrações, não apresentam atividade hemolítica contra células sanguíneas. Nas concentrações mais altas, se faz necessário o uso de outras técnicas para a confirmação de sua toxicidade.

3.3.4 Determinação da Potência de STZC 2

A análise foi realizada com as bactérias inibidas com a menor concentração de **STZC 2**, sendo utilizadas, portando, as espécies *Staphylococcus haemolyticus* IC 13084879, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Salmonella enteritidis* ATCC 13076.

Pela diluição de um antibacteriano conhecido, o Cloranfenicol 20 µg/mL, seguida do inóculo das bactérias nas mesmas quantidades e volumes que as o teste de determinação da CIM, foi observado que, em concentrações superiores a 0,15µg/mL, ocorreu a inibição do crescimento de *Staphylococcus haemolyticus* IC 13084879 e *Escherichia coli* ATCC 25922; e em concentrações superiores a 0,31µg/mL, foi inibido o crescimento de *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, como mostra a Tabela 5.

Tabela 5 - Concentração Inibitória Mínima de Cloranfenicol, cuja concentração inicial era de 20 µg/mL

Microrganismo	CIM _c *
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> IC 13084879	0,15µg/mL
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0,15µg/mL
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	0,31µg/mL

CIM^c= Concentração Inibitória Mínima do Cloranfenicol

Para a determinação da potência do produto testado neste trabalho, o **STZC 2** é necessário realizar a correlação entre os resultados da CIM do composto em análise com os do antibiótico conhecido. Deste modo, numericamente, temos:

$$P = \frac{CIM_t}{CIM_c} \times 100$$

Tabela 6 - Determinação da potência do STZC 2, em relação a atividade do antibiótico conhecido, Cloranfenicol [20µg/mL]

Microrganismo	CIM _t	CIM _c	P
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> IC 13084879	2,4 µg/mL	0,15µg/mL	1600
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	2,4 µg/mL	0,15µg/mL	1600
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	2,4 µg/mL	0,31µg/mL	774

CIM^t: Concentração Inibitória Mínima do Triazeno
 CIM^c = Concentração Inibitória Mínima do Cloranfenicol
 P: Potência

A comparação entre a atividade do **STZC 2** e a do Cloranfenicol contra as bactérias inibidas com apontou que o antibiótico apresentou potência de 1600 vezes maior que o composto em análise.

3.3.4 Irritabilidade dos Triazenos

Observando os resultados da triplicata em espectrofotometria, e aplicando-lhes em análise estatística que relaciona a concentração que provoca 50% de hemólise (H₅₀) e o Índice de Desnaturação (ID), obteve-se a caracterização de **STZC 2** como Irritante Severo, de acordo com a Tabela 7.

Tabela 7. Índice de Irritabilidade dos Triazenos

Experimento	H ₅₀ mg/mL	ID (%)	<u>H₅₀/ID</u>	Irritabilidade
1	0,33	0,4	<u>0,9</u>	IS
2	0,33	0,4	<u>0,9</u>	IS
3	0,33	0,4	<u>0,9</u>	IS

IS = Irritante Severo

As análises da toxicidade dos triazenos descritas em literatura são relacionadas as pesquisas realizadas por PARAGINSKI et al. (Paraginski *et al.*, 2014), pela exposição da espécie *Artemia salina* Leach e ao contato com alguns produtos triazenos, diferentes do abordado neste trabalho.

GARZON et al. (L. R. Garzon; M. S. Nunes; R. Martini; R. F. Rampelotto; R. Hörner; A. Locatelli; M. Hörner, 2015) aborda a citotoxicidade de compostos da mesma classe, quando em contato com células leucêmicas, demonstrando resultados efetivos contra as mesmas, pela redução do percentual de viabilidade das células com alterações fenotípicas.

O estudo de irritabilidade demonstrou que o **STZC 2** é um agente Irritante Severo, indicando a necessidade de maiores cuidados na manipulação desses produtos.

3.3.5 Citotoxicidade sobre macrófagos

Os resultados de toxicidade celular obtidos mostraram que os triazenos se apresentaram tóxicas à cultura de células, sendo essas diferentes estatisticamente ao controle negativo. Em 24 horas de tratamento o composto 1,3-bis(2-metoxi-4-nitrofenil)triazeno (STZC 1) apresentou uma toxicidade de 100% na concentração de 47 µg/mL e o composto 1,3-bis(2-metoxi-5-nitrofenil)triazeno (STZC 2) apresentou toxicidade de 82,47% na concentração de 9 µg/mL, conforme a Figura 8.

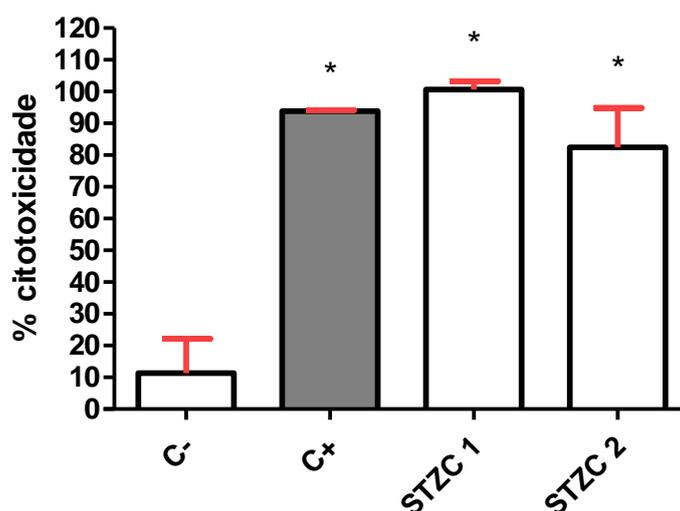


Figura 8 - Toxicidade dos compostos STZC 1 e STZC 2 em macrófagos humanos. A avaliação da citotoxicidade foi avaliada por incubação com MTT (5mg/mL), por 3 horas, á 37°C com estabilização colorimétrico com SDS (10%) overnight com posterior leitura da absorbância a 540 nm. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão do percentual de citotoxicidade para quatro indivíduos em triplicata; * $p < 0,05$, para o teste de Mann-Whitney, comparado ao controle negativo.

No teste de citotoxicidade com MTT após a exposição com os triazenos, de acordo com o Teste *One-Way ANOVA* houve aumento significativo de toxicidade para todas as concentrações e C+ em relação ao controle negativo, o que sugere que não há diferença entre o uso de qualquer um dos triazenos.

4 Conclusões

Os compostos **STZC 1** e **STZC 2** apresentam potencial para ser utilizado como agente antimicrobiano, por apresentarem baixa toxicidade e atividades frente à resistência das cepas bacterianas selecionadas.

O estudo de irritabilidade demonstrou que o **STZC 2** é um agente Irritante Severo, indicando a necessidade de maiores cuidados na manipulação desses produtos.

Agradecimentos

Este trabalho foi apoiado pela Universidade de Ceuma - UNICEUMA; Fundação de Pesquisa e Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão - FAPEMA (Processo UNIVERSAL-00503/15).

Referências Bibliográficas

Alves, E. N. (2003) *Red blood cell (RBC)-Teste de hemólise: uma alternativa ao teste de Draize-irritação ocular na avaliação do poder tóxico de produtos cosméticos no controle de qualidade.*

ANVISA BRASIL (2003) *Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos, Agência Nacional de Vigilância Sanitária.*

Cappoen, D. *et al.* (2014) ‘Anti-mycobacterial activity of 1,3-diaryltriazenes’, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 77, pp. 193–203. doi: 10.1016/j.ejmech.2014.02.065.

CLSI Supplement., T.-T. I. (2013) *Clinical and Laboratory Standards Institute, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing.* Available at: file:///C:/Users/mallam/Downloads/CLSIM100-24-2014.pdf.

Deurenberg, R. H. and Stobberingh, E. E. (2008) ‘The evolution of Staphylococcus aureus’, *Infection, Genetics and Evolution*, pp. 747–763. doi: 10.1016/j.meegid.2008.07.007.

Dutta Gupta, S. *et al.* (2016) ‘Eco-sustainable synthesis and biological evaluation of 2-phenyl 1,3-benzodioxole derivatives as anticancer, DNA binding and antibacterial agents’, *Arabian Journal of Chemistry*. King Saud University, 9, pp. S1875–S1883. doi: 10.1016/j.arabjc.2014.08.004.

GLADKOVA, V. F.; KONDRASHEV, Y. D. (1972) ‘CATENATED NITROGEN LIGANDS’, *Kristallografiya*, 17(33).

Guimarães, D. O., Da Silva Momesso, L. and Pupo, M. T. (2010) ‘Antibióticos: Importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes’, *Química Nova*, pp. 667–679. doi: 10.1590/S0100-40422010000300035.

KOEHLER, E. G. (2007) *Avaliação de arranjos supramoleculares de complexos triazenidos de Mercúrio(II) e Cobre(II).* Universidade Federal de Santa Maria - UFSM.

L. R. Garzon; M. S. Nunes; R. Martini; R. F. Rampelotto; R. Hörner; A. Locatelli; M. Hörner (2015) 'Triazenidos complexes of platinum (II): In vitro evaluation of antibacterial and cytotoxic activity against bacteria and bone marrow cells from leukemic patients in a university hospital', *Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences*, 36(2), pp. 285–291.

Ling, L. L. *et al.* (2015) 'A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance', *Nature*, 517(7535), pp. 455–459. doi: 10.1038/nature14098.

Lourenço, F. R. (2009) *Doseamento Microbiológico de Apramicina - desenvolvimento e validação de métodos empregando leitura cinética em micropilacas*. Universidade de São Paulo - USP.

M. Hörner, V. F. Giglio, A. J. R. W. A. dos Santos, A. B. Westphalen, B. A. Iglesias, P. R. Martins, C. H. do Amaral, T. M. Michelot, L. G. B. Reetz, C. de M. Bertonchel, R. H. (2008) 'Triazenos e atividade antibacteriana', *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 44(3), pp. 441–449. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-93322008000300014>.

Marchesi, F. *et al.* (2007) 'Triazene compounds: Mechanism of action and related DNA repair systems', *Pharmacological Research*, pp. 275–287. doi: 10.1016/j.phrs.2007.08.003.

Moore, D. S. and Robinson, S. D. (1986) 'Catenated nitrogen ligands part I. Transition metal derivatives of triazenes, tetrazenes, tetrazadienes, and pentazadienes', *Advances in Inorganic Chemistry*, 30(C), pp. 1–68. doi: 10.1016/S0898-8838(08)60239-1.

Moore, D. S. and Robinson, S. D. (1988) 'Catenated nitrogen ligands part II. transition metal derivatives of triazoles, tetrazoles, pentazoles, and hexazine', *Advances in Inorganic Chemistry*, 32(C), pp. 171–239. doi: 10.1016/S0898-8838(08)60232-9.

Ombaka A. O., Muguna, A. T. and Gichumbi, J. M. (2012) 'Antibacterial and antifungal activities of novel hydroxytriazenes', *Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology*, 4(7), pp. 133–136. doi: <https://doi.org/10.5897/JECE12.006>.

Paraginski, G. L. *et al.* (2014) 'IN VITRO ANTIBACTERIAL ACTIVITY AND TOXICITY TOWARD *Artemia salina* Leach. OF SOME TRIAZENE COMPOUNDS', *Química Nova*, 37(7), pp. 1138–1144. doi: 10.5935/0100-4042.20140180.

R. F. Rampelotto, V. V. Lorenzoni, G. A. de Moraes, M. Tizotti, M. Horner, R. H. (2016) 'Triazeno, complexo triazenido de paládio e seus precursores: atividade antibacteriana in vitro', *Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão*, 8(4).

Simonetti, E. *et al.* (2016) 'Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de *Eugenia anomala* e *Psidium salutare* (Myrtaceae) frente à *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*', *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 18(1), pp. 9–18. doi: 10.1590/1983-084X/15_005.

Vajs, J. *et al.* (2017) 'Diaryltriazenes as antibacterial agents against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and *Mycobacterium smegmatis*', *European Journal of Medicinal Chemistry*, 127, pp.

223–234. doi: 10.1016/j.ejmech.2016.12.060.

VERNIN, G.; SIV, C.; METZGER, J. . (1977) ‘Synthesis of 1,3-Diaryltriazenes and their Derivatives by Aprotic Decomposition of Arylamines’, *Synthesis*, 10, pp. 691–693. doi: 10.1055/s-1977-24536.

Keywords: *Word1. Word2. Word3.*

1 Introdução

Nonononononon nonononon nonononononononono,
nonononn,nononono,nnnn,nonono nononononononon ononono n onononono nono
no nonon ononon nononono onnonoononoononono nonoon nono non non onon
nono non

ononono n onononono nono no nonon ononon nononono
onnonoononoononono nonoon nono non non onon nono ononono n onononono
nono no nonon ononon nononono onnonoononoononono nonoon nono non non
onon nono ononono n onononono nono

1.1. Exemplo de subseção

Nononono n onononono nono no nonon ononon nononono onnonoononoononono
nonoon nono non non onon nono ononono n onononono nono no nonon ononon
nononono onnonoononoononono nonoon nono non non onon nono ononono n
onononono nono

1.1.1 Exemplo de subsubseção

Nononono n onononono nono no nonon ononon nononono onnonoononoononono
nonoon nono non non onon nono ononono n onononono nono no nonon ononon
nononono onnonoononoononono nonoon nono non non onon nono ononono n
onononono nono. Nononono n onononono nono no nonon ononon nononono
onnonoononoononono nonoon nono non non onon nono ononono n onononono
nono no nonon ononon nononono onnonoononoononono nonoon nono non non
onon nono ononono n onononono nono

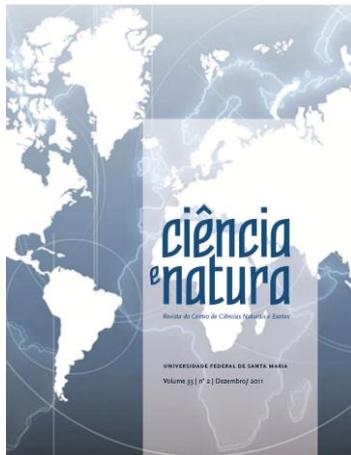
2 Como incluir Figuras

As figuras devem estar preferencialmente no formato Pdf ou Tiff. Você pode incluir figuras em seu trabalho. Por exemplo, veja a Figura 1.

Você também pode incluir e referenciar subfiguras, conforme Figura 2 como Figura 2(a) e Figura 2 (b).



Figura 1 – Exemplo de figura



(a)



(b)

Figura 2 – Exemplo de figura com duas imagens, figura 2(a) e figura 2 (b)

Nonononononon nonononon nonononononononono,
nonononn,nononono,nnnn,nonono nonononononononon ononono n onononono nono
no nonon ononon nononono onnonoonononoononono nonoon nono non non onon
nono non

ononono n onononono nono no nonon ononon nononono
onnonoonononoononono nonoon nono non non onon nono o nonon ononon nononono
onnonoonononoononono nonoon nono non non onon nono ononono n onononono
nono

Nonononononon nonononon nonononononononono,
 nonononn,nononono,nnnn,nonono nonononononononon ononono n onononono nono
 no nonon ononon nononono onnonoonononoononono nonoon nono non non onon
 nono non
 ononono n onononono nono no nonon ononon nononono
 onnonoonononoononono nonoon nono non non onon nono o nonon ononon nononono
 onnonoonononoononono nonoon nono non non onon nono ononono n onononono
 nono

3 Exemplos de tabelas e equações

Um exemplo de tabela

Tabela 1 – Example table 1

Name			
Name	Name		
John	Doe	12333	23333
Richard	Miles	12323	48989

Quando as tabelas são grandes coloca-las em mais de uma pagina, mas nunca passando das margens da folha. Um exemplo disso pode ser verificada na Tabela 2.

Tabela 2 – Tabela grande

	Latitude (°)	Longitude (°)	Latitude (°)	Longitude (°)
P ₁	25°25'25,000000"	-25°25'25,000000"	25°25'25,000000"	-25°25'25,000000"
P ₂	-25°25'25,000000"	120°25'25,000000"	-25°25'25,000000"	120°25'25,000000"
P ₃	00°00'0,003240"	89°59'59,996760"	00°00'0,003240"	89°59'59,996760"
P ₄	00°00'0,003240"	179°59'59,996760"	00°00'0,003240"	179°59'59,996760"
P ₅	89°59'59,995442"	45°00'00,000000"	89°59'59,995442"	45°00'00,000000"
P ₆	-89°59'59,995442"	-135°00'00,000000"	-89°59'59,995442"	-135°00'00,000000"
P ₇	89°59'59,995442"	45°00'00,000000"	89°59'59,995442"	45°00'00,000000"
P ₈	-89°59'59,995442"	-135°00'00,000000"	-89°59'59,995442"	-135°00'00,000000"
P ₉	89°59'59,995442"	45°00'00,000000"	89°59'59,995442"	45°00'00,000000"
P ₁₀	-89°59'59,995442"	-135°00'00,000000"	-89°59'59,995442"	-135°00'00,000000"
P ₁₁	89°59'59,995442"	45°00'00,000000"	89°59'59,995442"	45°00'00,000000"

Um exemplo de equação numerada pode ser verificado em (1).

$$d(F_2P) = \sqrt{Z_p^2 + (c - Y_p)^2} \quad (1)$$

Somente equações referenciadas no texto devem ser numeradas.

4 Exemplos de citações

Nonoo nono no no no Castro et al. (2001) nono nono nnono. Silva e Andrade (2002) nonononon nonon no n, nonono , nononon nonoo (FANTUCCI, 2001; SILVA; ANDRADE, 2002) nonon nnon ono non n o nono nonono no noo , nnon o, nononono,nononon nono o onononon o onononn. nonon nnon ono non n o nono nonono no noo , nnon o, nononono,nononon nono o onononon o onononn.

nonon nnon ono non n o nono nonono no noo , nnon o, nononono,nononon nono o onononon o onononn.nonon nnon ono non n o nono nonono no noo , nnon o, nononono,nononon nono o onononon o onononn.

nonon nnon ono non n o nono nonono no noo , nnon o, nononono,nononon nono o onononon o onononn. nonon nnon ono non n o nono nonono no noo , nnon o, nononono,nononon nono o onononon o onononn.nonon nnon ono non n o nono nonono no noo , nnon o, nononono,nononon nono o onononon o onononn.

nonon nnon ono non n o nono nonono no noo , nnon o, nononono,nononon nono o onononon o onononn.

Nonono, nonono,nononoonoononn nono no on nonono nonon o nono nono no nonon ono nonono, nonono,nononoonoononn nono no on nonono nonon o nono nono no nonon ono non ono nnon nn on o non onono non o onnon nono no , n o n on on onon ono non nonono nono nono nonon on non no nonono, nonono,nononoonoononn nono no on nonono nonon o nono nono no nonon ono non ono nnon nn on o non onono non o onnon n, no no , n o n on on onon ono non nonono nono nono nonon on non no nononononono nno non ononon . (ANDRADE, 2002, p.10)

5 Conclusões

Inclua suas conclusões aqui. nonon nnon ono non n o nono nonono nonon nnon ono non n o nono nonono nonon nnon ono non n o nono nonono nonon nnon ono non n o nono nonono

Agradecimentos

Agradecimentos a revisores, colaboradores e agências de fomento. Estas podem ser colocadas após o artigo ser aprovado para não comprometer a revisão as cegas.

Referências

GERAUD G, SPIERINGS EL, KEYWOOD C. Tolerability and safety of frovatriptan with short- and long-term use for treatment of migraine and in comparison with sumatriptan. Headache. 2002;42 Suppl 2:S93-9.

Artigos em Periódicos

Estrutura:

Título do artigo. Título do periódico. Ano de publicação;Volume(Número):Páginas.

Observações:

- Após o ano de publicação, não usar espaços.
- Usar os títulos abreviados oficiais dos periódicos. Para revistas nacionais que fazem parte da SciELO, essa informação pode ser obtida na página da própria revista, na sessão “sobre nós”. Para abreviatura de periódicos internacionais, consultar o “Index Medicus - abbreviations of journal titles” (<http://www2.bg.am.poznan.pl/czasopisma/medicus.php?lang=eng>).
- Ao listar artigos com mais de seis (06) autores, usar a expressão et al após o sexto autor.
- **Artigo Padrão**
VU RL, HELMESTE D, AL, REIST C. Rapid determination of venlafaxine and Odesmethylvenlafaxine in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. J. Chromatogr. B. 1997;703(1-2):195–201.
- **Volume com suplemento**
GERAUD G, SPIERINGS EL, KEYWOOD C. Tolerability and safety of frovatriptan with short- and long-term use for treatment of migraine and in comparison with sumatriptan. Headache. 2002;42 Suppl 2:S93-9.
- **Número com suplemento**
GLAUSER TA. Integrating clinical trial data into clinical practice. Neurology. 2002;58(12 Suppl 7):S6-12.
- **Número sem volume**
BANIT DM, KAUFER H, HARTFORD JM. Intraoperative frozen section analysis in revision total joint arthroplasty. Clin Orthop. 2002;(401):230-8.
- **Sem volume ou número**
Outreach: bringing HIV-positive individuals into care. HRSA Careaction. 2002:1-6
- **Artigo em uma língua diferente do português, inglês e espanhol**
HIRAYAMA T, KOBAYASHI T, FUJITA T, FUJINO O. [A case of severe mental retardation with blepharophimosis, ptosis, microphthalmia, microcephalus, hypogonadism and short stature-the difference from Ohdo blepharophimosis syndrome]. No To Hattatsu. 2004;36(3):253-7. Japanese.
- **Artigo sem dados do autor**
21st century heart solution may have a sting in the tail. BMJ. 2002;325(7357):184.
- **Artigo em periódico eletrônico**

SANTANA RF, SANTOS I. Transcender com a natureza: a espiritualidade para os idosos. Rev. Eletr. Enf. [Internet]. 2005 [cited 2006 jan 12];7(2):148-58. Available from: http://www.fen.ufg.br/revista/revista7_2/original_02.htm.

• **Artigo aceito para publicação, disponível online:**

SANTANA FR, NAKATANI AYK, FREITAS RAMM, SOUZA ACS, BACHION MM. Integralidade do cuidado: concepções e práticas de docentes de graduação em enfermagem do estado de Goiás. Ciênc. saúde coletiva [internet]. Forthcoming. [cited 2009 mar 09]. Author's manuscript available at: http://www.abrasco.org.br/cienciaesaudecoletiva/artigos/artigo_int.php?id_artigo=2494.

Livros

• **Com único autor**

DEMO P. Auto-ajuda: uma sociologia da ingenuidade como condição humana. 1st ed. Petrópolis: Vozes; 2005.

• **Organizador, editor, compilador como autor**

BRIGTH MA, editor. Holistic nursing and healing. Philadelphia: FA Davis Company; 2002.

• **Capítulo de livro**

MEDEIROS M, MUNARI DB, BEZERRA ALQ, ALVES MA. Pesquisa qualitativa em saúde: implicações éticas. In: Ghilhem D, Zicker F, editors. Ética na pesquisa em saúde: avanços e desafios. Brasília: Letras Livres UnB; 2007. p. 99-118.

• **Instituição como autor**

SECRETARIA EXECUTIVA, Ministério da Saúde. Sistema Único de Saúde (SUS): princípios e conquista. Brasília (Brasil): Ministério da Saúde, 2000. 44 p.

• **Livro com tradutor**

STEIN E. Anorectal and colon diseases: textbook and color atlas of proctology. 1st Engl. ed. Burgdorf WH, translator. Berlin: Springer; c2003. 522 p.

• **Livro disponível na Internet**

SECRETARIA DE CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INSUMOS ESTRATÉGICOS; Ministério da Saúde. Por que pesquisa em saúde? Série B. Textos Básicos de Saúde. Série Pesquisa para Saúde: Textos para Tomada de Decisão [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde; 2007 [cited 2009 Mar 09]. Available from: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/pq_pesquisa_em_saude.pdf.

Monografia, Dissertação e Tese

• **Monografia**

TONON FL, SILVA JMC. O processo de enfermagem e a teoria do autocuidado de Orem no atendimento ao paciente submetido à cirurgia de próstata: implementação de um plano de cuidados individualizado no preparo para a alta hospitalar [monography]. São Carlos: Departamento de Enfermagem/UFSCar; 2005.

• **Dissertação**

COELHO MA. Planejamento e execução de atividades de enfermagem em hospital de rede pública de assistência, em Goiânia/GO [dissertation]. Goiânia: Faculdade de Enfermagem/UFG; 2007. 119 p.

• **Tese**

SOUZA ACS. Risco biológico e biossegurança no cotidiano de enfermeiros e auxiliares de enfermagem [thesis]. Ribeirão Preto: Escola de Enfermagem/USP; 2001. 65 p.

Trabalhos em Eventos Científicos

- **Anais/Proceedings de conferência**

MUNARI DB, MEDEIROS M, BEZERRA ALQ, ROSSO, CFW. The group facilitating interpersonal competence development: a brazilian experience of mental health teaching. In: Proceedings of the 16th International Congress of Group Psychotherapy [CD-ROM]; 2006 jul 17-21; São Paulo, Brasil. p. 135-6.

RICE AS, FARQUHAR-SMITH WP, BRIDGES D, BROOKS JW. Canabinoids and pain. In: Dostorovsky JO, Carr DB, Koltzenburg M, editors. Proceedings of the 10th World Congress on Pain; 2002 Aug 17-22; San Diego, CA. Seattle (WA): IASP Press; c2003. p. 437-68.

- **Anais/Proceedings de conferência disponível na Internet**

CENTA ML, OBERHOFER PR, CHAMMAS J. A comunicação entre a puérpera e o profissional de saúde. In: Anais do 8º Simpósio Brasileiro de Comunicação em Enfermagem [Internet]; 2002 Maio 02-03; São Paulo, Brasil. 2002 [cited 2008 dec 31]. Available from: <http://www.proceedings.scielo.br/pdf/sibracen/n8v1/v1a060.pdf>.

- **Trabalho apresentado em evento científico**

ROBAZZI MLCC, CARVALHO EC, MARZIALE MHP. Nursing care and attention for children victims of occupational accident. Conference and Exhibition Guide of the 3rd International Conference of the Global Network of WHO Collaborating Centers for Nursing & Midwifery; 2000 July 25-28; Manchester; UK. Geneva: WHO; 2000.

Outras Publicações

- **Jornais**

SOUZA H, PEREIRA JLP. O orçamento da criança. Folha de São Paulo. 1995 maio 02; Opinião: 1º Caderno.

- **Artigo de jornal na internet**

DEUS J. Pacto visa o fortalecimento do SUS em todo estado de Mato Grosso. Diário de Cuiabá [Internet]. 2006 Apr 25 [cited 2009 feb 16]. Saúde. Available from: <http://www.diariodecuiaba.com.br/detalhe.php?cod=251738>.

- **Leis/portarias/resoluções**

MINISTÉRIO DA SAÚDE; Conselho Nacional de Saúde. Resolução N° 196/96 – Normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo seres humanos. Brasília (Brasil): Ministério da Saúde; 1996. Conselho Federal de Enfermagem. Resolução COFEN-311/2007. Aprova a Reformulação do Código de Ética dos Profissionais de Enfermagem. Rio de Janeiro (Brasil): COFEN; 2007.

- **Base de dados online**

SHAH PS, ALIWALAS LI, SHAH V. Breastfeeding or breast milk for procedural pain in neonates. 2006 Jul 19 [cited 2009 mar 02]. In: The Cochrane Database of Systematic Reviews [Internet]. Hoboken (NJ): John Wiley & Sons, Ltd. c1999 – . Available from: <http://www.mrw.interscience.wiley.com/cochrane/clsystrev/articles/CD004950/frame.html> Record No.: CD004950.

- **Texto de uma página da Internet**

CARVALHO G. Pactos do SUS – 2005 – Comentários Preliminares [Internet]. Campinas: Instituto de Direito Sanitário Aplicado; 2005 Nov 15 [cited 2009 mar 11]. Available from: http://www.idisa.org.br/site/artigos/visualiza_conteudo1.php?id=1638

- **Publicação no Diário Oficial da União**

LEI N. 8.842 DE 4 DE JANEIRO DE 1994. Dispõe sobre a Política Nacional do Idoso, cria o Conselho Nacional do Idoso e dá outras providências. Diário Oficial da União (Brasília). 1994 Jan 05.

- **Homepage da Internet**

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA [Internet]. Brasília: Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão (BR) [cited 2009 feb 27]. Pesquisa Nacional por Amostra de

Domicílios. Síntese de Indicadores 2005. Available from:

<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/trabalhoerendimento/pnad2005/default.shtm>
DATASUS [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde (BR) [cited 2006 oct 20]. Departamento de Informática do SUS – DATASUS. Available from: <http://w3.datasus.gov.br/datasus/datasus.php>.

Para mais informações sobre as referências consulte International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Sample References: (http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html), ou ainda, consulte o site Citing Medicine (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=citmed.TOC&depth=2>).