



UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI - URCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOPROSPECÇÃO MOLECULAR
MESTRADO ACADÊMICO EM BIOPROSPECÇÃO MOLECULAR

GILLENA MARIA MACÊDO SAMPAIO

**Atividade antimicrobiana e espectroscopia vibracional de
5-[(4*H*-1,2,4-triazol-4-ilamino)metileno]-2,2-dimetil-1,3-dioxano-4,6-diona
monohidratada**

CRATO – CE,
2012.

GILLENAMARIA MACÊDO SAMPAIO

**Atividade antimicrobiana e espectroscopia vibracional de
5-[(4*H*-1,2,4-triazol-4-ilamino)metileno]-2,2-dimetil-1,3-dioxano-4,6-diona
monohidratada**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri – URCA, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioprospecção Molecular.

Orientador:

Prof. Dr. Alexandre Magno Rodrigues Teixeira

Co-orientador:

Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho

CRATO – CE,
2012.

Sampaio, Gillena Maria Macêdo.
S192a Atividade antimicrobiana e espectroscopia vibracional de 5-[(4H-1,2,4-triazol-4-ilamino)metileno]-2,2-dimetil-1,3-dioxano-4,6-diona monohidratada / Gillena Maria Macêdo Sampaio. - Crato-CE, 2012.
90p.

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-graduação Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri – URCA
Orientador: Prof. Dr. Alexandre Magno Rodrigues Teixeira
Co-orientador: Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho

1. Resistência microbiana; 2. Heterociclos; 3. Espectroscopia; 4. Computacional; 5. Atividade antimicrobiana.; I. Título.

CDD: 581

GILLENAMARIA MACÊDO SAMPAIO

**Atividade antimicrobiana e espectroscopia vibracional de
5-[(4*H*-1,2,4-triazol-4-ilamino)metileno]-2,2-dimetil-1,3-dioxano-4,6-diona
monohidratada**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri – URCA, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioprospecção Molecular. Área de concentração: Bioprospecção de Produtos Naturais.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Alexandre Magno Rodrigues Teixeira – Orientador
Universidade Regional do Cariri – URCA

Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho – Co-orientador
Universidade Regional do Cariri – URCA

Prof. Dr. Diniz Maciel de Sena Junior – Avaliador Interno
Universidade Regional do Cariri – URCA

Prof. Dr. José Galberto Martins da Costa – Avaliador Interno
Universidade Regional do Cariri – URCA

Prof. Dr. Paulo de Tarso Cavalcante Freire – Avaliador Externo
Universidade Federal do Ceará – UFC

CRATO – CE,
2012.

Dedico a meus pais, José Gilmar Sampaio e M^a Helena Macêdo Sampaio,
aos meus irmãos, José Gilmar Sampaio Filho e João Alfredo Macêdo Sampaio,
por acreditarem em mim e SEMPRE apoiarem meus sonhos.
Dedico também, a meu esposo Davi Coelho de Sá e ao nosso futuro filho(a)
por todo amor, paciência e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar permanentemente comigo, guiando meu caminho e transmitindo-me paz, confiança, sabedoria e tranquilidade.

Aos meus pais: José Gilmar Sampaio e Maria Helena Macêdo Sampaio, pelo amor incondicional, presença constante, apoio e por acreditarem nos meus sonhos. Obrigada por serem meus melhores amigos e por nunca me deixarem sozinha. Amo vocês!

Aos meus irmãos que tanto amo: José Gilmar Sampaio Filho e João Alfredo Macêdo Sampaio, por serem meus amigos, companheiros, por me encorajarem nas batalhas da vida e por estarem sempre dispostos a me ajudar quando necessário.

Ao meu esposo: Davi Coelho de Sá por todo seu amor, compreensão, paciência e por ser a fonte onde recarrego minhas forças todos os dias. Amo muito você!

A meu futuro filho(a) que está começando a se formar dentro de mim e que já me faz querer ser uma pessoa melhor por me mostrar que o milagre da vida é a presença do amor de Deus em mim e que não posso decepcioná-lo.

A todos os meus familiares, em especial meus avós: Geminiano Bem Sampaio (*in memorian*), Maria Ferreira Sampaio, Francisco Cruz Macêdo (*in memorian*) e meu anjo lá no céu: Joana Macêdo Saraiva (*in memorian*). Obrigada por se orgulharem tanto dos meus estudos e por sempre apoiarem minhas decisões.

Ao meu orientador prof. Dr. Alexandre Magno Rodrigues Teixeira, pela oportunidade de realizarmos este trabalho juntos, por toda sua disponibilidade, incentivo e confiança.

Ao meu co-orientador prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho, pelo compromisso e atenção. Muito obrigada por me mostrar que o trabalho científico é algo especial e prazeroso quando feito com amor e dedicação.

A Jacqueline Andrade, uma amiga que encontrei no mestrado e que levarei pelo resto da vida. Obrigada por seus conselhos, sua mão sempre estendida, seu carinho e seu apoio. Tive a oportunidade de aprender com você que as verdadeiras amizades podem surgir em pouco tempo e serem eternas.

A Fernanda Cordeiro, Leane Lima, Eliane Jucielly, Danielle Dayse, Gertrudes Nunes e Amaísa Amorim, amigas tão importantes. Obrigada por estarem sempre a meu

lado e por compartilharem comigo tantos momentos da minha vida, os bons e os ruins. Amo vocês!

A minha turma do mestrado: Anita Oliveira, Diógenes de Queiroz, Jacqueline Andrade, Leonardo Landim, Luiz Jardelino Natallyanea Bezerra, Emília Naiana, Olga Paiva, Patrícia Figueiredo, Renata Sampaio, Renata Lima e Thiago Almeida. Obrigada por terem feito esta caminhada feliz.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular em especial aos Drs.(a) Galberto Martins, Henrique Douglas Coutinho, Diniz Maciel, Marta Kerntopf, Sirleis Lacerda, Imeuda Peixoto, Roseli Barbosa, Waltécio Almeida e Irwin Alencar. Obrigada pelos ensinamentos, incentivo e dedicação.

As Secretárias Anderciele Rolim e Lenira Pereira pela disponibilidade e auxílios no decorrer do curso.

Ao prof. Dr. Luiz Everson da Silva da Universidade Federal do Paraná, Setor Litoral- Matinhos-PR pela concessão das amostras utilizadas nesta dissertação.

Aos membros do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LMBM), Flaviana, Audilene, Gláucia, Saulo, Jacqueline e Elba pelo acolhimento, ótima convivência e pelos momentos de descontração.

A Jacielly Cassiano, do Laboratório de Bioinformática e Química Computacional da Universidade Regional do Cariri, pelos desenhos das estruturas químicas presentes neste trabalho.

Ao prof. Dr. Carlos Emídio Sampaio Nogueira do Departamento de Física da Universidade Regional do Cariri pelo apoio no desenvolvimento do trabalho.

A Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ pela concessão das linhagens de bactérias padrão.

Ao Hospital Universitário da Universidade Federal da Paraíba – UFPB, pela concessão das linhagens de bactérias multirresistentes.

Ao Departamento de Física da Universidade Federal do Ceará – UFC, pela concessão do uso dos equipamentos para realização das medidas de espectroscopia infravermelho e espalhamento Raman.

**“Entrega o teu caminho ao Senhor; confia Nele, e Ele tudo fará”
Salmo 37:5.**

RESUMO

Os fármacos de origem sintética representam significativa parcela do mercado farmacêutico. A importância dos compostos heterocíclicos é incontestável, particularmente no que se refere ao fato de apresentarem inúmeros usos como medicamentos. No presente trabalho investigou-se a atividade antimicrobiana de 5-[(4*H*-1,2,4-triazol-4-ilamino)metileno]-2,2-dimetil-1,3-dioxano-4,6-diona ($C_9H_{10}N_4O_4$) e as propriedades estruturais e vibracionais do cristal 5-[(4*H*-1,2,4-triazol-4-ilamino)metileno]-2,2-dimetil-1,3-dioxano-4,6-diona monohidratada ($C_9H_{10}N_4O_4 \cdot H_2O$) utilizando as técnicas de espectroscopias Raman e infravermelho e cálculos computacionais de primeiros princípios. Estudos anteriores indicam que o grupo 1,2,4-triazol, presente no composto orgânico estudado, está associado com ação anti-inflamatória, antiviral, analgésica, antimicrobiana e antidepressiva. Os métodos experimentais em espectroscopia oferecem contribuições notáveis para o estado da arte da física atômica e molecular, da química e da biologia molecular. Muito do nosso atual conhecimento acerca da estrutura da matéria é baseado em investigações espectroscópicas. Neste aspecto, tem-se como objetivo realizar medidas de espectroscopia; já que a mesma desempenha papel importante oferecendo possibilidades de identificação, análise e caracterização de substâncias que possam ser empregadas nas indústrias de alimentos, fármacos ou cosméticos. A espectroscopia de espalhamento Raman e a espectroscopia no infravermelho são as duas técnicas de caracterização utilizadas no desenvolvimento desta pesquisa. Após realização das mesmas utilizou-se a simulação computacional para auxiliar na análise dos modos normais de vibrações do material orgânico estudado experimentalmente. Paralelamente à realização das medidas de caracterização ótica fez-se estudos *in-vitro* para identificação de atividade antimicrobiana; bem como seu efeito modulador da atividade antibacteriana e antifúngica junto a alguns aminoglicosídeos e antifúngicos. Para isso utilizou-se o método de microdiluição em caldo.

Palavras-chave: Resistência microbiana, heterociclos, espectroscopia, simulação computacional, atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

The drugs of synthetic origin represent significant portion of the pharmaceutical market. The importance of heterocyclic compounds is indisputable, particularly with regard to their many uses as medicaments. In the present study the antibacterial activity of 5 - [(4H-1,2,4-triazol-4-ylamino) methylene] -2,2-dimethyl-1,3-dioxane-4 ,6-dione ($C_9H_{10}N_4O_4$) was investigated and the structural and vibrational properties of crystal 5 - [(4H-1,2,4-triazol-4-ylamino) methylene] -2,2-dimethyl-1,3-dioxane-4 ,6-dione monohydrate ($C_9H_{10}N_4O_4.H_2O$) was studied using the techniques of Raman and infrared spectroscopy and computational calculations from first principles. Studies indicate that the 1,2,4-triazole group, present in the studied organic compound $C_9H_{10}N_4O_4$ is associated with anti-inflammatory, antiviral, analgesic, antimicrobial and anti-depressant. The experimental methods in spectroscopy offer notable contributions to the state of the art of atomic and molecular physics, chemistry and molecular biology. Much of our current knowledge about the structure of matter is based on spectroscopic investigations. In this aspect, it has as objective spectroscopy measurements, since it plays an important role offering possibilities for identification, analysis and characterization of substances that can be used in food, drugs or cosmetics. Raman spectroscopy and infrared spectroscopy are the two characterization techniques used in the development of this research. After experimental measurements by Raman and infrared spectroscopy techniques, a computational simulation was used to assist in analysis of normal modes of vibration of the organic material experimentally studied. Parallel to the implementation of the optical characterization measurements, *in-vitro* studies were performed to identify antimicrobial activity, as well as its modulatory effect of antibacterial and antifungal activity together with some aminoglycosides and antifungal agents, using the broth microdilution method.

Keywords: microbial resistance; heterocycles; spectroscopy; computational calculations; antibacterial activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química do salvarsan	25
Figura 2: Diferentes formas de vibrações moleculares. (Fonte: PAVIA <i>et al.</i> , 2010)	37
Figura 3: Interferômetro de Michelson. (Fonte: WARTEWIG <i>et al.</i> , 2005)	39
Figura 4: Reflectância Total Atenuada. (Fonte: WARTEWIG <i>et al.</i> , 2005)	39
Figura 5: Mecanismos de interação da Luz. (Fonte: RICCI, 2008)	41
Figura 6: Mecanismo de espalhamento Rayleigh e Raman. (Fonte: RICCI, 2008)	43
Figura 7: Heterociclos nitrogenados farmacologicamente ativos.	49
Figura 8: Estrutura química do pirrol.	50
Figura 9: Estruturas químicas: (1) pirazol; (2) imidazol; (3) 1,2,3-triazol; (4) 1,2,4-triazol; (5) tetrazol e (6) pentazol.	50
Figura 10: Estrutura química do 1,2,4-triazol.	51
Figura 11: Equilíbrio tautomérico em 1,2,4-triazóis.	51
Figura 12: Obtenção do ácido de Meldrum.	52
Figura 13: A síntese da substância $C_9H_{10}N_4O_4$	54
Figura 14: Estrutura molecular da substância $C_9H_{10}N_4O_4 \cdot H_2O$	54
Figura 15: Preparo dos inóculos bacterianos.	57
Figura 16: Microdiluição em caldo <i>Brain Heart Infusion</i> (BHI).	58
Figura 17: Espectrômetro utilizado nas medidas FT-Raman e FT-IR.	60
Figura 18: Estrutura molecular do composto $C_9H_{10}N_4O_4 \cdot H_2O$	68
Figura 19: Estrutura cristalina do composto $C_9H_{10}N_4O_4 \cdot H_2O$	69
Figura 20: Ligações de hidrogênio na estrutura cristalina do composto $C_9H_{10}N_4O_4 \cdot H_2O$ ao longo de um plano cristalino	69
Figura 21: Estrutura molecular de $C_9H_{10}N_4O_4 \cdot H_2O$ otimizada por DFT (azul) e a obtida por difração de Raios X (vermelho).	72
Figura 22: Espectro FT-Raman de amostra policristalina de $C_9H_{10}N_4O_4 \cdot H_2O$	73
Figura 23: Espectro FT-IR de amostra policristalina de $C_9H_{10}N_4O_4 \cdot H_2O$	73
Figura 24: Alguns deslocamentos atômicos correspondentes a alguns modos normais selecionados da molécula $C_9H_{10}N_4O_4 \cdot H_2O$	78

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Drogas e Reagentes	55
Quadro 2: Perfil de Resistência Bacteriana	56
Quadro 3: Frequência calculada (ω_{calc}), frequência escalada (ω_{scal}) pelo fator de escala 0,9495, posições das bandas Raman ($\omega_{\text{FT-Raman}}$) e IR ($\omega_{\text{FT-IR}}$) em unidades de cm^{-1} e classificação para os modos vibracionais de $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ com PED	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Espectro Eletromagnético	34
Tabela 2: Regiões espectrais do infravermelho	35
Tabela 3: Concentração Inibitória Mínica (CIM) da $C_9H_{10}N_4O_4$, sobre cepas microbianas.	64
Tabela 4: Valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM $\mu\text{g/mL}$) de aminoglicosídeos na presença e ausência da amostra em concentrações subinibitórias (CIM/8) sobre cepas resistentes.	65
Tabela 5: Valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM $\mu\text{g/mL}$) dos antifúngicos na presença e ausência da $C_9H_{10}N_4O_4$ em concentrações subinibitórias (CIM/8) sobre cepas originárias da ATCC.....	66
Tabela 6: Parâmetros geométricos experimentais e calculados do composto $C_9H_{10}N_4O_4 \cdot H_2O$	70

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ω_{calc} – Posições do número de onda calculado

$\omega_{\text{FT-Raman}}$ – Posições das bandas Raman

ω_{IR} – Posições das bandas infravermelho

ω_{scal} – Posições do número de onda escalado

Å – Angstrom

ATCC – *American Type Culture Collection*

ATR – *Attenuated total reflectance* (Reflectância Total Atenuada)

BHI – *Brain heart infusion*

Calc. – Calculado

CGAR – Cromatografia Gasosa de Alta Resolução

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CIM/8 – Concentração subinibitória

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DFT – Teoria do Funcional da Densidade

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA - *Deoxyribonucleic acid* (Ácido desoxiribonucléico)

EM – Espectrometria de Massas

Exp. – Experimental

FT-IR – Infravermelho com transformada de Fourier

FT-Raman – Espalhamento Raman com transformada de Fourier

HIA – *Heart infusion Agar*

HOMO - *Highest Occupied Molecular Orbital*

IR – *Infrared* (Infravermelho)

ITU – Infecções do trato urinário

IUPAC - *International Union of Pure and Applied Chemistry*

LUMO - *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*

mRNA – Ácido ribonucléico mensageiro

MM – Modelagem molecular

OMS – Organização Mundial de Saúde

PED – Distribuição de energia potencial

pKa – Potencial da constante de acidez

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

RNA – *Ribonucleic acid* (Ácido ribonucleico)

sc – *scissoring*

UV-VIS – Ultravioleta Visível

wag – *wagging* (balanço)

δ - deformação angular

δ_{out} - deformação fora do plano

ν - estiramento

ν_{as} - estiramento assimétrico

ν_{s} - estiramento simétrico

τ – torção

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	19
1. OBJETIVOS.....	22
1.1 OBJETIVO GERAL	22
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
2. REFERENCIAL TEÓRICO	24
2.1 AS DOENÇAS INFECCIOSAS	24
2.2 O SURGIMENTO DOS ANTIBIÓTICOS	24
2.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE PRODUTOS SINTÉTICOS	25
2.4 RESISTÊNCIA MICROBIANA	26
2.5 A BUSCA POR NOVOS FÁRMACOS	27
2.6 ESPECTROSCOPIA MOLECULAR	31
2.6.1 TIPOS DE TRANSIÇÕES MOLECULARES.....	33
2.6.2 O ESPECTRO ELETROMAGNÉTICO	34
2.7 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO (IR)	35
2.7.1 REGIÕES ESPECTRAIS DO INFRAVERMELHO	35
2.7.2 INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR).....	38
2.7.3 REFLECTÂNCIA TOTAL ATENUADA (ATR)	39
2.8 ESPALHAMENTO RAMAN	41
2.8.1 ESPALHAMENTO RAYLEIGH E ESPALHAMENTO RAMAN	42
2.8.2 MECANISMO DE ESPALHAMENTO RAYLEIGH E RAMAN	42
2.8.3 ESPALHAMENTO RAMAN COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-RAMAN)	44
2.9 A MODELAGEM MOLECULAR NO DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS	44
2.9.1 MECÂNICA QUÂNTICA.....	46
2.9.1.1 Cálculos Computacionais	46
2.9.1.2 Teoria do Funcional da Densidade (DFT).....	48
2.10 HETEROCICLOS NITROGENADOS	49

2.10.1 TRIAZÓIS	50
2.11 O ÁCIDO DE MELDRUM	52
3. MATERIAL E MÉTODOS	54
3.1 MATERIAL SINTÉTICO	54
3.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	55
3.2.1 MATERIAL UTILIZADO	55
3.2.2 PREPARO DA SOLUÇÃO INICIAL E DAS SOLUÇÕES DE TESTE.....	55
3.2.3 CEPAS MICROBIANAS	56
3.2.3.1 Perfil de resistência bacteriana	56
3.2.4 MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS	56
3.2.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM).....	57
3.2.5.1 Preparo dos inóculos bacterianos	57
3.2.5.2 Execução e leitura dos ensaios	58
3.2.6 MODULAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	59
3.2.6.1 Execução e leitura dos ensaios	59
3.3 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO E ESPALHAMENTO RAMAN	60
3.4 MÉTODOS COMPUTACIONAIS	61
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
4.1 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	63
4.1.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) – BACTÉRIAS E FUNGOS	63
4.1.2 MODULAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	64
4.1.2.1 Atividade moduladora por contato direto - bactérias	64
4.1.2.2 Atividade moduladora por contato direto - fungos.....	66
4.2 ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL	68
CONCLUSÃO.....	80
REFERÊNCIAS	82

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

O uso indiscriminado de antibióticos tem provocado uma série de problemas, dentre os quais se destacam o desequilíbrio da ecologia humana e a resistência microbiana, fazendo com que se busquem novos antibióticos que sejam eficazes. Essa busca abre caminho para a evolução das pesquisas, pois o desenvolvimento de qualquer novo antimicrobiano vem acompanhado pela resistência dos microrganismos. A emergência de patógenos resistentes é uma ameaça a esses avanços (MOELLERING JR, 2000).

A pesquisa de novos compostos com ação antimicrobiana tem levado a comunidade científica a investigar a corrida medicamento *versus* microrganismos, pois desde o início dos anos 80, o número de antimicrobianos em fase de desenvolvimento diminuiu consideravelmente enquanto que a resistência dos microrganismos aos mesmos tem crescido de forma imensurável, porque eles estão cada vez mais desenvolvendo uma série de novos mecanismos de resistência (FILE JR, 2000).

O estudo da resistência bacteriana, geralmente, é baseado em microrganismos de importância epidemiológica, tais como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e fungos leveduriformes, responsáveis por diferentes processos patológicos tanto em pacientes imunocompetentes quanto em pacientes imunodeprimidos (ANTUNES *et al.*, 2006).

Apesar do crescente desenvolvimento e dos evidentes avanços científico e tecnológico da indústria farmacêutica, existem ainda inúmeras doenças que necessitam de novos fármacos, com melhor perfil terapêutico para seu tratamento. Assim, a busca por novos agentes terapêuticos ainda se faz necessária nos tempos de hoje (AMARAL *et al.*, 2003).

Os métodos experimentais em espectroscopia oferecem contribuições notáveis para o estado da arte da física atômica e molecular, da química e da biologia molecular. Muito do nosso atual conhecimento acerca da estrutura da matéria é baseado em investigações espectroscópicas. Informações sobre a estrutura molecular e sobre a interação de moléculas com seus vizinhos podem ser derivadas de diversos modos a partir dos espectros de emissão e/ou absorção gerados quando a radiação interage com os átomos e/ou moléculas da matéria (ALCÂNTARA JR, 2002).

A interação da radiação eletromagnética com o movimento vibracional dos núcleos origina os espectros vibracionais no infravermelho e no Raman; neste contexto, a

espectroscopia no infravermelho apresenta-se como uma técnica analítica rápida, seletiva, sensível, de simples operação e baixo custo, além de apresentar elevada velocidade analítica, possibilidades de uso em sistemas de controle on-line, e de constituir um método não destrutivo e não poluente. Em virtude destas características, esta técnica pode ser utilizada em rotinas de análises químicas (RIBEIRO, 2012).

Embora possam existir consideráveis similaridades entre os espectros Raman e os espectros no infravermelho, existem suficientes diferenças entre os tipos de grupos que são ativos no infravermelho e ativos no Raman para torná-las técnicas complementares, em vez de competitivas. Recentemente, a espectroscopia Raman tornou-se uma ferramenta de rotina graças ao laser, aos arranjos de detectores e à disponibilidade de instrumentos comerciais a um custo moderado; além de ser uma técnica amplamente utilizada para estudos de sistemas biológicos principalmente por necessitar de amostras pequenas, possuir baixa sensibilidade à água e fornecer detalhamento espectral muito útil na análise de substâncias orgânicas (HOLLER *et al.*, 2009).

A modelagem molecular fornece informações importantes para o processo de descoberta de fármacos. Ela permite a obtenção de propriedades específicas de uma molécula que podem influenciar na interação com o receptor. Outras informações importantes também podem ser obtidas a partir da comparação estrutural entre diferentes moléculas, o que pode permitir a geração de um índice de similaridade que pode ser correlacionado com a atividade farmacológica (RODRIGUES, 2001a).

Entre as diversas estratégias utilizadas para a introdução de novos fármacos na terapêutica, as modificações moleculares mostram-se promissoras. Estas consistem na transformação química de moléculas conhecidas, com o objetivo de aumentar potência e segurança, garantindo assim, um melhor perfil farmacocinético e farmacodinâmico (SANTOS *et al.*, 2007).

Muitos derivados heterocíclicos nitrogenados do ácido Meldrum (2,2-dimetil-1,3-dioxano-4,6-diona) têm sido preparados e bem estudados do ponto de vista sintético e estrutural (CHEN, 1991), contudo, suas propriedades biológicas são pouco exploradas (SILVA, 2006). Portanto, neste trabalho analisou-se um derivado aminometilênico do ácido Meldrum $C_9H_{10}N_4O_4 \cdot H_2O$ - 5-[(4*H*-1,2,4-triazol-4-ilamino)metileno]-2,2-dimetil-1,3-dioxano-4,6-diona monohidratado, contendo em sua estrutura um triazol (1,2,4-triazol), o qual caracteriza-se por possuir um amplo espectro de atividades biológicas; explorando-se, assim, a reatividade química do núcleo heterocíclico com o objetivo de analisar suas propriedades estruturais e vibracionais e avaliar o potencial biológico.

OBJETIVOS

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a atividade antimicrobiana, moduladora da atividade antimicrobiana de 5-[(4*H*-1,2,4-triazol-4-ilamino)metileno]-2,2-dimetil-1,3-dioxano-4,6-diona ($C_9H_{10}N_4O_4$) e investigar as propriedades estruturais e vibracionais na sua forma cristalina 5-[(4*H*-1,2,4-triazol-4-ilamino)metileno]-2,2-dimetil-1,3-dioxano-4,6-diona monohidratada ($C_9H_{10}N_4O_4 \cdot H_2O$) utilizando as técnicas de espectroscopias Raman e infravermelho e cálculos computacionais de primeiros princípios.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o espectro de ação e o grau de inibição de $C_9H_{10}N_4O_4$ determinando a Concentração Inibitória Mínima (CIM) sobre as linhagens bacterianas e fúngicas patogênicas;

Verificar a eficácia de $C_9H_{10}N_4O_4$ na modulação da resistência bacteriana à aminoglicosídeos e modulação da resistência fúngica a antifúngicos;

Realizar medidas de caracterização ótica na amostra policristalina $C_9H_{10}N_4O_4 \cdot H_2O$ por espectroscopia Raman e infravermelho com o propósito de determinar a natureza dos modos vibracionais desta substância orgânica;

Utilizar a simulação computacional para auxiliar na análise dos modos normais de vibrações da amostra policristalina $C_9H_{10}N_4O_4 \cdot H_2O$ observados experimentalmente pelas técnicas de espectroscopias Raman e infravermelho;

Classificar os modos normais de vibração da substância sintética $C_9H_{10}N_4O_4 \cdot H_2O$ com base na distribuição de energia potencial (PED).

REFERENCIAL TEÓRICO

2. REFERENCIAL TEÓRICO

Neste capítulo fornecemos informações importantes que servem de embasamento para a discussão dos resultados obtidos no nosso trabalho.

2.1 AS DOENÇAS INFECCIOSAS

Doenças infecciosas são causadas por microrganismos patogênicos (por exemplo, bactérias, vírus, fungos e parasitas) que invadem as células do hospedeiro para a sua reprodução. Essas doenças representam graves problemas de saúde pública que afetam uma fração significativa da população mundial e, em razão de seu aspecto socioeconômico, representam um dos principais desafios para o século XXI, especialmente nas regiões mais pobres e vulneráveis do planeta. De acordo com a organização Mundial de saúde (OMS), as doenças infecciosas são responsáveis por aproximadamente um terço das causas de mortalidade no mundo. A relação entre essas enfermidades e a baixa renda das populações mais carentes fica evidente ao se constatar que as doenças infecciosas ocupam a primeira posição entre as principais causas de morte e incapacidade permanente nos países em desenvolvimento (WHO, 2008; GUIDO *et al.*, 2010).

2.2 O SURGIMENTO DOS ANTIBIÓTICOS

A descoberta dos antibióticos representa um dos mais importantes marcos da medicina moderna. A introdução das sulfonamidas, em 1930, e da penicilina, na década posterior, provocaram um grande avanço no tratamento de doenças infecciosas, causando uma drástica diminuição nas taxas de mortalidade e uma enorme sensação de bem-estar (ROCHA *et al.*, 2011).

O surgimento dos antibióticos e quimioterápicos permitiu o controle das doenças infecciosas, mudando a evolução natural destas enfermidades de modo marcante e sendo determinante na cura de milhares de pessoas. No entanto, apenas alguns anos após o início do uso clínico da penicilina, o primeiro antibacteriano comercializado, já havia sido registrado o primeiro caso de resistência bacteriana adquirida (MOREIRA, 2004, SILVA *et al.*, 2010).

O sucesso dos primeiros antibióticos na cura de doenças até então consideradas letais acarretou uma intensa busca por novas drogas. De fato, as décadas de 40, 50 e 60 do século passado foram marcadas pela imensa quantidade de antibióticos produzidos e rapidamente incorporados à prática clínica (ROCHA *et al.*, 2011).

No entanto, nas décadas posteriores houve um declínio na produção destes compostos. Entre o lançamento das quinolonas em 1962 até a aprovação das oxazolidinonas em 2000, houve pouca inovação no que se refere à introdução de novas classes de antibióticos de uso clínico bem-sucedido (ROCHA *et al.*, 2011).

2.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE PRODUTOS SINTÉTICOS

Os fármacos de origem sintética representam significativa parcela do mercado farmacêutico, estimado, em 2000, em 390 bilhões de dólares. Até 1991, entre 866 fármacos usados na terapêutica, 680 (79%) eram de origem sintética. Os restantes 186 (21%), correspondiam àqueles de origem natural ou semi-sintética. Quando observamos a estrutura dos fármacos empregados na terapêutica, constata-se que 62% deles são heterocíclicos, ou seja, possuem átomos de elementos distintos do carbono (heteroátomos) envolvidos em ciclos, dentre os quais 95% apresentam-se nitrogenados (MENEGATTI *et al.*, 2001).

Quando consideramos que os fármacos são produtos de um processo sintético de múltiplas etapas, podemos concluir que a pureza do produto final está diretamente relacionada à metodologia sintética empregada e à pureza dos intermediários e matérias-primas envolvidas na síntese (MENEGATTI *et al.*, 2001).

O pesquisador Paul Ehrlich, conhecido como o pai da quimioterapia (uso de substâncias químicas contra infecções) foi responsável pelos conceitos primários de que uma substância química poderia interferir com a proliferação de microrganismos, em concentrações toleráveis pelo hospedeiro. Em 1910, Ehrlich desenvolveu o primeiro antibiótico de origem sintética, salvarsan (Figura 1), usado contra sífilis (GUIMARÃES *et al.*, 2010).

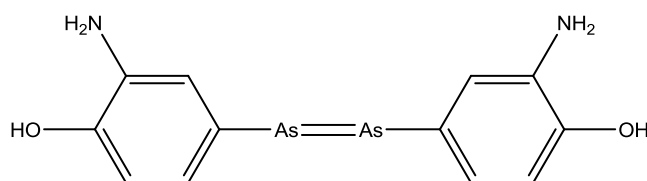


Figura 1: Estrutura química do salvarsan

Em termos da diversidade estrutural de fármacos líderes do mercado mundial, verifica-se a presença de apenas sete elementos químicos distintos (por exemplo: C, H, O, N, S, Cl e F), sendo todos compostos de origem sintética, policíclicos, com unidades carbocíclicas e heterocíclicas (BARREIRO, FRAGA, 2005).

2.4 RESISTÊNCIA MICROBIANA

Atualmente, a resistência bacteriana vem sendo considerada um crescente problema de saúde pública mundial e o maior obstáculo para o sucesso de um tratamento, já que continua a reduzir o número de antibióticos válidos disponíveis (OLIVEIRA *et al.*, 2008; BANGHEZAL *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2010).

A resistência bacteriana é um fenômeno relacionado à formação de cepas não sensíveis aos antibióticos, que são capazes de se multiplicar mesmo na presença de concentrações de antimicrobianos mais elevadas do que as provenientes de doses terapêuticas convencionais e ocorre devido à evolução natural dos microrganismos, além do uso desmedido e irracional destes agentes nas práticas médicas, agrárias e veterinárias (WANNMACHER, 2004; HOEFEL *et al.*, 2006;).

A resistência bacteriana aos agentes antimicrobianos pode ser intrínseca ou adquirida. A resistência intrínseca é uma propriedade natural da célula bacteriana e comumente se manifesta pela diminuição da captação dos agentes ou pela produção de enzimas que inativam o agente químico. A resistência adquirida pode ser obtida pela bactéria por meio de mutações ou por processos de recombinação gênica (RUSSELL, 1998, RUSSELL, 2001).

Apesar de todos os esforços da comunidade científica, a descoberta de novos antibióticos tem atingido sucesso limitado (WANG *et al.*, 2006). Várias medidas tecnológicas são sugeridas para resolver o problema das bactérias multirresistentes, entre elas, a busca por novos medicamentos ou protótipos a fármacos (HAIDA *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2010).

O fenômeno da resistência é, de fato, algo muito preocupante uma vez que existem cepas resistentes a quase todos os agentes conhecidos atualmente e, neste sentido, há uma forte necessidade de se produzir novas substâncias que não só tenham bom espectro de atividade, mas que possuam novos mecanismos de ação (ROCHA *et al.*, 2011).

2.5 A BUSCA POR NOVOS FÁRMACOS

O processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos é complexo, longo e de alto custo, tendo suas raízes profundamente ligadas às inovações científicas e tecnológicas (GUIDO *et al.*, 2008a). Os avanços expressivos da química e biologia, e a melhor compreensão de vias bioquímicas, alvos moleculares e de mecanismos que levam ao aparecimento e desenvolvimento de doenças, tornaram possível a descoberta de inovações terapêuticas notáveis, proporcionando melhorias significativas na qualidade de vida das diversas populações no mundo (GUIDO *et al.*, 2010).

As dificuldades específicas da área de Fármacos e Medicamentos no País têm início, dentre suas possíveis razões históricas, na época em que a nova realidade da indústria farmacêutica chega ao Brasil, contribuindo para a substituição das boticas – onde se dispensavam medicamentos, em grande parte, manipulados – pelas primeiras farmácias comerciais que não mais formulam e passam a vender medicamentos industrializados (BARREIRO, FRAGA, 2005).

O País consolida sua atividade industrial farmacêutica com as empresas multinacionais instalando-se aqui e passando a realizar apenas a quarta etapa da cadeia industrial farmacêutica; transformar o fármaco - princípio ativo do medicamento, ou insumo farmoquímico (desenvolvido fora e importado) - em medicamento, através da implantação da formulação galênica, e o necessário controle de qualidade dos medicamentos acabados, de fármacos e outros insumos necessários à produção farmacêutica (BARREIRO, FRAGA, 2005).

Quando um antibiótico é descoberto e introduzido no mercado, sua utilidade clínica começa a diminuir até um ponto em que há um aumento na restrição de seu uso. Esta restrição é provocada pelo surgimento de cepas resistentes. As bactérias surgiram na terra há bilhões de anos e para sobreviver desenvolveram mecanismos de resistência aos antibióticos que são encontrados livres na natureza (DEMAIN, SANCHEZ, 2009; ROCHA *et al.*, 2011).

Como consequência desta resistência intrínseca ou adquirida, uma guerra que parecia vencida tem se transformado em um grave problema de saúde pública. A rápida evolução da resistência aos antibióticos tem diminuído drasticamente o arsenal de drogas disponíveis. Portanto, uma busca contínua por novos fármacos tem de ser realizada para repor o arsenal que foi perdido, principalmente contra as bactérias Gram-negativas (ROCHA *et al.*, 2011).

O planejamento e o desenho estrutural de novos padrões moleculares de substâncias que possuam propriedades farmacoterapêuticas úteis, capazes de representarem novos compostos-protótipos de fármacos, são tarefas complexas pela multiplicidade de fatores que influenciam a resposta terapêutica de uma substância exógena, por ex. fármaco, que precisa apresentar elevada eficácia, reflexo das propriedades farmacodinâmicas - aquelas que regem as interações responsáveis pelo reconhecimento molecular do fármaco pelo biorreceptor e resultam na resposta terapêutica desejada – e farmacocinéticas - aquelas que governam os fatores de absorção, distribuição, metabolismo e eliminação do fármaco na biofase, resultando no perfil de biodisponibilidade (BARREIRO, FRAGA, 2005).

Uma vez descoberto o novo composto-protótipo, a etapa seguinte na cadeia de inovação em fármacos é sua otimização. Nesta etapa, devem ser identificadas as distintas contribuições farmacofóricas de todas as subunidades estruturais, de maneira a orientar as modificações moleculares a serem introduzidas na estrutura do composto-protótipo ampliando a diversidade estrutural deste padrão molecular (BARREIRO, FRAGA, 2005).

A etapa de otimização do composto-protótipo deve ser realizada simultaneamente àquela da investigação das propriedades de biodisponibilidade do protótipo-eleito, de maneira a instruir sobre a necessidade de se introduzirem novas modificações moleculares em sua estrutura visando otimizar, também, as propriedades farmacocinéticas. Este procedimento antecipa, por sua vez, preciosas informações para a etapa futura de desenvolvimento galênico do composto-protótipo descoberto (BARREIRO, FRAGA, 2005).

Apesar da clara necessidade de desenvolvimento de novas drogas antibacterianas, muitos laboratórios farmacêuticos têm optado por reduzir ou cessar suas atividades de pesquisa e desenvolvimento neste campo de estudo, embora o mercado mundial de fármacos utilizados no combate a doenças infecciosas seja da ordem de 70 bilhões de dólares (DEMAIN, SANCHEZ, 2009; ROCHA *et al.*, 2011).

Outro fator que contribui muito para tornar um antibiótico menos eficiente é a sua utilização indiscriminada e incorreta, o que vem a favorecer o surgimento de microrganismos resistentes. Atualmente, algumas classes de microrganismos representam extrema preocupação para a saúde pública. Dentre os que mais provocam mortes no mundo estão o *S. aureus*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *P. aeruginosa*, que são bactérias resistentes a múltiplas drogas. Os processos infecciosos causados por estas

classes de microrganismos geralmente estão associados com alta letalidade e altos custos de tratamento (ROCHA *et al.*, 2011).

S. aureus é um problema emergente e traz grandes preocupações tanto aos hospitais como às comunidades. Embora 37,2% das pessoas carreguem normalmente esses cocos Gram-positivos em sua mucosa nasal, as infecções causadas por *S. aureus* podem resultar em pequenas complicações, como doenças de pele até em infecções mais graves, como osteomielites, endocardites e pneumonia (MATOUSKOVA, JANOUT, 2008, CASTRO *et al.*, 2009).

Devido à má utilização dos antimicrobianos disponíveis no mercado e a alta capacidade adaptativa dos *S. aureus*, houve uma seleção de resistência destes microorganismos a diversos antimicrobianos. Atualmente, amostras de *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA) são reconhecidamente um dos principais problemas de infecção hospitalar, também com relatos de infecções em animais (DIAS, 2010).

E. coli é responsável, na maioria dos casos pelas infecções do trato urinário (ITU). São provenientes da flora intestinal e caracterizam quadros clínicos não complicados até aos mais complicados como uma pielonefrite crônica. É o principal microrganismo Gram-negativo, anaeróbio facultativo que faz parte da microbiota normal (NATARO; KAPER, 1998; TRABULSI *et al.*, 2002), este microrganismo tem uma tendência de se modificar de organismo comensal para um patógeno oportunista e para uma bactéria extremamente especializada (HART, WINSTANLEY, 2001). Essas habilidades se constituem numa delicada linha que delimita um patógeno em relação a um saprófita e estabelece quais mecanismos são utilizados por bactérias para desorganizar células humanas (SOUZA, 2006).

P. aeruginosa caracteriza-se por ser uma bactéria Gram-negativa ubíqua ambiental que é capaz de infectar uma grande variedade de plantas e animais hospedeiros (RAHME *et al.*, 1995, BRITIGAN *et al.*, 1997 MANHONG *et al.*, 2005). Sua presença na água do solo contribui para que chegue aos vegetais e até ao intestino humano. Por ter predileção por locais úmidos, é encontrada com maior facilidade em áreas do corpo humano como orofaringe, axilas, períneo e mucosa nasal, sendo o trato gastrointestinal sua principal área de colonização (FERREIRA, 2010).

É a principal causa de infecções hospitalares entre os bacilos Gram-negativos não-fermentadores de glicose. No ambiente hospitalar, as fontes de maior contaminação são os aparelhos de respiração, sistemas de hemodiálise, pias e artefatos de limpeza. A taxa de colonização por *P. aeruginosa* na mucosa e pele de pacientes hospitalizados em

uso de antibióticos de amplo espectro, tratamento quimioterápico ou que utilizam mecanismo artificial de respiração pode exceder 50% (POLLACK, 2003). As infecções adquiridas em hospitais são marcadas por uma forte característica: a multirresistência.(FERREIRA, 2010).

Espécies de *Candida* são reconhecidas como as leveduras mais usualmente envolvidas na etiologia de infecções micóticas. A candidíase caracteriza-se como a infecção fúngica mais comum, sendo *Candida albicans* seu agente etiológico mais freqüente. Ainda, outras espécies inseridas no gênero *Candida* (por ex. *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicallis*) também podem estar envolvidas na etiologia da candidíase. Os quadros clínicos mais rotineiramente reportados relacionados à candidíase são a do tipo cutâneo-mucosa, sistêmica/visceral e alérgica (LIMA *et al.*, 2006).

O aumento das infecções por *Candida sp.* se deve a fatores como tratamentos com antimicrobianos de amplo espectro, uso de nutrição parenteral, cateteres intravenosos, entubação endotraqueal e outros (ZARDO, MEZZARI, 2004). Estes microrganismos sobrevivem como comensais em sítios anatômicos, de acordo com o ambiente em que se encontram e a pressão ambiental exercida sobre eles. Em superfícies de mucosas, a limitação dos nutrientes e a competição entre as bactérias e fungos, pertencentes à microbiota normal, exercem uma pressão seletiva, o que resulta na eliminação dos microrganismos menos adaptados (CALDERONI, 2001).

2.6 ESPECTROSCOPIA MOLECULAR

Informações importantes a respeito da natureza de átomos e moléculas têm sido obtidas através de estudos da interação da radiação com a matéria. Muitas evidências experimentais, desde a metade do século XIX, sugeriam que a luz deveria ser descrita como um movimento ondulatório. Esta evidência incluía o fato de que a luz exibe fenômenos de interferência e difração. Naquela época, em 1864, a teoria eletromagnética ondulatória foi desenvolvida de uma forma bastante satisfatória por J. C. Maxwell. Suas famosas equações diferenciais envolvendo os campos elétricos e magnéticos descrevem a radiação luminosa ondulatória e suas propriedades, em uma forma similar na qual as equações do movimento são aplicáveis às ondas sonoras. Utilizando a teoria eletromagnética ondulatória, pode-se correlacionar a inteira gama de comprimentos de onda, λ , desde raios X ($\lambda \approx 10^{-10}$ m) até ondas de rádio comuns ($\lambda \geq 1$ m) (ALMEIDA, SANTOS, 2001).

Medidas do comprimento de onda de linhas espectrais permitem a determinação de níveis de energia de sistemas atômicos e moleculares. A intensidade da linha é proporcional à probabilidade de transição que mede quão fortemente dois níveis de uma transição molecular (ou atômica) estão acoplados. Uma vez que a probabilidade de transição depende das funções de onda de ambos os níveis de energia, medidas de intensidade são úteis para verificar a distribuição espacial de cargas dos elétrons excitados, a qual pode ser estimada a partir de soluções aproximadas da equação de Schrödinger (ALCANTARA JR., 2002).

Em termos genéricos, podemos definir espectroscopia como o estudo da interação de qualquer tipo de radiação eletromagnética com a matéria. Dessa forma, toda manifestação que nossos olhos percebem, por exemplo, é um tipo de espectroscopia que está acontecendo (OLIVEIRA, 2001).

A tentativa de compreender os efeitos que a radiação eletromagnética exerce sobre a matéria provém de longa data, mas foi com Sir Isaac Newton, proeminente pesquisador inglês, quem iniciou o estudo científico das propriedades da luz. Ele descobriu que a luz branca do sol nada mais era que um somatório de outras cores, variando desde o violeta, passando pelo azul, verde, amarelo, laranja e terminando no vermelho. Isso pode ser observado no fenômeno natural da dispersão da luz do sol nas gotículas de água da chuva, formando o arco-íris (OLIVEIRA, 2001).

A luz apresenta duas propriedades principais: seu comprimento de onda λ (a distância entre dois máximos das ondas geradas) e sua frequência ν (o número de vezes por segundo em que essas ondas são geradas por uma fonte). A relação entre essas duas grandezas está na expressão abaixo:

$$c = \lambda \cdot \nu \quad (1)$$

onde c , a constante de proporcionalidade, é a velocidade da luz no vácuo, igual a $3,00 \times 10^8 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$. É interessante notar que, em função da Equação (1), quando uma onda luminosa tem grande valor de comprimento de onda, terá também um baixo valor de frequência, e vice-versa. Outra característica importante refere-se à quantidade de energia contida no feixe luminoso, que pode ser calculado a partir da equação de Planck:

$$E = h \cdot \nu \quad (2)$$

na qual pode ser também escrita como:

$$E = h \cdot c \cdot \lambda^{-1} \quad (3)$$

onde h é a constante de Planck, igual a $6,626 \times 10^{-34} \text{ J}\cdot\text{s}$. Essa relação possibilita dizer que a luz vermelha, com valor de comprimento de onda de 632,8 nm (a cor proveniente de um laser de hélio-neônio) tem energia da ordem de 2 eV (OLIVEIRA, 2001).

2.6.1 Tipos de transições moleculares

De acordo com o valor de energia da radiação eletromagnética, as transições entre os estados ocorrem diferenciadamente, e podemos dividi-las em vários tipos, dos quais as principais são as transições eletrônicas, vibracionais e rotacionais. Além delas, temos também as transições translacionais, todas ocorrendo em diferentes valores de energia do espectro eletromagnético. Nas transições eletrônicas, ocorre a passagem de um elétron de um estado de menor energia para um estado de maior energia, através da absorção da radiação, mas praticamente não há mudança da posição dos núcleos da molécula. Entretanto, nos demais tipos de transição ocorre uma mudança da posição relativa dos átomos na molécula devido ao efeito da radiação eletromagnética. A partir disso, podemos definir os chamados graus de liberdade moleculares, que definem a qualidade e a quantidade de movimentos que podem ser efetuados pelos átomos que compõem a molécula em questão (OLIVEIRA, 2001).

Nas transições vibracionais, os núcleos dos átomos mudam de posição constantemente devido a mudanças das distâncias de ligação ou nos ângulos de ligação; nas rotacionais, há mudanças na posição dos átomos da molécula devido a rotações sobre eixos definidos, e nas translacionais, ocorrem movimentos de translação da molécula como um todo. Dessa forma teremos então, para uma molécula linear qualquer (uma molécula cujos átomos estão dispostos sobre um dos eixos do sistema de coordenadas, por exemplo, o eixo x), três modos rotacionais (rotações em cada um dos eixos x , y e z), e também outros dois movimentos translacionais (movimentos de translação devido aos eixos nos quais a molécula não está definida; sobre o eixo em que a molécula está - por exemplo o eixo x , não poderá haver translação. Isso define então, para uma molécula linear, que os demais movimentos permitidos serão devidos aos movimentos que chamamos de vibracionais, e que serão $3N - 5$. Para uma molécula que não seja linear, existirão $3N - 6$ movimentos vibracionais, uma vez que haverá todos os modos translacionais possíveis (OLIVEIRA, 2001).

A espectroscopia tem como fundamento básico revelar o efeito da interação da radiação com a matéria, estando esta no estado gasoso, líquido ou sólido. Desde o século XIX trabalhos experimentais na área de espectroscopia, mais especificamente espectroscopia atômica, proporcionaram um conjunto de informações relevantes que levaram cientistas a buscarem modelos e teorias mais adequadas para descrição da interação da radiação com a matéria (ALMEIDA, SANTOS, 2001).

2.6.2 O espectro eletromagnético

O espectro eletromagnético entre 390 e 700 nanômetros (nm) corresponde ao espectro da luz visível. A região do infravermelho (IR – do inglês *infrared*) estende-se dos 3×10^{11} Hz até aproximadamente os 4×10^{14} Hz e corresponde à região do espectro eletromagnético situada entre as regiões do visível e microondas, englobando radiações com números de onda de 12.800 cm^{-1} a 10 cm^{-1} , ou com comprimentos de onda de 780 a $1,0 \times 10^6$ nm. O espectro infravermelho pode ser dividido em infravermelho próximo (NIR, do inglês *Near Infrared*), médio (MID, do inglês, *Middle Infrared*) e distante (FAR, do inglês, *Far Infrared*) (Tabela 01) (HOLLER, 2009; SILVERSTEIN *et al.*, 2007, LIMA, BAKKER, 2011).

Tabela 1: Espectro Eletromagnético

Designação		Frequência (Hz)			Comprimento de onda		
Ondas de rádio		$< 3,0 \times 10^{11}$			$> 0,3\text{m}$		
Microondas		10^9	a	$3,0 \times 10^{11}$	0,3m	a	1 mm
Infravermelho		$3,0 \times 10^{11}$	a	$3,8 \times 10^{14}$	1 mm	a	789 nm
Visível	Vermelho	$3,8 \times 10^{14}$	a	$4,8 \times 10^{14}$	789 nm	a	625 nm
	Laranja	$4,8 \times 10^{14}$	a	$5,0 \times 10^{14}$	625 nm	a	600 nm
	Amarelo	$5,0 \times 10^{14}$	a	$5,2 \times 10^{14}$	600 nm	a	577 nm
	Verde	$5,2 \times 10^{14}$	a	$6,1 \times 10^{14}$	577 nm	a	491 nm
	Azul	$6,1 \times 10^{14}$	a	$6,6 \times 10^{14}$	491 nm	a	455 nm
		$6,6 \times 10^{14}$	a	$8,0 \times 10^{14}$	455 nm	a	390 nm
Ultravioleta		$8,0 \times 10^{14}$	a	$2,4 \times 10^{16}$	390 nm	a	9 nm
Raios X		$2,4 \times 10^{16}$	a	$5,0 \times 10^{19}$	9 nm	a	6 pm
Raios gama		$> 5,0 \times 10^{19}$			$< 6\text{pm}$		

(adaptado, LIMA, BAKKER, 2011)

2.7 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO (IR)

2.7.1 Regiões espectrais do infravermelho

A Tabela 2 apresenta as três regiões espectrais de classificação do infravermelho.

Tabela 2: Regiões espectrais do infravermelho

Região Espectral	Número de onda (cm ⁻¹)	Comprimento de onda (nm)	Frequência (Hz)
Próximo (NIR)	12.800 a 4.000	780 a 2.500	3,8x10 ¹⁴ a 1,2x10 ¹⁴
Médio (MID)	4.000 a 200	2.500 a 50.000	1,2x10 ¹⁴ a 6,0x10 ¹²
Distante (FAR)	200 a 10	50.000 a 1.000.000	6,0x10 ¹² a 3,0x10 ¹¹

(adaptado, SKOOG *et al.*, 2002)

A primeira descrição do NIR, realizada por Frederick William Herschel, astrônomo, musicista e cientista anglo-alemão, ocorreu no ano de 1800. Somente em 1968, entretanto, o engenheiro agrícola Karl Norris desenvolveu a espectroscopia baseada no uso da luz no espectro do infravermelho-próximo (LIMA, BAKKER, 2011).

O princípio de análise da NIR com diferentes comprimentos de onda é baseado nas diferentes características de absorção e dispersão da luz e avalia de forma quantitativa e qualitativa a molécula (LIMA, BAKKER, 2011).

A espectroscopia na região do IR é uma técnica de inestimável importância na análise orgânica qualitativa, sendo amplamente utilizada nas áreas de química de produtos naturais, síntese e transformações orgânicas. O infravermelho e demais métodos espectroscópicos modernos como a ressonância magnética nuclear (RMN), espectroscopia na região do ultravioleta-visível (UV-VIS) e espectrometria de massas (EM) constituem hoje os principais recursos para a identificação e elucidação estrutural de substâncias orgânicas. São, também, de alta relevância na determinação da pureza e quantificação de substâncias orgânicas, bem como no controle e acompanhamento de reações e processos de separação. O uso dos referidos métodos físicos de análise traz uma série de vantagens, destacando-se a redução no tempo de análise, diminuição substancial nas quantidades de amostra, ampliação da capacidade de identificar ou caracterizar estruturas complexas, não destruição da amostra (exceto EM) e a possibilidade de

acoplamento com métodos modernos de separação, como a cromatografia gasosa de alta resolução (CGAR) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A espectroscopia na região do infravermelho tem sido também, amplamente utilizada em linhas de produção, no controle de processos industriais (LOPES, FASCIO, 2004).

Cada molécula possui suas próprias frequências naturais de vibração, absorvendo ondas eletromagnéticas de frequências específicas e gerando um espectro de absorção característico, justamente quando ocorre a ressonância entre a frequência da radiação infravermelha incidente e as frequências naturais de vibração do material (LEITE, PRADO, 2012).

Para absorver a radiação infravermelha, uma molécula tem que sofrer uma variação no momento de dipolo durante seu movimento rotacional ou vibracional. Somente nessas circunstâncias o campo elétrico alternado da radiação pode interagir com a molécula e causar variações na amplitude de um de seus movimentos, seja ele movimento vibracional ou rotacional. O momento de dipolo é determinado pela magnitude da diferença de carga e pela distância entre dois centros de carga. Entretanto, não ocorre variação no momento dipolar durante a vibração ou rotação de espécies homonucleares, tais como O_2 , N_2 ou Cl_2 , impedindo que estas moléculas absorvam radiação no infravermelho (HOLLER *et al.*, 2009).

As características de uma vibração molecular podem ser aproximadas por um modelo mecânico, o qual considera que a ligação entre duas massas (átomos) é feita por uma mola, em que a frequência de vibração da mola é descrita pela Lei de Hooke. Uma perturbação de uma dessas massas ao longo do eixo da mola resulta em uma vibração chamada movimento harmônico simples. As vibrações moleculares podem ser classificadas em dois tipos, vibração de deformação axial ou estiramento (*stretching*) e vibração de deformação angular (*bending*), podendo estas deformações serem simétricas ou assimétricas. As deformações de estiramento são oscilações radiais das distâncias entre os núcleos, e as deformações angulares envolvem mudanças dos ângulos entre o plano que contém a ligação e um plano de referência. As vibrações de deformação angular podem ser de quatro tipos: simétrica no plano (*scissoring* ou tesoura), assimétrica no plano (*rocking* ou oscilação), simétrica fora do plano (*wagging* ou balanço em fase) e assimétrica fora do plano (*twisting* ou balanço fora de fase) (FIGURA 2) (PAVIA *et al.*, 2010, OZAKI *et al.*, 2007).

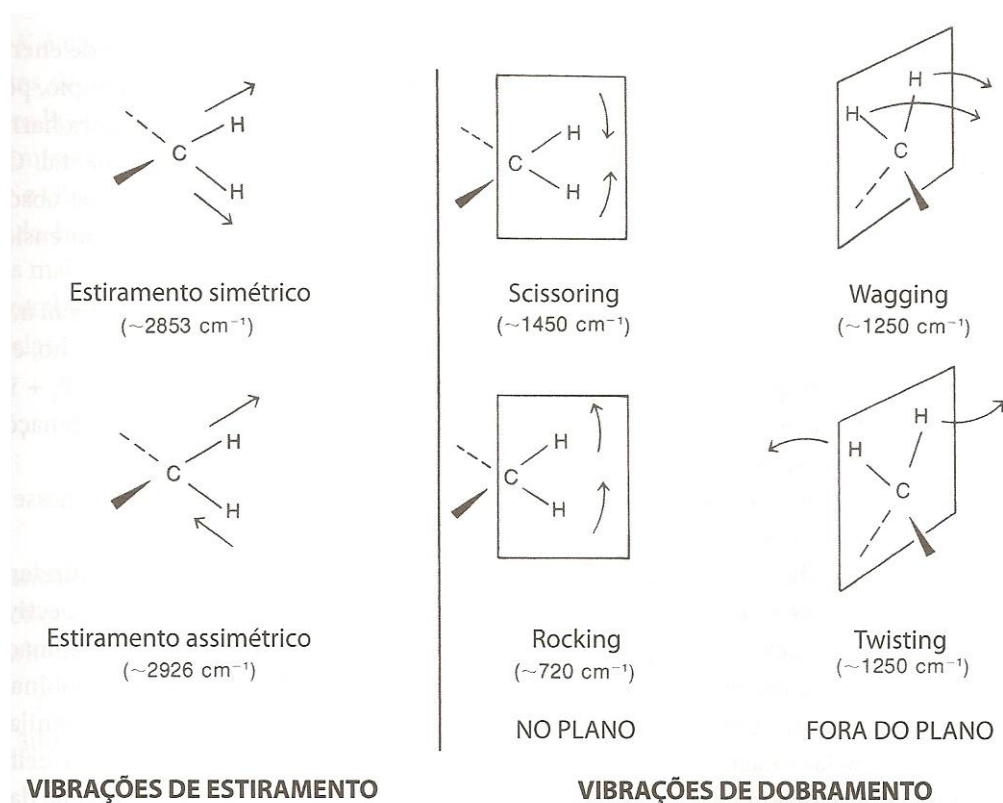


Figura 2: Diferentes formas de vibrações moleculares. (Fonte: PAVIA *et al.*, 2010)

A espectroscopia de infravermelho próximo gera espectros que apresentam sobretons (*overtones*) de vibrações fundamentais e bandas de combinações de vibrações fundamentais. As bandas de combinação ocorrem quando dois modos vibracionais são excitados simultaneamente e as duas frequências vibracionais (ν_1 e ν_2) acoplam-se em uma molécula, originando uma nova frequência de vibração dentro da molécula (NAES *et al.*, 2002; KELLNER *et al.*, 2004).

O espectro no infravermelho médio apresenta vibrações fundamentais, onde as bandas são intensas e bem definidas. O espectro infravermelho médio pode ser subdividido em duas regiões, sendo a região de 4.000 a 1.400 cm^{-1} , correspondente a bandas de absorção da maioria dos grupos funcionais. Já a região de 1.400 a 600 cm^{-1} é conhecida como região de impressão digital, onde cada substância apresenta um padrão específico de bandas de absorção (HOLLER *et al.*, 2009; PAVIA *et al.*, 2010).

A região do FAR é particularmente útil para estudos inorgânicos, uma vez que a absorção devido às vibrações de estiramento e a deformação de ligações entre átomos

metálicos e ligantes orgânicos e inorgânicos geralmente ocorrem em frequências mais baixas do que 650cm^{-1} ($> 15\mu\text{m}$) (HOLLER *et al.*, 2009).

A radiação eletromagnética quando interage com a matéria pode sofrer diferentes tipos de reflexão, tais como: reflexão especular, reflexão difusa, reflexão interna e reflectância total atenuada (ATR, do inglês *attenuated total reflectance*). No caso da espectrometria no Infravermelho de reflexão interna, é uma técnica para obtenção de espectros IR de amostras que são difíceis de serem manipuladas, como sólidos de solubilidade limitada, filmes, fios, pós, adesivos e pastas. (HOLLER *et al.*, 2009).

2.7.2 Infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

No FT-IR, a radiação, contendo todos os comprimentos de onda, depois de colimada por um espelho, é introduzida em um interferômetro de Michelson (dispositivo formado por um divisor de feixe – Figura 3) e separada em dois feixes, um deles percorrendo uma distância fixa e o outro, uma distância variável (espelho móvel). No divisor de feixe, os dois raios são combinados opticamente, podendo gerar uma interferência construtiva (se estiverem em fase) ou destrutiva (se estiverem fora de fase). Quando este feixe combinado de luz atravessa a amostra, é absorvido seletivamente e, dependendo das absorções apresentadas pela amostra, gera um interferograma. Este interferograma pode ser tratado por meio de um processo matemático, denominado Transformada de Fourier, originando um espectro ou padrão de absorção da amostra, ou seja, o seu espectro no infravermelho, que pode ser tanto de transmitância quanto de absorbância (WARTEWIG *et al.*, 2005). Essa técnica permite a aquisição de centenas de espectros de infravermelho em apenas alguns minutos. Os espectros isolados são combinados no computador, originando um espectro no qual os ruídos de fundo do equipamento podem ser bastante reduzidos, produzindo, portanto, um espectro limpo (HEINEN, 2006).

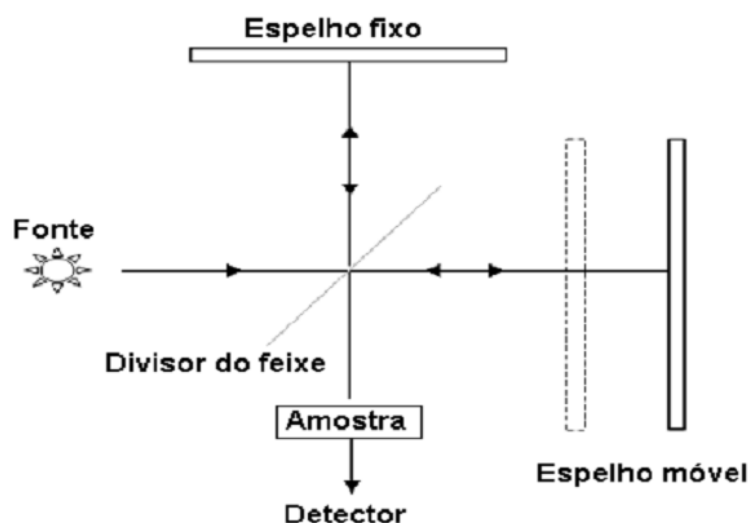


Figura 3: Interferômetro de Michelson. (Fonte: WARTEWIG *et al.*, 2005)

2.7.3 Reflectância Total Atenuada (ATR)

A utilização da técnica de Reflectância Total Atenuada (ATR) em espectroscopia ocorre quando um feixe de radiação passa de um meio mais denso para um meio menos denso ocorrendo reflexão. Embora ocorra completa reflexão interna na interface cristal/amostra, a radiação penetra de fato uma pequena distância dentro da amostra. Esta penetração chama-se onda evanescente. A amostra interage com a onda evanescente, resultando na absorção da radiação pela amostra, que corresponde ao espectro de transmissão dessa mesma amostra, conforme representação esquemática a seguir na Figura 4 (WARTEWIG *et al.*, 2005; HOLLER *et al.*, 2009).

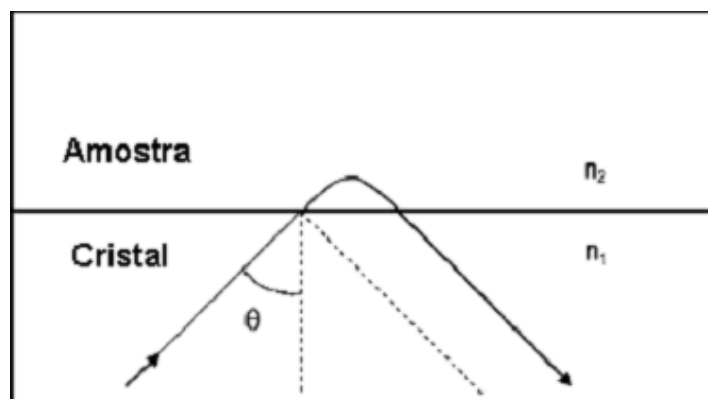


Figura 4: Reflectância Total Atenuada. (Fonte: WARTEWIG *et al.*, 2005)

O espectro depende de diversos parâmetros, incluindo ângulo de incidência da radiação na amostra, comprimento de onda da radiação, índices de refração da amostra e do cristal (cristais de ZnSe, BaF₂, CaF₂, KBr, KCl) do equipamento (WARTEWIG *et al.*, 2005). A profundidade da penetração efetiva d_p depende do comprimento de onda do feixe, dos índices de refração do cristal e da amostra e do ângulo do feixe. Pode-se calcular a profundidade de penetração a partir da seguinte equação:

$$d_p = \frac{\lambda}{2\pi\eta_1\sqrt{\sin^2\theta - (\eta_2/\eta_1)^2}}$$

onde:

λ = comprimento de onda da radiação incidente

η_1 = índice de refração do cristal

η_2 = índice de refração da amostra

θ = ângulo de incidência

A espectroscopia ATR traz como uma de suas maiores vantagens os espectros de absorção facilmente obtidos de uma ampla variedade de tipos de amostras e com o mínimo de preparo da amostra. Linhas, fios, fibras e tecidos podem ser estudados, pressionando-se a amostra contra um cristal denso. Pós, pastas ou suspensões podem ser manipuladas de forma semelhante. Soluções aquosas também podem ser acomodadas, desde que o cristal utilizado no equipamento não seja solúvel em água (HOLLER *et al.*, 2009).

2.8 ESPALHAMENTO RAMAN

Quando a radiação passa através de um meio transparente, as espécies presentes espalham uma fração do feixe em todas as direções. O espalhamento Raman resulta do mesmo tipo de alterações vibracionais quantizadas associadas com a absorção no IR. Portanto, a diferença em comprimento de onda entre a radiação visível incidente e a espalhada corresponde a comprimentos de onda na região do MID. De fato, os espectros de espalhamento Raman e de absorção no IR para uma dada espécie frequentemente são bastante semelhantes (HOLLER *et al.*, 2009).

No ano de 1928, o físico indiano Chandrasekhara Venkata Raman descobriu que o comprimento de onda visível de uma pequena fração da radiação espalhada por certas moléculas difere daquele do feixe incidente. Além disso, Raman descobriu que os deslocamentos em comprimento de onda dependem das estruturas químicas das moléculas responsáveis pelo espalhamento Raman e recebeu em 1931 o Prêmio Nobel de Física por esta descoberta (HOLLER *et al.*, 2009).

Quando um grupo de moléculas é iluminado por luz monocromática, cujo comprimento de onda não permite sua absorção, a maior parte da luz incidente é transmitida diretamente através da amostra e temos o espalhamento Rayleigh, outra parte é espalhada em frequências menores ou maiores que da radiação original chamado espalhamento Raman, o qual pode ser de dois tipos: *Stokes* e *anti-Stokes* como mostra a Figura 5 (RICCI, 2008).

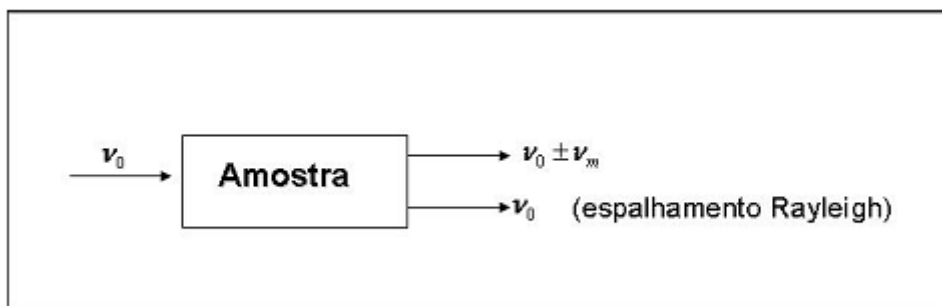


Figura 5: Mecanismos de interação da Luz. (Fonte: RICCI, 2008)

2.8.1 Espalhamento Rayleigh e Espalhamento Raman

Uma amostra é irradiada com luz de frequência ν_0 , decorrendo em dois tipos de espalhamento: o espalhamento elástico (Rayleigh) em que a luz espalhada tem a mesma frequência ν_0 da luz incidente, e o espalhamento inelástico (Raman) cuja luz espalhada tem a frequência igual à frequência da luz incidente ν_0 mais ou menos a frequência vibracional da molécula ν_m (RICCI, 2008).

Quando a radiação espalhada é de menor frequência do que a radiação incidente, ela é chamada de espalhamento *Stokes*. A radiação espalhada de frequência maior do que a radiação da fonte é chamada espalhamento *Anti-Stokes*. O espalhamento elástico ocorre com emissão de um fóton com a mesma energia que o fóton de excitação; a radiação espalhada de mesma frequência da fonte é chamada espalhamento *Rayleigh* (HOLLER *et al.*, 2009).

O espalhamento Raman envolve uma distorção momentânea dos elétrons distribuídos em torno de uma ligação na molécula, seguida por reemissão da radiação enquanto a ligação volta ao estado normal. Na sua forma distorcida, a molécula fica temporariamente polarizada. E de acordo com a mecânica quântica uma vibração é ativa no espectro Raman quando durante a vibração ocorre uma mudança na polarizabilidade da molécula. A polarizabilidade é a facilidade da nuvem eletrônica sofrer distorção quando submetida a um campo elétrico (SKOOG *et al.*, 2002).

2.8.2 Mecanismo de Espalhamento Rayleigh e Raman

No espalhamento *Rayleigh* as moléculas estão num estado denominado fundamental (que é o estado no qual as moléculas estão num menor nível de energia). Quando essas moléculas sofrem colisão com o fóton de energia (que é a luz incidente) passa do estado fundamental para um estado virtual e volta em seguida para o estado fundamental e o fóton é espalhado sem alteração de energia.

No espalhamento Raman *Stokes* as moléculas sofrem colisão com o fóton passando do estado fundamental para o estado virtual, decaindo em seguida para um estado vibracional excitado de energia. O fóton espalhado terá energia menor que a radiação incidente.

No espalhamento Raman *anti-Stokes* o fóton encontra a molécula já em um estado excitado e leva a molécula a uma energia bem mais alta, quando chega ao estado virtual, a molécula decai para o estado fundamental. O fóton espalhado terá energia maior que a radiação incidente, conforme o diagrama da Figura 6 .

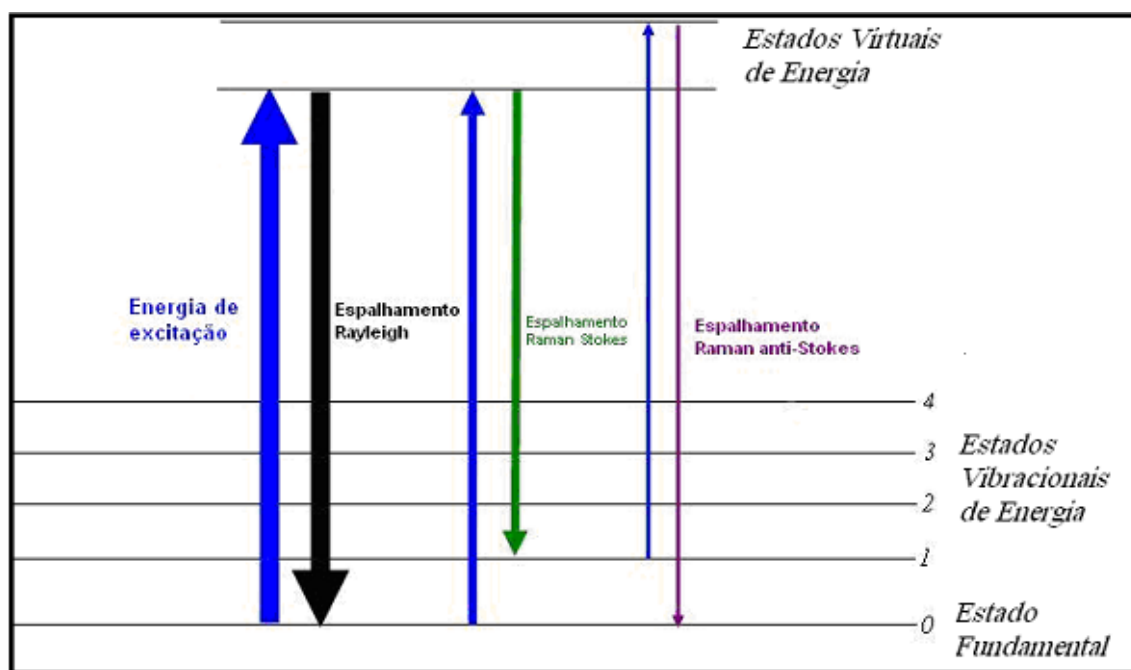


Figura 6: Mecanismo de espalhamento Rayleigh e Raman. (Fonte: RICCI, 2008)

O espectro Raman de uma determinada molécula consiste de uma série de picos ou bandas, cada um correspondendo a uma frequência vibracional característica daquela molécula. Cada molécula tem o seu próprio espectro característico, e dessa forma, o espectro Raman pode fornecer uma “impressão digital” de uma substância da qual a sua estrutura molecular pode ser determinada (LORINCZ *et al.*, 2004).

A manipulação da amostra para medidas em espectroscopia Raman é mais simples do que em espectroscopia IR, isto porque o vidro comum pode ser utilizado em janelas, lentes e outros componentes ópticos, no local de cristais de haletos, que são mais frágeis e menos estáveis na atmosfera. Além disso, a fonte de laser é facilmente focalizada em uma área pequena da amostra e a radiação emitida é eficientemente focalizada na abertura ou fenda de entrada de um espectrômetro. Como resultado, amostras muito pequenas podem ser investigadas (HOLLER *et al.*, 2009).

2.8.3 Espalhamento Raman com Transformada de Fourier (FT-Raman)

O instrumento Raman com transformada de Fourier (FT-Raman) emprega um interferômetro de Michelson, similar ao utilizado em espectrômetros FT-IR, e um laser Nd-YAG de onda contínua; o uso da linha em 1064 nm (1,064 μm) praticamente elimina a fluorescência e a fotodecomposição das amostras; portanto, corantes e outros compostos fluorescentes podem ser investigados com instrumentos FT-Raman. O instrumento FT-Raman também proporciona uma melhor precisão da frequência em relação aos instrumentos convencionais (HOLLER *et al.*, 2009).

2.9 A MODELAGEM MOLECULAR NO DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS

A modelagem molecular (MM) de acordo com a União Internacional de Química Pura e Aplicada – IUPAC – (da sigla inglesa – *International Union of Pure and Applied Chemistry*) é a investigação das estruturas e das propriedades moleculares pelo uso de química computacional e técnicas de visualização gráfica, visando fornecer uma representação tridimensional, sob um dado conjunto de circunstâncias (SANT’ANNA, 2002; ANDRADE *et al.*, 2010).; o conceito é muito amplo e sua definição mais geral engloba qualquer análise de dados moleculares utilizando-se métodos computacionais. No entanto o entendimento usual, na pesquisa farmacêutica, desta moderna área do conhecimento está na utilização das ciências da informação e da implementação computacional de técnicas físicas e estatísticas aplicadas ao estudo dos sistemas biológicos, desde o nível molecular (p.ex. DNA, RNA, proteínas) até o dos organismos e sistemas complexos (OLIVA, 2008).

O processo de descoberta de novos fármacos, atribuição da Química Medicinal, caracteriza-se por sua complexidade, fruto da multiplicidade de fatores que envolvem o planejamento molecular de novas estruturas capazes de apresentar os efeitos farmacológicos desejados, com biodisponibilidade adequada ao seu emprego terapêutico, seguro e confortável (BARREIRO *et al.*, 2001; BARREIRO, 2002).

Atualmente, o planejamento racional de fármacos fundamenta-se basicamente no conhecimento da estrutura molecular dos receptores, o que possibilita elaborar substâncias com perfis farmacológicos mais definidos. Para tanto, as hipóteses são elaboradas fundamentando-se no conhecimento das propriedades físico-químicas dos

compostos ativos e seus respectivos sítios moleculares de ação. Entretanto, como muitas vezes a estrutura dos receptores não é conhecida admite-se que a gênese de moléculas potencialmente bioativas seja realizada sem levar em conta sua natureza (AMARAL *et al.*, 2003).

Um dos mais importantes avanços no planejamento e na descoberta de novos fármacos tem sido a utilização da MM. Atualmente, a MM é uma ferramenta indispensável não somente no processo de descoberta de novos fármacos, mas também na otimização de protótipos já existentes e no planejamento racional de candidatos a fármacos (COHEN, 1996; SANT'ANNA, 2002; CARVALHO *et al.*, 2005; WERMUTH, 2009).

O grande desenvolvimento da MM nos últimos anos deveu-se em grande parte ao avanço dos recursos computacionais em termos de hardware (velocidade de cálculo) e de software (programas computacionais), além dos avanços em química computacional, ressonância magnética nuclear, cristalografia de raios-X, bioquímica e biologia molecular (COHEN, 1996). Isto permitiu grande contribuição na descoberta de candidatos a fármacos, conduzindo a rápidos progressos em pesquisas e despertando o interesse tanto do meio acadêmico como de indústrias farmacêuticas (COHEN, 1996; WERMUTH, 2009; ANDRADE, 2010).

Os avanços na computação têm permitido a construção de softwares de alto desempenho, especificamente no que diz respeito ao uso de imagens 3D (tridimensionais) projetadas em duas dimensões que, devido a suas características, permitem uma melhor visualização dos modelos adotados pela comunidade científica para representar os arranjos atômicos e os processos envolvidos nos fenômenos químicos (FERREIRA *et al.*, 2011).

Ela permite a obtenção de propriedades específicas de uma molécula que podem influenciar na interação com o receptor. Como exemplos, podemos citar o mapa de potencial eletrostático, o contorno da densidade eletrônica e a energia e os coeficientes dos orbitais de fronteira HOMO (Highest Occupied Molecular Orbital) e LUMO (Lowest Unoccupied Molecular Orbital) (RODRIGUES, 2001).

A maioria dos programas de modelagem molecular é capaz de desenhar a estrutura molecular e realizar os cálculos de otimização geométrica e estudos de análise conformacional. Os arquivos de saída destes cálculos podem ser utilizados como arquivos de entrada para outros programas. Desta forma, a primeira etapa em estudos de modelagem molecular é desenhar a estrutura da molécula. Em seguida, a molécula é

otimizada objetivando encontrar parâmetros geométricos tais como comprimentos e ângulos de ligação que estejam próximos aos valores determinados experimentalmente (RODRIGUES, 2001).

Assim, um programa de modelagem molecular deve ser capaz de adotar o princípio da transferibilidade, ou seja, reconhecer e transferir os parâmetros embutidos no programa para uma nova molécula que apresente as mesmas características estruturais e eletrônicas das moléculas usadas para confeccionar o programa (mesmo tipo de átomos, funções químicas, hibridização molecular etc.) (RODRIGUES, 2001).

2.9.1 Mecânica Quântica

Na mecânica quântica usa-se a equação de Schrödinger para calcular as propriedades de uma molécula, a partir das interações entre os seus elétrons e núcleos (BARREIRO, RODRIGUES, 1997). O movimento dos elétrons é considerado mais rápido e independente do núcleo e, uma vez que os elétrons giram em torno do núcleo, é possível descrever a energia eletrônica separadamente da energia nuclear. Os cálculos de mecânica quântica não são exatos, pois são feitas algumas aproximações baseadas em dados empíricos (CARVALHO *et al.*, 2003).

2.9.1.1 Cálculos Computacionais

Os métodos de cálculos de primeiros princípios também denominados de *ab initio*, descrevem de maneira rigorosa a natureza quântica dos elétrons. Os métodos *ab initio* mais empregados atualmente são: Hartree-Fock e a Teoria do Funcional da Densidade (DFT).

Douglas Rayner Hartree e Vladimir Fock foram pioneiros no cálculo de propriedades de átomos com vários elétrons usando a mecânica quântica (HARTREE *et al.*, 1927; FOCK *et al.*, 1930). Hartree introduziu o método do campo autoconsistente, no qual cada elétron se move em um campo médio criado pelos núcleos atômicos e pelos demais elétrons, enquanto, Fock produziu os primeiros cálculos usando funções de ondas anti-simétricas, que resultou no que conhecemos hoje como método de Hartree-Fock.

O método semi-empírico apresenta uma confiabilidade menor devido a utilização de vários parâmetros de entrada; não sendo do tipo *ab initio*. Entretanto, quando

utilizados cuidadosamente, ou seja, quando esses parâmetros são obtidos das medidas experimentais, os resultados podem ser extremamente valiosos no estudo de sistemas com um número grande de átomos.

O modo convencional de tratar sistemas com muitos elétrons é baseado na utilização da função de onda como ponto de partida. Uma vez determinada a função de onda, é possível obter toda a informação física sobre o sistema estudado. No entanto, quando estudamos substâncias que possuem muitos átomos, e, portanto, grande quantidade de elétrons, lidar diretamente com a função de onda é bastante difícil. Uma abordagem menos dispendiosa capaz de prescindir do cálculo da função de onda baseia-se em empregar a idéia de funcionais de densidade, que é utilizada na formulação do método da Teoria do Funcional da Densidade (DFT).

A idéia dos funcionais de densidade é empregar uma densidade eletrônica. A equação de Schrödinger é então escrita em termos de matrizes de densidade. A densidade eletrônica no método DFT corresponde ao número de elétrons que podem ser encontrados em um certo volume. A sua integral em todo o espaço fornece o número de elétrons presentes. A localização dos seus picos revela as coordenadas nucleares e a forma de cada um desses picos indica a magnitude da carga nuclear presente.

De fato, o método DFT permite que as diversas propriedades de um material que dependam da energia total do sistema ou de diferenças de energia (por exemplo: parâmetros de rede, energia de formação, frequências vibracionais, etc) possam ser determinadas com extrema precisão. Outra característica bastante atraente desse método é sua versatilidade. Este método pode ser aplicado para diversos tipos de materiais (metais, isolantes, semicondutores, estruturas orgânicas e inorgânicas e mesmo em nanoestruturas) nas mais diversas situações (*bulk*, superfícies, defeitos, cristais, etc).

Esses são alguns dos possíveis métodos de cálculos que podem ser empregados no estudo das propriedades estruturais e vibracionais em sistemas moleculares. O arcabouço teórico destes métodos são elucidados na literatura de livros de Física e Química Computacional (GIORDANO *et al.*, 2006; LANDAU *et al.*, 2007; VIANA *et al.*, 2004; MORGON *et al.*, 2007).

Neste trabalho foi empregado o método DFT utilizando o programa de estrutura eletrônica Gaussian 03 (FRISCH *et al.*, 2003) para obtenção das propriedades estruturais e vibracionais do composto $C_9H_{10}N_4O_4 \cdot H_2O$.

2.9.1.2 Teoria do Funcional da Densidade (DFT)

O método teórico aqui aplicado tem como base a Teoria do funcional da densidade (DFT), desenvolvida nos anos 1960, por W. Kohn, P. Hohenberg e L. Sham (HOHENBERG *et al.*, 1964 e KOHN *et al.*, 1965).

Na metodologia DFT a minimização da energia total utilizando as funções densidade eletrônica em função da posição espacial $\rho = \rho(\vec{r})$ é equivalente ao cálculo das funções de onda do estado fundamental do sistema, inclusive para um sistema de muitas partículas.

Na DFT a energia total é função da densidade ρ e das coordenadas $\vec{r}$ dos núcleos atômicos: $E = E(\rho, \vec{r})$. A energia total pode ser decomposta de forma exata em energia cinética, energia de Coulomb, e um termo que inclui os fatores de troca e correlação eletrônica. A essência da teoria é a minimização de E em relação às (funções) densidades eletrônicas ρ .

Assumindo que a energia total possui um ponto mínimo local com relação à densidade eletrônica total do sistema pode-se chegar às Equações de Kohn-Shan:

$$-\frac{\hbar^2}{2m} \nabla^2 \Psi_i + U(\vec{r}) \Psi_i + \mu_{xc}(\vec{r}) \Psi_i = E_i \Psi_i \quad (4)$$

onde $-\frac{\hbar^2}{2m} \nabla^2$ é o operador energia cinética monoelétrica, $U(\vec{r})$ é o operador Coulombiano que inclui todas as interações eletrostáticas e $\mu_{xc}(\vec{r})$ é o termo de troca e correlação eletrônica.

No desenvolvimento da DFT, o primeiro funcional de troca utilizado foi o LDA (aproximação da densidade local) baseado no estado fundamental do gás homogêneo, onde os elétrons se movimentam em um campo uniforme de cargas positivas. Posteriormente surgiram funcionais que melhoram os valores de energia, ao relacionar uma parte HF e outra DFT, chamados funcionais híbridos. Entre estes funcionais híbridos pode-se ressaltar o funcional de três parâmetros de Becke (B3LYP) (LEE *et al.*, 1988; PARR *et al.*, 1989; BECKE *et al.*, 1993) o qual foi utilizado neste trabalho juntamente com o conjunto de base 6-31G(d,p).

2.10 HETEROCICLOS NITROGENADOS

A importância dos compostos heterocíclicos é incontestável, particularmente no que se refere ao fato de apresentarem inúmeros usos como medicamentos (ROTH *et al.*, 1996; GILMAN *et al.*, 1991); mais da metade de todos os compostos conhecidos são heterociclos, com destaque para os fármacos, vitaminas e princípios ativos em plantas e organismos marinhos. Se pensarmos apenas nos fármacos, poderíamos definir a história da química medicinal pelos heterociclos. (SILVA, 2006).

Muitos dos heterociclos são fármacos mundialmente conhecidos e apresentam atividades farmacológicas diversificadas, tais como: anti-hipertensiva (losartana, 1); antiviral (ribavirina, 2); antitumoral (carbamato de fluorouracila, 3); antifúngica (fluconazol, 4); antiinflamatória e analgésica (dipirona, 5); antiprotozoária (metronidazol, 6); inibidora da β -lactamase (tazobactama sódica, 7) e antimicrobiana (benzilpenicilina, 8) (Figura 7) (MELO *et al.*, 2006).

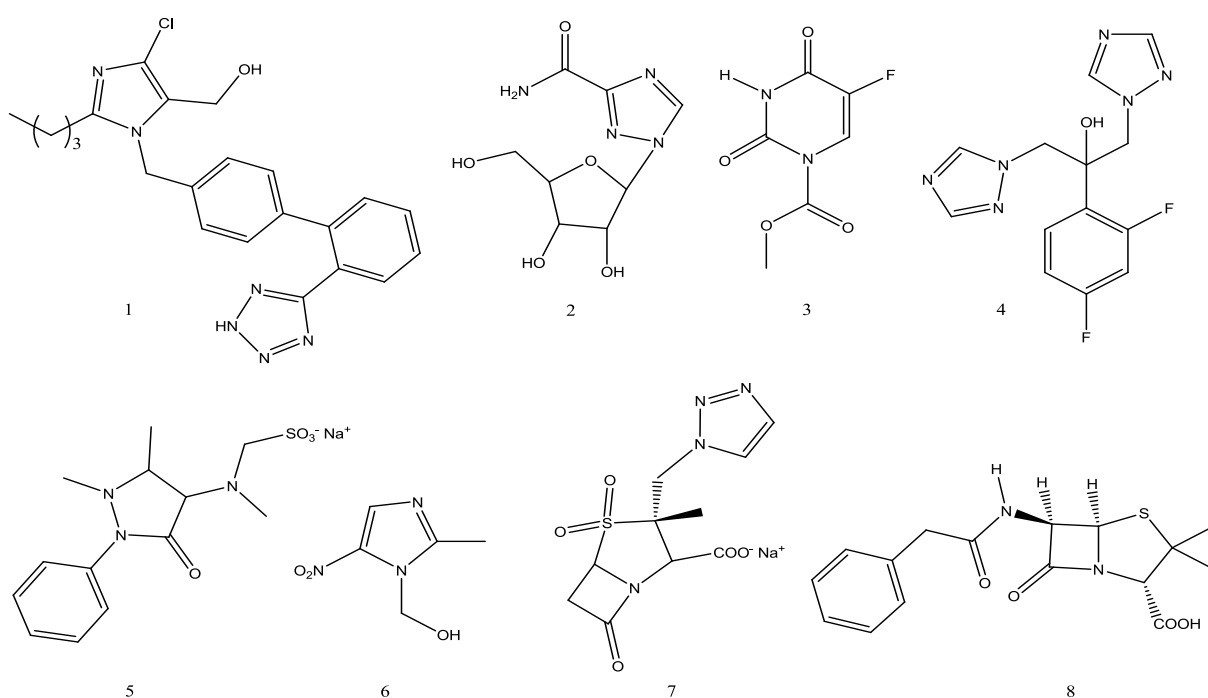


Figura 7: Heterociclos nitrogenados farmacologicamente ativos.

2.10.1 Triazóis

Os compostos heterocíclicos aromáticos nitrogenados de cinco membros, contendo um ou mais átomos de nitrogênio, pertencem à classe de substâncias denominada genericamente de azol, sendo que o mais simples deles é o pirrol (MELO *et al.*, 2006).

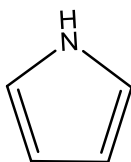


Figura 8: Estrutura química do pirrol.

Os sistemas heterocíclicos mais estudados são os triazóis, que têm despertado bastante interesse por possuírem variadas aplicabilidades, que vão desde usos como explosivos, até como agroquímicos e fármacos (MELO *et al.*, 2006); apresentam um amplo espectro de atividade biológica, tais como anticâncer, antibacteriana, antidepressiva, antiinflamatória, herbicida, dentre outras (SOUZA *et al.*, 2005).

Membros mais simples da classe estão esquematizados na Figura 9: pirazol (1), imidazol (2), 1,2,3-triazol (3), 1,2,4-triazol (4), tetrazol (5) e pentazol (6).

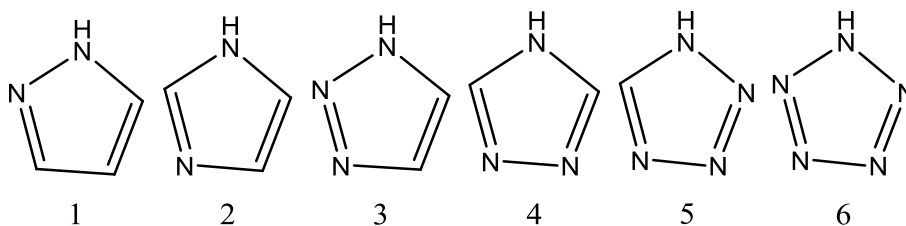


Figura 9: Estruturas químicas: (1) pirazol; (2) imidazol; (3) 1,2,3-triazol; (4) 1,2,4-triazol; (5) tetrazol e (6) pentazol.

Até o ano de 2003 foram publicados mais de 10.500 artigos sobre a química dos triazóis, sendo que, destes, 4.200 (40%) versavam sobre síntese, e mais de 2.400 (22,8%) sobre atividade biológica. Todos os triazóis são de origem sintética e não há indicações, até o momento, de que estes heterociclos possam ser encontrados na natureza. Os triazóis são substâncias hetero-aromáticas, apresentando seis elétrons π , sendo que aqueles que

não apresentam substituintes no átomo de nitrogênio podem se apresentar como três estruturas tautoméricas (MELO *et al.*, 2006).

O 1,2,4-triazol é um anel heterocíclico aromático contendo três átomos de nitrogênio dispostos nas posições 1, 2 e 4 de um anel de cinco membros (Figura 10). O interesse nos complexos contendo este ligante iniciou-se em meados de 1965, quando as propriedades magnéticas de vários complexos foram estudadas (HAASNOOT, 2000).

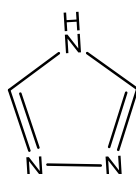


Figura 10: Estrutura química do 1,2,4-triazol.

As medidas de momento de dipolo indicam que, para o 1,2,4-triazol os cálculos teóricos e os resultados experimentais indicam preferência pelo 1,2,4-4H-triazol (Figura 11). Os triazóis são subclassificados como vicinais (1,2,3-triazóis) ou como triazóis simétricos (1,2,4-triazóis), sendo que os últimos são os mais investigados. Até 2004, haviam cerca de 1600 publicações referentes a 1,2,3-triazóis e mais de 7000 citações relativas a derivados 1,2,4-triazólicos (MELO *et al.*, 2006).

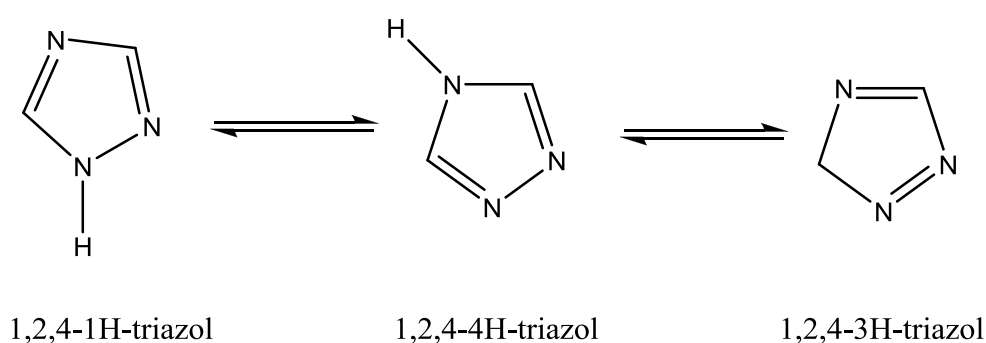


Figura 11: Equilíbrio tautomérico em 1,2,4-triazóis.

2.11 O ÁCIDO DE MELDRUM

O ácido de Meldrum (2,2-dimetil-1,3-dioxano-4,6-diona) é um composto orgânico, descoberto em 1908 por Andrew Norman Meldrum (1876-1934); que foi um químico inglês com contribuições notáveis em síntese orgânica (IVANOV, 2008).

Caracteriza-se como sólido cristalino branco e é obtido pela condensação do ácido malônico com acetona em anidrido acético na presença de ácido sulfúrico como catalisador (Figura 12) (SILVA, 2006; IVANOV, 2008).

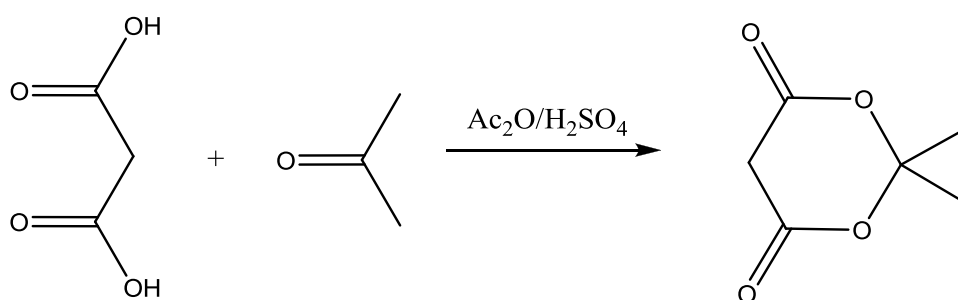


Figura 12: Obtenção do ácido de Meldrum.

O ácido de Meldrum apresenta pKa igual a 4,83; muito semelhante ao pKa do ácido acético (4,76). Seu caráter anfifílico permite um ataque nucleofílico nas posições 4 e 6, e eletrofílico na posição 5 deixando o anel intacto (SILVA, 2006).

Derivados de ácido de Meldrum atraíram atenção considerável como reagentes e produtos intermediários valiosos em síntese orgânica. Os derivados 5-aminometilenos são empregados na síntese de diversos heterocíclicos (IVANOV, 2008).

Outra característica importante do ácido de Meldrum é a possibilidade de formar moléculas complexas, análogos de produtos naturais através de reações seriadas utilizando substratos simples. Tal processo é chamado reação dominó; que utiliza duas ou mais reações sequenciais em condições laboratoriais com formação de produto com ligações idênticas. A reação multicompetente é um processo convergente que utiliza três ou mais materiais no início para formação de um produto, o qual apresenta a totalidade ou a maioria dos átomos. Os conceitos de reação dominó e multicompetente referem-se à rápida síntese de compostos heterocíclicos com diversos padrões de substituição (IVANOV, 2008).

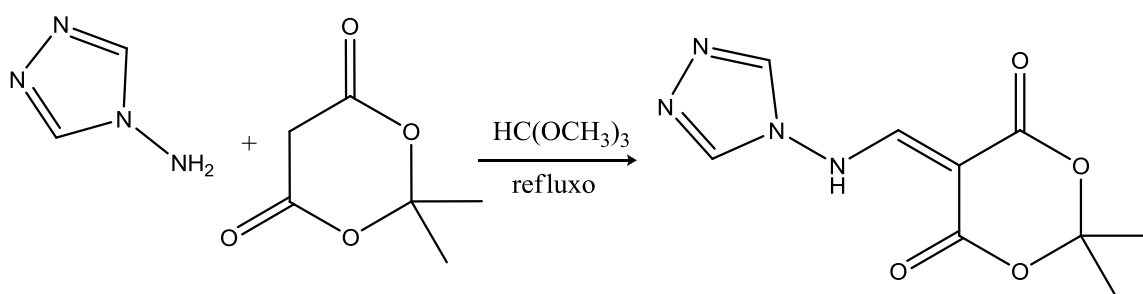
MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL SINTÉTICO

A substância sintética cristalizada 5-[(4*H*-1,2,4-triazol-4-ilamino)metileno]-2,2-dimetil-1,3-dioxano-4,6-diona monohidratada ($C_9H_{10}N_4O_4 \cdot H_2O$) utilizada no presente estudo foi cedida pelo professor Dr. Luiz Everson da Silva, do Departamento de Química, Setor Litoral, da Universidade Federal do Paraná.

A síntese é descrita pelo esquema abaixo (Figura 13):



(SILVA, 2006)

Figura 13: A síntese da substância $C_9H_{10}N_4O_4$

Essa substância originada da síntese apresenta-se no estado sólido como 5-[(4*H*-1,2,4-triazol-4-ilamino)metileno]-2,2-dimetil-1,3-dioxano-4,6-diona monohidratada, $C_9H_{10}N_4O_4 \cdot H_2O$ (Figura 14), com ponto de fusão entre 170 -172 ° C (JOUSSEF *et al.*, 2005).

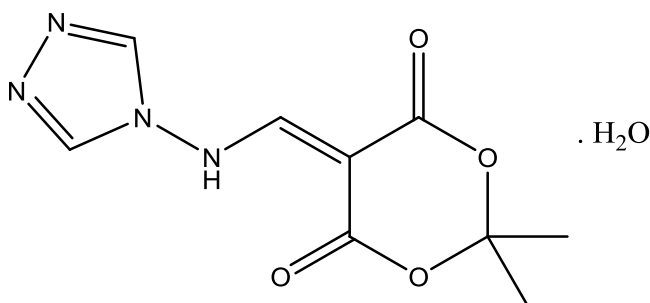


Figura 14: Estrutura molecular da substância $C_9H_{10}N_4O_4 \cdot H_2O$

Vale ressaltar que foi utilizada a amostra policristalina 5-[(4*H*-1,2,4-triazol-4-ilamino)metileno]-2,2-dimetil-1,3-dioxano-4,6-diona monohidratada ($C_9H_{10}N_4O_4 \cdot H_2O$) tanto nos testes de atividade antimicrobiana quanto nas medidas de espalhamento Raman e espectroscopia infravermelho. Entretanto, nos testes de atividade antimicrobiana a amostra $C_9H_{10}N_4O_4 \cdot H_2O$ foi solubilizada em Dimetilsulfóxido (DMSO - MERCK, Darmstadt, Alemanha) e diluída em água destilada, portanto, a molécula alvo nos teste de atividade antimicrobiana foi a forma anidra do composto 5-[(4*H*-1,2,4-triazol-4-ilamino)metileno]-2,2-dimetil-1,3-dioxano-4,6-diona ($C_9H_{10}N_4O_4$).

3.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

3.2.1 Material utilizado

O Quadro 1 mostra as drogas e reagentes com suas respectivas origens que foram utilizados nos testes de Concentração Inibitória Mínima e Modulação.

Quadro 1: Drogas e Reagentes

Substâncias	Origem
Brain Heart Infusion (BHI)	HIMEDIA – Índia
Dimetilsulfóxido (DMSO)	MERK – Alemanha
Rezasurina	Sigma – USA
Amicacina	Sigma – USA
Gentamicina	Sigma – USA
Neomicina	Sigma – USA
Anfotericina B	Sigma – USA
Benzoilmetronidazol	Sigma – USA
Nistatina	Sigma – USA
Mebendazol	Sigma – USA

3.2.2 Preparo da solução inicial e das soluções de teste

No preparo da solução inicial a substância policristalina $C_9H_{10}N_4O_4 \cdot H_2O$ foi solubilizada DMSO, sendo observadas as seguintes proporções: 0,01g da amostra solubilizada em 1 mL de DMSO, para obter uma concentração inicial de 10mg/mL. Em seguida, esta solução foi diluída em água destilada para uma concentração de 1024µg/mL.

3.2.3 Cepas microbianas

Foram utilizadas cepas microbianas provenientes da “American Type Culture Collection” (ATCC) obtidas através do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde: *Escherichia coli* ATCC 10536; *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4362; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442; *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; *Candida albicans* ATCC 40006; *Candida tropicalis* ATCC 13803, *Candida krusei* ATCC 6258 e linhagens multiresistentes de *Escherichia coli* 27, *Staphylococcus aureus* 358 e *Pseudomonas aeruginosa* 03. Todas as cepas foram mantidas em *slants* com *Heart Infusion Agar* (HIA, Difco Laboratories Ltda.). Antes do ensaio, as células foram cultivadas durante a noite, à 37°C, em infusão cérebro coração (BHI, Difco Laboratories Ltda.) a fim de conservarem inalteradas todas as suas características bioquímicas e perfil de sensibilidade a antimicrobianos.

3.2.3.1 Perfil de resistência bacteriana

Quadro 2: Perfil de Resistência Bacteriana

Bactéria	Origem	Perfil de Resistência
<i>E. coli</i> 27	Ferida cirúrgica	Ast; Amp; Ami; Amox; Ca; Can; Caz; Cip; Cfc; Cf; Clo; Imi; Szt; Tet; Tob
<i>S. aureus</i> 358	Ferida cirúrgica	Ami; But; Can; Gen; Neo; Net Oxa; Para; Sis; Tob;
<i>P. aeruginosa</i> 03	Urocultura	Cpm,Ctz,Imi,Cip,Ptz,Lev,Mer,Ami

Ast-Aztreonan; Amx- Amoxicilina; Amp-Ampicilina; Ami-Amicilina; Amox-Amoxilina, Ca-Cefadroxil; Cfc-cefaclor; Cf-Cefalotina; Caz-Ceftazidima; Cip-Ciprofloxacin; Clo-Clorafenicol; Imi-Imipenem; Can-Canamicina; Szt-Sulfametrim; Tet-Tetraciclina; Tob-Tobramicina; Oxa-Oxacilina; Gen-Gentamicina; Neo- Neomicina; Para- Paramomicina; But-Butirosina; Sis-Sisomicina; Net-Netilmicina; Com-Cefepime; Ctz-Ceftazidime; Ptz-Piperacilina-tazobactam; Lev-Levofloxacin; Mer-Meropenem.

3.2.4 Meios de Cultura Utilizados

Os meios de cultura utilizados foram *Agar Heart Infusion* – HIA (Difco Laboratories Ltda.) e *Brain Heart Infusion* – BHI (padrão e a 10%). Os meios de cultura foram produzidos segundo instruções dos fabricantes e esterilizados em autoclave de vapor quente.

3.2.5 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Os testes para determinação da CIM da substância $C_9H_{10}N_4O_4$ foram feitos através do Método da Microdiluição em Caldo utilizando placas esterilizadas com 96 poços de fundo redondo de acordo com a Norma M7-A6 (CLSI, 2003) (Figura 16, p. 56), com concentrações variando de 512 a $8\mu\text{g/mL}$. Culturas microbianas foram mantidas em Infusão de Coração em Ágar (Heart Infusion Agar – HIA) à temperatura de 4°C . Antes do início dos testes, as devidas linhagens foram repassadas para o meio citado e incubadas a 35°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) por um período de 24 h. As linhagens repicadas a serem testadas foram inoculadas em Caldo BHI a 3,7% e incubadas durante 24 h a 35°C ($\pm 2^\circ\text{C}$).

3.2.5.1 Preparo dos inóculos bacterianos

As suspensões bacterianas previamente padronizadas foram diluídas na proporção 1:10 com caldo BHI para obtenção da concentração final de 10^5 células/mL (NCCLS 2000b) (Figura 15).

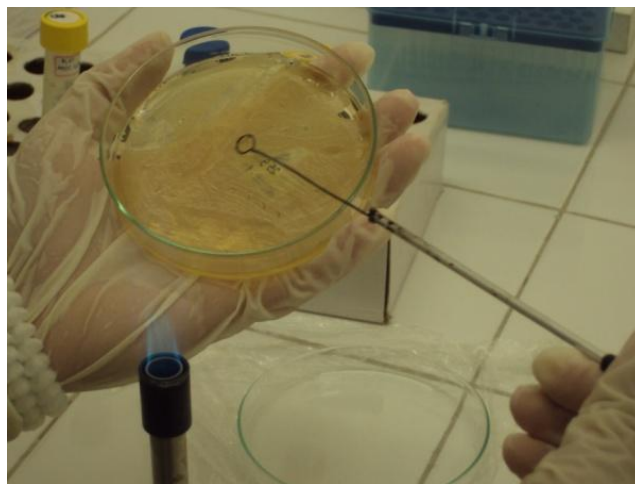


Figura 15: Preparo dos inóculos bacterianos.

3.2.5.2 Execução e leitura dos ensaios

A solução da amostra $C_9H_{10}N_4O_4 \cdot H_2O$ foi preparada separadamente utilizando 10 mg da amostra solubilizada em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) obtendo uma concentração inicial de 10 mg/mL. A partir desta concentração, realizaram-se diluições em água destilada estéril para obter uma solução estoque de 1024 $\mu\text{g/mL}$. As concentrações finais da amostra no meio de cultura foram 512, 256, 128, 64, 32, 16 e 8 $\mu\text{g/mL}$.

Utilizando-se 100 μL do meio de cultura com a suspensão bacteriana e fúngica em cada cavidade (Figura 16); foi realizada diluição seriada com a suspensão da amostra na proporção 1:1. As placas preenchidas foram incubadas a 35°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) por 24 h (JAVADPOUR *et al.*, 1996).

Preparou-se uma solução indicadora de resazurina sódica em água destilada estéril na concentração 0,01% (p/v) para evidenciar a Concentração Inibitória Mínima das soluções frente às linhagens bacterianas padrão. Após a incubação, 20 μL da solução indicadora foram adicionados em cada cavidade e, depois do período de 1 h em temperatura ambiente fez-se a leitura dos resultados. A mudança da coloração azul para rosa é devido à redução da resazurina e indica que houve crescimento bacteriano (MANN, MARKHAN, 1998; PALOMINO *et al.*, 2002). As placas contendo as cepas fúngicas foram reveladas através de visualização da turvação no meio; desta forma é possível verificar a CIM, definida como sendo a menor concentração da droga capaz de inibir o crescimento bacteriano.

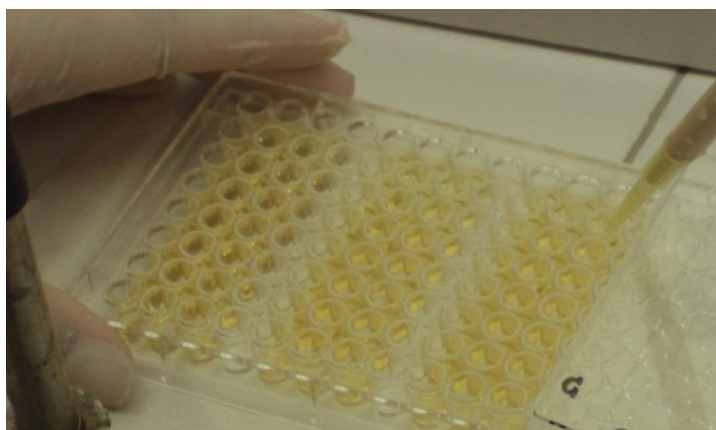


Figura 16: Microdiluição em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI).

3.2.6 Modulação da atividade antimicrobiana

No teste de modulação é feita a avaliação da interferência da substância $C_9H_{10}N_4O_4$ sobre a resistência aos antibióticos aminoglicosídeos e antifúngicos. Para avaliar a substância $C_9H_{10}N_4O_4$ como possível moduladora da ação antibiótica e antifúngica, a CIM de antibióticos da classe dos aminoglicosídeos (amicacina, gentamicina e neomicina) e a CIM antifúngica foram avaliadas na presença e na ausência da substância $C_9H_{10}N_4O_4$ em microplacas estéreis. Os aminoglicosídeos foram avaliados nas concentrações variando de 2500 a $2,5\mu\text{g/mL}$ pelo método de microdiluição em caldo (CLSI, 2003). As linhagens utilizadas foram inoculadas em caldo BHI a 10% e incubadas em estufa bacteriológica a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 h. As cepas leveduriformes foram inoculadas em caldo Sabouraud a 10% e mantidas em temperatura ambiente até o momento do ensaio. O teste foi monitorado com um controle positivo contendo apenas os antibióticos e os microorganismos.

3.2.6.1 Execução e leitura dos ensaios

A solução da substância $C_9H_{10}N_4O_4$ foi adicionada em caldo BHI 10% em concentrações subinibitórias, obtidas e determinadas após a realização do teste de avaliação da CIM; sendo que para o teste de modulação a concentração da solução da $C_9H_{10}N_4O_4$ foi reduzida 8 vezes (CIM/8). A preparação das soluções de antibióticos foi realizada com a adição de água destilada estéril a uma concentração $5000\mu\text{g/mL}$, as concentrações finais dos antibióticos no meio de cultura foram de 512 a $0,5\mu\text{g/mL}$. No caso das soluções de antifúngicos a preparação foi realizada com a adição de água destilada estéril a uma concentração de $1024\mu\text{g/mL}$. Volumes de $100\mu\text{L}$ contendo inóculo bacteriano e fúngico com suspensão da amostra em caldo BHI 10% foram utilizados para preenchimento dos poços da microplaca estéril. Foram então, efetuadas diluições seriadas com os aminoglicosídeos e antifúngicos na proporção de 1:1. Os mesmos controles utilizados na avaliação da CIM para a $C_9H_{10}N_4O_4$ foram utilizados na modulação (SATO *et al.*, 2004, modificado). As microplacas preenchidas foram incubadas a 35°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) por 24 h e após esse período a leitura foi efetuada com a utilização da solução indicadora de rezasurina como citado anteriormente no teste de verificação da CIM e visualização da turvação, onde o aumento da turbidez ou opacidade no meio indica o crescimento das leveduras.

3.3 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO E ESPALHAMENTO RAMAN

Amostras policristalinas da substância $C_9H_{10}N_4O_4 \cdot H_2O$ foram caracterizadas por técnicas de espectroscopias infravermelho e Raman no Laboratório de Espalhamento Raman do Departamento de Física da Universidade Federal do Ceará -UFC.

As medidas por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) foram realizadas usando o espectrofotômetro da marca Bruker, modelo Equinox-55. As amostras foram diluídas em KBr na razão média de 1:100 e prensadas em forma de pastilhas. O espectro de transmitância foi registrado, na região de 400 a 4000 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} .

As medidas de espalhamento Raman com transformada de Fourier (FT-Raman) foram realizadas utilizando o equipamento FT-Raman Bruker Vertex 70 com módulo Ram II com a amostra excitada na linha 1064 nm de laser de Nd:YAG e usando uma potência de laser de 150 mW. O espectros Raman foi registrados na região de 40 a 4000 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} .

O equipamento utilizado para a realização de medidas FT-IR e FT-Raman está ilustrado na Figura 17.



Figura 17: Espectrômetro utilizado nas medidas FT-Raman e FT-IR.

3.4 MÉTODOS COMPUTACIONAIS

O algoritmo baseado na Teoria do Funcional da Densidade (DFT) foi utilizado nos cálculos computacionais desta dissertação, e todos os cálculos foram realizados usando o programa Gaussian 03 (FRISCH *et al.*, 2003). Os cálculos DFT foram realizados numa molécula isolada de $C_9H_{10}N_4O_4 \cdot H_2O$ utilizando o funcional de correlação Lee-Yang-Parr B3LYP e o conjunto de base 6-31 G (d, p) (LEE *et al.*, 1988; PARR *et al.*, 1989; BECKE *et al.*, 1993). A estrutura molecular de $C_9H_{10}N_4O_4 \cdot H_2O$ foi otimizada e as frequências vibracionais foram então calculadas. O arquivo de saída contém a estrutura otimizada, as frequências vibracionais e os deslocamentos atômicos de cada modo.

Na estrutura otimizada da molécula, nenhum modo de frequência imaginária foi obtido, provando que um verdadeiro mínimo sobre a superfície de energia potencial foi encontrado. As atribuições das vibrações moleculares foram baseadas em cálculos da distribuição de energia potencial (PED) usando o programa Gar2ped (MARTIN *et al.*, 2007). Este procedimento permitiu atribuir com boa precisão as vibrações moleculares presentes nos espectros Raman e infravermelho de $C_9H_{10}N_4O_4 \cdot H_2O$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O composto 1,2,4-triazol e seus derivados têm sido usados como materiais de partida para a síntese de muitos compostos heterocíclicos aromáticos (DESENKO *et al.*, 1995). Estudos indicam que o grupo 1,2,4-triazol está associado com ação anti-inflamatória (GUPTA *et al.*, 1978), e também com atividades farmacológicas, tais como antiviral (JONES *et al.*, 1965), analgésica (SUGHEN *et al.*, 1978), antimicrobiana (CANSIZ *et al.*, 2001), antidepressiva (KANE *et al.*, 1988) e antifúngicas (MASSA *et al.*, 1992). Por outro lado, compostos cíclicos que contém o ácido de Meldrum (2,2-Dimetil-1,3-dioxano-4,6-diona) e os seus análogos 5-arilaminometileno desempenham um papel importante na química heterocíclica como agentes intermediários para a formação de novos produtos heterocíclicos aromáticos (GABER *et al.*, 2001).

4.1 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

4.1.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) – bactérias e fungos

A utilização da associação de antimicrobianos continua a ser avaliada pela capacidade de suprimir o aparecimento de mutantes resistentes, e produzir um efeito sinérgico “*in vivo*”. Uma tentativa de manter o uso de antimicrobianos atuais poderia ser encontrada em sua combinação com outros produtos, que representariam uma opção terapêutica no tratamento de infecções causadas por *S. aureus* e outros patógenos, no que diz respeito ao aparecimento crescente de resistência múltipla (MAIA *et al.*, 2009).

No teste de verificação da CIM utilizando a substância $C_9H_{10}N_4O_4$ na concentração de 1024µg/mL observou-se na leitura da microplaca com a adição da solução indicadora de resazurina que todas as cavidades mudaram da coloração azul para rosa indicando que houve crescimento bacteriano em todas as concentrações testadas; em relação às cepas fúngicas, observou-se na leitura da microplaca que em todas as cavidades houve turvação do meio; ou seja, a CIM é maior ou igual a 1024µg/mL (Tabela 3).

Tabela 3: Concentração Inibitória Mínica (CIM) da $C_9H_{10}N_4O_4$, sobre cepas microbianas.

Bactérias e Fungos		CIM ($\mu\text{g/mL}$)
		$C_9H_{10}N_4O_4$
<i>S. aureus</i>	ATCC 25923	≥ 1024
<i>E. coli</i>	ATCC 10536	≥ 1024
<i>P. aeruginosa</i>	ATCC 15442	≥ 1024
<i>K. pneumoniae</i>	ATCC 4362	≥ 1024
<i>C. albicans</i>	ATCC 40006	≥ 1024
<i>C. tropicalis</i>	ATCC 13803	≥ 1024
<i>C. krusei</i>	ATCC 6258	≥ 1024

4.1.2 Modulação da atividade antimicrobiana

4.1.2.1 Atividade moduladora por contato direto - bactérias

A Tabela 4 mostra a interferência da $C_9H_{10}N_4O_4$ em concentrações subinibitórias (CIM/8) sobre a atividade de aminoglicosídeos, demonstrando uma interferência na atividade antibiótica sobre algumas cepas. Observou-se que em relação a *Escherichia coli* 27 a $C_9H_{10}N_4O_4$ apresentou sinergismo com a amicacina, pois verificou-se que a concentração subinibitória diminuiu de 19,5 para 4,9; já com a gentamicina e neomicina verificou-se que não houve mudança significativa nas concentrações subinibitórias. Em relação a *Staphylococcus aureus* 358 a $C_9H_{10}N_4O_4$ apresentou sinergismo com a amicacina, gentamicina e neomicina pois diminuiu a concentração subinibitória de 19,5 para 2,4; 9,8 para 2,4 e 312,5 para 78,1 respectivamente. Com relação à *Pseudomonas aeruginosa* 03 a $C_9H_{10}N_4O_4$ apresentou sinergismo com a gentamicina, pois diminuiu a concentração subinibitória de 156,2 para 39,0; não havendo mudanças significativas em relação à amicacina e à neomicina.

Tabela 4: Valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM µg/mL) de aminoglicosídeos na presença e ausência da amostra em concentrações subinibitórias (CIM/8) sobre cepas resistentes.

<i>Escherichia coli</i> 27	C ₉ H ₁₀ N ₄ O ₄ (µg/mL)	CONTROLE (µg/mL)
Amicacina	4,9	19,5
Gentamicina	4,9	4,9
Neomicina	625	1250
<i>Staphylococcus aureus</i> 358	C ₉ H ₁₀ N ₄ O ₄ (µg/mL)	CONTROLE (µg/mL)
Amicacina	2,4	19,5
Gentamicina	2,4	9,8
Neomicina	78,1	312,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 03	C ₉ H ₁₀ N ₄ O ₄ (µg/mL)	CONTROLE (µg/mL)
Amicacina	78,1	78,1
Gentamicina	39,0	156,2
Neomicina	625	1250

Estudos realizados por Cansiz (2001), indicam que a presença do grupamento 1,2,4-triazol, presente na molécula C₉H₁₀N₄O₄, confere efeitos antimicrobianos comprovados. Portanto, os resultados desse estudo demonstram um aumento da atividade de aminoglicosídeos frente a algumas cepas Gram-positivas e Gram-negativas, quando associados à C₉H₁₀N₄O₄. Os antibióticos aminoglicosídeos apresentam efeito bactericida por ligarem-se especificamente à subunidade 30S dos ribossomos bacterianos, impedindo o movimento do ribossomo ao longo do mRNA e, conseqüentemente, interrompendo a síntese de proteínas (GUIMARÃES *et al.*, 2010).

Os ensaios antibacterianos demonstram que a C₉H₁₀N₄O₄ possui melhor efeito bactericida frente a microrganismos Gram-positivos, pois modulou a atividade antibiótica produzindo sinergismo com todos os aminoglicosídeos testados quando exposto ao *Staphylococcus aureus*. Por outro lado, as Gram-negativas, *E. coli* e *P. aeruginosa* foram menos sensíveis apresentando sinergismo apenas com a amicacina e gentamicina, respectivamente. Estes resultados concordam com os encontrados na literatura que demonstram uma menor sensibilidade das bactérias Gram-negativas, pois as mesmas possuem parede bacteriana diferenciada, apresentando uma membrana externa composta por lipopolissacarídeos (LPS), conferindo maior resistência à célula bacteriana (PALANIAPPAN, HOLLEY, 2010).

Algumas estratégias podem ser adotadas para evitar o desenvolvimento de resistência bacteriana: prevenção de infecções bacterianas com o uso de vacinas, uso racional de antibióticos, controle e prevenção da disseminação de microrganismos resistentes, descoberta de desenvolvimento de novos antibióticos (MOELLERING JR., 2008). A combinação dos antimicrobianos atuais com substâncias puras, isoladas e sintetizadas em laboratório poderiam representar uma opção terapêutica no tratamento de infecções causadas por *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e outros patógenos, como também, na diminuição da resistência múltipla.

4.1.2.2 Atividade moduladora por contato direto - fungos

As infecções oportunistas por espécies de *Candida* possuem tratamento limitado devido ao fato de muitos antifúngicos apresentarem efeitos colaterais indesejáveis, tais como a nefrotoxicidade, podendo também, induzir à resistência múltipla aos antifúngicos disponíveis, principalmente em pessoas imunodeprimidas (FICA, 2004).

A Tabela 5 mostra que a associação entre a $C_9H_{10}N_4O_4$ em concentrações subinibitórias (CIM/8) com os antifúngicos: anfotericina, nistatina, benzoilmetronidazol e mebendazol frente a espécies de *Candida* não interferiu na atividade antifúngica, pois a CIM dos antifúngicos permaneceu a mesma.

Tabela 5: Valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM µg/mL) dos antifúngicos na presença e ausência da $C_9H_{10}N_4O_4$ em concentrações subinibitórias (CIM/8) sobre cepas originárias da ATCC.

<i>C. albicans</i> / <i>C. tropicalis</i> / <i>C. krusei</i>	$C_9H_{10}N_4O_4$ (µg/mL)	CONTROLE (µg/mL)
Anfotericina	≥ 1024	≥ 1024
Nistatina	≥ 1024	≥ 1024
Benzoilmetronidazol	≥ 1024	≥ 1024
Mebendazol	≥ 1024	≥ 1024

O tratamento das micoses humanas não é sempre efetivo, pois os fármacos antifúngicos disponíveis produzem recorrência ou causam resistência, além de apresentarem importante toxicidade. Por esta razão, há uma busca contínua de novos fármacos antifúngicos mais potentes, mas, sobretudo, mais seguros que os existentes (FENNER, 2006).

Uma grande quantidade de fármacos obtida através da síntese orgânica têm sido utilizada no tratamento de infecções micóticas (LIMA *et al.*, 2006). Com frequência, as infecções fúngicas são de difícil tratamento, fato intrinsecamente relacionado à aquisição por parte de seus agentes etiológicos de resistência frente à ação de antifúngicos (ARAÚJO *et al.*, 2004). Nossos resultados demonstram que a substância orgânica analisada não atuou de forma positiva, pois a mesma não apresentou atividade antifúngica frente às cepas.

4.2 ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL

Um aspecto importante relacionado às substâncias com potencialidade de uso farmacêutico diz respeito às suas estabilidades térmicas. Esta estabilidade pode ser inferida por diversas técnicas experimentais, incluindo análise espectroscópica. Assim, ao utilizar-se espectroscopia vibracional é possível entender os diversos tipos de vibração de uma determinada substância e, posteriormente, entender o comportamento térmico da mesma.

A estrutura básica da molécula $C_9H_{10}N_4O_4 \cdot H_2O$ é caracterizada por dois anéis (R1, R2). O anel R1 aromático é formado pelos átomos C1, C2, N1, N2 e N3 que fazendo uma analogia corresponde ao grupo funcional tipo 1,2,4 triazol. Por outro lado, o anel R2 é formado pelos átomos C4, C5, C6, C7, O2 e O3 que corresponde ao anel do ácido Meldrum (2,2-dimetil-1,3-dioxano-4,6-diona). A estrutura molecular e a nomenclatura usada para descrever os átomos da molécula $C_9H_{10}N_4O_4 \cdot H_2O$ é mostrada na Figura 18.

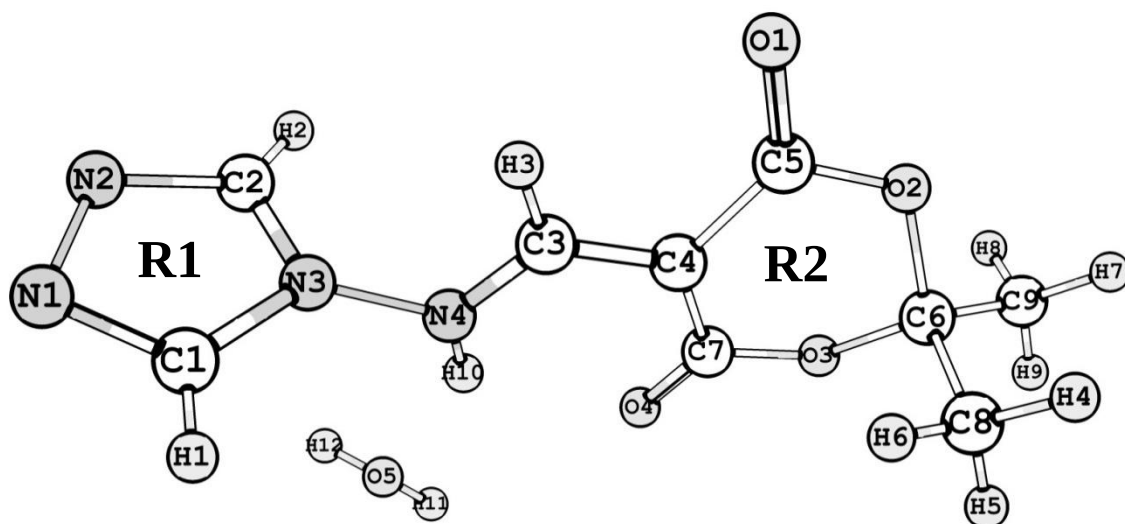


Figura 18: Estrutura molecular do composto $C_9H_{10}N_4O_4 \cdot H_2O$

O cristal da substância 5-[(4*H*-1,2,4-triazol-4-ilamino)metileno]-2,2-dimetil-1,3-dioxano-4,6-diona monohidratada, $C_9H_{10}N_4O_4 \cdot H_2O$ na temperatura ambiente pertence à estrutura monoclinica com grupo espacial $P2_1/c$ com $Z=4$ (quatro unidades por célula unitária) e parâmetros de rede $a=18.012 \text{ \AA}$, $b=5.356 \text{ \AA}$, $c=12.937 \text{ \AA}$ com $\beta=108.786^\circ$ (JOUSSEF *et al.*, 2005). A distribuição das quatro moléculas de $C_9H_{10}N_4O_4 \cdot H_2O$ na célula unitária é mostrada na Figura 19, onde as linhas tracejadas representam as ligações de hidrogênio entre as moléculas. Tal tipo de ligação é o principal responsável pela

estabilização da estrutura no estado sólido, tal como ocorre com vários outros materiais orgânicos. A Figura 20 mostra as ligações de hidrogênio na estrutura cristalina do composto $C_9H_{10}N_4O_4 \cdot H_2O$ ao longo de um plano cristalino.

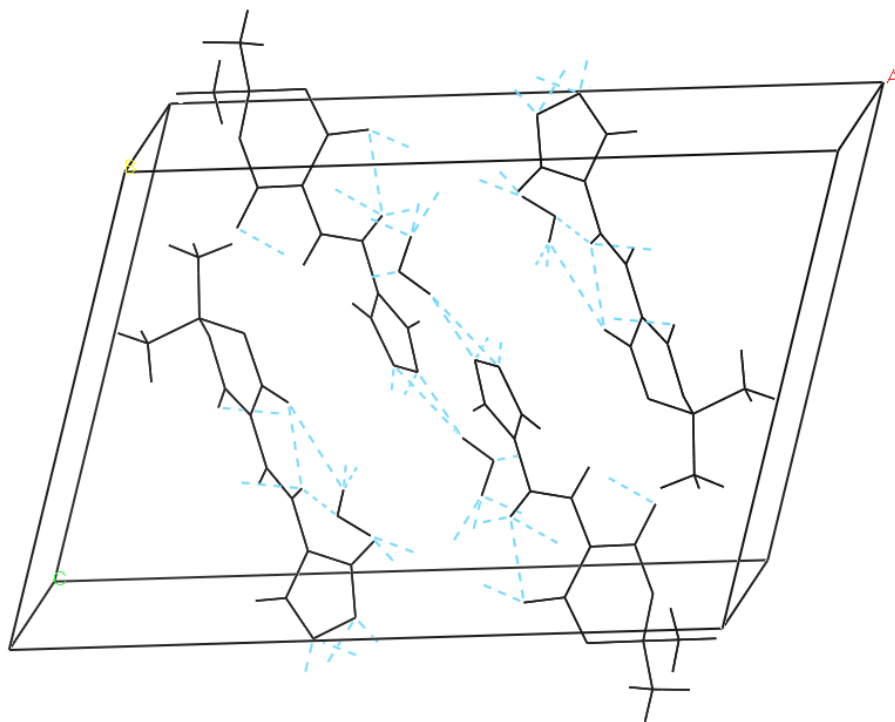


Figura 19: Estrutura cristalina do composto $C_9H_{10}N_4O_4 \cdot H_2O$

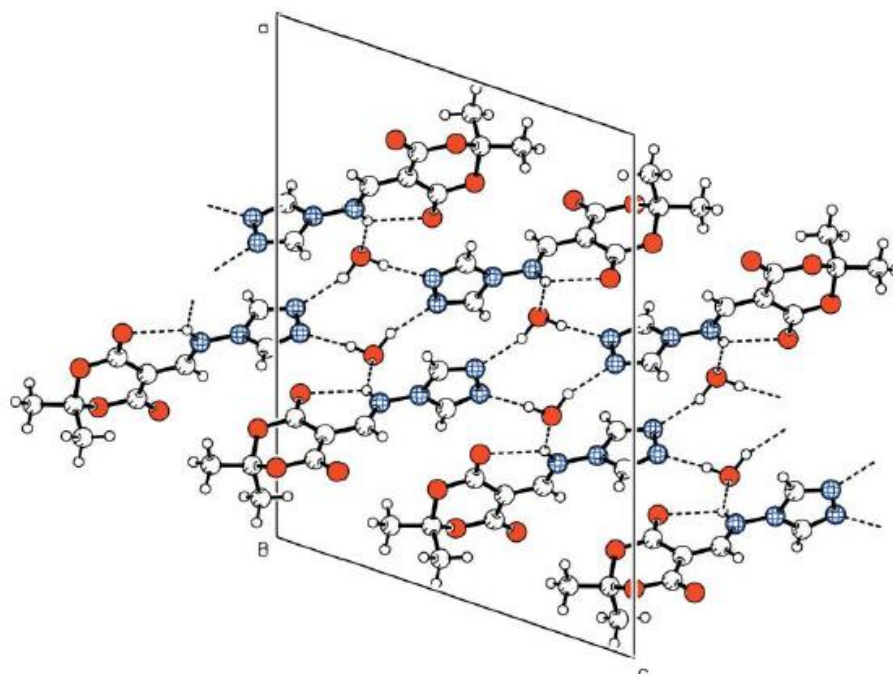


Figura 20: Ligações de hidrogênio na estrutura cristalina do composto $C_9H_{10}N_4O_4 \cdot H_2O$ ao longo de um plano cristalino

A Tabela 6 mostra, respectivamente, comprimentos de ligação, ângulos de ligação, ângulos diedros e ligação de hidrogênio para a estrutura otimizada da molécula $C_9H_{10}N_4O_4 \cdot H_2O$ (Calc.) e as obtidas a partir de análise de raios-X de referência (Exp.) (JOUSSEF *et al.*, 2005). Na Figura 21 é apresentada a superposição da estrutura molecular $C_9H_{10}N_4O_4 \cdot H_2O$ otimizada por DFT e a obtida por difração de raios X. A concordância entre a estrutura molecular otimizada e a experimental está mostrando ser muito boa, de modo que, a geometria de otimização da molécula quase reproduz exatamente a conformação experimental.

Tabela 6: Parâmetros geométricos experimentais e calculados do composto $C_9H_{10}N_4O_4 \cdot H_2O$

COMPRIMENTOS DE LIGAÇÃO

Comprimento da ligação	Exp. (Å)	Calc. (Å)	Comprimento da ligação	Exp. (Å)	Calc. (Å)
C1—N1	1.293	1.306	C5—O2	1.365	1.369
C1—N3	1.348	1.375	O2—C6	1.433	1.431
C1—H1	0.930	1.080	C6—O3	1.436	1.446
N1—N2	1.387	1.390	C6—C8	1.500	1.527
N2—C2	1.299	1.306	C6—C9	1.502	1.517
C2—N3	1.346	1.376	O3—C7	1.362	1.356
C2—H2	0.930	1.080	C7—O4	1.211	1.224
N3—N4	1.391	1.384	C8—H4	0.960	1.092
N4—C3	1.317	1.340	C8—H5	0.960	1.092
N4—H10	0.860	1.036	C8—H6	0.960	1.093
C3—C4	1.367	1.378	C9—H7	0.960	1.092
C3—H3	0.930	1.087	C9—H8	0.960	1.092
C4—C7	1.437	1.456	C9—H9	0.960	1.092
C4—C5	1.451	1.474	O5—H11	0.910	0.973
C5—O1	1.207	1.211	O5—H12	0.960	0.966

ÂNGULOS DE LIGAÇÃO

Ângulo de ligação	Exp. (°)	Calc. (°)	Ângulo de ligação	Exp. (°)	Calc. (°)
N1—C1—N3	109.7	110.0	O2—C6—O3	110.2	111.5
N1—C1—H1	125.1	127.1	O2—C6—C8	110.00	110.8
N3—C1—H1	125.1	122.9	O3—C6—C8	109.9	109.4
C1—N1—N2	107.6	107.6	O2—C6—C9	106.5	106.3
C2—N2—N1	106.6	107.6	O3—C6—C9	106.3	105.8
N2—C2—N3	110.1	110.0	C8—C6—C9	113.8	113.6
N2—C2—H2	124.9	127.1	C7—O3—C6	117.8	119.4
N3—C2—H2	124.9	122.9	O4—C7—O3	117.8	118.3
C2—N3—C1	105.9	104.9	O4—C7—C4	125.6	125.0
C2—N3—N4	127.0	127.5	O3—C7—C4	116.6	116.6

Ângulo de ligação	Exp. (°)	Calc. (°)	Ângulo de ligação	Exp. (°)	Calc. (°)
C1—N3—N4	127.0	127.4	C6—C8—H4	109.5	109.6
C3—N4—N3	119.5	119.2	C6—C8—H5	109.5	110.0
C3—N4—H10	125.8	126.2	H4—C8—H5	109.5	111.0
N3—N4—H10	114.7	114.6	C6—C8—H6	109.5	111.0
N4—C3—C4	126.4	128.5	H4—C8—H6	109.5	108.5
N4—C3—H3	116.8	115.1	H5—C8—H6	109.5	108.6
C4—C3—H3	116.8	116.4	C6—C9—H7	109.5	109.8
C3—C4—C7	121.8	123.4	C6—C9—H8	109.5	109.5
C3—C4—C5	117.2	115.8	H7—C9—H8	109.5	109.1
C7—C4—C5	120.8	120.5	C6—C9—H9	109.5	110.0
O1—C5—O2	117.9	119.4	H7—C9—H9	109.5	109.3
O1—C5—C4	126.3	125.3	H8—C9—H9	109.5	109.2
O2—C5—C4	115.8	115.3	H11—O5—H12	107.0	104.7
C5—O2—C6	118.3	119.5			

ÂNGULOS DIEDROS

Ângulo diedro	Exp. (°)	Calc. (°)	Ângulo diedro	Exp. (°)	Calc. (°)
N3—C1—N1—N2	0.6	0.4	C7—C4—C5—O2	-5.4 (3)	-7.1
C1—N1—N2—C2	0.1	0.2	O1—C5—O2—C6	159.2 (2)	161.2
N1—N2—C2—N3	-0.8	-0.7	C4—C5—O2—C6	-23.0 (3)	-21.5
N2—C2—N3—C1	1.1	0.9	C5—O2—C6—O3	49.5 (2)	46.2
N2—C2—N3—N4	176.18	176.3	C5—O2—C6—C8	-71.8 (2)	-75.4
N1—C1—N3—C2	-1.1	-0.8	C5—O2—C6—C9	164.38 (18)	161.1
N1—C1—N3—N4	-176.12	-176.2	O2—C6—O3—C7	-49.7 (2)	-44.2
C2—N3—N4—C3	77.5	86.9	C8—C6—O3—C7	71.7 (2)	78.0
C1—N3—N4—C3	-108.4	-98.7	C9—C6—O3—C7	-164.71 (18)	-159.3
N3—N4—C3—C4	-177.2	-178.8	C6—O3—C7—O4	-159.60 (18)	-164.8
N4—C3—C4—C7	2.8	2.7	C6—O3—C7—C4	23.6 (3)	17.7
N4—C3—C4—C5	177.6	177.0	C3—C4—C7—O4	3.1 (3)	5.6
C3—C4—C5—O1	-2.6	-4.5	C5—C4—C7—O4	-171.5 (2)	-168.5
C7—C4—C5—O1	172.2	170.0	C3—C4—C7—O3	179.60 (18)	177.2
C3—C4—C5—O2	179.8	178.5	C5—C4—C7—O3	5.0 (3)	8.8

LIGAÇÕES DE HIDROGÊNIO

Ligação de Hidrogênio (Å, °)								
D—H...A	D—H		H...A		D...A		D—H...A	
	Exp.	Cal.	Exp.	Cal.	Exp.	Cal.	Exp.	Cal.
N4—H10...O4	0.9	1.0	2.2	2.3	2.8	2.9	119.6	112.3
N4—H10...O5	0.9	1.0	2.0	1.8	2.7	2.8	142.0	164.8

A Figura 21 demonstra a superposição das estruturas moleculares de $C_9H_{10}N_4O_4 \cdot H_2O$, otimizada por DFT, em azul, e a obtida por difração de raios-X, em vermelho, confirmando a ocorrência de boa concordância entre as mesmas.

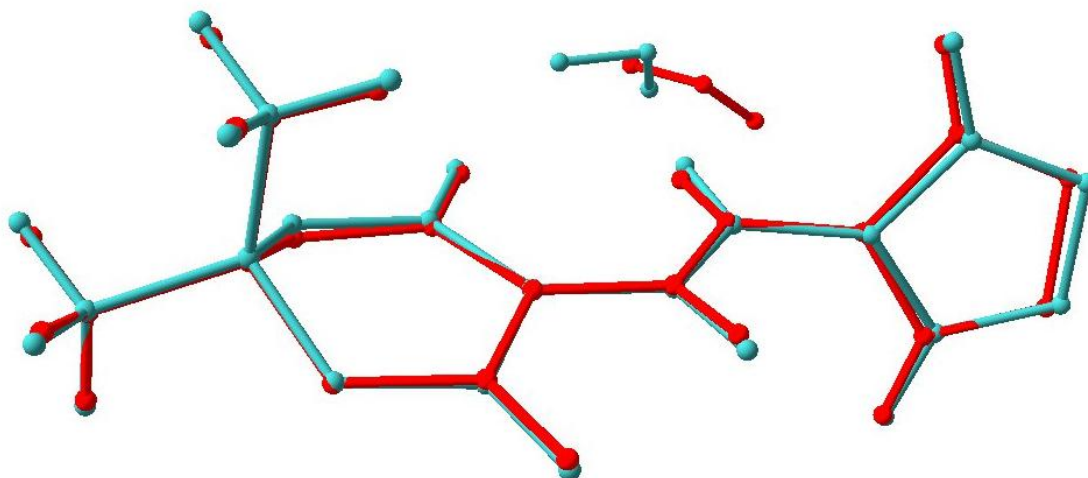


Figura 21: Estrutura molecular de $C_9H_{10}N_4O_4 \cdot H_2O$ otimizada por DFT (azul) e a obtida por difração de raios-X (vermelho).

A molécula $C_9H_{10}N_4O_4 \cdot H_2O$ contém 30 átomos e, portanto, possui 84 modos normais de vibração.

Os espectros FT-Raman e FT-IR de amostras policristalinas da substância 5-[(4H-1,2,4-triazol-4-ilamino)metileno]-2,2-dimetil-1,3-dioxano-4,6-diona monohidratada $C_9H_{10}N_4O_4 \cdot H_2O$ são apresentados nas Figuras 22 e 23, respectivamente. Eles foram registrados à temperatura ambiente nas regiões de 40 cm^{-1} a 4000 cm^{-1} , e de 400 cm^{-1} a 4000 cm^{-1} , respectivamente.

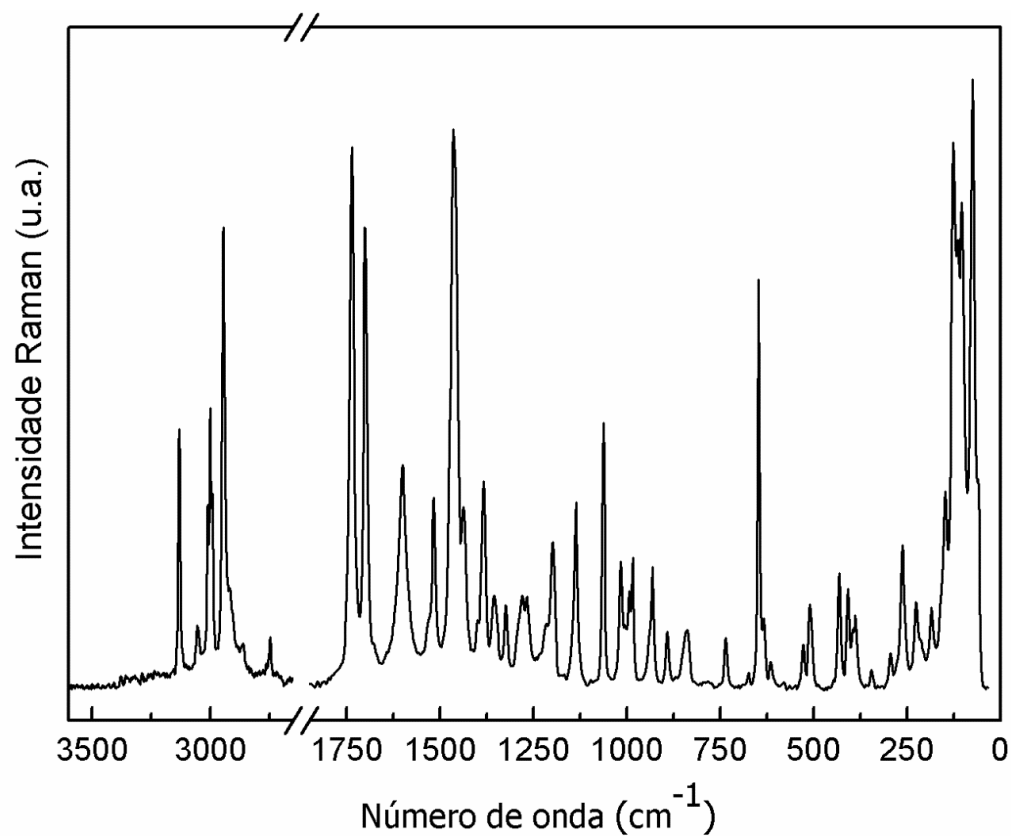


Figura 22: Espectro FT-Raman de amostra policristalina de $C_9H_{10}N_4O_4 \cdot H_2O$

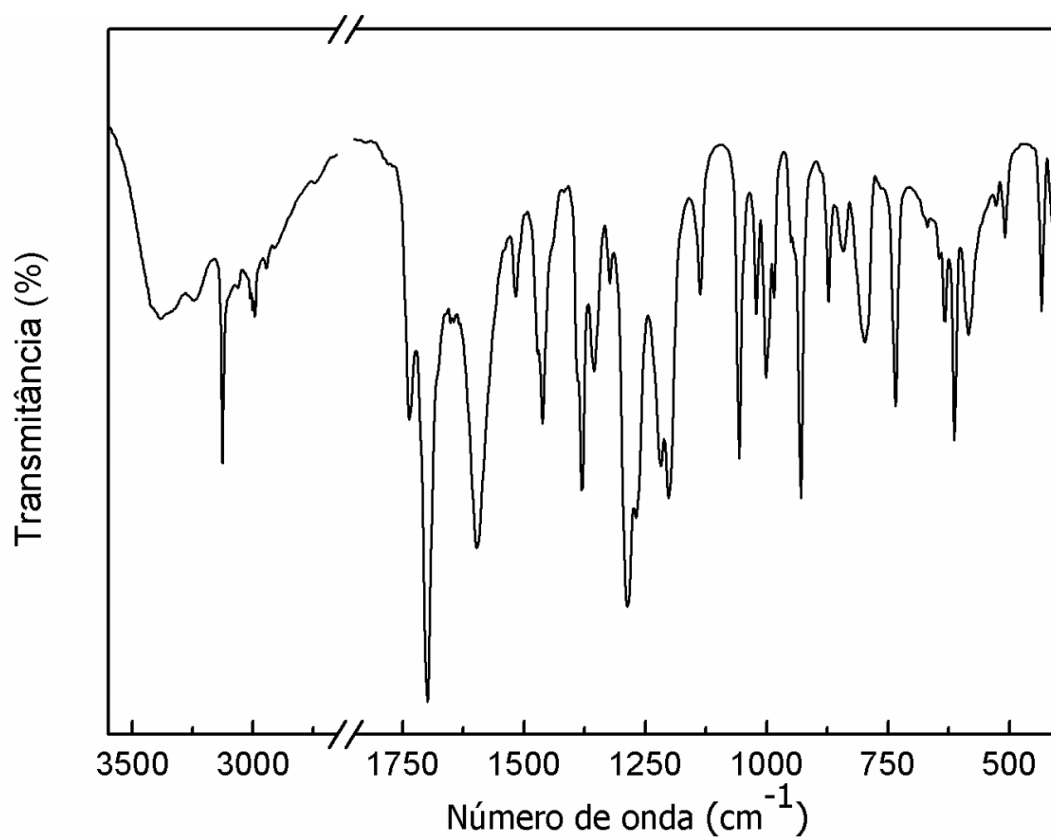


Figura 23: Espectro FT-IR de amostra policristalina de $C_9H_{10}N_4O_4 \cdot H_2O$

O Quadro 3 lista uma descrição detalhada das atribuições dos modos vibracionais do cristal $C_9H_{10}N_4O_4 \cdot H_2O$. Nas primeira e segunda colunas encontram-se os valores das frequências calculadas e escaladas, respectivamente. Os valores experimentais correspondentes ao número de onda para o cristal obtido por espectroscopias FT-Raman e FT-IR, são apresentados nas terceira e quarta colunas, respectivamente. Na quinta coluna observam-se as atribuições dos modos vibracionais juntamente com a distribuição de energia potencial (PED), para valores maiores do que 10%. A contribuição percentual da PED para cada modo vibracional é mostrada entre parênteses nesta coluna.

Para descrever as atribuições das vibrações moleculares os seguintes símbolos foram usados: τ = torção; *sc* = *scissoring*; *wag* = *wagging*, δ = deformação; δ_{out} = deformação fora do plano; ν = estiramento; ν_{as} = estiramento assimétrico; ν_s = estiramento simétrico. No que diz respeito à classificação da intensidade das bandas de Raman e infravermelho, foi utilizada a notação seguinte: vs, s, m, w e vw, respectivamente, representando intensidade muito forte, forte, média, fraca e muito fraca.

As frequências calculadas são comparadas com as posições da banda Raman e infravermelho e as atribuições para cada modo de vibração são apresentadas no Quadro 4. Uma boa concordância foi observada quando as frequências calculadas são ajustadas pelo fator de escala 0,9495.

Quadro 3: Frequência calculada (ω_{calc}), frequência escalada (ω_{scal}) pelo fator de escala 0,9495, posições das bandas Raman ($\omega_{\text{FT-Raman}}$) e IR ($\omega_{\text{FT-IR}}$) em unidades de cm^{-1} e classificação para os modos vibracionais de $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ com PED

ω_{calc}	ω_{scal}	$\omega_{\text{FT-Raman}}$	$\omega_{\text{FT-IR}}$	Classificação dos modos vibracionais com PED* (%)
30	28			δ_{out} (C7C4C3C5) (73) + δ_{out} (C3N4HN3) (18)
35	33			δ_{out} (C3N4HN3) (89)
39	37			δ_{out} (C3N4HN3) (79) + δ_{out} (C7C4C3C5) (14)
52	49	61 m		δ_{out} (C2N3N4C1) (72)
78	74	74 vs		δ_{out} (C3N4HN3) (90)
104	99	104 vs		R2[τ (C4C5O2C6)] (95)
121	115	115 vs		R2[δ (C7C4C5;O2O3C6)] (32) + δ_{out} (C2N3N4C1) (27) + δ_{out} (C7C4C3C5) (18)
130	123	125 vs		δ_{out} (C7C4C3C5) (42) + R2[τ (C4C5O2C6)] (18) + R2[δ (C4O2C5;O3C4C7)] (13)
160	152	148 m		R2[τ (C4C5O2C6)] (20) + δ_{out} (C3N4HN3) (20) + δ_{out} (C2N3N4C1) (13) + R2[δ (C4O2C5;O3C4C7)] (13)
201	191	161m		δ_{out} (C7C4C3C5) (65) + δ_{out} (C2N3N4C1) (15)
217	206	185 m		δ_{out} (C7C4C3C5) (84) + δ_{out} (C3N4HN3) (11)
220	209	207 w		R2[τ (C8H ₃ ;C9H ₃)] (79) + δ_{out} (C7C4C3C5) (16)
250	237	214 w		R2[δ (C7C4C5;O2O3C6)] (70) + δ_{out} (C2N3N4C1) (13)
258	245	226 m		R2[τ (C8H ₃ ; C9H ₃)] (33) + R2[δ (C4O2C5;O3C4C7)] (21) + δ_{out} (C3N4HN3) (17)
259	246	263 m		R2[τ (C8H ₃ ;C9H ₃)] (42) + δ (HO5H) (29) + δ_{out} (C3N4HN3) (13)
296	281	295 w		R2[τ (C4C5O2C6)] (41) + R2[δ (C4O2C5;C6C7O3)] (26) + R2[τ (C8H ₃ ;C9H ₃)] (26)
335	318	317 vw		δ_{out} (C7C4C3C5) (24) + R2[δ (C4O2C5;O3C4C7)] (17) + δ (HN4N3) (16)
343	326	328 vw		δ_{out} (C7C4C3C5) (59) + δ_{out} (C3N4HN3) (35)
387	367	346 w		R2[τ (C4C5O2C6)] (60) + δ_{out} (C3N4HN3) (17) + δ (C6C8H) (11)
401	381	360 vw		δ_{out} (C7C4C3C5) (51) + δ_{out} (C3N4HN3) (28)
419	398	389 m		δ_{out} (C7C4C3C5) (58) + δ_{out} (C3N4HN3) (15) + δ_{out} (C4C3HN4) (14)
422	401	396 m		δ_{out} (C3N4HN3) (81)
433	411	408 m	412 m	δ_{out} (C7C4C3C5) (61) + δ_{out} (C3N4HN3) (22) + δ_{out} (C4C3HN4) (11)
505	479	432 m	434 s	R2[δ (C4O2C5;C6C7O3)] (49) + R2[δ (C4O2C5;O3C4C7)] (26) + δ_{out} (C7C4C3C5) (11)
509	483	447 vw		R2[δ (C7C4C5;O2O3C6)] (95)
525	498	487 vw		R2[δ (C7C4C5;O2O3C6)] (78) + δ_{out} (C7C4C3C5) (17)
588	558	510 m	509 m	R1[τ (N2N1C1N3)] (43) + δ (HN4N3) (30) + δ_{out} (C2N3N4C1) (13)
625	593	529 m	528 w	R1[τ (N2N1C1N3)] (54) + δ_{out} (C2N3N4C1) (20)
638	606	550 vw		R1[τ (N2N1C1N3)] (44) + δ_{out} (C2N3N4C1) (26)
644	611	564 vw		δ_{out} (C7C4C3C5) (49) + R2[δ (C7C4C5;O2O3C6)] (23)
684	649	581vw	584 s	R1[τ (N2N1C1N3)] (57) + R1[δ_{out} (N3C1HN1)] (24)
721	685	615 w	613 s	δ_{out} (C4C3HN4) (63) + R2[τ (C4C5O2C6)] (22) + δ_{out} (C3N4HN3) (13)
741	704	634 m	634 m	δ_{out} (C7C4C3C5) (46) + R2[δ (C7C4C5;O2O3C6)] (31)
784	744	648 s	644 m	δ_{out} (C7C4C3C5) (92)
806	765	675 w	669 w	R1[δ_{out} (N3C1HN1)] (73) + R1[δ_{out} (N2C2HN3)] (25)
833	791	736 m	735 s	R1[δ_{out} (N3C1HN1)] (74) + R1[δ_{out} (N2C2HN3)] (21)
849	806	840 m	798 s	R1[δ_{out} (N3C1HN1)] (46) + R1[δ_{out} (N2C2HN3)] (11)
871	827	856 w	843 m	δ_{out} (C3N4HN3) (65) + δ_{out} (C4C3HN4) (23)
900	855	892 m	873 m	δ_{out} (C7C4C3C5) (31) + R2[δ (C7C4C5;O2O3C6)] (23) + δ_{out} (C3N4HN3) (18) + R2[δ (C7C4C5;O2O3C6)] (13)
935	888	932 m	930 vs	R1[δ (C1N3C2N2N1)] (83)

945	897	941m	951 m	$r(C_8H_3) (30) + R2[\delta(C_7C_4C_5;O_2O_3C_6)] (15) + \delta(C_9H_3) (12)$
952	904	985 m	985 m	$R2[\delta(C_7C_4C_5;O_2O_3C_6)] (24) + R2[\delta(C_4O_2C_5;C_6C_7O_3)] (22)$
1001	950	994 m		$R1[\delta(C_2N_2N_3)] (37) + R1[\delta(C_1N_1N_3)] (17) + R1[v(N_1N_2)] (15)$
1014	963	1006 m	1001s	$\delta_{out}(C_4C_3HN_4) (51) + R2[\delta(C_7C_4C_5;O_2O_3C_6)] (27) + \delta_{out}(C_7C_4C_3C_5) (11)$
1024	972	1017 m	1021 m	$r(C_8H_3) (53) + r(C_9H_3) (22)$
1041	988	1063 m	1057 s	$\delta_{out}(C_4C_3HN_4) (87)$
1048	995	1097 vw		$\delta_{out}(C_4C_3HN_4) (80)$
1070	1016	1137 m	1136 m	$R1[\delta(C_2N_2N_3)] (43) + R1[\delta(C_1N_3C_2N_2N_1)] (20) + R1[v(C_1N_3)] (12) + R1[\delta(C_1N_1N_3)] (11)$
1156	1098	1168 vw		$\delta(HN_4N_3) (16) + R1[\delta(C_1N_1N_3)] (16) + \delta(N_4C_3C_4) (16)$
1222	1160	1200 m	1202 w	$R1[\delta(C_1N_1N_3)] (89)$
1224	1162	1218 m	1218 s	$R1[\delta(C_2N_2N_3)] (62) + R1[\delta(C_1N_1N_3)] (25)$
1235	1173	1234 vw		$R2[\delta(C_7C_4C_5;O_2O_3C_6)] (83)$
1255	1192	1243 vw		$R2[\delta(C_7C_4C_5;O_2O_3C_6)] (23) + R2[\delta(C_4C_5C_7)] (20) + R1[\delta(C_1N_1N_3)] (12)$
1290	1225	1269 m	1268 s	$\delta(N_4C_3C_4) (22) + R2[\delta(C_7C_4C_5;O_2O_3C_6)] (22) + \delta(HN_4N_3) (12)$
1301	1235	1280 m	1287 vs	$R2[\delta(C_7C_4C_5;O_2O_3C_6)] (57) + \delta(N_4C_3C_4) (32)$
1332	1265	1295 m		$\delta_{out}(C_3N_4HN_3) (35) + R1[v(C_1N_3)] (24) + R1[\delta(C_1N_3C_2N_2N_1)] (19)$
1341	1273	1325 m	1323 w	$\delta(N_4C_3C_4) (46) + R2[\delta(C_7C_4C_5;O_2O_3C_6)] (23) + \delta(HN_4N_3) (23)$
1405	1334	1356 m	1355 m	$\delta(HN_4N_3) (38) + R2[\delta(C_7C_4C_5;O_2O_3C_6)] (24) + \delta(N_4C_3C_4) (16)$
1420	1348	1384 m	1380 s	$wag(C_9H_3) (69) + wag(C_8H_3) (25)$
1435	1363	1401w	1390 m	$\delta(HN_4N_3) (54) + wag(C_8H_3) (18)$
1439	1366	1438 m	1437 w	$\delta(HN_4N_3) (78)$
1491	1416	1463 vs	1462 m	$sc(C_9H_3) (74) + sc(C_8H_3) (14)$
1492	1417			$sc(C_9H_3) (49) + sc(C_8H_3) (16) + \delta(HN_4N_3) (14)$
1508	1432	1474 m	1472 m	$\delta(HN_4N_3) (72)$
1510	1434			$\delta(HN_4N_3) (64) + R2[\delta(C_7C_4C_5;O_2O_3C_6)] (21)$
1514	1438	1517 m	1517 w	$sc(C_9H_3) (52) + \delta(HN_4N_3) (15)$
1518	1441	1533 w	1539 vw	$\delta(HN_4N_3) (51) + R1[\delta(C_2N_2N_3)] (23)$
1545	1467	1602 m	1597 s	$\delta(HN_4N_3) (34) + R1[\delta(C_1N_1N_3)] (24) + R1[\delta(C_2N_2N_3)] (20)$
1656	1572	1643 vw	1645 vw	$\delta(HN_4N_3) (53) + \delta(HO_5H) (33)$
1681	1596	1678 vw	1675 m	$\delta(HN_4N_3) (50) + \delta(HO_5H) (42)$
1776	1686	1701vs	1699 vs	$R2[v(C_7O_4)] (61) + R2[\delta(C_7C_4C_5;O_2O_3C_6)] (15) + R2[\delta(C_4O_2C_5;C_6C_7O_3)] (12)$
1833	1740	1737 vs	1736 s	$R2[\delta(C_7C_4C_5;O_2O_3C_6)] (76)$
3066	2911	2749 w		$v_s(C_8H_3) (92)$
3075	2920	2863 w		$v_s(C_9H_3) (88)$
3145	2986	2886 vw		$v_{as}(C_8H_3) (97)$
3153	2994	2920 m	2912 w	$v_{as}(C_8H_3) (56) + v_{as}(C_9H_3) (27) + \delta(C_6C_8H) (12)$
3161	3001	2947 vs	2944 w	$v_{as}(C_9H_3) (82)$
3162	3002	2993 m	2992 m	$v_{as}(C_9H_3) (93)$
3197	3036	3002 s	3003 m	$v(N_4H) (86) +$
3211	3049	3012 s	3013 m	$v(C_3H) (59) + \delta(N_4H) (32)$
3283	3117	3056 w	3060 w	$R1[v(C_2H)] (80) + R1[v(C_1H)] (15)$
3288	3122	3133 s	3127 s	$R1[v(C_1H)] (89)$
3721	3533		3241 m	$v_s(HO_5H) (82)$
3872	3676		3385 m	$v_{as}(HO_5H) (97)$

* Somente PED com valores maiores que 10 % são dados.

Legenda: τ = torção; sc = *scissoring*; wag = *wagging*, δ = deformação; δ_{out} = deformação fora do plano; v = estiramento; v_{as} = estiramento assimétrico; v_s = estiramento simétrico. vs = muito forte; s = forte; m = média; w = fraca; vw = muito fraca.

A atribuição para o cristal mostra que a maioria das bandas no FT-Raman e FT-IR correspondem a misturas de modos de vibração. As deformações fora do plano estão presentes principalmente na região entre $30\text{ cm}^{-1} \leq \omega_{\text{cal}} \leq 900\text{ cm}^{-1}$, mas podem também ser observadas até $\omega_{\text{cal}} = 1332\text{ cm}^{-1}$. Vibrações tipo torção são observadas na região dos valores das frequências calculadas entre 104 cm^{-1} a 684 cm^{-1} . No entanto é possível observar uma localização acentuada dos modos CH_3 : vibrações tipo torção do CH_3 são observadas em $\omega_{\text{cal}} = 258\text{ cm}^{-1}$ e $\omega_{\text{cal}} = 259\text{ cm}^{-1}$, vibração *rocking* do CH_3 é identificada em $\omega_{\text{cal}} = 1024\text{ cm}^{-1}$, vibrações *wagging* do CH_3 ocorrem em $\omega_{\text{cal}} = 1420\text{ cm}^{-1}$ e $\omega_{\text{cal}} = 1435\text{ cm}^{-1}$ e de vibração tipo *scissorig* do CH_3 aparece em $\omega_{\text{cal}} = 1491\text{ cm}^{-1}$.

Para cristais orgânicos, a região entre 2800 cm^{-1} a 3200 cm^{-1} contém as bandas originadas a partir de estiramento dos grupos funcionais CH, CH_2 , CH_3 , e NH.

Uma vez que duas bandas de infravermelho foram observadas acima 3200 cm^{-1} , e uma vez que as vibrações de estiramento da molécula de água ocorrem próximas a 3400 cm^{-1} , podemos confirmar que o cristal em estudo realmente contém água. As bandas infravermelho do cristal $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ observadas em 3241 cm^{-1} ($\omega_{\text{cal}} = 3721\text{ cm}^{-1}$) e 3385 cm^{-1} ($\omega_{\text{cal}} = 3872\text{ cm}^{-1}$) correspondem, respectivamente, ao estiramento assimétrico e à deformação angular da água.

Os deslocamentos atômicos correspondentes a alguns modos normais selecionados da molécula $C_9H_{10}N_4O_4 \cdot H_2O$ são apresentados na figura Fig. 24.

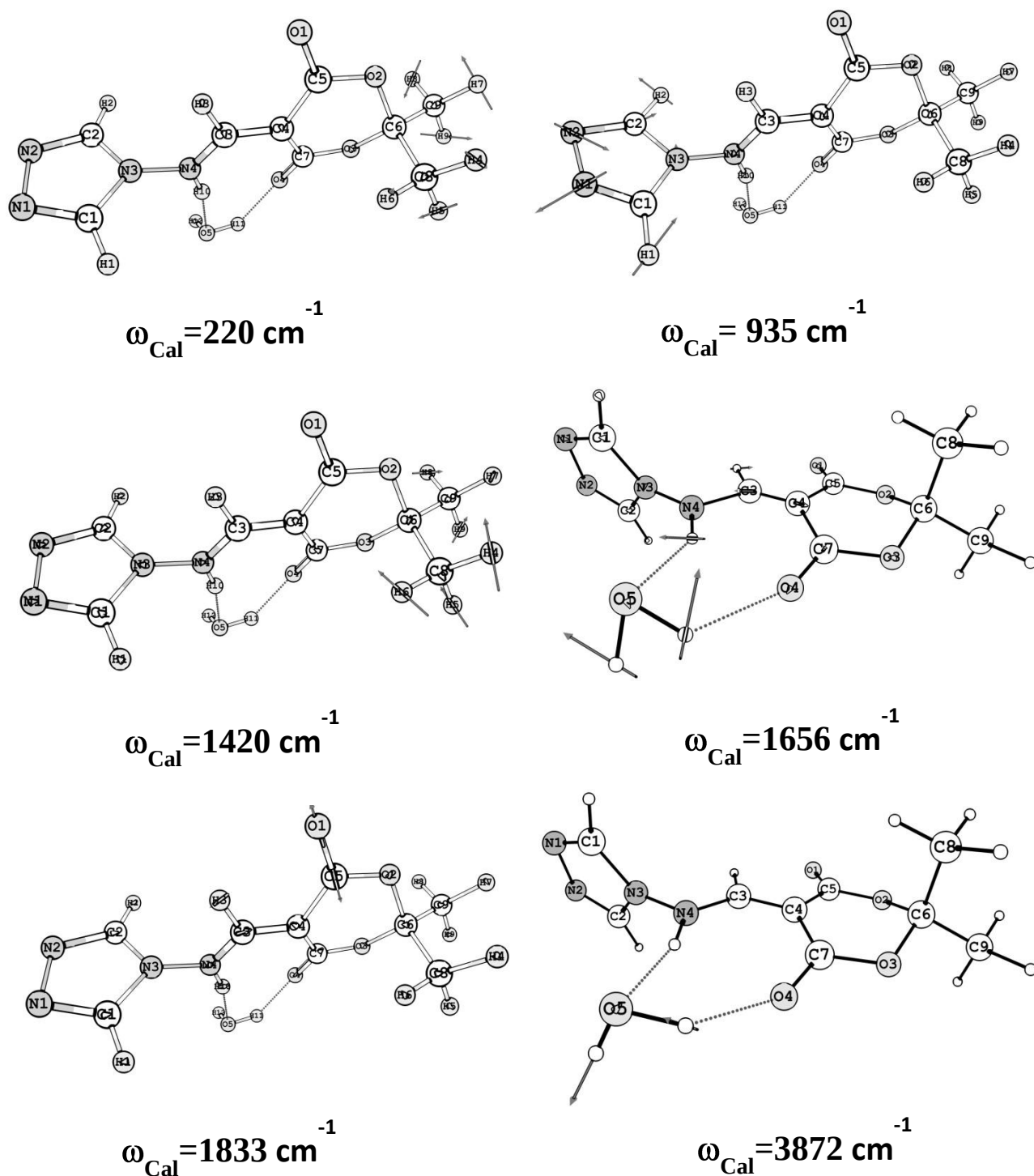


Figura 24: Alguns deslocamentos atômicos correspondentes a alguns modos normais selecionados da molécula $C_9H_{10}N_4O_4 \cdot H_2O$

CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

- A atividade antibacteriana e antifúngica verificada pela substância $C_9H_{10}N_4O_4$ apresenta os mesmos valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) frente aos microrganismos testados, sendo todos os valores observados maiores ou iguais a 1024 $\mu\text{g/mL}$.
- Foi observado sinergismo com os aminoglicosídeos quando os mesmos foram associados à $C_9H_{10}N_4O_4$, por contato direto, frente às bactérias. Por outro lado, a associação entre a $C_9H_{10}N_4O_4$ e os antifúngicos testados frente às espécies de *Candida* não foi capaz de interferir na atividade antifúngica.
- A concordância entre a estrutura otimizada e a observada experimentalmente por difração de Raios X é muito boa, de modo que o cálculo da otimização da geometria da molécula quase reproduz os parâmetros geométricos experimentais.
- Há uma boa concordância quando as frequências calculadas foram ajustadas pelo fator de escala 0,9495, mostrando que os valores das frequências calculadas e as experimentais observadas nos espectros FT-Raman e FT-IR são muito próximos. Essa concordância possibilitou a atribuição completa das bandas Raman e Infravermelho juntamente com a distribuição de energia potencial (PED) para cada modo normal de vibração da substância sintética $C_9H_{10}N_4O_4 \cdot H_2O$.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ALCÂNTARA, P. Jr.: ESPECTROSCOPIA MOLECULAR, Departamento de Física, Universidade Federal do Pará, 2002. Disponível em: <<http://www.ufpa.br/ccen/fisica/didatico/espectroscopia.pdf>>
- ALMEIDA, W.B.; SANTOS, H.F. Modelos teóricos para compreensão da estrutura da matéria. *Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola*, n. 4, p. 6-13, maio, 2001.
- AMARAL, P.A.; NEVES, G.; FARIAS, F.; EIFLER-LIMA, V.L. Química Combinatória: moderna ferramenta para a obtenção de candidatos a protótipos de novos fármacos. *Brazilian Journal Pharmaceutical Science*, vol. 39, n. 4, p. 351-363, 2003.
- ANDRADE, C.H.; TROSSINI, G.H.G.; FERREIRA, E.I. Modelagem molecular no ensino de química farmacêutica. *Revista Eletrônica de Farmácia*, vol. 7, p. 1-23, 2010.
- ANTUNES, R.M.P.; LIMA, E.O.; PEREIRA, M.S.V.; CAMARA, C.A.; ARRUDA, T.A.; CATÃO, R.M.R.; BARBOSA, T.P.; NUNES, X.P.; DIAS, C.S.; SILVA, T.M.S. Atividade antimicrobiana “*in vitro*” e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 16, p. 517-524, 2006.
- ARAÚJO, J.C.L.V.; LIMA, E.O.; CEBALLOS, B.S.O.; FREIRE, K.R.L.; SOUZA, E.L.; SANTOS FILHO L. Ação antimicrobiana de óleos essenciais sobre microrganismos potencialmente causadores de infecções oportunistas. *Revista de Patologia Tropical*, vol 33, p. 55-64, 2004.
- BARREIRO, E.J.; RODRIGUES, C.R. Modelagem molecular: uma ferramenta para o planejamento racional de fármacos em química medicinal. *Química Nova*, vol. 20, p. 1-11, 1997.
- BARREIRO, E.J. Estratégia de simplificação molecular no planejamento racional de fármacos: a descoberta de novo agente cardioativo. *Química Nova*, vol. 25, p. 1172-1180, 2002.
- BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.M. A questão da inovação em fármacos no brasil: proposta de criação do Programa Nacional de Fármacos (PRONFAR). *Química Nova*, vol. 28, p. 56-63, 2005.
- BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.M. Química Medicinal: As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos, Editora ArtMed Ltda.: Porto Alegre, 2001.
- BECKE, A.D. Density-Functional Thermo chemistry. The role of exact exchange. *Journal of Chemical Physics*, vol. 98, p. 5648-5652, 1993.
- BENGHEZAL, M.; ADAM, E.; LUCAS, A.; BURN, C.; ORCHARD, M.G.; DEUSCHEL, C.; VALENTINO, E.; BRAILLARD, S.; PACCAUD, J.P.; COSSON, P.

Inhibitors of bacterial virulence identified in a surrogate host model. *Cell Microbiology*, vol. 9, p. 1336-1342, 2007.

BRITIGAN, B.E.; RASMUSSEN, G.T.; COX, C.D. Augmentation of oxidant injury to human pulmonary epithelial cells by the *Pseudomonas aeruginosa* siderophore pyochelin. *Infection and Immunity*, vol. 63, p. 1071-1076, 1997.

BRUICE, P.Y. Química Orgânica. 4 ed. São Paulo: Pearson/Prentice Hall, 2006.

BUTLER, M. S.; BUSS, A. D. Natural products - The future scaffolds for novel antibiotics. *Biochemistry Pharmacology*, vol 71, p. 919-929, 2006.

CALDERONE, R.A.; FONZI, W.A. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiology*, vol. 9, p. 327-335, 2001.

CANSIZ, A.; SERVI, S.; KOPARIR, M.; ALTINTAS, M.; DIGRAK, M. Synthesis and biological activities of some Mannich bases of 5-(2-furyl)-1,2,4-triazole-3-thiones. *Journal of the Chemical Society of Pakistan*, vol. 23, p. 237-240, 2001.

CARVALHO, I.; PUPO, M.T.; BORGES, A.D.L.; BERNARDES, L.S.C. Introdução a modelagem molecular de fármacos no curso experimental de química farmacêutica. *Química Nova*, vol. 26, n. 3, p. 428-438, 2003.

CARVALHO, I.; BORGES, A.D.L.; BERNARDES, L.S.C. Medicinal Chemistry and Molecular Modeling: An Integration To Teach Drug Structure–Activity Relationship and the Molecular Basis of Drug Action. *Journal of Chemical Education*, vol. 82, p. 588-596, 2005.

CASTRO, F.L.; BARTH Jr., V.C.; GALLO, S.W.; RARO, O.H.F.; FERREIRA, C.A.S.; OLIVEIRA, S.D. Determinação da resistência antimicrobiana de isolados de *Staphylococcus aureus*. X Salão de Iniciação Científica – PUCRS, 2009.

CHEN, B-C. Meldrum`s Acid in Organic Synthesis. *Heterocycles*, v. 32, n. 3, p. 529-597, 1991.

CHIANG, L.H.; COLEGROVE, L.F. Industrial implementation of on-line multivariate quality control. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, v. 88, p. 143-153, 2007.

CLSI- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for bacteria that grow aerobically. 6. ed. Wayne, PA: NCCLS Approved Standard M7-A6, 2003.

COHEN, N.C. Guidebook on molecular modeling in drug design. San Diego: Academic Press, 1996.

COUTINHO H.D.M.; COSTA, J.G.M.; LIMA, E.O.; FALCÃO-SILVA, V. S.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P. Enhancement of the Antibiotic Activity against. *Chemotherapy*, v. 54, p. 328-330, 2008.

DEMAIN, A. L.; SANCHEZ, S. J. Microbial drug discovery: 80 years of progress. *The Journal of Antibiotics*, vol. 62, p. 2-24, 2009.

DESENKO, S.M. *Chemistry of Heterocyclic Computer*. 1995.

DIAS, N.L. Identificação de *Staphylococcus aureus*, avaliação do seu potencial enterotoxigênico e resistência a metilicina pela técnica de pcr em amostras de leite da microrregião de sete lagoas-Mg, 2009. Dissertação de Mestrado da Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária. Belo Horizonte, março, 2010.

FENNER, R.; BETTI, A.H.; MENTZ, L.A.; RATES, S.M.K. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 42, n. 3, jul./set., 2006.

FERREIRA, C.; ARROIO, A.; REZENDE, D.B. Uso de modelagem molecular no estudo dos conceitos de nucleofilicidade e basicidade. *Química Nova*, vol. 34, n. 9, p. 1661-1665, 2011.

FERREIRA H.; LALA E.R.P. *Pseudomonas aeruginosa*: Um alerta aos profissionais de saúde. *Revista Panamericana Infectologia*, vol. 12, p. 44-50, 2010.

FICA, C.A. Tratamiento de infecciones fúngicas sistêmicas. Primera parte: fluconazol, itraconazol y voriconazol. *Revista Chilena de Infectologia*, v. 21, n. 1, p. 26-38, 2004.

FILE Jr.; T.M. Visão geral sobre resistência bacteriana nos anos 90. *Ple Chest*, vol. 2, p. 3-8, 2000.

FOCK, V. Näherungsmethode zurdes quantenmechanischen Mehrkorperproblems. *Zs. Physical*, vol. 60, p. 320, 1930.

FRAZIER, W.C.; WESTHOFF D.C. *Microbiologia de los Alimentos*. 4. ed. Zaragoza: Acribia, p. 681, 2000.

FRISCH, M. J.; TRUCKS, G. W.; SCHLEGEL, H. B.; SCUSERIA, G. E.; ROBB, M. A.; CHEESEMAN, J. R.; MONTGOMERY, J. A.; VREVEN, JR., T.; KUDIN, K. N.; BURANT, J. C.; MILLAM, J. M.; IYENGAR, S. S.; TOMASI, J.; BARONE, V.; MENNUCCI, B.; COSSI, M.; SCALMANI, G.; REGA, N.; PETERSSON, G. A.; NAKATSUJI, H.; HADA, M.; EHARA, M.; TOYOTA, K.; FUKUDA, R.; HASEGAWA, J.; ISHIDA, M.; NAKAJIMA, T.; HONDA, Y.; KITAO, O.; NAKAI, H.; KLENE, M.; LI, X.; KNOX, J. E.; HRATCHIAN, H. P.; CROSS, J. B.; ADAMO, C.; JARAMILLO, J.; GOMPERTS, R.; STRATMANN, R. E.; YAZYEV, O.; AUSTIN, A. J.; CAMMI, R.; POMELLI, C. OCHTERSKI, J. W.; AYALA, P. Y.; MOROKUMA, K.; VOTH, G. A.; SALVADOR, P.; DANNENBERG, J. J.; ZAKRZEWSKI, V. G.; DAPPRICH, S.; DANIELS, A. D.; STRAIN, M. C.; FARKAS, O.; MALICK, D. K.; RABUCK, A. D.; RAGHAVACHARI, K.; FORESMAN, J. B.; ORTIZ, J. V.; CUI, Q.; BABOUL, A. G.; CLIFFORD, S.; CIOŚŁOWSKI, J.; STEFANOV, B. B.; LIU, G.;

LIASHENKO, A.; PISKORZ, P.; KOMAROMI, I.; MARTIN, R. L.; FOX, D. J.; KEITH, T.; AL-LAHAM, M. A.; PENG, C. Y.; NANAYAKKARA, A.; CHALLACOMBE, M.; GILL, P. M. W.; JOHNSON, B.; CHEN, W.; WONG, M. W.; GONZALEZ, C.; POPLE, J. A. Gaussian 03, Revision B.02, Gaussian, Inc., Pittsburgh PA, 2003.

FUEYO, J.M. Relationships between toxin gene content and genetic background in nasal carried isolates of *Staphylococcus aureus* from Asturias, Spain. *FEMS Microbiology Letters*, v. 243, p. 447-454, 2005.

GABER, A.E-A.M.; McNAB, H. Synthetic Applications of the Pyrolysis of Meldrum's Acid Derivatives. *Synthesis*, v. 14, p. 2059-2074, 2001.

GEDECK, P.; WILLETT P. Visual and computacional analysis of structure-actiivty relationships in high-throughput screening data. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 5, p. 389-395, 2001.

GERMANO P.M.L.; GERMANO M.I.S. Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos. 2^a ed. São Paulo: Varela, 2003.

GIORDANO, N.J., NAKANISHI. Computacional physics - 2nd ed. Perarson Prentice Hall, 2006.

GIVENS, D.I.; DEBOEVER, J.L.; DEAVILLE, E.R. The principles, practices and some future applications of near infrared spectroscopy for predicting the nutritive value of foods for animals and humans. *Nutrition Research Reviews*, v. 10, p. 83-114, 1997.

GOMEZ, L.C.; MATIA, E.C.; CURIEL, A.G.; DIAZ J.P. Infecciones por *Pseudomonas* spp. *Medicine*, vol. 7, p. 3629-3633, 1998.

GUIDO, R.V.C.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Virtual screening and its integration with modern drug design technologies. *Current Medicinal Chemistry*, v.15, n.1, p. 37-46, 2008.

GUIDO, R.V.C.; ANDRICOPULO, A.D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. *Estudos Avançados*, vol. 24, p. 81-98, 2010.

GUPTA, A. K.; BHARGAVA, K. P. Some triazole analogs as anti-inflammatory agents. *Pharmazie*, vol. 33, p. 430-431, 1978.

HAASNOOT, J.G. Mononuclear, oligonuclear and polynuclear metal coordination compounds with 1,2,4-triazole derivatives as ligands. *Coordination Chemistry Reviews*, v. 200, p. 131-135, 2000.

HAIDA, K.S.; PARZIANELLO, L.; WERNER, S.; GARCIA, D.R.; INÁCIO C.V. Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de oito espécies de plantas medicinais. *Arquivo de Ciências da Saúde da Unipar*, vol. 11, p. 185-192, 2007.

HART, C.A.; WINSTANLEY, C. What makes a pathogen? *Microbiology Today*, v. 28, p. 4-6, 2001.

HARTREE, D. R. *The Cambridge Philosophical Society*, vol. 24, p. 89, 1927.

HEINEN, P.E.T. Estudo das Alterações Mitocondriais Provocadas na Sepsis por Espectroscopia de Infravermelho pela Transformada de Fourier e Refletância Total Atenuada. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, out., 2006.

HOHENBERG, P.; KOHN, W. Inhomogeneous Electron Gas. *Physical Review B*, 136, B864, 1964.

HOEFEL, R.; VIDOTTI, C.C.F.; MENEZES, E.S.; PINHEIRO, S. Ações que estimulam o uso racional de antimicrobianos. *Bol Farmacot* vol. 11, p. 1-4, 2006.

HOLLER F.J.; SKOOG D.A.; CROUCH S.R. Princípios de Análise Instrumental. 6. ed. Porto Alegre: Bookman, 2009.

IVANOV, A.S. Meldrum's acid and related compounds in the synthesis of natural products and analogs. *Chemical Society Reviews*, vol. 37, p. 789-811, 2008.

JAVADPOUR, M.M.; JUBAN, M.M.; LO, W.C.; BISHOP, S.M.; ALBERTY, J.B.; COWELL, S.M.; BECKER, C.L.; MCLAUGHLIN, M.L. De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 39, p. 3107-3113, 1996.

JONES, D.H.; SLACK, R.; SQUIRES, S.; WOOLDRIDGE, K.R. H. Antiviral Chemotherapy .I. Activity of Pyridine and Quinoline Derivatives against Neurovaccinia in Mice. *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 8, p. 676-680, 1965.

JOUSSEF, A.C.; SILVA, L.E.; BORTOLUZZI, A.J.; FORO, S. 2,2-Dimethyl-5-(4H-1,2,4-triazol-4-ylaminomethylene)-1,3-dioxane-4,6-dione monohydrate. *Acta Crystallographica Section E*, vol. 61, p. 2642-2643, 2005.

KANE, J.M.; DUDLEY, M.W.; SORENSEN, S.M.; MILLER, F.P. 2,4-Dihydro-3h-1,2,4-Triazole-3-Thiones as potential antidepressant agents. *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 31, p. 1253-1258, 1988.

KISKA, D.L.; GILLIAN, P.H. Pseudomonas. In: Manual of Clinical Microbiology. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Jorgensen JH, Tenover FC. 8ª ed. Manual of Clinical Microbiology. American Society for Clinical Microbiology, Washington DC.

KOHN, W.; SHAM, L. J. Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects. *Physical Review*, vol. 140, Issue 4A, p. 1133-1138 (1965).

LANDAU, R.H.; PÁEZ, M.J.; BORDEIANU, C.C. Computacional physics - 2nd ed. Wiley-VCH, 2007.

- LEE, C.T.; YANG, W.T.; PARR R.G. Development of the Colle-Salvetti Correlation-Energy formula into a Functional of the Electron-Density. *Physical Review Letters*, vol. 37, p. 785-789, 1988.
- LEITE, D.O.; PRADO R.J. Espectroscopia no infravermelho: uma apresentação para o Ensino Médio. *Revista Brasileira de Ensino de Física*, v. 34, n. 2, p. 2504, 2012.
- LIMA, A.; BAKKER J. Espectroscopia no infravermelho próximo para a monitorização da perfusão tecidual. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*, vol. 23, p. 341-351, 2011.
- LIMA, I.O.; OLIVEIRA, R.A.G.; LIMA, E.O.; FARIAS, N.M.P.; SOUZA, E.L. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, vol. 16, p. 197-201, Abr./Jun. 2006.
- LOPES, W.A.; FASCIO M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. *Química Nova*, vol. 27, n. 4, p. 670-673, 2004.
- LORINCZ, A.; HADDAD, D.; NAIK, R.; NAIK, V.; FUNG, A.; CAO, A.; MANDA, P.; PANDYA, A.; AUNER, G.; RABAH, R., LANGENBURG, S.E.; KLEIN, M.D. Raman Spectroscopy for Neoplastic Tissue Differentiation: a pilot study. *Journal of Pediatric Surgery*, v.39, n.6, p. 953-956, June 2004.
- LUZ, I.S. Caracterização molecular das toxinas em *Staphylococcus aureus* isolados de leite e queijo de coalho em municípios da Região Agreste de Pernambuco. 125f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife. 2008.
- LYCZAK, J.B.; CANNON, C.L.; PIER, G.B. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes and Infection*, vol. 2, p. 1051-1060, 2000.
- MAIA, R.R.; PEREIRA, M.S.V.; ALBUQUERQUE, A.C.L.; PEREIRA, L.F.; COSTA M.R.M. Estudo do efeito antimicrobiano do extrato da goiabeira (*Psidium guajava* Linn) sobre *Staphylococcus aureus* multiresistentes. *ACSA – Agropecuária Científica do Semi-Árido*, v.05, p. 36-40, 2009.
- MANHONG, W.; GUINA, T.; BRITTNACHER, M.; NGUYEN, H.; ENG, J.; MILLER, S.I. The *Pseudomonas aeruginosa* Proteome during Anaerobic Growth. *Journal of Bacteriology*, vol. 187, p. 8185-8190, dez. 2005.
- MANN, C.M.; MARKHAN J.L. A new method for determine the minimum inhibitory concentration of essential oils. *Journal of applied microbiology*, vol. 84, p. 538-544, 1998.
- MARTIN, J.M.L., ALSENOY, C.V. Gar2PED: A computer program for PED calculations, University of Antwerp, Belgium, 2007.

MASSA, S.; DISANTO, R.; RETICO, A.; ARTICO, M.; SIMONETTI, N.; FABRIZI, G.; LAMBA, D. Antifungal agents .1. Synthesis and antifungal activities of estrogen-like imidazole and triazole derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 27, p. 495-502, 1992.

MATOUSKOVA, I.; JANOUT, V. Current Knowledge of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacký, Olomouc, Czechoslovakia Republic*, vol. 152, n, 2, p. 191-202, 2009.

MELO, J.O.F.; DONNICI, C.L.; AUGUSTI, R.; FERREIRA, V.F.; SOUZA, M.C.B.V.; FERREIRA, M.L.G.; CUNHA, A.C. Heterociclos 1,2,3-triazólicos: histórico, métodos de preparação, aplicações e atividades farmacológicas. *Química Nova*, vol. 29, n. 3, p. 569-579, 2006.

MENEGATTI, R.; FRAGA, C.A.M.; BARREIRO, E.J. A importância da síntese de fármacos. *Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola*, n. 3, p. 16-22, maio, 2001.

MOELLERING JR., R.C. Novos desafios no campo das doenças infecciosas. In: Patógenos emergentes nas doenças infecciosas: Relatório Especial Hospital Práctice. Euromédice. Ed. Médicas. 2000.

MOELLERING JR., R.C. *Clinical Infectology Disease*. 1998, 27, S135; Dzidic, S.; Suskovic, J.; Kos, B.; *Food Technol. Biotech.* 46, 2008.

MOREIRA, L.B. Princípios para uso racional de antimicrobianos. *Revista da AMRIGS*, vol. 48, p. 118-120, 2004.

MORGON, N.H.; COUTINHO, K. Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular. São Paulo, Ed. Livraria da Física, 2007.

MOURA, L.B.; FERNANDES, M.G. A Incidência de Infecções Urinárias Causadas por *E. Coli*. *Revista Olhar Científico – Faculdades Associadas de Ariquemes* – vol. 01, n.2, p. 411-426, Ago./Dez. 2010.

NATARO, J.P.; KAPER, J. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, v.11, p. 142-201, 1998.

NCCLS – NATIONAL COMMITTEE FOT CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 5ª ed. Villanova, PA: NCCLS approved standard M7-A5, v.20, n.2, 2000b.

OLIVA G. Bioinformática: Perspectivas na Medicina. *Gazeta Médica da Bahia*, vol. 78, p. 52-58, 2008.

OLIVEIRA, A.C.; SILVA, R.S. Desafios de cuidar em saúde frente à resistência bacteriana: uma revisão. *Revista Eletrônica de Enfermagem*, vol. 10, p. 189-197, 2008.

OLIVEIRA, L.F.C., Espectroscopia Molecular. Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola, n, 4, p. 24-30, maio, 2001.

PALANIAPPAN, K.; HOLLEY, R.A. Use of natural antimicrobials to increase antibiotic susceptibility of drug resistant bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, v.140, p. 164-168, 2010.

PALOMINO, J.C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin microtiter assay plate: simple and unexpensive method for detection of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 46, n.8, p. 2720-2722, 2002.

PARR, R.G.; YANG, W. Density Functional Theory of Atoms and Molecules, Oxford University Press, New York, 1989.

PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S.; VYVYAN, J.R. Introdução à Espectroscopia. Tradução de: BARROS, Pedro. 4. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

POLLACK, M. Pseudomonas aeruginosa. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds.). Principles and Practices of Infectious Diseases. 4th ed. Philadelphia, Churchill Livingstone, 1995; 2003.

RAHME, L.G.; STEVENS, E.J.; WOLFORT, S.F.; SHAO, J.; TOMPKINS, R.G.; AUSUBEL, F.M. Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science*, vol. 268, p. 1899-1902, 1995.

RICCI, E.G. Aplicação do método de análise dos componentes principais e espectroscopia Raman para a avaliação da mistura de etanol-metanol. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências, Universidade de Franca. Franca, 2008.

RIBEIRO, L.F. Uso de espectroscopia no infravermelho e análise multivariada para previsão de ácidos graxos em linhaça dourada e marrom. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2012.

ROCHA, D.P.; PINTO, G.F.; RUGGIERO, R.; OLIVEIRA, C.A.; GUERRA, W.; FONTES, A.P.S.; TAVARES, T.T.; MARZANO, I.M.; PEREIRA-MAIA, E.C. Coordenação de metais a antibióticos como uma estratégia de combate à resistência bacteriana. *Química Nova*, vol. 34, n. 1, p. 111-118, 2011.

RODRIGUES, C.R. Processos Modernos no Desenvolvimento de Fármacos: Modelagem Molecular; *Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola*, n. 03, p. 43-49, maio, 2001.

RUSSELL, A.D. Bacterial resistance to disinfectants: present knowledge and future problems. *Journal of Hospital Infection*, vol. 43, p. 57-68, 1998.

RUSSELL, A.D. Principles of antimicrobial activity and resistance. In: Block SS (ed.). Disinfection, sterilization, and preservation. Baltimore, Willians & Wilkins, p. 31-54, 2001.

SANT'ANNA, C.M.R. Glossário de termos usados no planejamento de fármacos. (Recomendações da IUPAC para 1997), *Química Nova*, vol. 25, p. 505-512, 2002.

SANTANA, E.H.W.; BELOTI, V.; OLIVEIRA, T.C.R.M. Staphylococci: colonies morphological characteristics, coagulase and EEA production collected from cooled raw milk samples. Seminário: Ciências Agrárias, Londrina, v. 27, n. 4, p. 639-646, 2006.

SANTOS, J.L.; BLAU, L.; MENEGON, R.F.; OLIVEIRA, H.P.; BUELONI, R.H.; BOFFO, E.; MACHADO, R.G.P.; LONGO, M.C.; CHUNG, M.C. Síntese e modelagem molecular do novo derivado indolinônico como candidato a antiinflamatório COX-2 seletivo. *Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences*, v. 28, n.2, p. 235-240, 2007.

SATO, Y.; SHIBATA, H.; ARAI, T.; YAMAMOTO, A.; OKIMURA, Y.; ARAKAKI, N.; HIGUTI, T. Variation in synergistic activity by flavone and its related compounds on the increased susceptibility of various strains of methicillin – resistant *Staphylococcus aureus* to β – lactam antibiotics. *International journal of antimicrobial agents*, v.24, p. 28-35, 2004.

SHIROMA, C., RODRIGUEZ-SAONA, L. Application of NIR and MID spectroscopy in quality control of potato chips. *Journal of Food Composition Analysis*, vol. 22, p. 596-605, 2009.

SILVA, C.V.; REIS, A.L.V.; FERRER, S.R.; GUERREIRO, H.M.N.; BARROS, T.F.; VELOZO, E.S. Avaliação da atividade antimicrobiana de duas espécies de Rutaceae do Nordeste Brasileiro. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, vol. 20, p. 355-360, Jun./Jul. 2010.

SILVA, L. E., Heterociclos Aromáticos Nitrogenados – Síntese e Potencial Quimioterápico, Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2006.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN T.A. Princípios de análise instrumental. 5.ed. Porto Alegre:Bookman, 2002.

SOUZA, C.P. Segurança alimentar e doenças veiculadas por alimentos: utilização do grupo coliforme como um dos indicadores de qualidade de alimentos. *Revista APS*, vol. 9, n. 1, p. 83-88, jan/jun. 2006.

SOUZA, M.V.N.; FERREIRA, S.B.; MENDONÇA, J.S.; COSTA, M.; REBELLO, F.R. Métodos de obtenção e aplicações sintéticas de tiazóis, uma importante classe de compostos heterocíclicos. *Química Nova*, vol. 28, n. 1, p. 77-84, 2005.

SUGHEN, J.K.; YOLOYE, T. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, vol. 58, p. 64-68, 1978.

SZABO, A.; OSTLUND, N. S. *Modern Quantum Chemistry*. McGraw-Hill, New York, 1989

TRABULSI L.R.; KELLER, R; GOMES, TAT. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerging Infectious Diseases*, vol. 8, p. 508-513, 2002.

VASIL, M.L. *Pseudomonas aeruginosa*: biology, mechanisms or virulence, epidemiology. *Journal Pediatric*, vol. 108, p. 800-805, 1986.

VIANA, J.D.M.; FÁZZIO, A.; CANUTO S. *Teoria Quântica de Moléculas e Sólidos: simulação computacional*. São Paulo, Ed. Livraria da Física, 2004.

WANG, J.; SOISSON, S.M.; YOUNG, K.; SHOOP, W.; KODALI, S.; GALGOCI, A.; PAINTER, R.; PARTHASARATHY, G.; TANG, Y.S.; CUMMINGS, R.; HÁ, S.; DORSO, K.; MOTYL, M.; JAYASURIYA, H.; ONDEYKA, J.; HERATH, K.; ZHANG, C.; HERNANDEZ, L.; ALLOCCO, J.; BASILIO, A.; TORMO, J.R.; GENILLOUD, O.; VICENTE, F.; PELAEZ, F.; COLWELL, L.; LEE, S.H.; MICHAEL. B.; FELCETTO, T.; GILL, C.; SILVER, L.L.; HERMES, J.D.; BARTIZAL, K.; BARRETT, J.; SCHMATZ, D.; BECKER, J.W.; CULLY, D.; SINGH, S.B. Platensimycin is a selective FabF inhibitor with potent antibiotic properties. *Nature*, vol. 441, p. 358-361, 2006.

WANNMACHER, L. Uso indiscriminado de antibiótico e resistência microbiana: Uma guerra perdida. URM: *Temas Seleccionados*, vol. 1, p. 1-6, 2004.

WARTEWIG, S.; NAUBERT, R.H.H. Pharmaceutical Applications of Mid-IR and Raman Spectroscopy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 57, p. 1144-1170, 2005.

WERMUTH, C.G. *The practice of medicinal chemistry*. 3rd ed. London: Academic Press; 2009.

WHO. The global burden of disease: 2004 update. Geneva: World Health Organization, p. 1-146, 2008.

ZARDO, V.; MEZZARI, A. Os antifúngicos nas infecções por *Candida* sp. *NewsLab* - edição 63, 2004.