

UNIVERSIDADE DE ARARAQUARA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM MEDICINA
REGENERATIVA E QUÍMICA MEDICINAL**

Isabela Amanda Polson Izidoro

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DAS ATIVIDADES
BIOLÓGICAS DE COMPLEXOS METÁLICOS COM LIGANTES
BIOATIVOS**

Araraquara,

SP 2025

Isabela Amanda Polson Izidoro

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DAS ATIVIDADES
BIOLÓGICAS DE COMPLEXOS METÁLICOS COM LIGANTES
BIOATIVOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal da Universidade de Araraquara – UNIARA – como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Biotecnologia, Área de Concentração: Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

Orientador: Prof. Dr. Wilton Rogério Lustri

Araraquara,

SP 2025

FICHA CATALOGRÁFICA

I97s Izidoro, Isabela Amanda Polson

Síntese, caracterização e estudo das atividades biológicas de complexos metálicos com ligantes bioativos/Isabela Amanda Polson. – Araraquara: Universidade de Araraquara, 2025.

53f.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química medicinal – UNIARA

Orientador: Prof. Dr. Wilton Rogério Lustrí

1. Complexos metálicos. 2. Atividade antimicrobiana. 3. Atividade Citotóxica. 4. Zaphobas morio. I. Título.

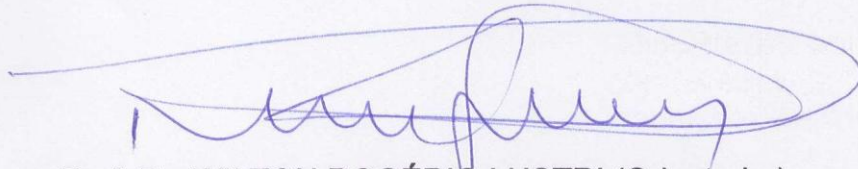
CDU 60

ISABELA AMANDA POLSON IZIDORO

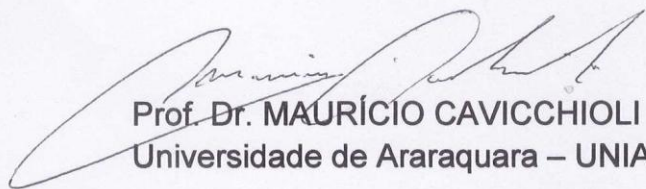
Dissertação apresentada a Universidade de Araraquara - UNIARA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

Araraquara, 19 de fevereiro de 2025.

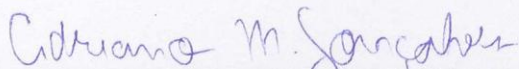
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. WILTON ROGÉRIO LUSTRI (Orientador)
Universidade de Araraquara – UNIARA



Prof. Dr. MAURÍCIO CAVICCHIOLI
Universidade de Araraquara – UNIARA



Prof. Dr. ADRIANO MARQUES GONÇALVES
Escola de Aplicação da Faculdade de Campinas - USP

Dedico este trabalho a Deus, aos meus pais e ao meu marido.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo o que Ele faz e por tudo o que Ele é em minha vida.

Aos meus pais, por todo o apoio, encorajamento, incentivo e motivação que me deram para trilhar meu próprio caminho e alcançar meus sonhos.

Ao meu noivo, que sempre me motiva, ajuda e encoraja e me ajuda nessa trajetória acadêmica.

Ao meu colega, professor e orientador Dr. Wilton Rogério Lustri, por todo apoio, ajuda, ensinamento, paciência e acompanhamento que tive em cada etapa deste trabalho, você é um pesquisador sensacional, te admiro e te respeito, sou imensamente grata por tudo.

A equipe da empresa N&P e especialmente meus queridos e colegas Ana Carolina Nazaré e ao Maicon Segalla Petrônio pelo incentivo, motivação e auxílio para seguir a trajetória acadêmica de pesquisadora.

A minha colega Tatiane Zucchini de Souza que ao longo da jornada se tornou amiga, muito obrigada pelos momentos de estudos, ajuda, motivação que sempre tive de você. Sou imensamente grata por tudo.

Aos meus colegas e companheiros de laboratório, muito obrigada por todo auxílio em diversos momentos dessa caminhada.

Ao prof. Dr. Hernane Barud pelo auxílio e pela parceria em etapas do meu trabalho. Ao prof. Dr. Pedro Corbi pela colaboração e parceria nesse trabalho.

À secretaria de pós-graduação por toda ajuda, em todos os momentos que precisei, ao professor e coordenador Dr. André Capaldo Amaral, gostaria de agradecer por todo auxílio e amparo conosco alunos do programa de Pós Graduação em Biotecnologia da UNIARA.

Ao Programa de Pós – Graduação em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal (PPBG-MRQM) da UNIARA de Araraquara, por oferecer aos seus alunos do programa uma imensa estrutura de ensino.

Ao apoio financeiro recebido pela agência de fomento desta pesquisa, a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior) que me possibilitou a oportunidade de estudo.

A todos os funcionários da UNIARA, aos professores do PPGB-MRQM, sempre prestativos em ajudar seus alunos, amparando nessa etapa.

Ninguém começa a ser professor numa terça-feira as 4 horas da tarde... Ninguém nasce professor ou marcado para ser professor. A gente se forma como educador permanentemente na pratica e na reflexão sobre a pratica.”

(Paulo Freire)

RESUMO

A resistência múltipla a fármacos antimicrobianos é uma das principais ameaças à saúde global, reconhecida como uma prioridade mundial. Nesse contexto, complexos metálicos conjugados a ligantes bioativos surgem como uma estratégia promissora para aplicação na Medicina, com o objetivo de ampliar o arsenal terapêutico contra infecções bacterianas e fúngicas. Este estudo propôs a síntese, caracterização dos complexos metálicos Ag-BIO, Zn1-BIO, Cu1-BIO por técnicas de espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e análise elementar (AE), além da avaliação *in vitro* da atividade inibitória de crescimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, por difusão em discos e determinação da concentração inibitória mínima (CIM). Também foram avaliadas a estabilidade à luz/ar e a citotoxicidade utilizando *Zophobas morio* dos complexos sintetizados com o ligante bioativo biotina (BIO) e os metais Ag(I), Cu (II) e Zn (II). Os complexos metálicos Ag-BIO, Cu1-BIO e Zn1-BIO foram sintetizados e caracterizados por espectroscopia FTIR, análise elementar (AE), análise termogravimétrica (TGA) e testados quanto à capacidade de inibição de crescimento antimicrobiano por difusão em disco e determinação da CIM. A atividade antimicrobiana do Ag-BIO e Cu1-BIO foi confirmada no teste de difusão em disco utilizando as espécies bacterianas Gram-positivas *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 14579 e Gram-negativas *Escherichia coli* EC 958, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13833, e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27253 e a levedura *Candida albicans* 10231. Os resultados obtidos destacam a potencial aplicação do complexo metálico Ag-BIO em medicina, visando ampliar o arsenal terapêutico para o tratamento de infecções bacterianas e fúngicas.

Palavras-Chave: Biotina; complexos metálicos; atividade antimicrobiana; atividade citotóxica; *Zophobas morio*.

ABSTRACT

Multiple antimicrobial drug resistance is a major threat to global health and is recognized as a global priority. In this context, metal complexes conjugated to bioactive ligands emerge as a promising strategy for application in Medicine, with the aim of expanding the therapeutic arsenal against bacterial and fungal infections. This study proposed the synthesis and characterization of the metal complexes Ag-BIO, Zn1-BIO, and Cu1-BIO by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and elemental analysis (EA) techniques, in addition to the in vitro evaluation of the inhibitory activity on the growth of Gram-positive and Gram-negative bacteria by disk diffusion and determination of the minimum inhibitory concentration (MIC). The light/air stability and cytotoxicity of the synthesized complexes with the bioactive ligand biotin (BIO) and the metals Ag(I), Cu (II) and Zn (II) were also evaluated using *Zophobas morio*. The metal complexes Ag-BIO, Cu1-BIO and Zn1-BIO were synthesized and characterized by FTIR spectroscopy, elemental analysis, thermogravimetric analysis (TGA) and tested for antimicrobial growth inhibition capacity by disk diffusion and MIC determination. The antimicrobial activity of Ag-BIO and Cu1-BIO was confirmed in the disk diffusion test using Gram-positive bacterial species *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 14579, and Gram-negative *Escherichia coli* EC 958, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13833, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27253, and the yeast *Candida albicans* ATCC 10231). The results obtained highlight the potential application of the Ag-BIO metal complex in medicine, aiming to expand the therapeutic arsenal for the treatment of bacterial and fungal infections.

Keywords: Biotin; metal complexes; antimicrobial activity; cytotoxic activity; *Zophobas morio*

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 - Fórmula estrutural da biotina.....	19
FIGURA 2 - Fórmula estrutural da L-carnosina.....	20
FIGURA 3 - Análise por FTIR do complexo Ag-BIO	30
FIGURA 4 - Curva termogravimétrica do complexo metálico Ag-BIO	31
FIGURA 5 - Análise por FTIR do complexo metálico Ag-Lcar	32
FIGURA 6 - Análise por FTIR do complexo Zn1-BIO..... BIO	33
FIGURA 7 - Curva termogravimétrica do complexo Zn1-BIO	34
FIGURA 8 - Análise por FTIR do complexo Cu1-BIO.....	35
FIGURA 9 - Curva termogravimétrica do complexo Cu1-BIO.....	36
FIGURA 10 - Atividade antimicrobiana de inibição de crescimento dos microrganismos dos complexos metálicos Ag-BIO, Cu1-BIO e Zn1-BIO....	37
FIGURA 11 - Halos de inibição do complexo Ag-BIO durante período de exposição ao ar/luz	41
Figura 12 - Avaliação da citotoxicidade do complexo Ag-BIO usando Z. morio.....	43

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1 - Atividade inibitória de crescimento dos complexos metálicos Ag-BIO, Cu1- BIO, Zn1-BIO e sal de partida AgNO₃ sobre os microrganismos testados.....**37**

TABELA 2 - Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos complexos metálicos sobre cepas de microrganismos *S. Aureus*, *B. cereus*, *K. pneumoniae* e *E.coli* em mmol.L⁻¹.....**40**

TABELA 3 - Estabilidade da atividade antibacteriana após exposição ar/luz do complexo Ag-BIO.....**42**

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Ag-BIO: Complexo de Prata (I) com biotina AE: Análise Elementar

Ag-PROB: Complexo de Prata (I) com probenecida ATCC: American Type Culture
Collection

Ag-Lcar: Complexo de Prata (I) com L-carnosina BIO: Biotina

BHI: Brain-heart infusion

Cu1-BIO: Complexo de Cobre (II) com biotina, sintetizado com o CuCl_2 Zn1-BIO:
Complexo de Zinco (II) com biotina, sintetizado com o ZnCl_2 CIM: Concentração
Inibitória Mínima

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

DMSO: Dimetilsulfóxido

DFT: Density Functional Theory

FTIR: Espectroscopia na região do Infravermelho transformada de Fourier OMS:
Organização Mundial da Saúde

TGA: Análise Termogravimétrica

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
1.1 Aspectos Gerais.....	14
1.2 Complexos metálicos antibacterianos.....	16
1.3 Ligantes bioativos utilizados.....	18
1.4 Biotina (Vitamina B7)	18

1.5 L-carnosina.....	19
2. OBJETIVOS.....	20
2.1 Objetivos específicos.....	20
3. MATERIAS E MÉTODOS.....	21
3.1 Materiais.....	21
3.1.1 Reagentes para a síntese de complexos.....	21
3.1.2 Reagentes utilizados na composição dos meios de cultivo de ensaios antibacterianos.....	21
3.1.3 Cepas bacterianas.....	22
3.2 Métodos.....	22
3.2.1 Sínteses dos complexos metálicos.....	22
3.2.2 Caracterização físico químicas dos complexos.....	22
3.2.2.1 Análise Elementar.....	23
3.2.2.2 Análise Termogravimétrica.....	24
3.2.2.3 Espectroscopia no Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).....	24
3.2.3 Análises das atividades biológicas dos complexos.....	24
3.2.3.1 Método por difusão em disco.....	24
3.2.3.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos complexos metálicos obtidos.....	25
3.2.3.3 Teste de estabilidade ar/luz do complexo Ag-BIO.....	25

3.2.3.4	Avaliação da atividade antimicrobiana do complexo Ag-BIO, in vivo, empregando o modelo de <i>Zophobas morio</i>	26
3.2.3.5	Método por difusão em disco.....	26
3.2.3.6	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos complexos obtidos.....	27
3.2.3.7	Teste de Estabilidade ar/luz do complexo Ag-BIO.....	28
3.2.3.8	Avaliação da atividade citotóxica do complexo Ag-BIO, in vivo, empregando o modelo alternativo de <i>Z. Morio</i>	28
4.	RESULTADOS	29
4.1	Espectroscopia por FTIR do complexo Ag-BIO.....	29
4.1.1	Análise Elementar do complexo Ag-BIO	30
4.1.2	Análise Termogravimétrica do complexo Ag-BIO.....	31
4.2	Espectroscopia por FTIR do complexo Ag-Lcar	31
4.3	Espectroscopia por FTIR do complexo Zn1-BIO.....	33
4.3.1	Análise Termogravimétrica do complexo Zn1-BIO.....	34
4.4	Espectroscopia por FTIR do complexo Cu1-BIO.....	34
4.4.1	Análise Elementar Cu1-BIO.....	35
4.4.2	Análise Termogravimétrica Cu1-BIO.....	36
4.5	Determinação da atividade inibitória de crescimento de microrganismos dos complexos metálicos Ag-BIO, Cu1-BIO e Zn1-BIO	36

4.5.1	Atividade inibitória de crescimento de Microrganismos por difusão em discos dos complexos metálicos obtidos.	36
4.5.2	Atividade biológica de inibição de crescimento de microrganismos Gram-positivos, Gram-negativos por concentração inibitória mínima (CIM) dos complexos metálicos Ag-BIO e Cu1-BIO.....	39
4.5.3	Avaliação da estabilidade do complexo metálico Ag-BIO à exposição ao ar/luz.	41
4.5.4	Avaliação da citotoxicidade in vivo usando <i>Z. morio</i>	42
5.	CONCLUSÕES	44
6.	PERSPECTIVAS	45
7.	REFERENCIAS	46

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Aspectos Gerais

Embora a descoberta dos antibióticos, em 1940, tenham constituído uma revolução no tratamento de infecções bacterianas no século XX, o desenvolvimento de diferentes tipos de mecanismos de resistência tornou mais difícil o seu controle (Majdi *et al.*, 2023) constituindo, atualmente, um problema de saúde global (Chelkeba; Melaku, 2022; Duval; Grare; Demoré, 2019; Jeon *et al.*, 2023; Lustri *et al.*, 2023; Majdi *et al.*, 2023).

Nesse sentido, segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) nenhum antibiótico disponível no momento seria suficiente para o tratamento de infecções causadas por bactérias multirresistentes, que poderão levar a óbito milhões de pessoas até 2050 (Majdi *et al.*, 2023), o que torna importante a busca de novos fármacos antibacterianos que diminuam o desenvolvimento de mecanismos de multirresistência bacteriana e redução de efeitos adversos (Alenazy, 2022; Lustri *et al.*, 2023).

Sendo assim, dentre os diversos mecanismos de multirresistência bacteriana destacam-se a produção de β -lactamases, e a produção de biofilmes bacterianos (Lustri *et al.*, 2023; Zhang, Huan *et al.*, 2021).

As bactérias produtoras de β -lactamases, que constituem a principal causa de resistência aos antibióticos da classe dos β -lactâmicos como penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos (Lustri *et al.*, 2023; Zhang, Huan *et al.*, 2021), representam uma ameaça global, de acordo com o relatório do ECDC 2022(Survey, 2022) .

Foram identificados mais de 4.400 tipos de β -lactamases que, de acordo com a sequência de aminoácidos e características moleculares, podem ser

agrupadas em quatro diferentes classes (A, B, C e D) (Fatima *et al.*, 2021; Naas *et al.*, 2017). As pertencentes às classes A, C e D são designadas como serino- β -lactamases (SBL) hidrolisam o anel β -lactâmico, entretanto, para essas classes de β -lactamases existem agentes inibidores, como o clavulanato, sulbactam e tazobactam. Já, para a classe B, classificada como metalo- β -lactamase (MBLs), assim designadas por utilizarem íons Zn (II) para hidrolisar o anel β -lactâmico, para as quais, atualmente, não há inibidores clinicamente disponíveis. Existem outras classes de β -lactamases classificadas como β -lactamase de espectro estendido (ESBL) e carbapenemases (KPC) para as quais, também, não há inibidores clinicamente disponíveis (Bush; Bradford, 2019).

Já, o biofilme bacteriano é composto por uma matriz polimérica autoproduzida de polissacarídeos, proteínas e DNA que promovem resistência a antibióticos, desinfetantes e à resposta imunológica. Estudos indicam que as bactérias formadoras de biofilmes apresentam uma tolerância de 10 a 1000 vezes maior a tratamentos antimicrobianos em comparação às bactérias planctônicas. A estrutura tridimensional do biofilme atua como uma barreira protetora, aumentando a resistência à penetração de antibióticos (Shree *et al.*, 2023).

Uma estratégia para tratamento de infecções causadas por bactérias multirresistentes, produtoras de β -lactamases e biofilmes é a combinação de íons metálicos com ligantes que já possuam atividades biológicas, como exemplo da sulfadiazina de prata (Aquaroni *et al.*, 2020; Lustri *et al.*, 2023; Pereira *et al.*, 2023).

Portanto, a procura por novos complexos metálicos com atividade antibacteriana, inibidores de β -lactamases e inibidores de biofilmes, para a utilização em estudos *in vitro* e *in vivo*, visando a determinação e compreensão

dos mecanismos farmacocinéticos, farmacodinâmicos e moleculares de ação constitui uma abordagem de grande interesse na área da química medicinal.

1.2 Complexos metálicos antibacterianos

A evolução e a propagação da resistência bacteriana aos antibióticos não são fenômenos recentes e representam um problema de saúde pública de extrema gravidade em escala global. Uma abordagem para combater cepas bacterianas multirresistentes e a disseminação de determinantes de resistência é a utilização de íons metálicos em combinação com ligantes que já possuem atividades biológicas (Lustri *et al.*, 2023).

Outra vantagem é que os complexos metálicos podem ser racionalmente projetados para reduzir sua toxicidade e exibir múltiplos modos de ação devido às suas propriedades de troca de ligantes, catalíticas, redox e fotofísicas (Waters *et al.*, 2023).

Dentre os metais mais utilizados como agentes antimicrobianos, a prata, o cobre e o zinco se destacam, um exemplo é a sulfadiazina de prata, comumente utilizada como agente antimicrobiano para tratar e prevenir o desenvolvimento de infecções bacterianas em queimaduras de pele (Pereira *et al.*, 2023). Adicionalmente, estudos realizados em colaboração com nosso grupo de pesquisas, envolvendo metalofármacos de prata com os ligantes 5-fluorocitosina (Pereira *et al.*, 2023) e com nimesulida (Candido *et al.*, 2022), demonstraram significativa atividade antibacteriana sobre espécies Gram-negativas e Gram-positivas.

Os resultados recentemente publicados por nosso grupo de pesquisa, utilizando o metalofármaco de prata(I) associado ao ácido 4-aminobenzóico (Aquaroni *et al.*, 2020) e à probenecida (Ag-PROB) (Lustri *et al.*, 2023)

evidenciaram um considerável potencial inibitório no crescimento bacteriano sobre espécies Gram-positivas e Gram-negativas.

O cobre é um metal de relevância clínica, cuja utilização na medicina remonta à antiguidade, sendo reconhecido por suas propriedades como agente antibacteriano de grande eficácia. Um exemplo notável dessa aplicação é o complexo de Cu(II) com ciprofloxacina, o qual também demonstra considerável atividade antibacteriana (Matshwele *et al.*, 2023).

A literatura relata diversos resultados promissores de compostos de cobre(II) associados a ligantes bioativos com atividade antibacteriana sobre *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922 e *P. aeruginosa* ATCC 27583, tais como sulfonamida (Nakahata *et al.*, 2020), rodamina (Ajala *et al.*, 2022), morfolina ditiocarbamato de potássio (Balakrishnan *et al.*, 2019), polietileno tereftalato (Xie *et al.*, 2023), de *N*-(4-metoxibenzil) *N*-(feniletil) ditiocarbamato (Singh *et al.*, 2023), de pirazolona (Zhang, Huan *et al.*, 2021) e nanopartículas de cobre com curcumina (Rajkumari *et al.*, 2023), piridina e tiocianato sobre *E. coli* ATCC 35218 (Abalintsina *et al.*, 2022).

Complexos de cobre com ligantes mistos, demonstraram grande eficácia na atividade antibacteriana sobre bactérias Gram-negativas, e, além disso, interagiram significativamente com o receptor do SARS-Cov-2 (Arthi *et al.*, 2023).

A literatura também relata complexos de zinco(II) com atividade antibacteriana sobre *E. coli* ATCC 8899 e *S. aureus* ATCC 25923, como o complexo de zinco-glicose-citrato (Zhang, Yun *et al.*, 2021), de *N*-(4-metoxibenzil) *N*-(feniletil) ditiocarbamato (Singh *et al.*, 2023) e de pirazolona (Zhang, Liang *et al.*, 2021), de curcumina sobre *B. subtilis* e *E. coli* (Al-Thubaiti, 2023) e com ortofenilenodiamina (OPDA) com efeito inibitório sobre cepas de

E. coli, *B. subtilis*, *K. pneumoniae* e *B. cereus* (kavitha; Alivelu; Savithajyostna, 2024).

1.3 Ligantes bioativos utilizados

Neste trabalho, foram utilizados dois ligantes bioativos, a biotina (Bio) e a L-carnosina (Lcar) para a síntese de complexos metálicos de Ag(I), Cu(II) e Zn(II) e avaliação das atividades antibacterianas.

1.4 Biotina (BIO)

A biotina(Figura 1) é vitamina hidrossolúvel, conhecida como vitamina B7, vitamina H e coenzima R, (Zhou *et al.*, 2023) considerada um suplemento natural, que atua como coenzima para as enzimas carboxilases envolvidas no metabolismo de carboidratos e lipídios (Muthuraman *et al.*, 2023) que desempenha um papel importante na sinalização celular e na regulação de genes epigenéticos (Kallus *et al.*, 2019). Na mesma direção, a biotina atua como uma coenzima em diversos processos enzimáticos, catalisando a fixação e transferência de dióxido de carbono. Existem várias carboxilases dependentes de biotina, todas as quais necessitam de íons metálicos, como Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} ou Cu^{2+} , para a carboxilação da biotina com trifosfato de adenosina (Goncharova; Sykora; Urbanová, 2010).

A literatura aponta para o uso potencial da biotina como um ligante de endocitose, mediando a interação com o transportador multivitamínico dependente de sódio (também denominado receptor de biotina), o qual se encontra expresso em células epiteliais, endoteliais e neoplásicas. Por esta razão, o direcionamento da biotina tem sido investigado em estratégias de conjugação de pró-fármacos, com o objetivo de otimizar a entrega celular de

compostos ativos incorporados (Li *et al.*, 2023) e, por ser essencial para as funções celulares normais, o crescimento e o desenvolvimento (Wang *et al.*, 2020).

A estrutura química da biotina possibilita sua utilização como um ligante bioativo para a síntese de complexos com metais prata(I), cobre (II) e zinco (II) proposto nesse trabalho. Pois atua como uma coenzima em muitos processos enzimáticos que catalisam a fixação e transferência de dióxido de carbono (Goncharova; Sykora; Urbanová, 2010).

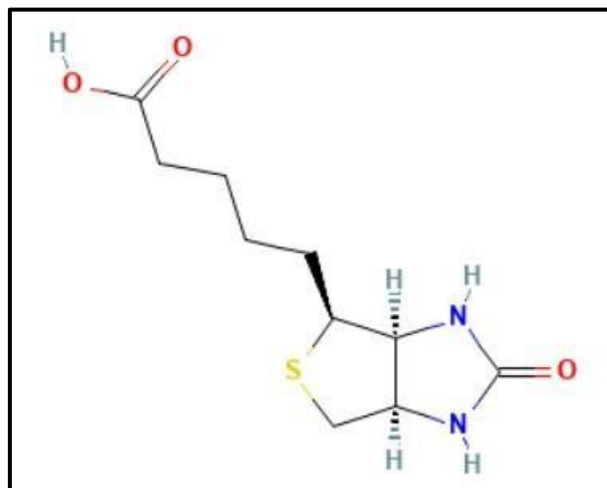


Figura 1. Fórmula estrutural da biotina.

Fonte: Pubchem.

1.5 L-carnosina (Lcar)

A L-carnosina (Figura 2) é um dipeptídeo constituído pelos aminoácidos beta-alanina e L-histidina, altamente solúvel em água, e possui três grupos ionizáveis, incluindo um grupo carboxílico e um anel imidazólico, apresenta atividade antioxidante mediada por diferentes mecanismos envolvendo metais

de quelação de íons e eliminação de espécies reativas de oxigênio e radicais peróxido. Estudos em animais e humanos sugerem que a carnosina

pode acelerar cicatrização de feridas e lesão pulmonar induzida por quimiorradioterapia (Efthymakis; Neri, 2022) estrutura química da L-carnosina possibilita a sua utilização como ligante bioativo para a síntese de complexo com metal prata(I).

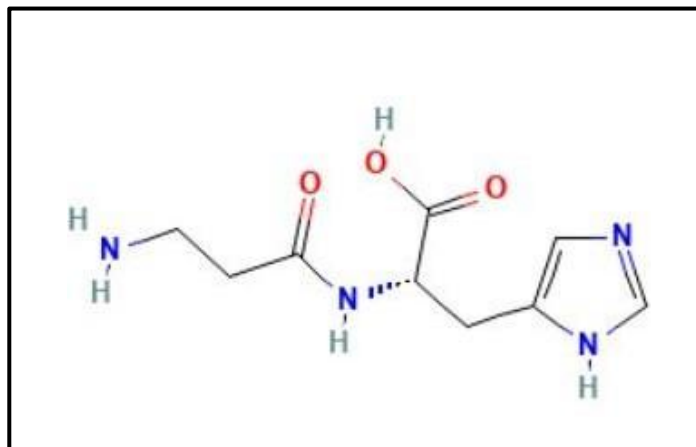


Figura 2. Fórmula estrutural da L-carnosina.

Fonte: Pubchem.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivos a síntese, caracterização, análise da atividade antibacteriana dos novos complexos metálicos Ag (I), Cu (II) e Zn (II) com os ligantes BIO e Lcar.

2.2 Objetivos específicos

- Síntese e caracterização dos novos complexos de Ag(I), Cu (II) e Zn (II) com os ligantes bioativos BIO e Lcar;
- Otimização das técnicas de síntese em relação aos valores de pH ideais, concentrações, temperatura, tempo de reação, e proporção metal-ligante;
- Caracterização por técnicas instrumentais de espectroscopia vibracional de absorção na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), análise elementar (AE), e análise térmica (TGA);
- Avaliação da ação inibitória, *in vitro*, por testes de difusão em discos, dos metalofármacos obtidos, dos ligantes livres, sais de partida, sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.
- Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos complexos metálicos que apresentaram atividade antibacteriana por difusão em discos.
- Avaliação da estabilidade sob condições de ar e luz, bem como à avaliação da sua atividade citotóxica em modelo *in vivo* utilizando *Zophobas morio* como um modelo alternativo, para os complexos que demonstraram atividade antibacteriana por difusão em discos.

3. MATERIAS E METODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Reagentes para a síntese dos complexos

Os ligantes biotina, L-carnosina, AgNO₃ (99%), CuCl₂, CuSO₄, ZnCl₂, ZnSO₄, usados no presente trabalho foram obtidos dos laboratórios, respectivamente, Sigma Aldrich®, SM Empreendimentos Farmacêuticos LTDA, Labsynth®, Dinâmica®. O KOH) (85%) obtido da Labsynth®.

3.1.2 Reagentes utilizados na composição dos meios de cultivo de ensaios antibacterianos

Os meios de cultivo utilizados nos ensaios antibacterianos foram o Brain Heart Infusion Broth (BHI) (Kasv®), o Mueller Hinton Agar (MH) (Kasv®), a Resazurina e o Sabouraud Dextrose Líquido (SD) (Kasv®).

3.1.3 Cepas bacterianas

As cepas bacterianas *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus cereus* (ATCC 14579), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13833) *Escherichia coli* (EC 958), *Pseudomonas aeruginosa* (ATTCC 27253), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) e um fungo *Candida albicans* (10231), usadas nos ensaios foram obtidas da Coleção de Culturas da Fundação André Toselho.

3.1 MÉTODOS

3.1.2 Sínteses de complexos metálicos

O complexo Ag-BIO foi sintetizado pela reação de 20 mL de solução aquosa contendo 1 mmol (0,24431 g) de biotina e 1 mmol (0,05611 g) de KOH (pH ideal 12), com 20 mL da solução aquosa contendo 1 mmol (0,169 g) de AgNO₃. A síntese foi realizada à temperatura ambiente, com agitação constante e ao abrigo da luz. Após 30 minutos de reação, foi observado um precipitado branco que foi coletado por filtração, usando um papel de filtro membrana de

nitrocelulose 47 mm 0.45 μm . Após esse procedimento, o precipitado obtido foi submetido à secagem completa em uma estufa a uma temperatura entre 35°C e 37°C em estufa bacteriológica, ao abrigo da luz, por 7 dias. O complexo Ag-BIO, foi acondicionado em um tubo de micro centrífuga estéril, envolto em papel alumínio e armazenado ao abrigo da luz até o momento de sua utilização.

O complexo Ag-Lcar foi sintetizado pela reação de 20 mL de solução aquosa contendo 1 mmol (0,453 g) de L-carnosina e 1 mmol (0,05611 g) de KOH (pH ideal 12), com 20 mL da solução aquosa contendo 1 mmol (0,348 g) de AgNO_3 . A síntese foi realizada sob agitação constante e temperatura ambiente. Após 30 minutos de reação, foi observado um precipitado branco coletado por filtração, usando um papel de filtro membrana de nitrocelulose 47 mm 0.45 μm . Após esse procedimento, o precipitado foi submetido a secagem em estufa bacteriológica de 35°C a 37°C, ao abrigo da luz, por 9 dias.

O complexo Zn1-BIO foi sintetizado pela da reação de 20 mL de solução aquosa contendo 1 mmol (0,24431 g) de biotina e 1 mmol (0,05611 g) de KOH (pH ideal 12), com 20 mL da solução aquosa contendo 1 mmol (0,136 g) de ZnCl_2 . A síntese foi realizada sob agitação constante em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após 30 minutos de reação, foi observado um precipitado branco que foi coletado por filtração, usando um papel de filtro membrana de nitrocelulose 47 mm 0.45 μm . Após esse procedimento, o precipitado obtido foi submetido à secagem completa em uma estufa bacteriológica, ao abrigo da luz, por 5 dias. O complexo Zn1-BIO, foi adicionado em um tubo de micro centrífuga estéril, envolto em papel alumínio e armazenado ao abrigo da luz até o momento de sua utilização.

O complexo Zn2-BIO foi sintetizado pela reação de 20 mL de solução aquosa contendo 1 mmol (0,24431 g) de biotina e 1 mmol (0,05611 g) de KOH (pH ideal 12), com 20 mL da solução aquosa contendo 1 mmol (0,0287 g) de ZnSO_4 . A síntese foi realizada sob agitação constante em agitador magnético e

temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após 30 minutos de reação, foi observado um precipitado branco que foi coletado por filtração, usando um papel de filtro membrana de nitrocelulose 47 mm 0.45 μm . Após esse procedimento, o precipitado obtido foi submetido à secagem completa em uma estufa a uma temperatura entre 35°C e 37°C em estufa bacteriológica, ao abrigo da luz, por 2 dias. O complexo Zn₂-BIO foi acondicionado em tubo de micro centrífuga estéril, envolto em papel alumínio e armazenado ao abrigo da luz até o momento de sua utilização.

O complexo Cu₁-BIO foi sintetizado pela reação de 20 mL de solução aquosa contendo 1 mmol (0,24431 g) de biotina e 1 mmol (0,05611 g) de KOH (pH ideal 12), com 20 mL da solução aquosa que continha 1 mmol (0,170 g) de CuCl₂. A síntese foi realizada sob agitação constante em agitador magnético e temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após 30 minutos de reação, foi observado um precipitado azul que foi coletado por filtração, usando papel um filtro membrana de nitrocelulose 47 mm 0.45 μm . Após esse procedimento, o precipitado obtido foi submetido à secagem completa em estufa a uma temperatura entre 35°C e 37°C em estufa bacteriológica, ao abrigo da luz, por 6 dias. O complexo Cu₁-BIO foi acondicionado em um tubo de micro centrífuga estéril, envolto em papel alumínio e guardado longe da luz até o momento de sua utilização.

O complexo Cu₂-BIO foi sintetizado pela reação de 20 mL de solução aquosa contendo 1 mmol (0,24431 g) de biotina e 1 mmol (0,05611 g) de KOH (pH ideal 8), com 20 mL da solução aquosa contendo 1 mmol (0,252 g) de CuSO₄. A síntese foi realizada sob agitação constante em agitador magnético e temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após 30 minutos de reação, foi observado um precipitado azul que foi coletado por filtração, usando um papel de filtro membrana de nitrocelulose 0.42 μm . Após esse procedimento, o precipitado obtido foi submetido à secagem completa em uma estufa a uma

temperatura entre 35°C e 37°C em estufa bacteriológica, ao abrigo da luz, por 6 dias. O complexo Cu₂-BIO foi acondicionado em um tubo de micro centrifuga estéril, envolto em papel alumínio e armazenado ao abrigo da luz até o momento de sua utilização.

3.1.3 Caracterização físico-químicas dos complexos metálicos sintetizados

3.1.3.1 Análise elementar

As análises elementares de carbono, hidrogênio e nitrogênio foram realizadas em um equipamento Perkin-Elmer modelo 2400 CHNS/O. Estes estudos foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Pedro Corbi, do Instituto de Química da Universidade de Campinas – UNICAMP.

3.1.3.2 Análise termogravimétrica

Os estudos de análise termogravimétrica (TGA) foram conduzidos usando um termoanalisador TGA SDT Q600 da TA Instruments, com um cadinho de alumina e um fluxo de ar de 50 cm³·min⁻¹ em uma atmosfera de oxigênio. A taxa de aquecimento foi de 10°C·min⁻¹, variando de 25°C a 900°C. As curvas resultantes foram analisadas com o software Origin 7. Esses estudos foram realizados em parceria com o Prof. Dr. Hernane da Silva Barud, do laboratório de Biopolímeros e Biomateriais-BioPolMat da Universidade de Araraquara – UNIARA.

3.2.3.3 Espectroscopia no infravermelho por transformada de fourier (FTIR)

Para a obtenção de espectros de absorção na região do infravermelho dos complexos sintetizados as amostras foram analisadas em um espectrômetro FTIR Cary 630 Agilent, no laboratório de Celulose Bacteriana e Química Medicinal - CBQUIM da Universidade de Araraquara - UNIARA usando o acessório EasiDiff (Pike Technology) de reflectância difusa em uma faixa de 4000- 650 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} .

3.2.3.4 Análises das atividades inibitória de crescimento bacteriano pelos complexos

3.2.3.5 Método por difusão em disco

O teste de sensibilidade das bactérias Gram-negativas (*P. aeruginosa* ATCC 27253 e *E. coli* EC 958), Gram-positivas (*S. aureus* ATCC 25923 e *E. faecalis* ATCC 29212) e da levedura (*C. albicans* 10231), aos complexos metálicos sintetizados, foi realizado utilizando técnica de difusão em discos seguindo o método (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018).

Os microrganismos foram inoculados em tubos contendo caldo BHI estéril por 18h a 35°C-37°C. Após esse período, os microrganismos foram diluídos em BHI até atingir a escala nefelométrica 0,5 de McFarland ($\sim 1,5 \times 10^8 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$). As suspensões bacterianas obtidas foram semeadas, com auxílio de *swab* estéril em placas de ágar Mueller-Hinton (MH) e a levedura *C. albicans*, em meio Ágar Sabouraud-Dextrose (SD). Discos e papel de filtro estéreis de 10,0 mm de diâmetro (Whatman 3) foram impregnados assepticamente, utilizando solução aquosa de DMSO 10% com

0,057mmol de complexo Ag-BIO, 0,065 mmol de Zn1-BIO, 0,066 mmol de Cu1-BIO, 0,163 mmol de Cu2-BIO, 0,162 mmol de Zn2-BIO e 0,060 mmol de Ag-Lcar. Após impregnação, os discos foram mantidos em estufa bacteriológica a 35°C-37°C, até completa secagem do solvente. A seguir, os discos impregnados foram depositados na superfície das placas de MH e SD inoculadas com as suspensões dos cultivos bacterianos e da levedura, respectivamente. As placas foram incubadas durante 24h a 35°C-37°C. Após esse período, foram avaliadas a formação de halos de inibição de crescimento microbiano ao redor dos discos e avaliadas quanto ao desenvolvimento de halos de inibição ao redor dos discos. Os halos foram mensurados em mm. Os testes foram realizados em triplicata.

Esses experimentos foram realizados no laboratório de Celulose Bacteriana e Química Medicinal – CBQUIM da Universidade de Araraquara – UNIARA.

3.1.3.6 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos complexos obtidos

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos compostos foi determinada pelo ensaio de diluição em microplaca, segundo o guia CLSI, 2018 (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018). Os testes foram realizados usando as cepas bacterianas Gram-negativas *K. pneumoniae*, *E. coli* (EC958) e cepas positivas *S. aureus* (ATCC 25923) e *B. cereus* (ATCC 14579).

Para os experimentos realizados, as cepas bacterianas foram cultivadas em meio BHI líquido a 37°C por 18 horas. A partir desse cultivo, as bactérias foram diluídas no mesmo meio, até atingirem a escala nefelométrica 1,0 de McFarland ($\sim 3 \times 10^8$ mg·mL⁻¹). A partir de suspensões estoque em DMSO 10% Ag-Bio (20,0 mg·mL⁻¹) e Cu-Bio (50,0 mg·mL⁻¹), os complexos foram submetidos a diluições seriadas (1:2) em uma microplaca de 96 poços com volume final de 100 µL. Em seguida, foram adicionados 100 µL da suspensão bacteriana na escala 1,0 de

McFarland, para atingir o volume final 200 µL/poço, levando a diluição das suspensões bacterianas para a escala de 0,5 de McFarland ($\sim 1,5 \times 10^8$ mg·mL⁻¹). Como controle positivo, foram utilizados os sais de partida nas mesmas diluições seriadas dos complexos metálicos. As microplacas foram incubadas a 37°C por 18 horas para posterior análise da CIM. Após o período de incubação, foram adicionados em cada poço das microplacas 20 µL de resazurina a 0,02% em solução aquosa estéril. Após 4 horas de incubação, a leitura foi realizada. Esse experimento foi realizado no laboratório de Celulose Bacteriana e Química Medicinal – CBQUIM da Universidade de Araraquara – UNIARA.

3.1.3.7 Teste de estabilidade ar/luz do complexo Ag-BIO

A estabilidade do complexo Ag-BIO sob as condições de ar e luz foi analisada por exposição direta à luz fluorescente (12 W) em atmosfera de ar, à temperatura ambiente. Discos estéreis de papel de filtro (Whatman 3–10,0 mm de diâmetro) foram impregnados com Ag-BIO (1 mg/disco) e expostos ao ar e à luz conforme descrito por Lustri e colaboradores (Lustri *et al.*, 2023). A estabilidade foi monitorada visualmente durante um período de 120 horas. A cada 24 horas de exposição ao ar/luz (do intervalo de 24 a 120 horas), os discos impregnados foram colocados sobre a superfície de ágar MH previamente inoculado com *E. coli* EC 958. As placas foram incubadas por 18 horas a uma temperatura de 35°C a 37°C e, em seguida, analisadas para avaliar a relação entre a estabilidade e a manutenção da atividade antimicrobiana do complexo Ag-BIO.

3.1.3.8 Avaliação da atividade citotóxica do complexo ag-bio, *in vivo*, empregando o modelo alternativo de *Z. morio*

O experimento foi realizado conforme as diretrizes descritas por Sousa *et. al* (Sousa *et al.*, 2023), com algumas modificações. Foram utilizadas larvas de *Z. morio*, com massa aproximada de 700 mg cada, distribuídas de forma aleatória em triplicata para a execução dos testes. Um volume de 20 μL (20 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ do complexo Ag-BIO em uma concentração de 10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$).

Foi injetado na região da hemocele, situada no terceiro esternito visível acima das pernas, na porção ventral, utilizando uma seringa de insulina com agulha fixa (6 mm x 0,25 mm), marca Needs.

As larvas foram incubadas, em triplicata, em placas de Petri com aberturas para ventilação, sob condições de temperatura de $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de 70–80% e fotoperíodo claro-escuro, com 14 horas de luz e 10 horas de escuridão, em uma estufa B.O.D. A viabilidade dos grupos foi observada após 12, 24 e 48 horas, por meio da análise da ausência de movimento, da presença de melanização e das mortes. Como controle, os mesmos procedimentos foram realizados utilizando o ligante livre (BIO).

4. RESULTADOS

4.1 Espectroscopia por ftir do complexo AG-BIO

O espectro FTIR do ligante BIO (padrão A) foi comparado ao espectro do complexo Ag-BIO (padrão B) para identificar possíveis interações do metal com os grupos funcionais do ligante. A banda em 3291.445 cm^{-1} , atribuída ao estiramento dos grupos O-H e N-H no BIO, sofre um deslocamento para 3224.707 cm^{-1} no complexo Ag-BIO. Esse deslocamento para menor energia sugere uma possível coordenação do metal com os grupos doadores do ligante, evidenciando interação entre a prata e os possíveis sítios de coordenação da BIO.

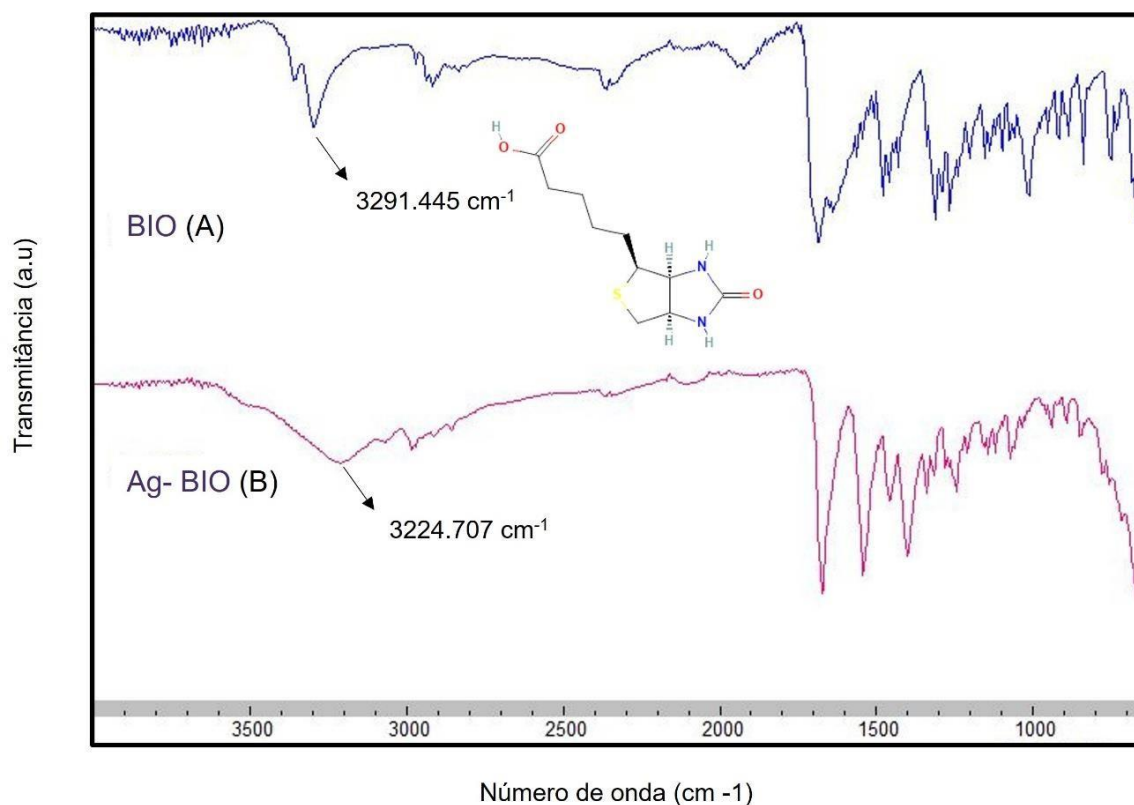


Figura 3. Análise por FTIR do complexo metálico Ag-BIO, onde (A): ligante BIO e (B): Complexo Ag-BIO

4.1.1 Análise elementar do complexo AG-BIO

A análise elementar permitiu determinar a proporção metal:ligante no complexo Ag-BIO, indicando uma razão 1:1 entre a prata e o ligante. A composição teórica calculada para a fórmula $\text{Ag}(\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ foi C = 31,02%, H = 4,95%, N = 7,24%, enquanto os valores experimentais encontrados foram C = 30,28%, H = 4,62%, N = 7,07%. A pequena diferença entre os valores teóricos e experimentais sugere que a síntese do complexo foi bem-sucedida e que a composição química do material obtido está de acordo com a estrutura proposta, possivelmente contendo duas moléculas de água de hidratação.

4.1.2 Análise termogravimétrica do complexo AG-BIO

A partir dos dados obtidos na análise elementar, foi confirmado a composição do complexo Ag-BIO, $[\text{Ag}(\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_3\text{S})] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. A TGA possibilitou avaliar a curva termogravimétrica, onde é mostrada na Figura 4, a perda do ligante nas temperaturas de 278°C a 582°C. Dessa forma, foi possível calcular a perda do ligante que foi avaliada em 75,98%, sendo o resíduo final identificado como a prata metálica calculado para Ag^0 (%): 24,02 %.

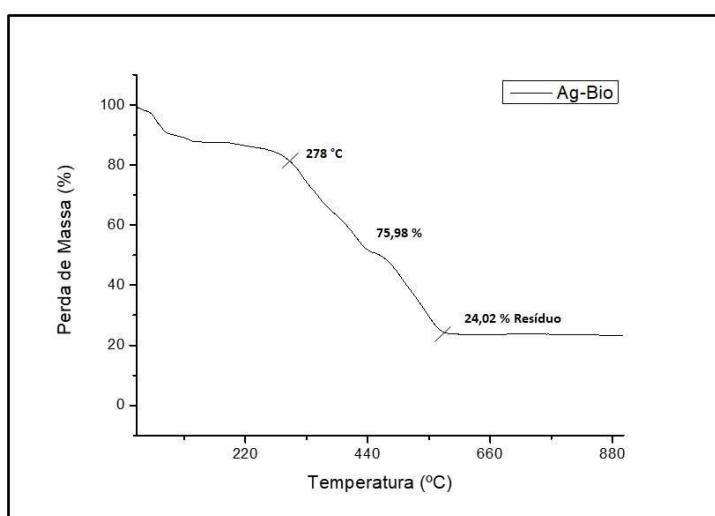


Figura 4. Curva termogravimétrica do complexo Ag-BIO

4.2 Espectroscopia por FTIR do complexo AG-Lcar

O espectro FTIR do ligante Lcar (padrão A) foi relacionado ao espectro do complexo Ag-Lcar(padrão B) para identificar possíveis interações do metal com os grupos funcionais do ligante. A banda em 1563.766 cm^{-1} , atribuída a vibração ao estiramento do grupo N- H no Lcar, sofre um deslocamento para 1537.670 cm^{-1} no complexo Ag-Lcar. Esse deslocamento para menor energia sugere um possível coordenação do metal com os grupos doadores do ligante, evidenciando interação entre a prata e os possíveis sites de coordenação da prata.

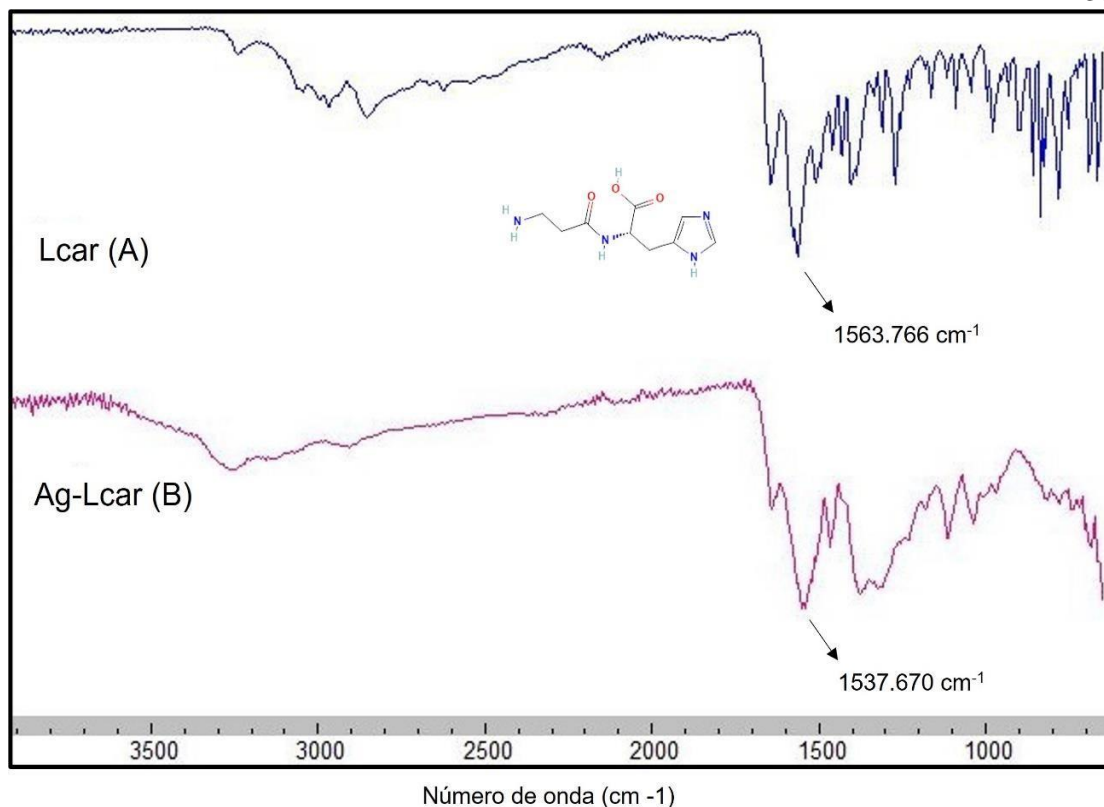


Figura 5. Análise por FTIR do complexo metálico Ag-Lcar, onde (A): ligante Lcar e (B): Complexo Ag-Lcar

O espectro FTIR do ligante Lcar (padrão A) foi relacionado ao espectro do complexo Ag-Lcar(padrão B) para identificar possíveis interações do metal com os grupos funcionais do ligante. A banda em 1563.766 cm⁻¹, atribuída a vibração ao estiramento do grupo N- H no Lcar, sofre um deslocamento para 1537.670 cm⁻¹ no complexo Ag-Lcar. Esse deslocamento para menor energia sugere um possível coordenação do metal com os grupos doadores do ligante, evidenciando interação entre a prata e os possíveis sites de coordenação da prata.

4.3 Espectroscopia por FTIR do complexo Zn1-BIO

O espectro FTIR do complexo Zn1-BIO apresenta bandas características que indicam formação do complexo metálico. A banda observada em 3287.745 cm⁻¹ no ligante livre, atribuída ao estiramento dos grupos O-H e N-H, sofre um

deslocamento para 2974.120 cm^{-1} no complexo, sugerindo uma possível interação do zinco com esses grupos. Esse deslocamento significativo pode ser resultado da coordenação direta do metal com os sítios doadores da biotina, alterando a densidade eletrônica dessas ligações. Além disso, o efeito pode estar associado a mudanças estruturais no ligante ou à formação de novas interações intermoleculares no complexo Zn1-BIO.

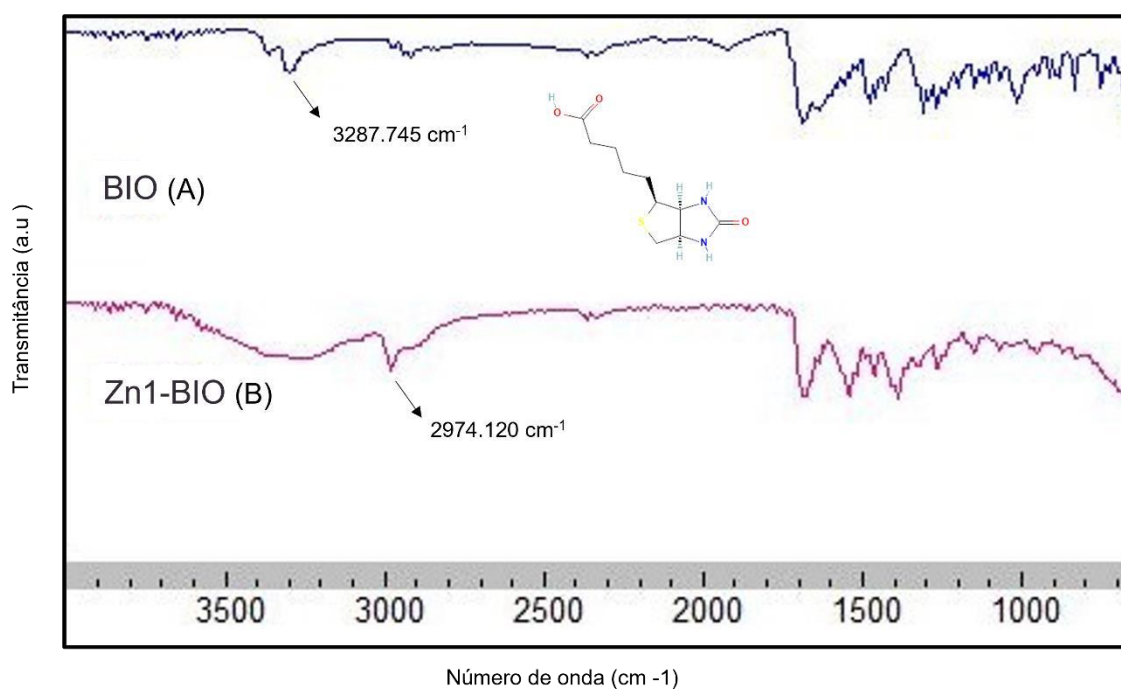


Figura 6. Análise por FTIR do complexo metálico Zn1-BIO, onde (A): ligante biotina (BIO) e (B): complexo (Zn1-BIO).

4.3.1 Análise Termogravimétrica do Zn1-BIO

A TGA proporcionou avaliar a curva termogravimétrica, onde é mostrada na figura 7, a perda do ligante nas temperaturas de $123,25^{\circ}\text{C}$ a 577°C . Desta forma, foi possível calcular a perda do ligante que foi avaliada em 57,05%, sendo o resíduo final identificado como zinco metálico calculado para ZnO° (%): 42,95 %.

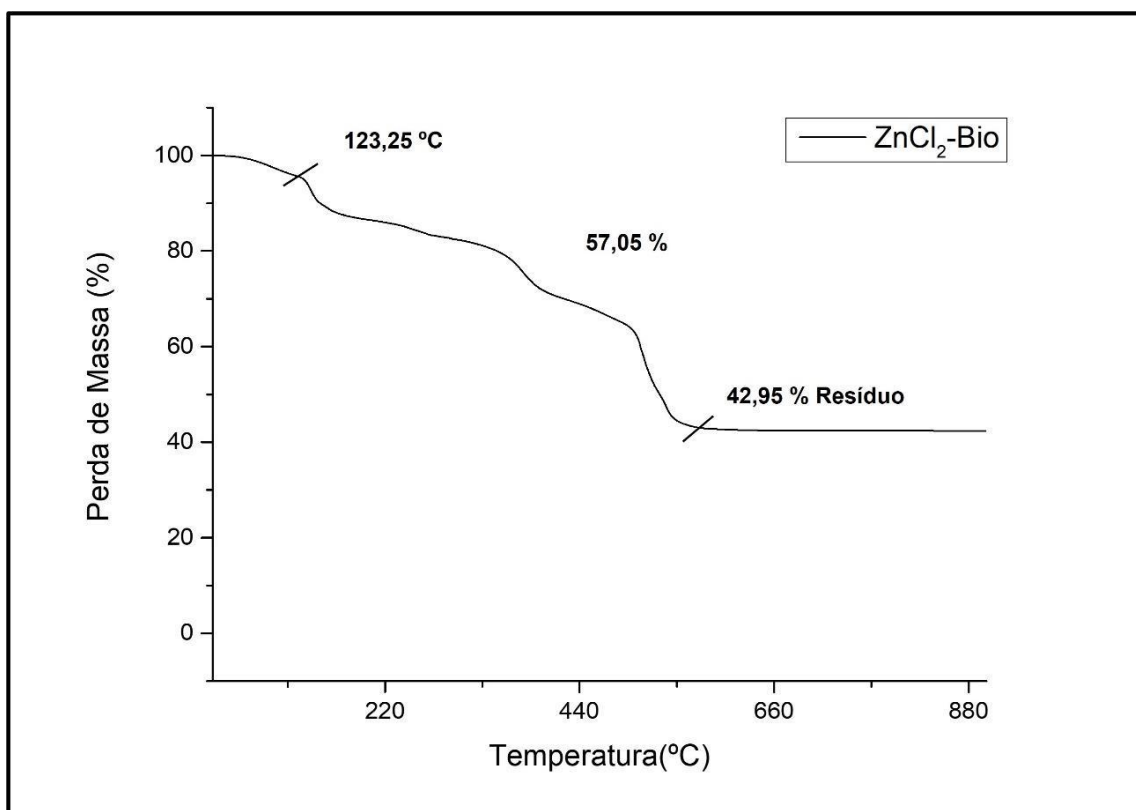


Figura 7. Curva termogravimétrica do complexo Zn1-BIO

4.4 Espectroscopia por FTIR do complexo Cu1-BIO

O espectro FTIR do ligante BIO (padrão A) foi relacionado ao espectro do complexo Cu1-BIO (padrão B) para identificar possíveis interações do metal com os grupos funcionais do ligante. A banda em 3294.835 cm^{-1} , atribuída a vibração ao estiramento do grupo O-H no BIO, sofre um deslocamento para 3220.926 cm^{-1} no complexo Cu1-BIO. Esse deslocamento para menor energia sugere um possível coordenação do metal com o grupo doador do ligante.

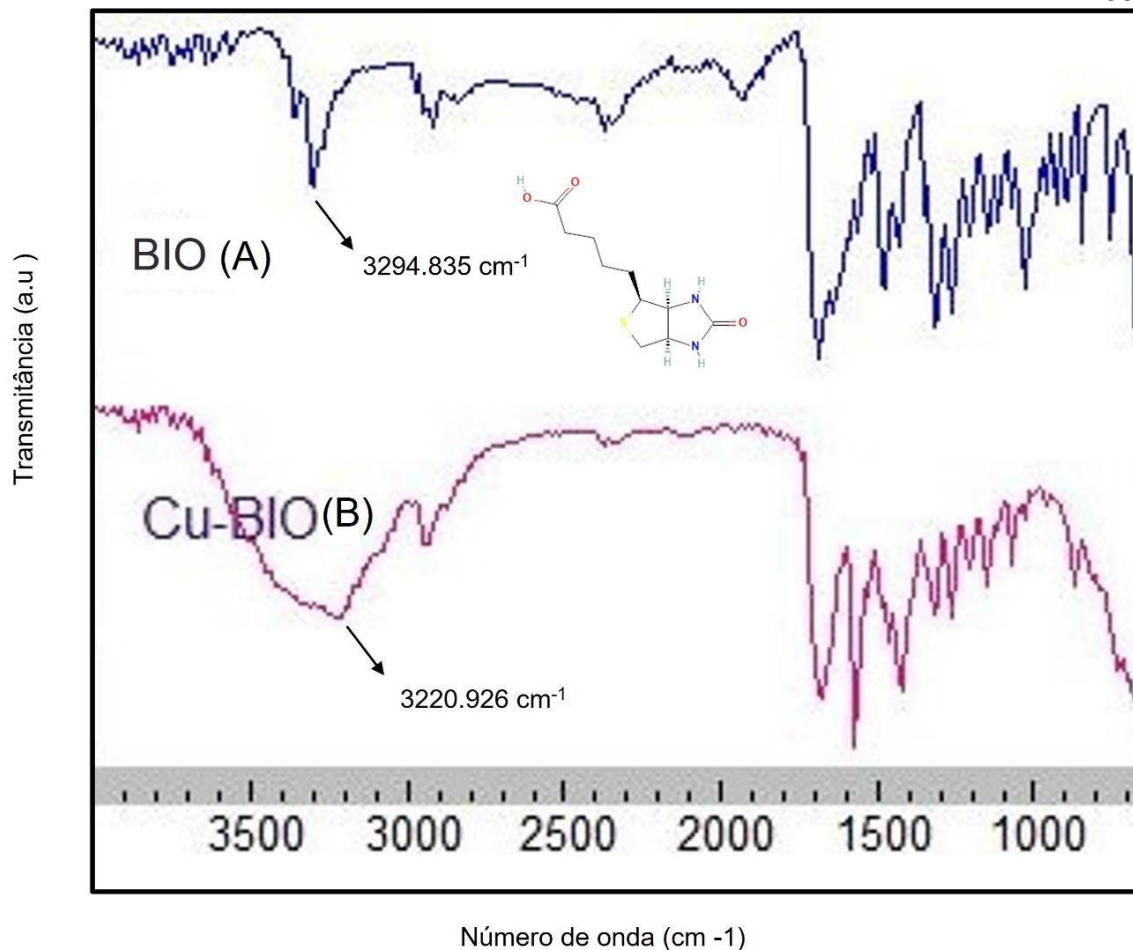


Figura 8. Análise por FTIR do complexo metálico Cu1-BIO, onde (A): ligante biotina (BIO) e (B): complexo (Cu1-BIO).

4.4.1 Análise Elementar Cu1-BIO

A análise elementar permitiu determinar a proporção metal:ligante no complexo Cu1-BIO, apontando uma razão 1:1 entre cobre e o ligante. A composição teórica calculada para a fórmula $[\text{Cu}(\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_3\text{S})] \cdot \text{H}_2\text{O}$ foi C = 36,97%; H = 5,27%; N = 8,62%, enquanto os valores encontrados foram C = 37,00%; H = 5,05%; N = 8,59%. A pequena diferença entre os valores teóricos e experimentais sugere que a síntese do complexo foi bem-sucedida e que a composição química do material obtido está de acordo com a estrutura proposta.

4.4.2. Análise Termogravimétrica Cu1-BIO

A partir dos resultados obtidos na análise elementar, foi confirmado a composição do complexo Cu1-BIO, formulado como $[\text{Cu}(\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}_3\text{S})]\cdot\text{H}_2\text{O}$. A curva termogravimétrica possibilitou avaliar a perda do ligante nas temperaturas de 198°C a 549°C. Dessa maneira, foi possível calcular a perda do ligante que foi avaliado em 82,46%, sendo o resíduo final identificado como óxido de cobre calculado para CuO^0 (%): 17,54%.

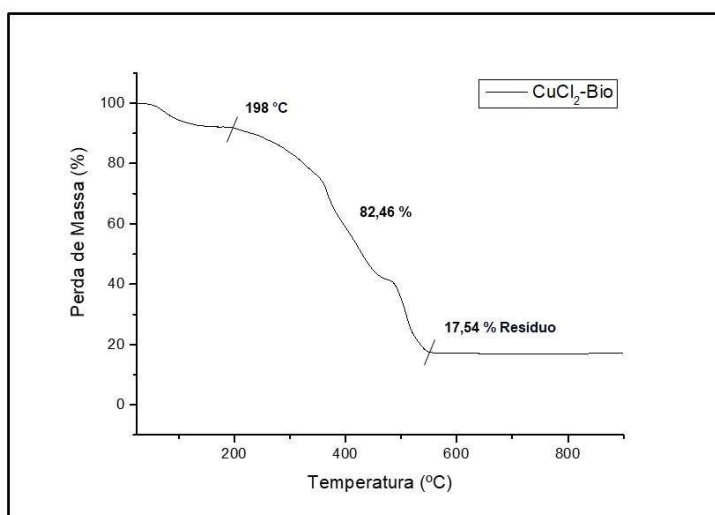


Figura 9. Curva termogravimétrica do complexo Cu1-BIO

4.5 Determinação da atividade inibitória de crescimento de microrganismos dos complexos metálicos Ag-Bio, Cu1-Bio e Zn1-Bio

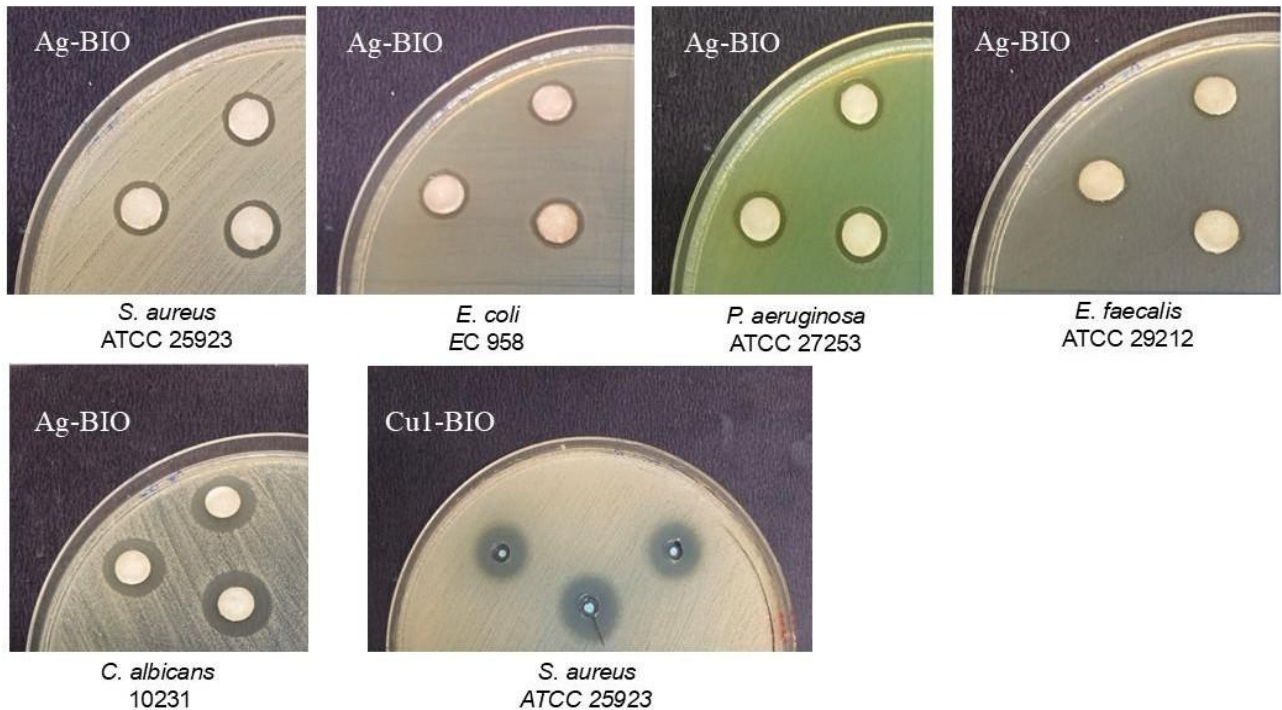
4.5.1 Atividade inibitória de crescimento por difusão em discos dos complexos metálicos obtidos

Os resultados do teste de atividade inibitória de crescimento pela técnica de difusão em discos realizados para os complexos encontram-se descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Atividade inibitória de crescimento dos complexos metálicos Ag-BIO, Cu1- BIO, Zn1-BIO e sal de partida AgNO_3 sobre os microrganismos testados.

Halos de inibição em milímetros ($\pm 0,1$ mm)				
Compostos	AgNO_3	Ag-BIO	Cu1-BIO	Zn1-BIO
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	13,2	11,3	10,3	R
<i>B. cereus</i> ATCC 14579	12,3	13,3	R	n. a
<i>E. coli</i> EC 958	11,6	13,6	R	R
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27253	12,6	10,6	R	R
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	n. a	12,0	R	R
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	n. a	14,0	R	R
<i>K. pneumoneai</i> ATCC 13833	n. a	11,6	R	n. a

(R): Microrganismos Resistente, (n.a): Não aplicado



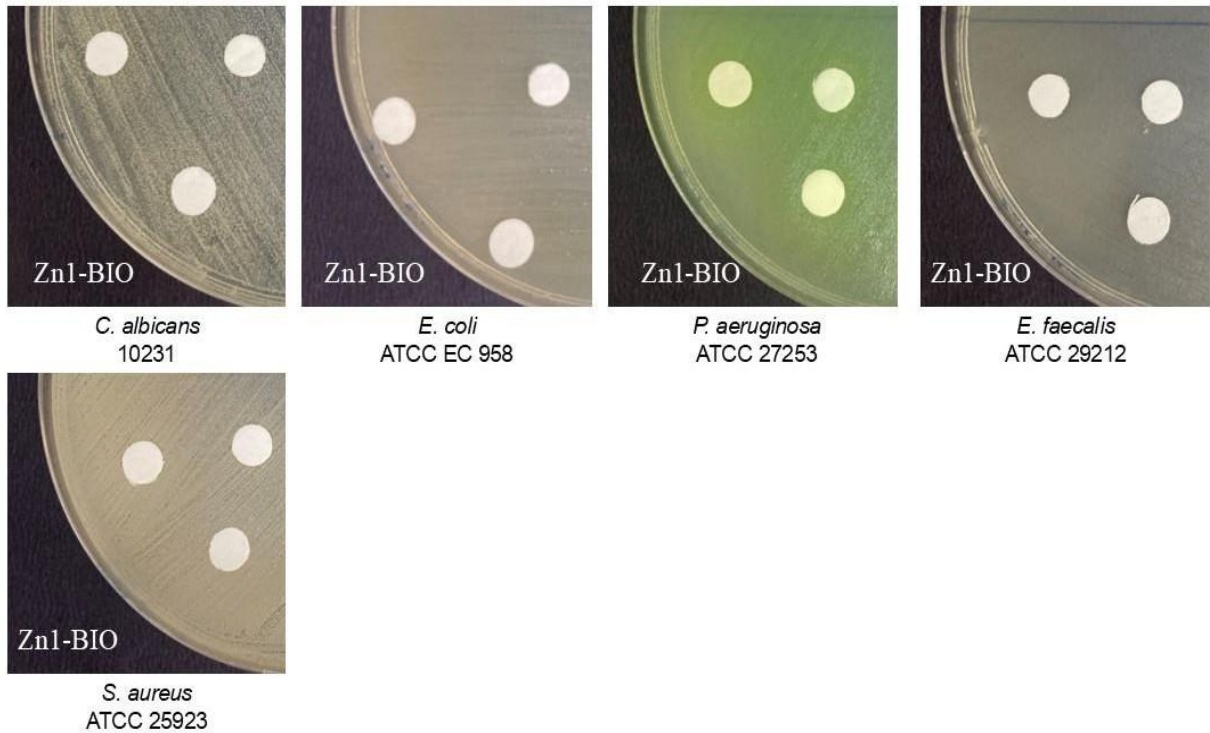


Figura 10. Observação da atividade antimicrobiana de inibição de crescimento dos microrganismos dos complexos metálicos Ag-BIO, Cu1-BIO e Zn1-BIO. **Fonte: Autoria Própria, 2024.**

Foram utilizadas cepas bacterianas Gram-negativas (*E. coli* EC 958, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *K. pneumoniae* ATCC 13883), Gram-positivas (*S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 29212) e uma levedura (*C. albicans* ATCC 10231) para a realização do teste de atividade antimicrobiana por difusão em discos, bem como para a avaliação da concentração inibitória mínima (CIM), com o propósito de analisar a eficácia dos complexos metálicos obtidos como agentes antimicrobianos. Os resultados foram comparados aos obtidos com AgNO_3 , o complexo Ag-BIO e o ligante BIO.

Conforme demonstrado na Tabela 1, o complexo metálico Ag-BIO mostrou-se eficaz na inibição dos microrganismos testados.

Esse resultado permite sugerir que a atividade antimicrobiana do complexo de prata está associada à liberação lenta do íon prata(I) ativo, que é capaz de provocar a desnaturação de proteínas e o comprometimento da função da membrana, resultando na morte da bactéria (Claudel; Schwarte; Fromm, 2020).

Em relação aos resultados obtidos para os complexos Cu1-BIO e Zn1-BIO, não foi observada atividade antimicrobiana sobre os microrganismos, exceto no caso da espécie *S. aureus*, onde o complexo Cu1-BIO demonstrou halo de inibição. Nesse sentido, não tem elementos suficientes para afirmar o mecanismo de transferência, uma vez que a inibição ocorreu apenas para uma cepa bacteriana.

Também pode-se observar que o composto Ag-BIO foi o complexo que demonstrou maior atividade de inibição contra os microrganismos, destacando-se especialmente pela sua eficácia contra a levedura *C. albicans* ATCC 10231.

Conforme apresentado na Tabela 1 o complexo Ag-BIO foi o que apresentou maior atividade de inibição sobre a cepa bacteriana *E. coli* EC 958. Devido ao seu múltiplo mecanismo de ação, o íon prata(I) é capaz de inativar proteínas, interferir nas reações redox, inativação de enzimas-chave, bloqueio da respiração celular e da transferência de elétrons. Além disso, pode também se ligar ao DNA (Aquaroni *et al.*, 2020).

4.5.2 Atividade biológica de inibição de crescimento de microrganismos Gram- positivos, Gram-negativos por concentração inibitória mínima (CIM) dos complexos metálicos Ag-BIO e Cu1-BIO

A atividade antibacteriana dos complexos metálicos Ag-BIO e Cu1-BIO foi avaliada, também, pelo ensaio de Concentração Inibitória mínima (CIM). Os valores do CIM para estes complexos, estão apresentados na Tabela 2.

(R): Microrganismos Resistente, (n.a): Não aplicado.

Tabela 2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos

Compostos	CIM (mmol L ⁻¹)			
	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>B. cereus</i> ATCC 14579	<i>K. pneumoneai</i> ATCC 13833	<i>E. coli EC</i> 958
AgNO₃	0,11	0,22	n. a	0,28
Ag-BIO	0,89	R	0,89	0,89
Cu1-BIO	20,4	R	R	R

complexos metálicos sobre cepas de microrganismos *S. aureus*, *B. cereus*, *K. pneumoniae* e *E. coli* em mmol·L⁻¹

Os complexos analisados demonstraram efetiva atividade inibitória de crescimento em relação a todas as cepas testadas. O composto Ag-BIO mostrou-se ativo na inibição do crescimento de todas as bactérias testadas em concentrações superiores às observadas para o AgNO₃, com uma CIM de 0,89 mmol·L⁻¹ maior do que a apresentada pelo AgNO₃ para os mesmos microrganismos. Similarmente, o complexo Cu1-BIO exibiu atividade na inibição do crescimento apenas para uma cepa bacteriana testada em concentração mais elevada do que a do AgNO₃, com uma CIM de 20,4 mmol·L⁻¹ superior à do AgNO₃, que foi de 0,11 mmol·L⁻¹.

4.5.3 Avaliação da estabilidade do complexo metálico Ag-BIO à exposição ao ar/ luz

Os discos impregnados com o complexo metálico Ag-BIO foram expostos ao ar e à luz fluorescente (12W) durante 120 horas. Verificou-se que os discos do complexo Ag- BIO apresentaram pouca mudança de cor, indicando que o tempo de exposição não influencia significativamente sua coloração. Observou-se que o composto começou a adquirir tonalidade marrom após 24 horas, intensificando-se gradualmente até as 120 horas. Mesmo após esse período de exposição ao ar e à luz, os resultados do teste antimicrobiano por difusão em disco demonstraram que a atividade antimicrobiana foi pouco comprometida. A Figura 11 apresenta os resultados do teste inibição de crescimento bacteriano após exposição ar/luz e a Tabela 3, as medidas dos halos de inibição de crescimento bacteriano.

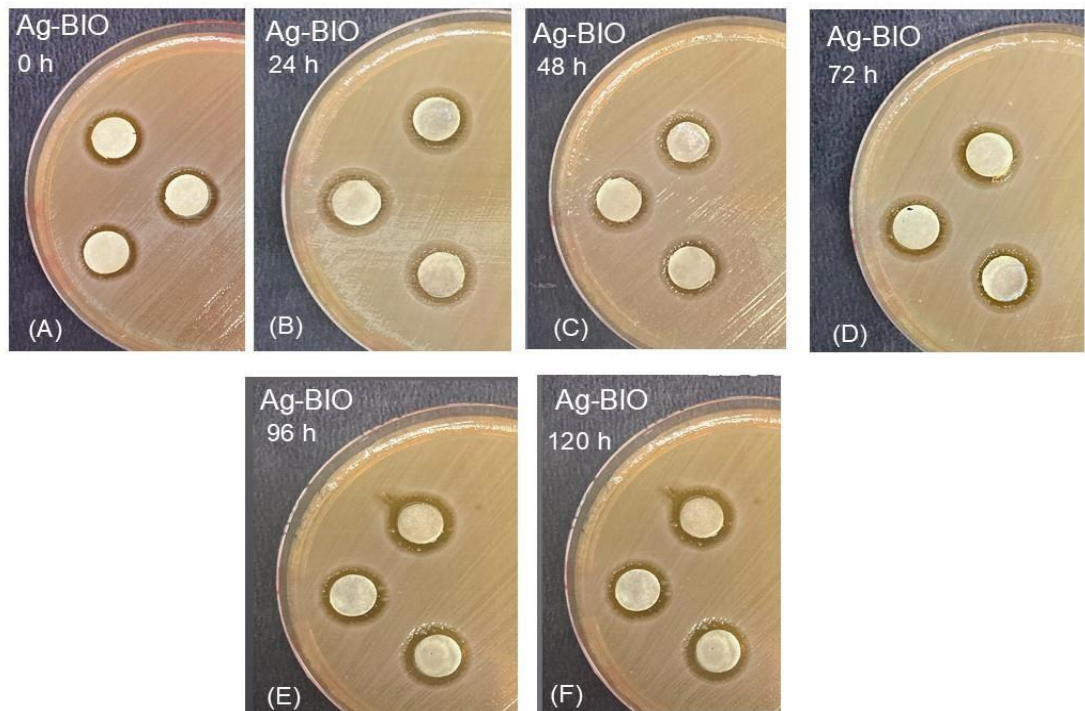


Figura 11. Halos de inibição do complexo Ag-BIO durante período de exposição ao ar/luz.

Tabela 3. Estabilidade da atividade antibacteriana após exposição ar/luz do complexo Ag-BIO

Halos de inibição em milímetros (mm)						
	0 horas	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas
Ag-BIO	12,3	9,3	11,3	10,6	10,3	10,3

O complexo Ag-BIO demonstrou atividade inibitória no crescimento da cepa bacteriana testada após um período de 120 horas de exposição. Foi observado que, mesmo após 120 horas de exposição ar/luz, os resultados da atividade antimicrobiana mostraram-se pouco afetados, conforme demonstrado na Tabela 3.

Os resultados demonstram, assim, o potencial de utilização do complexo metálico Ag- BIO na medicina, visando ampliar o arsenal terapêutico para o tratamento de infecções bacterianas.

4.5.4 Avaliação da citotoxicidade *in vivo* usando *Z. morio*

Foi realizada a avaliação da citotoxicidade *in vivo* utilizando larvas de *Z. morio* tratadas com o complexo metálico Ag-BIO na concentração de 20 mg/mL, durante um período de 48 horas. Verificou-se que, após 12, 24 e 48 horas, não houve alteração na melanização em comparação com o controle. Um outro fator importante observado foi a manutenção da mobilidade das larvas de *Z. morio* ao longo do período mencionado, ou seja, sua mobilidade se manteve estável por 48 horas.

A Figura 12 apresenta as imagens da avaliação da citotoxicidade do complexo Ag-BIO usando *Z. morio*.

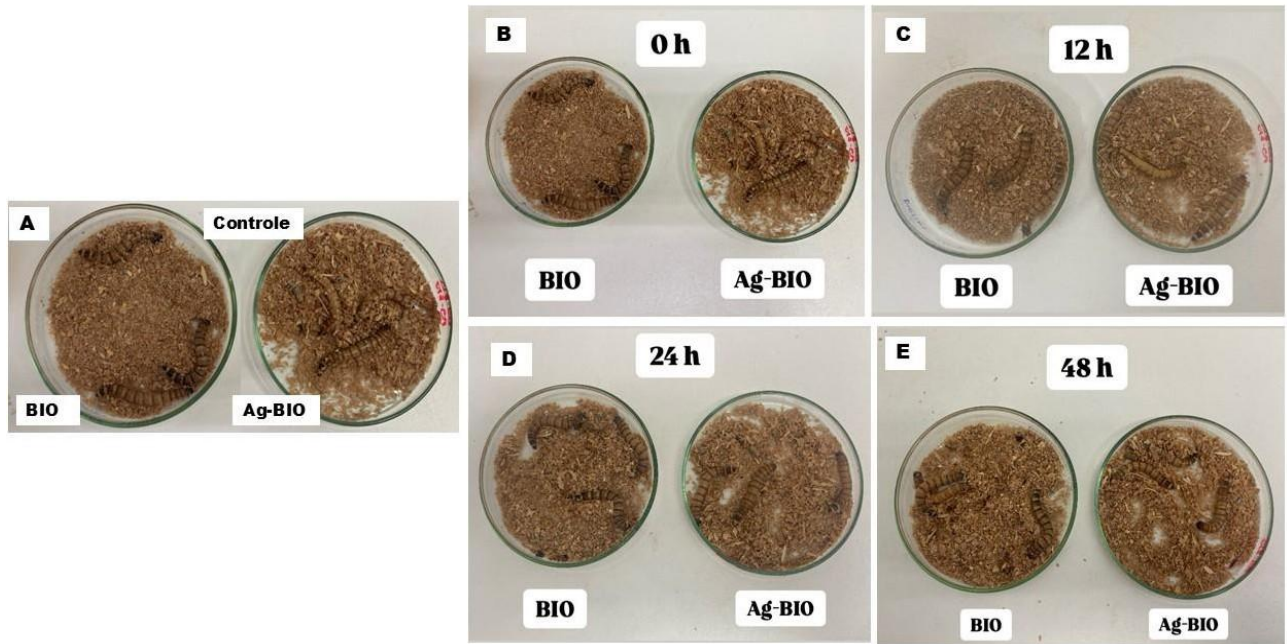


Figura 12. Avaliação da citotoxicidade do complexo Ag-BIO usando *Z. morio* A: controle, B:0 horas, C:12 horas, D:24 horas, E: 48 horas

5. CONCLUSÕES

Foram obtidos três complexos metálicos de Ag(I), Cu (II) e Zn (II) com biotina nomeados Ag-BIO, Cu1-BIO e Zn1-BIO.

Os complexos metálicos Ag-BIO e Cu1-BIO apresentaram estequiometria 1:1 $\text{Ag}(\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e Cu1-BIO $[\text{Cu}(\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_3\text{S})] \cdot \text{H}_2\text{O}$.

O complexo metálico Ag-BIO apresentou ação inibitória, in vitro, sobre as cepas bacterianas Gram-positivas (*B. cereus*, *S. aureus* ATCC 25923 e *E. faecalis* ATCC 29212), Gram-negativas (*K. pneumoniae* ATCC, *E. coli* EC 958 e *P. aeruginosa* ATCC 27253) e sobre uma cepa fúngica (*C. albicans* 10231), evidenciando o potencial para aumento do arsenal terapêutico para o tratamento de infecções bacterianas e fúngicas.

O complexo metálico Cu1-BIO apresentou atividade somente sobre a *S. aureus*.

O complexo Ag-BIO não apresentou citotoxicidade para as larvas de *Z. morio*.

O complexo metálico Zn-BIO não apresentou ação inibitória, in vitro, sobre as cepas bacterianas Gram-positivas e Gram-negativas, e sobre a levedura *C. albicans* ATCC 10231. Portanto, foi excluídos dos demais testes até o final do projeto de pesquisa.

6. PERSPECTIVAS

Caracterização do complexo Ag-BIO por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H , ^{13}C e ^{15}N .

Avaliação das atividades mutagênica e genotóxica do complexo Ag-BIO. Realização do teste interação com DNA com o complexo Ag-BIO. Obtenção de cristais do complexo metálico Ag-BIO.

Avaliação da atividade antimicrobiana, in vivo, em modelo animal.

7. REFERÊNCIAS

ABALINTSINA, Seth Armand *et al.* Synthesis, characterization and antimicrobial properties of Cobalt(III), Nickel(III), Copper(II) and Zinc(II) complexes with pyridine and thiocyanate. **Scientific African**, [s. l.], v. 18, p. e01402, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2022.e01402>.

AJALA, Samuel A. *et al.* Green and environmental friendly synthesis of copper (II) and nickel (II) complexes of rhodanine and its antibacterial effectiveness. **Current Research in Green and Sustainable Chemistry**, [s. l.], v. 5, n. May, p. 100318, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.crgsc.2022.100318>.

AL-THUBAITI, Eman Hillal. Antibacterial and antioxidant activities of curcumin/Zn metal complex with its chemical characterization and spectroscopic studies. **Heliyon**, [s. l.], v. 9, n. 6, p. e17468, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e17468>.

ALENAZY, Rawaf. Antibiotic resistance in Salmonella: Targeting multidrug resistance by understanding efflux pumps, regulators and the inhibitors. **Journal of King Saud University - Science**, [s. l.], v. 34, n. 7, p. 102275, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2022.102275>.

AQUARONI, Nayara Ap Simei *et al.* Antibacterial activities and antiproliferative assays over a tumor cells panel of a silver complex with 4-aminobenzoic acid: Studies in vitro of sustained release using bacterial cellulose membranes as support. **Journal of Inorganic Biochemistry**, [s. l.], v. 212, n. September, p. 111247, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2020.111247>.

ARTHI, Padmanathan *et al.* Multi-target activity of copper complexes: Antibacterial, DNA binding, and molecular docking with SARS-CoV-2 receptor.

Chemico-Biological Interactions, [s. l.], v. 373, n. January, p. 110349, 2023.

Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2023.110349>.

BALAKRISHNAN, Senthilkumar *et al.* Syntheses, physicochemical characterization, antibacterial studies on potassium morpholine dithiocarbamate nickel (II), copper (II) metal complexes and their ligands. **Heliyon**, [s. l.], v. 5, n. 5, p. e01687, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01687>.

BUSH, Karen; BRADFORD, Patricia A. Interplay between β -lactamases and new β -lactamase inhibitors. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 17, n. 5, p. 295–306, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41579-019-0159-8>. CANDIDO, Tuany Zambroti *et al.* Silver Nimesulide Complex in Bacterial Cellulose Membranes as an Innovative Therapeutic Method for Topical Treatment of Skin Squamous Cell Carcinoma. **Pharmaceutics**, [s. l.], v. 14, n. 2, p. 1–18, 2022. CHELKEBA, Legese; MELAKU, Tsegaye. Epidemiology of staphylococci species and their antimicrobial-resistance among patients with wound infection in Ethiopia: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, [s. l.], v. 29, p. 483–498, 2022.

CLAUDEL, Mickaël; SCHWARTE, Justine V.; FROMM, Katharina M. New Antimicrobial Strategies Based on Metal Complexes. **Chemistry (Switzerland)**, [s. l.], v. 2, n. 4, p. 849–899, 2020.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Institute CaLS. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals CLSI Supplement VET08. Edited by Pennsylvania. **CLSI supplement M100**, [s. l.], v. 4, p. 282, 2018.

DUVAL, Raphaël E.; GRARE, Marion; DEMORÉ, Béatrice. Fight against antimicrobial resistance: We always need new antibacterials but for right bacteria. **Molecules**, [s. l.], v. 24, n. 17, p. 1–9, 2019.

EFTHYMAKIS, Konstantinos; NERI, Matteo. The role of Zinc L-Carnosine in the prevention and treatment of gastrointestinal mucosal disease in humans: a review.

Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology, [s. l.], v. 46, n. 7, 2022.

FATIMA, Huma *et al.* Recent strategies for inhibiting multidrug-resistant and β -lactamase producing bacteria: A review. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 205, n. June, p. 111901, 2021. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.111901>.

FREI, Angelo *et al.* Metal complexes as a promising source for new antibiotics. **Chemical Science**, [s. l.], v. 11, n. 10, p. 2627–2639, 2020.

GONCHAROVA, Iryna; SYKORA, David; URBANOVÄ, Marie. Association of biotin with silver (I) in solution: A circular dichroism study. **Tetrahedron Asymmetry**, [s. l.], v. 21, n. 15, p. 1916–1920, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tetasy.2010.06.025>.

JEON, Jeong Ho *et al.* Transmission of antibiotic resistance genes through mobile genetic elements in *Acinetobacter baumannii* and gene-transfer prevention. **Science of the Total Environment**, [s. l.], v. 857, n. August 2022, p. 159497, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.159497>.

KALLUS, Sebastian *et al.* Synthesis and biological evaluation of biotin-conjugated anticancer thiosemicarbazones and their iron(III) and copper(II) complexes. **Journal of Inorganic Biochemistry**, [s. l.], v. 190, n. June 2018, p. 85–97, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2018.10.006>.

KAVITHA, Natte; ALIVELU, Munagala; SAVITHAJYOSTNA, Tangeda. Synthesis, Theoretical studies, and antibacterial activity of Novel Zn(II) metal complex with salicylaldehyde semicarbazone, and ortho phenylene diamine ligands. **Chemical Physics Impact**, [s. l.], v. 8, n. April, p. 100602, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chphi.2024.100602>.

LI, H. *et al.* Biotin receptor-mediated intracellular delivery of synthetic polypeptide- protein complexes. **Journal of Controlled Release**, [s. l.], v. 357, n. December 2022,p. 333–341, 2023.

LUSTRI, Wilton R. *et al.* A new complex of silver(I) with probenecid: Synthesis, characterization, and studies of antibacterial and extended spectrum β -lactamases (ESBL) inhibition activities. **Journal of Inorganic Biochemistry**, [s. l.], v. 243, n. March, 2023.

MAJDI, Chaimae *et al.* An overview on the antibacterial properties of juglone, naphthazarin, plumbagin and lawsone derivatives and their metal complexes. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, [s. l.], v. 162, n. April, p. 114690, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114690>.

MATSHWELE, James T.P. *et al.* Synthesis, characterization, antibacterial properties, mode of action and molecular docking studies of copper pyridyl complexes against drug-resistant bacteria. **Inorganic Chemistry Communications**, [s. l.], v. 158, n. P1,p. 111461, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2023.111461>.

MUTHURAMAN, N. *et al.* Assessment of serum biotin levels and its association with blood glucose in gestational diabetes mellitus. **European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology: X**, [s. l.], v. 17, n. February, p. 100181, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.eurox.2023.100181>.

NAAS, Thierry *et al.* Beta-lactamase database (BLDB)–structure and function. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 32, n. 1, p. 917–919, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/14756366.2017.1344235>.

NAKAHATA, Douglas H. *et al.* Sulfonamide-containing copper(II) complexes: New insights on biophysical interactions and antibacterial activities. **New Journal of Chemistry**, [s. l.], v. 44, n. 40, p. 17236–17244, 2020.

PEREIRA, Gabriele de Menezes *et al.* Synthesis, spectroscopic characterization, antibacterial activity and antiproliferative profile of a new silver(I) complex of 5- fluorocytosine. **Journal of Fluorine Chemistry**, [s. l.], v. 266, n. December 2022, 2023.

RAJKUMARI, Nandini Priyam *et al.* Enhancing anti-inflammatory and antibacterial activity of curcumin by nano composing with curcumin reduced copper nano for the treatment of bacterial infection. **Materials Science and Engineering: B**, [s. l.], v. 292, n. March, p. 116416, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mseb.2023.116416>.

SHREE, Pallee *et al.* Biofilms: Understanding the structure and contribution towards bacterial resistance in antibiotics. **Medicine in Microecology**, [s. l.], v. 16, n. October 2022, p. 100084, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.medmic.2023.100084>.

SINGH, Anupam *et al.* Synthesis, characterization, and in vitro antibacterial and cytotoxic study of Co(II), Ni(II), Cu(II), and Zn(II) complexes of N-(4-methoxybenzyl) N-(phenylethyl) dithiocarbamate ligand. **Journal of Molecular Structure**, [s. l.], v. 1288, n. April, p. 135835, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2023.135835>.

SOUSA, João Paulo Araujo de *et al.* Antileishmanial activity of 2-aminothiophene derivative SB-200. **International Immunopharmacology**, [s. l.], v. 123, n. August, 2023.

SURVEY, National Health. M P I E M P I E Ly. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**, [s. l.], 2022. Disponível em: <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m100/>.

WATERS, Jessica E. *et al.* Recent advances in the development of metal complexes as antibacterial agents with metal-specific modes of action. **Current Opinion in Microbiology**, [s. l.], v. 75, p. 102347, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2023.102347>.

XIE, Kefeng *et al.* Preparation and antibacterial properties of copper phthalate/polyethylene terephthalate composition fiber. **Alexandria Engineering Journal**, [s. l.], v. 75, p. 271–278, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aej.2023.05.083>.

ZHANG, Yun *et al.* A novel zinc complex with antibacterial and antioxidant activity. **BMC Chemistry**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 1–12, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13065-021-00745-2>.

ZHANG, Liang *et al.* Preparation and properties of conductive bacterial cellulose- based graphene oxide-silver nanoparticles antibacterial dressing. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 257, n. September 2020, p. 117671, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.117671>.

ZHANG, Huan *et al.* Spectroscopic and biochemical characterization of metallo- β - lactamase IMP-1 with dicarboxylic, sulfonyl, and thiol inhibitors. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 40, n. February, p. 116183, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2021.116183>.

ZHOU, Ruisi *et al.* Biotin decorated celastrol-loaded ZIF-8 nano-drug delivery system targeted epithelial ovarian cancer therapy. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, [s. l.], v. 167, n. July, p. 115573, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.115573>.