UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Química

RODRIGO DA SILVA MAFFEI

Novos complexos de Cu(II) com ligantes fluorados para
o tratamento de leishmaniose

São Paulo

Data do Depósito na SPG:
02/12/2009

RODRIGO DA SILVA MAFFEI

Novos complexos de Cu(II) com ligantes fluorados para o
tratamento de leishmaniose

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo para ob-
tenção do Título de Mestre em Química (Química
Inorgânica)

Orientador(a): Prof. Dr. Breno Pannia Espósito

São Paulo
2009

Rodrigo da Silva Maffei

Novos complexos de Cu(II) com ligantes fluorados para o tratamento de leishmaniose.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo para ob-
tenção do Título de Mestre em Química (Química
Inorgânica)

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Bom, é difícil começar um agradecimento, uma vez que tenho tanto a agradecer, ou melhor, só tenho a agradecer. Seriam necessárias muitas paginas para listar o nome de todos que me ajudaram nesse tempo todo que estou cursando o Mestrado, são tantas pessoas que, acho que ficaria até maior que a dissertação.

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus, sempre, pois senão fosse Ele, eu não estaria aqui e nunca teria tido as oportunidades que me foram dadas e nem teria conhecido as pessoas que tanto me estenderam a mão.

Apesar da lista imensa, vou citar os principais, aqueles que, sem eles, não teria passado nem pelo P1 da Universidade de São Paulo. Bom, começo pelo Breno, meu orientador, que é a pessoa que tem a maior paciência que eu já conheci na vida. Ele me auxiliou, me ajudou, brigou comigo, ficou no meu pé, me pressionou, mas tudo com uma paciência tão absurda que, acho que nunca mais vou ver isso em ninguém. Se tem uma pessoa para a qual eu devo tudo, táí o nome dela. É difícil expressar gratidão com palavras escritas e até mesmo, faladas. Ninguém consegue saber, mais do que nós mesmos, o que sentimos, portanto, nada que eu disser vai demonstrar exatamente o que eu nunca vou poder pagar, que é a dívida imensa por toda dedicação, toda paciência, todo o trabalho que esse orientador me dispensou esse tempo todo. Nunca vou poder pagar, nem com todo o dinheiro que eu ganhar no mundo e nem com todas as palavras bonitas que eu conheço ou venha a conhecer.

A minha tia Derenize e primos Fábio e Jairo, que cederam tão de boa vontade a casa deles, para que eu pudesse morar aqui em São Paulo, uma vez que meus pais ficaram no interior. Todo esse tempo que tenho estado com eles, sinto como se tivesse ganhado mais uma mãe e mais dois irmãos. Tem discussões, tem caras feias, como em qualquer lugar tem, porém, eu não sou nenhum anjo para criticar alguém nesse sentido, aliás, acho até que merecem um prêmio por me agüentarem de tão boa vontade. São mais três pessoas, que jamais vou poder pagar por todo o carinho, toda a simpatia, toda a dedicação e toda a renúncia que dedicaram a mim esse tempo todo.

Aos meus pais José Carlos e Sandra, aos meus avós maternos Alceu e Dirce, a minha tia Marlene que, por mais que não digam nada, sei que sofrem com a minha ausência, mais do que aparentam. Não perdem a oportunidade para dizer que eu poderia voltar a morar no interior e tudo o mais, mesmo tendo certeza que, se depender de mim, jamais vou voltar. Mesmo magoando essas pessoas que tanto amo, no fundo eles sabem que só estou tentando buscar

algo de bom para a minha vida. Mais agradecido a eles do que sou, impossível dizer. Se não fosse por eles também, nem em São Paulo eu teria chegado, imagine no Mestrado. Mesmo me querendo por perto, nunca foram contra a minha decisão de vir morar em São Paulo e muito menos de estudar aqui. Posso contar com eles pra tudo, mesmo que eu já tenha magoado muito esses corações queridos.

Ao meu avô paterno Raul, que faleceu no meio do meu terceiro ano de graduação, que estava sempre junto comigo, pois morei com ele por dois anos e meio, até seu falecimento. Aquele que me esperava toda sexta-feira à tarde, quando eu chegava do trabalho para ir pra faculdade, e me dava o dinheiro do almoço do sábado, pois eu tinha aula o dia todo. Falava muito pouco, mas eu sabia que estava sempre procurando saber se eu estava precisando de alguma coisa. Que Deus ilumine sempre seus passos, onde quer que esteja, à espera de um reencontro futuro.

Aos meus amigos do laboratório, que sempre estiveram ali, trabalhando, conversando, sempre junto de mim, principalmente, na fase pós-mudança, quando eu não conhecia quase ninguém na cidade. Por todos os papos, todas as risadas, todos os trabalhos, por toda a amizade e carinho.

Resumindo, só tenho a agradecer e nada a reclamar. Mesmo que eu fique eternamente escrevendo, sempre lembrarei de um fato novo a acrescentar, seja ele de trabalho, seja ele de amizade ou seja ele familiar. Sem todo o apoio que tive de todos, dificilmente conseguiria ser quem sou e chegar até onde eu cheguei. Estou começando a subir os degraus da escada da vida, o primeiro degrau foi difícil, mas tive quem me aparou, o segundo foi ainda mais difícil, mas também não faltou quem me sustentasse. Muitas pessoas passam pela vida da gente e vão embora sem jamais serem lembradas, porém, outras passam e permanecem ou passam e vão embora, mas deixam marcas que jamais serão esquecidas, pelo contrário, serão eternamente lembradas pelas coisas boas que fizeram, pelas coisas boas que proporcionaram e pelas lembranças que enraizaram em nossa memória que nada, nem o tempo será capaz de apagar.

Um grande obrigado a todas essas pessoas que, passaram ou que ainda estão presentes na minha vida. Que Deus sempre guie seus passos por onde quer que vão e seja lá o que façam.

Gostaria de agradecer por último, mas não menos importante, à FAPESP e ao CNPq, que financiaram alguns projetos do nosso laboratório.

RESUMO

Maffei, R.S. **Novos complexos de Cu(II) com ligantes fluorados para o tratamento de leishmaniose**. 2009. 83p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Química Inorgânica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Este trabalho teve como objetivo a síntese e caracterização de novos complexos de Cu^{2+} com α -hidroxicarboxilatos fluorados, como forma de aumentar a lipofilicidade dos mesmos e, conseqüentemente, a sua biodisponibilidade. Os sólidos de coloração azul obtidos foram caracterizados por análise elementar e métodos espectroscópicos (eletrônico e infra-vermelho), confirmando a coordenação do metal a dois equivalentes dos ligantes, que se coordenam através da carboxila e da α -hidroxila. Testes de partição em vesículas multi-camadas de lecitina indicaram que o complexo derivado do ácido trifluorolático é o mais lipossolúvel. A capacidade dos complexos catalisarem a reação de formação de espécies reativas de oxigênio pela reação com peróxido foi estudada por um método fluorimétrico (oxidação da 1,2,3-dihidrorodamina), sendo que os complexos fluorados em geral apresentaram menor taxa de formação de espécies oxidantes. A atividade anti-leishmânica dos compostos foi estudada em promastigotas de *Leishmania amazonensis*, tendo o complexo bis(trifluorolactato) de cobre(II) apresentado a maior atividade, que foi entretanto menor que o íon livre Cu(II), o que sugere que o ligante sirva como um transportador de metal para o alvo. Todos os complexos foram menos tóxicos a células de mamífero (HeLa). Nossos dados indicam que o aumento de lipofilicidade e/ou da taxa de formação de radicais livres pode ser uma estratégia interessante para o desenvolvimento de metalofármacos anti-leishmânicos a base de cobre.

Palavras-chave: cobre, flúor, leishmaniose, lactato, trifluorolactato, antimônio

ABSTRACT

Maffei, R.S. **New Cu(II) complexes with fluorinated ligands for the treatment of leishmaniasis.** 2009. 83p. Masters Thesis - Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

In this work we synthesized and characterized new Cu(II) complexes with fluorinated α -hydroxycarboxylates as a means of increase its lipophilicity and bioavailability. The blue solids were characterized by means of elemental analysis and spectroscopic methods (electronic and infrared), confirming the 2:1 ligand to metal stoichiometry and coordination through both the carboxylate and α -hydroxyl moieties. Partition tests in multi-lamellar lecitin vesicles showed that the trifluorolactate derivative is the most liposoluble. The ability of the complexes to catalyze the formation of reactive oxygen species under reaction with peroxide has been studied by a fluorimetric method (oxidation of 1,2,3-dihydrorhodamine); the fluorinated complexes showed decreased probe oxidation rate. Antileishmanial activities were studied on *Leishmania amazonensis* promastigotes, and the bis(trifluorolactate)copper(II) displayed the highest activity among the complexes, but smaller than that of free Cu(II), suggesting that ligand may ferry the metal to its biological target. All the complexes were less toxic to mammal (HeLa) cells. Our data suggest that increase of lipophilicity and/or free radicals generation rate may be an interesting strategy to develop antileishmanial metallodrugs based on copper.

Keywords: copper, fluorine, leishmaniasis, lactate, trifluorolactate, antimony

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	08
1.1. Complexos de cobre com aplicação médica	08
1.2. Flúor na medicina	18
1.3. Leishmaniose	23
2. OBJETIVOS	43
3. MATERIAIS E MÉTODOS	44
3.1. Síntese e análise elementar	44
3.2. Espectroscopia eletrônica	44
3.3. Espectrometria no infravermelho	49
3.4. Partição	51
3.5. Atividade pró-oxidante dos complexos de Cu	52
3.6. Ensaio biológicos	55
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
4.1. Síntese e análise elementar	57
4.2. Espectroscopia eletrônica	58
4.3. Espectrometria no infravermelho	59
4.4. Partição	62
4.5. Atividade pró-oxidante dos complexos de Cu	63
4.6. Ensaio biológicos	66
5. CONCLUSÕES	71
6. BIBLIOGRAFIA	73
SÚMULA CURRICULAR	79
ANEXO I	80

1. INTRODUÇÃO

1.1 COMPLEXOS DE COBRE COM APLICAÇÃO MÉDICA

1.1.1. COBRE

O cobre nativo, o primeiro usado pelo homem, era conhecido por algumas das mais antigas civilizações que se tem notícia, e tem sido utilizado pelo menos há 10.000 anos, porém o descobrimento acidental do metal pode ter ocorrido vários milênios antes. Em 5.000 a.C., já se realizava a fusão e refinação do cobre a partir de óxidos como a malaquita e azurita. Descobriram-se moedas, armas, utensílios domésticos sumérios de cobre e bronze de 3.000 a.C., assim como tubos de cobre egípcios da mesma época. Os egípcios também descobriram que a adição de pequenas quantidades de estanho facilitava a fusão do metal e aperfeiçoaram os métodos de obtenção do bronze; ao observarem a durabilidade do material, representaram o cobre com o *Ankh*, símbolo da vida eterna (Shils 1994).

O elemento cobre faz parte de um sub-grupo dos metais de transição que são conhecidos como *metais de cunhagem*. É moderadamente abundante, sendo o vigésimo quinto elemento em massa na crosta terrestre (em torno de 68 ppm), podendo ser encontrado no estado livre ou ligado a enxofre, arsênio, cloro e carbono (Cotton e Wilkinson 1971). Todos os elementos do grupo 11 têm um elétron *s* externo, além de um nível *d* completo. Apresentam mais diferenças que semelhanças em suas propriedades. Possuem estrutura cristalina cúbica de empacotamento compacto. Conduzem particularmente bem a eletricidade e o calor, e tendem a ser pouco reativos (Lee 2003).

O cobre possui somente um elétron *s* por fora de uma camada *d* completa, por esta razão, ele é classificado, as vezes, no grupo I. Essa afirmação não é certa, porque o Cu tem mui-

to pouco em comum com os metais alcalinos, que se excetuam pelas estequiometrias formais em um estado de oxidação +1 (Cotton e Wilkinson 1971). A camada *d* completa é muito menos eficiente para proteger os elétrons *s* de uma carga nuclear do que a camada dos gases nobres, em consequência do primeiro potencial de ionização do cobre ser maior que dos metais alcalinos. Como os elétrons da camada *d* também estão envolvidos em uniões metálicas, o calor de sublimação e o ponto de fusão do cobre são muito mais elevados do que o dos metais alcalinos. Esses fatores são responsáveis pelo comportamento do cobre como um metal nobre; esses efeitos fazem com que seus complexos sejam mais covalentes e possuam uma energia reticular maior, que é compensado pelo fato de que o raio do íon monopositivo seja menor que o dos metais alcalinos do mesmo período: Cu^+ : 0,93 Å, Na^+ : 0,95 Å, K^+ : 1,33 Å. O segundo e terceiro potencial de ionização do cobre são muito menores do que o dos metais alcalinos e isso explica parte do caráter de metal de transição do cobre, que se evidencia pela existência de íons paramagnéticos coloridos e complexos nos quais seu estado de oxidação são II e III (Cotton e Wilkinson 1971).

1.1.2. IMPORTÂNCIA BIOLÓGICA DO COBRE

Diferentemente do Fe, o cobre provavelmente tornou-se importante somente após o O_2 ter surgido em concentrações apreciáveis na atmosfera terrestre, o que permitiu a disponibilização desse metal como sais de Cu(II) solúveis, em vez dos sulfetos insolúveis (Cu_2S).

O cobre foi reconhecido como essencial a partir de 1928, quando Hart mostrou que uma suplementação de cobre era necessária para combater a anemia ferropriva (anemia causada por falta de ferro no organismo) em ratos nutridos exclusivamente com regime lácteo. O cobre é necessário à síntese da hemoglobina (Shils 1994).

Depois desta data, numerosos estudos científicos mostraram o papel eminente exercido pelo cobre sobre o metabolismo de enzimas fundamentais. Mas foi somente nos últimos vinte anos que se pôde por em evidência a patologia desenvolvida por uma deficiência em cobre e a origem genética da mesma. Trata-se da doença de Menkes, detectada em 1962 em cinco crianças que sofriam de problemas de crescimento, de degeneração cerebral e do cerebelo, com retardamento mental e um aspecto específico dos cabelos (brancos, fragmentados e com torções particulares). Desde então, numerosos pesquisadores se debruçaram no estudo dos aportes diários de cobre em uma alimentação mais ou menos restritiva ou normal. O organismo humano contém cerca de 80 mg de cobre para um adulto de 70 kg. A recomendação das autoridades em saúde considera como mínimo necessário a absorção diária de cerca de 2 mg/dia. Uma dieta equilibrada contém de 2 a 5 mg/dia (Fiorini 2008).

Os órgãos do nosso corpo mais ricos em cobre são o fígado, onde o excesso é estocado, e o cérebro. Cerca de um terço está nos músculos e esqueleto. O transporte do cobre é assegurado por uma proteína, a ceruloplasmina. Quando este transportador está saturado, a absorção do cobre pelos intestinos é diminuída (Fiorini 2008). Numerosos regimes alimentares fornecem uma quantidade de cobre inferior aos 2 mg/dia recomendados: 1 mg para pessoas que se alimentam em *self-service*, 1,7 mg para os militares americanos, 0,70 mg para os hospitais americanos, 1,5 mg na Suíça, 1,6 mg nas mulheres neozelandesas e somente 1,5 mg se elas não comem fígado. Frequentemente encontramos divergências entre as quantidades de cobre que deveriam existir nas dietas estabelecidas pelos nutricionistas e as que são encontradas na alimentação fornecida. A deficiência de cobre no organismo de animais gera anemia e pode causar deficiências em recém nascidos como hipopigmentação (condição causada por deficiência ou perda da melanina na epiderme), queratina com defeitos (por exemplo, em lã de cordeiros), distúrbios neurológicos graves, como ataxia (falta de coordenação dos movimentos, podendo afetar a força muscular e o equilíbrio de uma pessoa, normalmente associada

a uma degeneração ou bloqueio de áreas específicas do cérebro ou cerebelo), deformações ósseas, distúrbios na reprodução, insuficiência cardíaca, aneurismas arteriais e cardíacos. No homem, se manifesta como anemia ou neutropenia (diminuição do número de glóbulos brancos), sendo que a origem da neutropenia não é totalmente compreendida, porém a anemia parece estar ligada à má atividade da ceruloplasma-ferroxidase e à falta de utilização do ferro pelas células (Williams 1983; Danks 1988; Uauy, Olivares et al. 1998).

O principal papel do Cu está nas reações de transferência de elétrons que se situam na extremidade superior da escala de potenciais e nas reações de oxi-redução catalíticas envolvendo o O_2 . Ele também é usado para a ligação reversível do O_2 (Azevedo e Chasin 2003). Tanto o Cu(II) quanto o Cu(I) ligam-se fortemente a ligantes biológicos, particularmente às bases “macias” segundo a classificação de Pearson (p. ex., S^{2-}) (Argirova e Ortwerth 2003; Benite, Machado et al. 2007). Os íons de Cu livres são altamente tóxicos e estão praticamente ausentes das células. A detecção espectroscópica é relativamente simples para a espécie Cu(II), que produz espectros de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) bem característicos, além de bandas fortes de absorção na região do visível do espectro eletrônico para os centros “azuis” de Cu. Entretanto, o mesmo não vale para a espécie Cu(I). A essencialidade desse metal deve-se à sua incorporação a um grande número de enzimas e proteínas estruturais. O papel do cobre nas atividades enzimáticas de oxidorredução se deve à sua habilidade em funcionar como um intermediário de transferência de elétrons. Por exemplo (Azevedo e Chasin 2003):

- 1) Amino oxidases (responsáveis pela oxidação de aminas).
- 2) Ascorbato oxidases (oxidação do ácido ascórbico).
- 3) Citocromo oxidase (atua juntamente com grupos heme na etapa final de oxidação).
- 4) Galactose oxidase (oxidação de um grupo $-OH$ a $-CHO$ no monossacarídeo galactose).

O cobre também é importante na:

- 1) Lisina oxidase, que controla a elasticidade das paredes da aorta.
- 2) Dopamina hidroxilase, que atua sobre as funções cerebrais.
- 3) Tirosinase, que influencia a pigmentação da pele.
- 4) Ceruloplasmina, que transporta Cu e atua no metabolismo do Fe.

Devido à grande quantidade de aplicações, que vão da catálise à atividade biológica, passando pela medicina, os complexos de cobre despertam grande interesse, e um estudo de suas propriedades visando novas aplicações é relevante.

1.1.3. COMPLEXOS DE COBRE(II)

Complexos metálicos, nos quais um único átomo metálico ou íon central está rodeado por vários átomos ou íons, têm papel importante na química inorgânica, especialmente para os elementos do bloco *d*. As principais características geométricas dos complexos de metais do bloco *d* foram identificadas pelo químico suíço Alfred Werner (1866-1919), especialista em estereoquímica orgânica (Shriver e Atkins 2008).

A química dos complexos de Cu^{2+} tem sido amplamente investigada e a relação entre estrutura e reatividade, variando entre catálises industriais e atividades biomédicas, são de grande importância. A grande maioria dos estudos de cristalografia de raios-X de complexos de metais de transição são de derivados do cobre (Melnik, Kabesova et al. 2000).

O estado de oxidação dipositivo é o mais estável e importante do cobre. A maioria dos complexos de cobre (I) é oxidada com facilidade a complexos cúpricos, porém, o contrário é mais difícil (Cotton e Wilkinson 1971). O íon cúprico, Cu^{2+} , tem configuração eletrônica d^9 e, portanto, tem um elétron desemparelhado. Seus complexos são geralmente coloridos (azul e

verde) devido às transições *d-d*, e paramagnéticos. Essa coloração se deve à presença de uma banda de absorção da região de 600-900 nm (Russel 1994; Lee 2003; Shriver e Atkins 2008).

1.1.4. COMPLEXOS DE α -HIDROXICARBOXILATOS

Diversos α -hidroxicarboxílicos ocorrem naturalmente. Podem conter um átomo de carbono assimétrico e são potencialmente solúveis. Os que ocorrem naturalmente são, em geral, opticamente ativos. A não-estereoseletividade tem sido relatada para alguns destes compostos (Portanova, Lajunen et al. 2003). Os ácidos α -hidroxicarboxílicos e seus derivados são de grande importância para a indústria farmacêutica, biológica, química e outras. A capacidade de complexação a metais de alguns deles, como o ácido láctico, ácido málico, ácido tartárico, ácido *meso*-tartárico e ácido cítrico (Figura 1), pode ser de interesse ambiental e biológico como, por exemplo, na remoção de urânio do solo e combate à intoxicação pelo mesmo (Francis, Dodge et al. 2005). Também podem ser utilizados em técnicas de obtenção de precursores de materiais cerâmicos e luminescentes, juntamente com neodímio, európio ou lantânio (Gaspar, Stucchi et al. 2006; Gaspar, Stucchi et al. 2007). Juntamente com os ácidos acima citados, o ácido glicólico teve sua atividade antifúngica comprovada contra *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium brevicompactum*, *Penicillium camembert*, *Penicillium commune*, *Penicillium expansum* e *Penicillium solitum*, coletados em câmara de maturação de queijos (Dias, Barbiéri et al. 2006) e, complexados com germânio, tiveram sua atividade biocida testada contra *Staphylococcus aureus* cultivado *in vitro* (Barbieri, Guedes et al. 2004).

Figura 1: Estrutura dos ácidos α -hidroxicarboxílicos, onde: (a) ácido láctico; (b) ácido málico; (c) ácido L-tartárico; (d) ácido D-tartárico; (e) ácido *meso*-tartárico; (f) ácido cítrico e (g) ácido glicólico.

Os ácidos hidroxicarboxílicos possuem dois grupos doadores, a hidroxila e o grupo carboxilato, portanto, todos eles são potencialmente ligantes bidentados. A constante de complexação do próton e do íon metálico desses ligantes dependem fortemente da posição relativa dos dois grupos doadores na molécula, assim, a presença da hidroxila na posição 2 (α) do ácido carboxílico resulta em um aumento da acidez do mesmo. Esse efeito diminui rapidamente com a distância entre as duas funções e se torna insignificante quando atua através de quatro ou mais átomos. Assim, as constantes de dissociação dos ácidos 4-hidroxicarboxílicos não diferem substancialmente dos correspondentes ácidos alcanóicos não-substituídos.

A complexação de íons metálicos com os ácidos hidroxicarboxílicos é fortemente influenciada pela posição relativa dos grupos carboxilato e hidroxila. Os ácidos 2-hidroxicarboxílicos formam complexos consideravelmente mais estáveis com a maioria dos

íons metálicos, através da quelação bidentada, envolvendo ambos os grupos funcionais, do que os correspondentes ácidos carboxílicos simples. Os grupos hidroxila mais distantes dos grupos carboxilatos geralmente não participam da formação de complexos quelatos, ocorrendo a coordenação dos ligantes ao íon metálicos apenas através dos grupos carboxilatos. Os ácidos α -hidroxicarboxílicos formam complexos estáveis com a maioria dos íons metálicos (Portanova, Lajunen et al. 2003).

1.1.5. METALOFÁRMACOS DE COBRE(II)

Por anos, a química medicinal foi quase que exclusivamente baseada em compostos orgânicos e produtos naturais. No entanto, a importância do uso de íons metálicos para a vida tem sido observada nos últimos tempos, principalmente em substâncias inorgânicas. Nesse sentido, há algumas décadas, os complexos dos metais de transição vêm sendo isolados e estudados como agentes quimioterápicos (Xavier 1986; Sigel e Sigel 2000).

Pesquisas sobre complexos anti-tumorais têm sido realizadas sob inspiração dos derivados de platina(II) que alcançaram grande sucesso em terapia, como a cisplatina e a carboplatina. Parte dessas investigações está focada na atividade biológica de complexos formados por íons metálicos essenciais, como os íons de cobre. Uma vez que perturbações nas quantidades e/ou natureza de alguns metais do ciclo metabólico normal podem causar efeitos tóxicos ao organismo (por exemplo, o cobre na doença de Wilson), tais complexos também poderiam servir como agente citotóxicos. De fato, observa-se que as bis(tiosemicarbazonas; bTSC) do tipo H_2KTS e complexos de cobre dela derivados $CuKTS$ (3-etoxi-2-oxobutiraldeído bis(tiosemicarbazonato) de cobre(II) (Figura 2) apresentam significativa atividade antitumoral, *in vitro* e *in vivo* (Gielen e Tiekink 2005).

H₂KTS: R₄ = etoxietil, R₁-R₃ = H

Figura 2: (a) Estrutura geral da bis(tiosemicarbazona) H₂KTS (3-etoxi-2-oxobutiraldeído) e (b) seu complexo de cobre CuKTS (Gielen e Tiekink 2005)

Alguns complexos de cobre com bases de Schiff (grupo funcional que contém uma ligação dupla de carbono-nitrogênio com o átomo de nitrogênio conectado a um grupo arila ou alquila) tridentadas bloqueiam a reprodução tumoral através da inibição do processo de criação de novos vasos que irrigam o tumor (ou seja, são anti-angiogênicos) (Denari e Dockal 2008).

A síntese, caracterização e avaliação da atividade biológica de complexos de cobre(II) mono e binucleares têm sido realizadas com obtenção de resultados satisfatórios, demonstrados em testes *in vivo* e *in vitro*, como antitumorais e antiproliferativos. Dentre esses complexos, Figuram:

a) os derivados de purinas, que tiveram sua atividade antitumoral testada contra linhagens tais como B16-F0 (melanoma de rato), G361 (melanoma humana maligna), HOS (sarcoma osteogênico humano) e MCF7 (adenocarcinoma de mama humano) (Figura 3).

Figura 3: Antitumorais derivados de purinas, onde: (a) 6-(clorobenzil-amino)purina (HL_1); (b) 6-(3-clorobenzilamino)purina (HL_2) (Gielen e Tiekink 2005).

b) as tiosemicarbazonas, no caso, a 1,2-naftoquinona (NQTS), que tiveram sua atividade antitumoral testada contra uma linhagem de células MCF7 (adenocarcinoma de mama humano), e a salicilaldeído tiosemicarbazona (H_2STSC) que apresenta atividade anti-tuberculose (Figura 4).

Figura 4: Derivados de Tiosemicarbazona, onde: (a) 1,2-naftoquinona (NQTS) e (b) salicilaldeído tiosemicarbazona (H_2STSC) (Gielen e Tiekink 2005).

c) o complexo de cobre com ácido benzohidroxâmico, $[Cu(C_6H_5(O)CNHO)_2]$, que apresenta atividade antitumoral testada em ratos com carcinoma ascítico de Ehrlich.

d) os complexos de cobre com imidazol, por exemplo, o complexo *trans*-bis(acetato)bis(imidazol)cobre(II), que demonstrou uma forte atividade antitumoral contra células B16, ou o 2-(4'-tiazol)benzimidazol, (tiabendazol; TBZH) com características comuns

aos fen e benzimidazol, não tóxicos aos seres humanos e utilizados como fungicidas na agricultura (Figura 5).

Figura 5: Estrutura do tiabendazol (Gielen e Tiekink 2005).

e) os complexos de cobre com policarboxilatos, como o derivado do ácido 1,2-propilenodiamina-N,N,N,N'-tetracético (PDTA), formando o complexo $[\text{Cu}(\text{PDTA}-\text{H}_2)(\text{H}_2\text{O})_2]\cdot\text{H}_2\text{O}$, que foi testado *in vitro* contra células TG (células tumorais do ovário) e *in vivo* contra Sarcoma sólido 180 (Gielen e Tiekink 2005).

1.2. FLÚOR NA MEDICINA

O poder extremamente oxidante do flúor faz com que ele reaja, geralmente, de forma vigorosa, com a maioria das moléculas orgânicas e inorgânicas e com os gases nobres criptônio, xenônio e radônio (Shriver e Atkins 2008). Ele pode ser armazenado a baixas pressões em recipientes de aço ou monel (uma liga de níquel e cobre) somente porque ele forma, rapidamente, uma camada de fluoreto na superfície do metal, que é resistente e impede que a reação tenha prosseguimento. Também pode ser estocado em vidros, desde que HF não esteja presente como impureza (Russel 1994).

Os compostos moleculares de flúor tendem a ser altamente voláteis. Isso se deve a variações na força de interação de dispersão (a interação entre momentos de dipolo elétrico transiente instantâneo), que é mais forte para moléculas altamente polarizáveis. Os elétrons nos pequenos átomos de F são fortemente atraídos pelo núcleo e, por isso, os compostos de flúor possuem baixas polarizabilidades e, logo, fracas interações de dispersão. Uma outra caracte-

rística do átomo de flúor é a capacidade de atrair os elétrons dos átomos aos quais ele está ligado. Essa atração leva ao aumento da acidez de Brønsted (Shriver e Atkins 2008).

Como a maioria dos elementos eletronegativos, o flúor é peça chave das modernas ciências farmacêuticas, agropecuárias e de materiais. Com a incorporação do flúor e/ou grupos contendo flúor na molécula orgânica, há uma perturbação notável nas propriedades químicas, físicas e biológicas da mesma e, com isso, acredita-se que, com a síntese de compostos fluorados seja possível o desenvolvimento de novos agentes e materiais com novas funções (Figura 6) (Shimizu e Hiyama 2005).

Figura 6: Efeitos do flúor sobre moléculas, que podem ser aproveitados no desenvolvimento de substâncias com atividade biológica (Hiyama 2000).

O emprego de moléculas fluoradas tem permitido o surgimento de novos fármacos (Figura 7), especialmente por aumentar a lipossolubilidade e a estabilidade metabólica dos fármacos. Compostos lipofílicos têm tendência de serem oxidados por enzimas do fígado, em particular o citocromo P450. Existem muitas estratégias para tentar minimizar esse efeito, e uma delas é tornar a molécula mais polar. Uma estratégia alternativa é bloquear o sítio metabólico com um flúor substituinte e esperar que o mesmo não prejudique a ligação com a pro-

teína alvo. De fato, essa aproximação é frequentemente empregada com sucesso para a obtenção de novos compostos (Smith, Waterbeemd et al. 2001).

Figura 7: Estruturas de alguns fármacos fluorados, onde: (a) panomifeno; (b) tamoxifeno (antitumoral); (c) atorvastatina (reduzidor de colesterol total e LDL); (d) fluoxetina (antidepressivo); (e) fluconazol (tratamento de infecções fúngicas em pacientes imunodeprimidos); (f) eze-timibe (reduzidor de colesterol); (g) efavirenz (combate o HIV); (h) sulindaco (antiinflamatório) (Shimizu e Hiyama 2005).

O flúor, por ser muito eletronegativo, tem um efeito muito forte sobre a acidez ou basicidade de grupos funcionais, dependendo da posição que ocupe na molécula. Por exemplo, os pKa's do ácido acético e seus análogos fluorados são 4,76 (CH_3COOH), 2,59 (CH_2FCOOH), 1,24 (CHF_2COOH), e 0,23 (CF_3COOH). Frequentemente, a mudança de pKa interfere muito nas propriedades farmacocinéticas da molécula, o que pode ser útil para o projeto de fármacos mais biodisponíveis. Se, por exemplo, a fluoração da molécula resultar em compostos de menor basicidade, a permeação do fármaco por membranas biológicas é normalmente facilitada, resultando em compostos que apresentam, por exemplo, maior absorção por via oral (Böhm, Banner et al. 2004).

A lipofilicidade é um dos parâmetros-chave moleculares em Química Medicinal. Tipicamente, para o uso de grupos de substâncias lipofílicas como ligantes em complexos é necessário que as mesmas tenham uma grande afinidade com a proteína. Entretanto, o aumento da lipofilicidade resulta da redução da solubilidade do composto. Por isso, um balanço entre a lipofilicidade e polaridade dessas moléculas é um desafio para a Química Medicinal. Como exemplo, investigou-se a variação de lipofilicidade em alguns compostos, onde um átomo de hidrogênio foi substituído por um átomo de flúor, e o seu efeito sobre a biodisponibilidade dos mesmos (Figura 8) (Böhm, Banner et al. 2004).

Figura 8: Efeito dos valores de pK_a sobre a biodisponibilidade em alguns agonistas de 5HT. A molécula não-fluorada é o fármaco comercial, de elevada basicidade, que proporciona uma ligação muito estável com o receptor. Entretanto, tem baixa biodisponibilidade. O fármaco monofluorado preserva o requisito de elevada basicidade, e apresenta a vantagem de aumento de biodisponibilidade (dado que a fluoração aumenta a lipofilicidade). O fármaco difluorado é pouco básico e apresenta baixa ligação com o receptor, não sendo útil para efeitos terapêuticos (Böhm, Banner et al. 2004).

O flúor substituinte pode levar a uma mudança na conformação da molécula. Esse efeito pode ser explicado pelo tamanho e pela eletronegatividade do flúor. Dado o raio de van der Waals do flúor (1,47 Å), o volume do grupo trifluorometil é praticamente o dobro do do grupo metil, resultando em distorções. Por exemplo, metoxibenzenos sem grupos substituintes na posição orto, favorecem a conformação planar, enquanto que os trifluorometoxibenzenos sem grupos substituintes na posição orto apresentam ângulos diedros de C-C-O-C em torno de 36° a 90° (Klocker, Karpfen et al. 2003).

O flúor pode ter efeitos significantes na afinidade de complexos ligados a proteínas. O efeito pode ser direto (interação do ambiente fluorado com a proteína) ou indireto (modulação da polaridade de outros grupos que interagem com a proteína). Frequentemente, vê-se que o

flúor substituinte ocasiona em um leve aumento da afinidade por aumento na lipofilicidade da molécula, resultando em uma melhor afinidade pela proteína (Böhm, Banner et al. 2004).

1.3. LEISHMANIOSE

1.3.1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença infecciosa, amplamente distribuída em todo o mundo, que afeta o homem e os animais. A leishmaniose tegumentar (LT) (Cravo ou Botão de Biskra, Botão de Touggourt, Botão de Zibans, Botão de Laghouat e Botão d'Ouargla da Argélia; Botão de Tebessa ou de Gafsa na Tunísia; Botão do Nilo no Egito; Botão d'Alep na Síria; Botão de Bagdad ou Bouchir na Arábia; Botão de Delhi na Índia; Botão das Filipinas nesse mesmo país e Úlcera de Bauru no Brasil) e a leishmaniose visceral (LV) (Kala-Azar; Moléstia de Sahib; Febre Dum-Dum) no mundo envolvem diferentes entidades eco-epidemiológicas, variando entre uma doença exclusivamente zoonótica (transmissível de forma natural entre animais vertebrados), antroponótica (infecção exclusiva de seres humanos) ou de ambas as condições. Estima-se que a incidência anual varie de 1 a 1,5 milhão de casos novos de leishmaniose cutânea e cerca de 500 mil casos novos de leishmaniose visceral no mundo. Calcula-se que cerca de 350 milhões de pessoas estejam em áreas de risco para desenvolver alguma forma de leishmaniose. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) há uma prevalência de 12 milhões de casos no mundo (Figura 9) (Luz, Ribeiro et al. 2006).

Existem relatos sobre a doença, no continente americano, desde a época colonial. Na América Latina, a doença foi descrita em pelo menos 12 países, sendo que 90% dos casos ocorrem no Brasil, especialmente na Região Nordeste (Figura 10) (Ministério_da_Saúde 2006), porém vem sendo identificada em todos os estados, com exceção da Região Sul. Cons-

titui-se, portanto, em uma das afecções dermatológicas que merecem mais atenção no País, devido ao risco de ocorrência de deformidades que pode produzir no homem, como também pelo envolvimento psicológico do doente, com reflexos no campo social e econômico (NED/ASCOM/FUNASA 2000).

Figura 9: Principais áreas endêmicas de Leishmaniose Visceral no Mundo (Lima 2005).

Figura 10: Distribuição dos casos de Leishmaniose Visceral humana no Brasil (Lima 2005).

A doença no Brasil tem apresentado mudanças importantes no padrão de transmissão, inicialmente predominando em ambientes rurais e periurbanos e, mais recentemente, tendo atingido centros urbanos como Rio de Janeiro (RJ), Corumbá (MS), Belo Horizonte (MG), Araçatuba (SP), Palmas (TO), Três Lagoas (MS), Campo Grande (MS), entre outros (Ministério da Saúde 2006).

Segundo a OMS (Organização Mundial de Saúde), noventa por cento dos casos de leishmaniose nas Américas estão no Brasil, que registrou 53.780 casos entre 1987 e 2006, com uma média anual de 2.689 casos e aproximadamente 300 óbitos (Monteiro, Lacerda et al. 1994). Um fato chama a atenção: tem ocorrido um aumento gradual na letalidade nacional por *Leishmania*, que passou de 0,04/100000 no ano de 1980 para 0,09/100000, em 1990. No ano 2000 ocorreram 280 casos de *Leishmania* no Rio Grande do Norte, com uma alta letalidade: 16 em cada 100 pacientes foram a óbito, perfazendo a mais alta taxa de óbito no Brasil naquele ano. Em novas áreas, onde só havia relatos de casos importados – estado de São Paulo, por exemplo –, a ocorrência de casos autóctones já é uma realidade (Luz, Ribeiro et al. 2006).

Apesar do pequeno interesse das indústrias farmacêuticas pela erradicação da doença, pois a mesma atinge, na maioria dos casos, a população de regiões sub-desenvolvidas e/ou de baixo poder aquisitivo, estudos recentes têm apresentado progressos na compreensão da biologia do parasita, das suas relações com o hospedeiro e da natureza da resposta imunológica. Os genomas de *L. major* (El-Sayed, Myler et al. 2005; Ivens, Peacock et al. 2005) e do mosquito-palha (*Lutzomyia longipalpis*) (Dillon 2005) foram recentemente decifrados, e prosseguem as buscas por uma vacina contra a doença (Requena, Iborra et al. 2004; Coler e Reed 2005).

O controle da leishmaniose está baseado em medidas profiláticas de combate ao vetor e no extermínio de cães infectados, que são reservatórios de parasitas em áreas peri-

domiciliares, bem como o tratamento dos indivíduos infectados com diversos fármacos disponíveis no mercado mundial (Bezerra, Leon et al. 2004).

1.3.2. CLASSIFICAÇÃO E TRANSMISSÃO

Essa doença é causada por diferentes espécies do parasita do gênero *Leishmania* e pode ser classificada de acordo com três manifestações (Bezerra, Leon et al. 2004):

a) Leishmaniose Visceral (“Calazar”): causada principalmente por *L. donovani*, mas também por *L. infantum* e *L. chagasi*, e é caracterizada por febre irregular, perda de peso, hepatoesplenomegalia (aumento do tamanho do fígado e do baço provocando, geralmente, uma grande atividade de defesa imunológica do organismo) e anemia, com aproximadamente 100% de taxa de mortalidade em indivíduos não tratados;

b) Leishmaniose Mucocutânea: uma das formas de Leishmaniose Tegumentar (LT), geralmente causada por *L. braziliensis*, compreendendo lesões que destroem parcial ou totalmente a mucosa nasal e oral, gerando deformidades;

c) Leishmaniose Cutânea: outra forma de Leishmaniose Tegumentar, causada geralmente por *L. mexicana*, *L. tropica* e *L. major*, sendo caracterizada por lesões ulcerativas em áreas expostas (braços, pernas, entre outras). Entretanto, segundo Cupolillo (2000), existem mais de 30 espécies de *Leishmania* que podem ser classificadas de acordo com o local de surgimento da doença no Mundo. No Brasil, os casos de leishmaniose cutânea e mucocutânea são ocasionados pela espécie *L. braziliensis* (Grimaldi e Tesh 1993).

No Novo Mundo, são reconhecidas oito espécies de *Leishmania* responsáveis pela doença no homem, pertencentes ao subgênero *Vianna* (V) e *Leishmania* (L), onde os agentes etiológicos correspondentes são: *Leishmania* (V) *panamensis*, *Leishmania* (V) *lainsoni*, *Lei-*

shmania (L) mexicana, Leishmania (L) amazonensis, Leishmania (L) venezuelensis e Leishmania (L) chagas. (Tabela 1) (Grimaldi, Tesh et al. 1989).

Tabela 1: Principais espécies do gênero *Leishmania* (Lainson e Shaw 1987; Albuquerque, Prado Jr. et al. 2009).

Subgênero <i>Leishmania</i>	Subgênero <i>Viannia</i>
<i>L. (Leishmania) donovani</i> ***	
<i>L. (L.) infantum</i> ***	
<i>L. (L.) chagasi</i> ***	
<i>L. (L.) archibaldi</i>	<i>L. (Viannia) braziliensis</i> *
<i>L. (L.) tropica</i> **	<i>L. (V.) guyanensis</i> *
<i>L. (L.) aethiopica</i> **	<i>L. (V.) panamensis</i>
<i>L. (L.) major</i> **	<i>L. (V.) peruviana</i>
<i>L. (L.) gerbilli</i>	<i>L. (V.) lainsoni</i> *
<i>L. (L.) mexicana</i>	<i>L. (V.) naiffi</i> *
<i>L. (L.) amazonensis</i> *	<i>L. (V.) shawi</i> *
<i>L. (L.) venezuelensis</i>	<i>L. (V.) colombiensis</i>
<i>L. (L.) enrietti</i>	<i>L. (V.) lindenberg</i>
<i>L. (L.) aristidesi</i>	
<i>L. (L.) pifanoi</i>	
<i>L. (L.) hertigi</i>	
<i>L. (L.) deanei</i>	

* determinantes da Leishmaniose Tegumentar no Brasil (“Leishmaniose Tegumentar Americana”)

** determinantes da Leishmaniose Tegumentar no Velho Mundo

*** determinantes da Leishmaniose Visceral

Os vetores da leishmaniose são insetos hematófagos da família *Psychodida*, gêneros *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo) (Figura 11), com vasta distribuição nos climas quentes e temperados. Somente as fêmeas são hematófagas. Pertencem ao tipo de dípteros de atividade crepuscular e pós-crepuscular, abrigando-se durante o dia em lugares úmidos, sombrios e bem protegidos dos ventos. São encontrados em tocas de animais silvestres, buracos de pau e ocos de bambu (Berman 1988).

Figura 11: (a) Flebotomíneo macho; (b) Flebotomíneo fêmea¹.

O protozoário apresenta-se de duas formas, amastigota e promastigota (Figuras 12 e 13). A forma amastigota é arredondada ou oval, com 4 a 6 μm de comprimento por 2 μm de diâmetro, com núcleo, cinetoplasto e um vacúolo. Esta forma é fagocitada pelas células retículo-histiocitárias de tecidos (baço, fígado, gânglios, medula óssea e pele). Pode ser encontrada, ocasionalmente, em outros fagócitos. A segunda forma, promastigota, é observada no tubo digestivo dos flebótomos, que são os transmissores, ou em meios de cultura apropriados. É fusiforme e mede cerca de 15 μm . Consiste em corpo (com citoplasma, núcleo, cinetoplasto) e flagelo livre. Ambas as formas apresentam um processo de divisão tipo binário (cissiparidade ou divisão simples ou fissão binária é o processo de divisão celular no qual um organismo celular se reproduz em dois por mitose (Veronesi 1985).

¹ Fonte: http://www.fiocruz.br/ccs/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?from_info_index=461&inoid=2284&sid=9 (acessado em 24/11/2009)

Figura 12: (a) As formas promastigotas de *Leishmania* são os estágios de desenvolvimento encontrados no inseto vetor e se multiplicam assexuadamente. Os promastigotas também podem ser cultivados em cultura *in vitro*. Sua principal característica é a posição do cinetoplasto, em frente ao núcleo com o flagelo emergindo da extremidade anterior da célula; (b) Os amastigotas representam também um estágio de desenvolvimento intracelular da *Leishmania*. Sua forma é esférica ou oval, com um flagelo rudimentar (veja esquema abaixo). Somente o núcleo e o cinetoplasto são visíveis à microscopia óptica. As formas amastigotas são encontradas em grupos no interior de macrófagos, ou livres após rompimento destas células (Gruber e Madeira 2009).

Figura 13: Esquema demonstrando a forma do protozoário, onde: (a) Promastigota – o flagelo emerge da parte anterior da célula; (b) Epimastigota – o flagelo emerge ao lado do núcleo da célula; (c) Tripomastigota – o flagelo emerge da parte posterior de célula e (d) Amastigota – somente o cinetoplasto é visível (não há flagelo) (Gruber e Madeira 2009).

Os flebótomos infectam-se ao picar o animal portador da doença, aspirando macrófagos parasitados ou amastigotas livres no sangue ou tecidos e podem, assim, transmitir a doença ao homem. Os mamíferos portadores da leishmaniose são geralmente animais silvestres como a preguiça, o tamanduá, roedores, raposas e outros, sendo que grande parte das lesões nestes não é aparente. No Brasil, os mais importantes reservatórios animais são o cão e a raposa (Rath, Trivelin et al. 2003). A transmissão da doença para o homem ocorre quando a fêmea do flebotomíneo promove seu repasto sanguíneo (quando o inseto se alimenta de sangue diretamente do animal). Enquanto suga o sangue do hospedeiro vertebrado, o inseto transfere promastigotas metacíclicas (forma do promastigota que causa a doença); que infectam células do sistema fagocítico mononuclear do homem (principalmente macrófagos) e, quando se encontram no interior do macrófago, os promastigotas se transformam em amastigotas, que se multiplicam, levando ao rompimento da célula hospedeira. A lise leva à liberação de grande quantidade de parasitas, que infectam outros macrófagos (Figura 14) (Magill 1995). Dessa maneira, a leishmaniose se inclui entre as moléstias ditas metaxênicas, ou seja, que apresentem a sua cadeia natural constituída pelas fontes de infecção, transmissores e hospedeiros suscetíveis (Veronesi 1985).

Figura 14: Cães e roedores servem como hospedeiros vertebrados principais e o homem serve como hospedeiro acidental (Martins 2009).

O Ciclo biológico do parasita está apresentado na Figura 15. Para o subgênero *Viannia*, após a reprodução e colonização das formas promastigotas no intestino do inseto, ocorre a migração dessas formas para o estômago, onde se transformam em paramastigota, que colonizam o estômago e faringe do flebotomíneo, diferenciando-se, após, em promastigota metacíclica (Albuquerque, Prado Jr. et al. 2009).

Figura 15: Ciclo Biológico do Parasita. (1) Durante o repasto sanguíneo, a fêmea do flebotomíneo introduz formas promastigotas metacíclicas no local da picada; (2) Promastigotas são interiorizadas por macrófagos teciduais; (3) Promastigotas se transformam em amastigotas; (4) Inicia-se o processo de reprodução no interior do vacúolo parasitóforo; (5) Ruptura do macrófago e liberação dos parasitas no interstício; (6) Parasitas são fagocitados por novo macrófago; (7) Macrófagos parasitados podem ser ingeridos pela fêmea do flebotomíneo durante o repasto sanguíneo; (8) No estômago do inseto, o macrófago se rompe liberando amastigotas. Transformação dos amastigotas em promastigotas, que se dividem por divisão binária; (9) Promastigotas migram para o intestino e colonizam as regiões do piloro e íleo, transformando-se em paramastigota (subgênero *Viannia*); (10) Paramastigotas se aderem ao epitélio e se reproduzem. Transformação em promastigota e migração para o estômago e, em seguida, para a faringe do inseto (promastigotas metacíclicas) (Albuquerque, Prado Jr. et al. 2009).

1.3.3. TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE À BASE DE ANTIMONIAIS

Em época anterior aos antimoniais, conforme testemunho de todos os estudiosos até a Primeira Grande Guerra, a leishmaniose evoluía com taxas alarmantes de mortalidade. Apesar do uso medicinal de compostos de antimônio já ser conhecido desde a Antiguidade para diversos fins terapêuticos, somente em 1912 Gaspar de Oliveira de Vianna observou que o tárta-ro emético, antimonial trivalente, era eficaz na terapia da leishmaniose tegumentar americana. (Rath, Trivelin et al. 2003).

Com o uso desses antimoniais trivalentes (Figura 16), percebeu-se uma série de problemas, como resistência do parasita e indução de efeitos colaterais (Lira, Sundar et al. 1999), como: artralgia, mialgia, náusea, vômito, cefaléia, anorexia, aumento da atividade de algumas enzimas (transaminases, fosfatase alcalina, lipase e amilase), leucopenia, alargamento do intervalo QT (intervalo do eletrocardiograma que compreende as fases de despolarização e repolarização dos ventrículos) e supra- ou infra-desnívelamento do segmento ST (parte do segmento QT, que vai do fim da despolarização ao início da repolarização). Outros efeitos colaterais menos freqüentes, são: aumento de uréia e creatinina, arritmia cardíaca, morte súbita e herpes zoster (NED/ASCOM/FUNASA 2000; Rath, Trivelin et al. 2003; Ministério_da_Saúde 2004) que limitam a utilização e, principalmente, a eficácia desses compostos. (Lira, Sundar et al. 1999). Por causa desses efeitos, os antimoniais trivalentes foram substituídos por antimoniais pentavalentes (Figura 17) (Grimaldi, Tesh et al. 1989; Lira, Sundar et al. 1999). Bramachari, em 1920, desenvolveu o primeiro complexo à base de antimônio pentavalente, o uréia estibamina, derivado uréico do ácido p-aminofenil estibínico. Em 1936, Schmidt introduziu na terapia médica o gluconato de antimônio (V) sódico, conhecido comercialmente como Solustibosan® (Bayer) ou Pentosam® (Glaxo Wellcome) (Rath, Trivelin et al. 2003).

Hoje, os metalofármacos à base de antimônio ainda são os principais agentes anti-leishmania empregados mundialmente, responsáveis por cerca de 90% no aumento da taxa de sobrevivência de pacientes infectados pelo parasita. Na ausência de uma vacina eficiente, esse é o único tratamento disponível para o controle da doença (os antimoniais são as drogas de escolha para o tratamento de todas as formas clínicas da doença) (Yan, Jin et al. 2005).

Figura 16: Estrutura química dos antimoniais trivalentes empregados em clínica médica. (a) Tartarato de antimônio e potássio ou Tártaro Emético; (b) Antimoniato de bis-catecol-3,5-dissulfonato sódico (Stibophen®, Repodral®, Fuadina®); (c) Tioglicolato de sódio e antimônio (Corbett 1973).

Figura 17: Estrutura química de antimoniais pentavalentes empregados em clínica médica. (a) Antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime®; antimoniato de meglumina); (b) Gluconato de antimônio(V) sódico (Estibogluconato de sódio; Pentosam®, Solustibosan®); (c) Uréia estibamina (Estibamine®) (Corbett 1973; Marsden 1985; Goldsmith e Katzung 1998; Yan, Jin et al. 2005).

Durante a Segunda Guerra Mundial, surgiu na França um medicamento alternativo ao gluconato de antimônio(V) sódico, o antimoniato de N-metil glucamina, comercializado como Glucantime® (Rhône-Poulenc-Rohrer) ou antimoniato de meglumina. Enquanto o Pentosam® é distribuído, até hoje, nos países de língua inglesa, o Glucantime® é comercializado nos países de língua francesa e espanhola. Um estudo comparativo entre o medicamento original e o genérico correspondente do gluconato de sódio antimônio, realizado no Quênia, revelou a viabilidade de comercialização do medicamento a custos menores e, em consequência, a possibilidade do tratamento de maior número de pacientes infectados pela leishmaniose visceral na África (Moore, O'Flaherty et al. 2001).

O mecanismo de ação dos fármacos antimoniais ainda é pouco compreendido. A hipótese mais aceita atualmente indica que os complexos de Sb(V) são reduzidos *in vivo* por tióis às espécies ativas de Sb(III) (Figura 18), ou seja, que o antimônio pentavalente é uma pró-droga. A ligação com nucleosídeos seguida de inibição de reparo do DNA e indução da apoptose também seriam alternativas para o desencadeamento de efeitos tóxicos (Yan, Jin et al. 2005).

Figura 18: Possíveis mecanismos de ação de fármacos antileishmânicos antimoniais (Yan, Jin et al. 2005).

Outro mecanismo de dano ao parasita provocado pelos fármacos antimoniais pode envolver o rompimento do balanço redox intracelular, com a conseqüente impossibilidade de reverter o acúmulo de espécies reativas de oxigênio. Em animais superiores, a maior parte desse balanço é mantido pelo equilíbrio redox do tripeptídeo glutatona (GSH/GSSG). O sis-

tema análogo no parasita depende do balanço redox da tripanotona, descoberta por Fairlamb e Cerami em 1985 (Figura 19) (Gielen e Tiekink 2005).

Figura 19: Estruturas moleculares: (a) glutathione e (b) tripanotona

A tripanotona é um derivado *bis*-glutathionil da espermidina ((N¹, N⁸-bisglutathionil) espermidina). Assim como a glutathione, a tripanotona participa das reações de redução e é oxidada a tripanotona dissulfeto e se comporta como substituinte para a glutathione nos tripanossomatídeos. Um dos aspectos mais notáveis da tripanotona é que os tripanossomatídeos dependem integralmente do grupo tiol para defesa oxidante. Como em outros microorganismos, o acúmulo de dissulfetos afeta o equilíbrio tiólico-redox e, conseqüentemente, a atividade metabólica do tripanossoma. Recentemente, uma flavoproteína dissulfeto redutase NADPH-dependente, a tripanotona redutase (TR), foi isolada e identificada como responsável pela manutenção intracelular da tripanotona na forma ditiol (reduzida; [T(SH)₂]) (Gielen e Tiekink 2005).

A terapia com antimoniais pode gerar resistência ao medicamento, na forma cutânea, e especialmente na forma mucosa. Embora os estudos muitas vezes não possam ser totalmente comparáveis, devido a diferentes esquemas posológicos utilizados, insucesso terapêutico ou

recidivas podem ocorrer com estes medicamentos na LTA (Leishmaniose Tegumentar Americana)(Oliveira, Macêdo et al. 1995; Romero, Guerra et al. 2001).

Em caso de falha terapêutica ao antimonial usado isoladamente, foi demonstrado que a associação com um inibidor do fator de necrose tumoral, a pentoxifilina, pode produzir bons resultados. A posologia nestes casos é de 20 mg/Sb^V/kg/dia com 400 mg de pentoxifilina três vezes ao dia por 30 dias (Lessa, Machado et al. 2001).

1.3.4. OUTRAS DROGAS UTILIZADAS PARA O TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE

Para o desenvolvimento de fármacos mais seletivos e com menos toxicidade, a descoberta de alvos específicos é crucial. Neste sentido, os estudos comparativos entre a bioquímica de parasitos e microorganismos e a dos hospedeiros constituem ferramenta importante para a introdução de novos quimioterápicos de forma racional. Considerando que a quimioterapia disponível é insatisfatória pelo seu limite de eficácia ou que os fármacos apresentem efeitos colaterais tóxicos, novos fármacos para quimioterapia específica estão sendo alcançados, traçando-se rotas bioquímicas seletivas aos parasitas (Grillo, Nathalie et al. 2008).

Como visto, o uso de antimoniais para o tratamento da leishmaniose apresenta uma série de problemas, como resistência do parasita (Ullman, Carrero-Valenzuela et al. 1989; Grögl, Thomason et al. 1992) e indução de efeitos colaterais, que limitam a utilização e, principalmente, a eficácia deles. Além disso, todos os fármacos disponíveis atualmente são de administração parenteral, o que exige a colaboração do paciente. Infelizmente, muitos abandonam o tratamento, fato que favorece o aparecimento de cepas resistentes (Amato 1998). Nesse sentido, diversas novas substâncias estão sendo testadas como quimioterápicos antilei-

shmânicos, entre as quais se destacam a pentamidina, anfotericina B, paromomicina e o miltefosine.

As amidinas são compostos orgânicos caracterizados pela presença dos grupamentos $C=N$ e $C-N$, que proporcionam propriedades específicas das funções azometina e amina, respectivamente. Esses compostos se mostram interessantes, principalmente por apresentarem atividade biológica variada, como antitripanossomatídea, antifúngica, antibacteriana, antiviral e antitumoral (Soares-Bezerra, Leon et al. 2004). Dentre esses compostos, destaca-se a pentamidina (Figura 20) que é eficaz na terapia da leishmaniose e em casos incipientes de tripanossomíase gambiense ou rodesiana (Doua, Miezán et al. 1996). A pentamidina é comercializada sob o nome de Lomidina®. No tratamento da leishmaniose visceral, a pentamidina foi usada com sucesso, em séries de 12 a 15 doses. A segunda série, administrada após intervalo de 1 a 2 semanas, pode ser necessária em áreas onde se sabe que a infecção responde de modo insatisfatório ao tratamento. A substância é particularmente útil em casos que não responderam aos antimonialis ou para pacientes com calazar que sejam hipersensíveis ao antimônio. A alta toxicidade desta droga também é fator limitante para o uso. Hipoglicemia, hipotensão, alterações cardiológicas, nefrotoxicidade e, até mesmo, morte repentina foram descritas. É contra-indicada em casos de gravidez, diabetes, nefropatias com insuficiência renal e cardiopatias (Balanã-Fouce, Reguera et al. 1998).

Figura 20: Estrutura da Pentamidina ou 4-[5-(4-carbaimidolfenoxi)pentoxi]benzenocarboxiimidamida.

A anfotericina B (Figura 21) é um antibiótico poliênico com atividade fungicida e leishmanicida (Soares-Bezerra, Leon et al. 2004). Os primeiros relatos da eficiência da anfoteri-

cina B no tratamento da LTA foram de Lacaz e Sampaio no início da década de 1960. Posteriormente, outros estudos analisaram a utilização da anfotericina B no tratamento da LTA, demonstrando pequeno número de recidivas e melhor ação sobre as lesões mucosas em comparação aos antimoniais (Castro 1972), pois ela interage com o ergosterol da membrana das leishmânias, causando aumento de permeabilidade e morte do parasito (Berman 1997). É contra-indicada em gestantes e em indivíduos com cardiopatias e nefropatias. Os efeitos colaterais são: febre, calafrios, cefaléia, hipocalemia, hipomagnesemia, anemia, leucopenia, flebite e nefrotoxicidade. Efeitos adversos raros são: arritmias e alterações do segmento ST e onda T (NED/ASCOM/FUNASA 2000; Ministério_da_Saúde 2004).

Figura 21: Estrutura da Anfotericina B

Formulações lipídicas da anfotericina B (FLAB) têm sido utilizadas esporadicamente no tratamento das formas cutâneas e muco-cutâneas da LTA, seja em pacientes imunocompetentes ou com alguma forma de imunossupressão, incluindo indivíduos infectados pelo vírus de imunodeficiência humana (Amato, Amato et al. 1998; Amato, Nicodemo et al. 2000). As FLAB têm apresentado resultados promissores, embora estudos para se determinar a dose adequada para cada forma de leishmaniose ainda sejam necessários. O emprego das FLAB no tratamento da leishmaniose constitui-se em alternativa terapêutica nos casos de falha ou contra-indicações aos antimoniais e medicações de segunda escolha (Sampaio e Marsden 1997; Brown, Noursadeghi et al. 2005).

A hexadecilfosfocolina ou miltefosina (Figura 22) é uma alquilfosfocolina desenvolvida originalmente para o tratamento do câncer (Unger, Damenz et al. 1989). Foi a primeira droga de uso oral usada no tratamento da leishmaniose visceral (LV). Na LV causada por *L. donovani* na Índia, os resultados foram bastante promissores. Os mecanismos de ação da miltefosina contra *Leishmania* ainda não são bem entendidos. Sabe-se que esta droga é capaz de bloquear a síntese e alterar a composição da membrana do parasita. Existem poucos efeitos adversos tais como vômito e diarreia. Em relação à LTA, estudos utilizando a miltefosina no tratamento da forma cutânea da doença resultaram em boa eficácia contra *L. (V.) panamensis*, mas para *L. (V.) braziliensis* não houve eficiência adequada. São necessários maiores estudos com esta medicação para verificar sua eficiência, em relação aos tipos de leishmanioses existentes no Brasil (Soto, Arana et al. 2004).

Figura 22: Estrutura da Mitelfosine

A paromomicina (aminosidina) (Figura 23) é um antibiótico aminoglicosídeo extraído de *Streptomyces rimosus*, licenciado na Europa para o tratamento parenteral de infecções bacterianas. Seu mecanismo de ação consiste na inibição de síntese protéica, através de ligação às proteínas ribossômicas, induzindo a leitura equivocada do mRNA. Desta forma, interfere no complexo de formação de peptídeos e causa ruptura dos polissomos em monossomos não funcionais. A paromomicina é diferente da neomicina B somente na substituição de uma OH por uma amina (NH₂) e possui um espectro de atividade parasitária que não é igualado por outro antibiótico aminoglicosídeo. A utilização de paromomicina oral tem sido recomendada para o tratamento de teníase e amebíase. A forma injetável (124 mg/kg dia por 19 dias em média) tem sido utilizada como monoterapia para a leishmaniose visceral, apresentando resultados

positivos em estudos clínicos realizados no Quênia e na Índia (Berman 1988; Berman 1997). Em outros estudos, a paromomicina associada ao Pentosam apresentou resultados similares àqueles obtidos quando o antimonial foi usado sozinho, mas neste caso o tempo de tratamento foi reduzido à metade (Thakur, Bhowmick et al. 1995). Entretanto, a paromomicina pode apresentar nefro e ototoxicidade, afetando o oitavo par de nervos cranianos, o que pode levar também a problemas de controle motor e do equilíbrio. Outro problema com a paromomicina é que o fabricante original interrompeu a produção e sua disponibilidade para uso não está assegurada. Além disso, esse fármaco foi testado em número insuficiente de pacientes para que os efeitos colaterais e a resistência dos parasitas fossem convenientemente avaliados (Berman 1988).

Figura 23: Estrutura da Paromomicina

Na forma cutânea da LTA, o critério de cura é definido pelo aspecto clínico das lesões, reepitelização das lesões ulceradas e não ulceradas, e regressão total da infiltração e eritema em até três meses da conclusão do esquema terapêutico. Na forma mucosa, o controle é definido pela regressão de todos os sinais clínicos ao exame otorrinolaringológico, em até seis meses após a conclusão do tratamento. Se não houver cicatrização, no período de tempo estipulado para qualquer das duas formas de LTA descritas acima, novo esquema terapêutico

com antimônio pentavalente dever ser instituído; no caso de nova falha terapêutica, uma droga de segunda escolha deve ser utilizada (NED/ASCOM/FUNASA 2000)

2. OBJETIVOS

1. Síntese e caracterização de novos complexos de Cu^{2+} com quelantes fluorados, como forma de aumentar a lipofilicidade dos mesmos e, conseqüentemente, a sua biodisponibilidade. Com isso, espera-se contribuir para o desenvolvimento de quimioterápicos ativos por via oral. Os quelantes escolhidos, com dióis livres (Figura 24), deverão mimetizar o sítio de coordenação provável dos fármacos Pentostan® e Glucantime®, e a modulação da lipofilicidade será efetuada através dos análogos trifluorados desses quelantes.

Figura 24: Estrutura dos ligantes: (a) ácido láctico; (b) ácido trifluorolático; (c) ácido 2-hidroxi-isobutírico; (d) ácido 2-hidroxi-trifluoroisobutírico.

2. Avaliação da atividade anti-leishmania desses novos complexos contra *L. amazonensis*.

Exceto pelos estudos de atividade redox dos complexos (v. capítulo 2.5), os demais resultados foram publicados: Rodrigo da Silva Maffei, Jenicer K. U. Yokoyama-Yasunaka, Danilo Ciccone Miguel, Silvia Reni Bortolin Uliana, Breno Pannia Espósito (2009). *Synthesis, characterization and evaluation of antileishmanial activity of copper(II) with fluorinated α -hydroxycarboxylate ligands*. *BioMetals* 22(6):1095-1101. Uma cópia desse artigo segue no Anexo I.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. SÍNTESE E ANÁLISE ELEMENTAR

Alíquotas de uma solução 0,75 M de CuSO_4 em água foram tratadas sob agitação a temperatura ambiente com iguais volumes de soluções dos ligantes (Figura 24), de modo a perfazer proporções molares finais 1:2 Cu:L. Observou-se em todos os casos imediatamente o desenvolvimento de diferentes tonalidades de coloração azul. O pH de todas as soluções foi ajustado para 7, e a agitação prosseguiu por 1 h. Ao final, as soluções aquosas foram tratadas por 4 vezes com 100 mL de metanol, observando-se a precipitação de um sólido esbranquiçado, provavelmente Na_2SO_4 ou NaOH em excesso. As soluções tiveram seu volume reduzido para 20 mL e foram transferidas para geladeira. Depois de 48 horas de repouso a frio, o sobrenadante foi retirado e tratado com metanol para que aumentar a precipitação do material da solução e, em seguida todo o precipitado foi filtrado e seco em estufa. A Análise Elementar dos sólidos foi realizada no equipamento Perkin Elmer (C, H, N) da Central Analítica do IQUSP.

3.2. ESPECTROSCOPIA ELETRÔNICA

3.2.1. INTRODUÇÃO

A teoria da estrutura eletrônica de complexos metálicos foi desenvolvida para esclarecer as propriedades dos íons metálicos d em cristais iônicos. Na teoria do campo cristalino, o par isolado de elétrons é considerado um ponto de carga negativa (ou como uma carga parcial negativa de um dipolo elétrico) que repele os elétrons dos orbitais *d* do íon metálico cen-

tral. Esta abordagem, baseia-se no desdobramento dos orbitais d em grupos em grupos de orbitais de energias diferentes, explicando satisfatoriamente o número de elétrons desemparelhados em um íon metálico e os espectros, estabilidade e propriedades magnéticas dos complexos. Em um complexo octaédrico, por exemplo, de acordo com essa teoria, seis ligantes são colocados nos eixos cartesianos centrados no íon metálico (Figura 25). Os ligantes interagem fortemente com o íon metálico central, e a estabilidade do complexo deriva em grande parte desta interação. Há um efeito secundário muito menor, que surge do fato de que os elétrons em diferentes orbitais d interagem com os ligantes com diferentes magnitudes (Figura 26). Embora essa interação seja responsável por pouco mais do que 10% da interação global metal-ligante, ela tem conseqüências importantes nas propriedades dos complexos (Shriver e Atkins 2008).

Figura 25: Orientação dos cinco orbitais d em relação aos ligantes de um complexo octaédrico (Shriver e Atkins 2008).

Figura 26: As energias dos orbitais d em um campo cristalino octaédrico (Shriver e Atkins 2008).

No caso dos complexos de cobre, temos que o arranjo octaédrico distorcido é comum para o Cu^{2+} , sendo essa distorção tetragonal uma consequência da sua configuração d^9 . Os nove elétrons d se distribuem da seguinte maneira: $(t_{2g})^6(e_g)^3$. Os três elétrons e_g ocupam os orbitais $d_{x^2-y^2}$ e d_{z^2} : dois em um orbital e o terceiro no outro. Como o preenchimento do nível e_g não é simétrico, ocorre a distorção de Jahn-Teller (Figura 27), cujo efeito é a quebra da degenerescência dos orbitais e_g (isto é, os dois orbitais e_g deixam de ter a mesma energia), o que resulta em distâncias metal-ligante diferentes e, portanto, em distorção de simetria. O orbital $d_{x^2-y^2}$ está sob a influência dos quatro ligantes que se aproximam segundo as direções $+x$ $-x$, $+y$ e $-y$. O orbital d_{z^2} está sob a influência de apenas dois ligantes, que se aproximam segundo as direções $+z$ e $-z$. Assim a energia do orbital $d_{x^2-y^2}$ aumenta mais do que a do orbital d_{z^2} . Por isso, os três elétrons do nível e_g passam a se distribuir como se segue: $(d_{z^2})^2(d_{x^2-y^2})^1$. Como o orbital d_{z^2} contém dois elétrons, os ligantes que se aproximam segundo as direções $+z$ e $-z$ são impedidos de se aproximarem do cobre tanto quanto os ligantes que se aproximam ao longo das direções $+x$, $-x$, $+y$ e $-y$ (Russel 1994; Lee 2003; Shriver e Atkins 2008).

Figura 27: Demonstração do efeito Jahn-Teller. Se a configuração eletrônica fundamental de um complexo não-linear é orbitalmente degenerada e assimetricamente preenchida, o complexo se distorcerá para remover a degenerescência e atingir menor energia (Shriver e Atkins 2008).

Portanto, um complexo d^9 octaédrico apresenta degenerescência orbital porque os orbitais e_g ($d_{x^2-y^2}$ e d_{z^2}) têm a mesma energia e um único elétron pode ocupar qualquer um deles. Uma distorção tetragonal faz com que os dois orbitais tenham energias diferentes, tornando a energia do complexo resultante menor do que a do complexo não-distorcido (Shriver e Atkins 2008).

A luz branca, uma mistura de todos os comprimentos de onda da radiação eletromagnética visível, pode incidir sobre elétrons de moléculas para transferi-los a orbitais de maior energia. Quando alguns desses comprimentos de ondas são removidos do feixe de luz branca pela passagem da luz através de uma amostra, a luz que sai não é mais branca a olho nu. Em complexos metálicos, boa parte dessa absorção é causada por transições d-d, nas quais um elétron é excitado de um orbital d para outro orbital d. Nos complexos octaédricos, a excitação é de um orbital t_{2g} para um orbital e_g . Em um complexo tetraédrico, a excitação é de um orbital e para um orbital t_2 , porque a ordem das energias dos orbitais se inverte. Existe um outro tipo de transição, chamado de transição de transferência de carga, na qual um elétron é

excitado do ligante para o átomo de metal ou vice-versa, sendo geralmente muito intensa. A intensidade das transições eletrônicas obedece a *regras de seleção*: complexos centro-simétricos (octaédricos ou quadrado planares) têm as transições *d-d* proibidas por não serem acompanhadas de mudança de paridade ($g \rightarrow u$ ou $u \rightarrow g$; proibição por Laporte). Essas transições apresentam ϵ ao redor de 20 a 100 $M^{-1}cm^{-1}$. Já nos complexos tetraédricos (não-centro-simétricos) e/ou octaédricos distorcidos, essa proibição é atenuada e os valores de ϵ podem atingir $\sim 500 M^{-1}cm^{-1}$ (Shriver e Atkins 2008).

Qualquer técnica que utilize luz para medir concentrações de espécies químicas pode ser chamada de espectrofotometria. O espectro visível é uma porção do espectro eletromagnético cuja radiação pode ser captada pelo olho humano, situando-se entre a radiação infravermelho e ultravioleta (faixa de 380-780 nm). A espectroscopia de absorção molecular está baseada na medida da transmitância (T) ou absorbância (A) de soluções contidas em células transparentes tendo um caminho óptico de b cm. De forma comum, a concentração c de um analito absorvente está relacionada linearmente à absorbância, conforme representado pela equação (Skoog, Holler et al. 2002):

$$A = -\log T = \log P_0 = \epsilon bc$$

Onde: A = absorbância; T = transmitância; P_0 = energia radiante; ϵ = absortividade molar ($M^{-1}.cm^{-1}$); b = caminho óptico (cm); c = concentração da amostra (M).

3.2.2. INSTRUMENTAÇÃO

Os espectros eletrônicos dos complexos foram obtidos em microplacas de 96 poços em leitor de microplacas Tecan Sapphire, a temperatura ambiente em diferentes solventes.

3.3. ESPECTROMETRIA NO INFRAVERMELHO

3.3.1. INTRODUÇÃO

A região espectral do infravermelho compreende radiação com números de onda no intervalo de aproximadamente 10 a 12.800 cm^{-1} ou comprimentos de onda de 0,78 a 1000 μm . Do ponto de vista tanto da aplicação como da instrumentação, o espectro infravermelho é convenientemente dividido em infravermelho *próximo*, *médio* e *distante*. Os limites aproximados de cada um são apresentados na Tabela 2 (Skoog, Holler et al. 2002).

Tabela 2: Regiões Espectrais do Infravermelho

Região	Intervalo de Comprimento de Onda, μm	Região de Número de Onda, cm^{-1}	Região de Frequência (ν), Hz
Próximo	0,78 a 2,5	12.800 a 4.000	$3,8 \times 10^{14}$ a $1,2 \times 10^{14}$
Médio	2,5 a 50	4.000 a 200	$1,2 \times 10^{14}$ a $6,0 \times 10^{12}$
Distante	50 a 1.000	200 a 10	$6,0 \times 10^{12}$ a $3,0 \times 10^{11}$
Mais usada	2,5 a 15	4.000 a 670	$1,2 \times 10^{14}$ a $2,0 \times 10^{13}$

Os espectros infravermelhos de absorção, emissão e reflexão de espécies moleculares podem ser racionalizados supondo-se que todos se originam de diversas variações de energia causadas por transições de moléculas de um estado vibracional ou rotacional de energia para outro. A radiação infravermelha não é energética o suficiente para causar as transições eletrônicas que encontramos na radiação ultravioleta, visível e raio X. A absorção de radiação infravermelha está restrita a espécies moleculares que têm diferenças de energia pequenas entre vários estados vibracionais e rotacionais (Skoog, Holler et al. 2002).

As transições no infravermelho (Silverstein, Webster et al. 2005) relevantes para este estudo são:

- a) Estiramento O–H: em álcoois e fenóis, quando livre, a frequência relativa a $\nu(\text{OH})$ aparece como picos entre $3700 - 3450 \text{ cm}^{-1}$;
- b) Vibrações de deformação axial de C–O: Aparecem no espectro dos ácidos carboxílicos entre $1320\text{-}1210 \text{ cm}^{-1}$
- c) Ânion carboxilato: O ânion carboxilato possui duas ligações $\text{C} \cdots \text{O}$ fortemente acopladas, cuja força de ligação é intermediária entre C=O e C–O (Figura 28).

Figura 28. Ânion carboxilato.

O íon carboxilato dá origem a duas bandas, uma das quais, entre $1650\text{-}1550 \text{ cm}^{-1}$, é intensa e provém da deformação axial assimétrica. A outra, mais fraca, observada em torno de 1400 cm^{-1} , provém da deformação axial simétrica. A conversão de um ácido carboxílico em um de seus sais pode confirmar a estrutura do ácido. Além disso, a diferença de frequência entre os modos assimétrico e simétrico do carboxilato (Δ_{COO}) permite determinar o modo de coordenação (monodentado ou bidentado) desse grupo em complexos metálicos (Deacon e Philips 1980).

- d) Estiramentos C–F: Moléculas que contêm flúor, especialmente grupos CF_3 ou CF_2 , absorvem fortemente na região entre $700 - 800$ e $1120 - 1350 \text{ cm}^{-1}$.

3.3.2. INSTRUMENTAÇÃO

Pastilhas de KBr com os ligantes livres e os complexos os complexos foram preparadas para a aquisição dos espectros na região do infra-vermelho em equipamento Bomem MB 100. Como alguns ligantes dispõem de grupos dióis e carboxilas disponíveis para coordenação, a inspeção dos deslocamentos $\nu_{C=O}$ (1600 cm^{-1}) e $\nu_{OH(\text{álcool secundário})}$ (1200 cm^{-1}) nos permitiu a identificação do grupo responsável pela coordenação.

3.4. PARTIÇÃO

3.4.1. INTRODUÇÃO

A partição de substâncias entre uma fase aquosa e uma orgânica é uma propriedade farmacológica muito estudada. Essa propriedade normalmente é expressa em termos do coeficiente de partição (P), definido em termos logarítmicos por:

$$\log P = \log \left(\frac{C_{org}}{C_{aq}} \right),$$

onde C_{org} é a concentração do soluto na fase orgânica, e C_{aq} é a concentração do soluto na fase aquosa.

O significado da influência do coeficiente de partição sobre a resposta biológica foi elucidado por Corwin Hansch que, em seu primeiro trabalho (Hansch, Maloney et al. 1962), demonstrou a importância primordial do Coeficiente de Partição em relações quantitativas estrutura-atividade (QSARs). O crescente interesse em QSAR durante o último quarto de século, estimulada pela escola Hansch, significa que muitos milhares de coeficientes de partição foram medidos. O primeiro Coeficiente de Partição foi definido por Berthelot e Jungfleisch

(Berthelot e Jungfleisch 1872) como a razão entre as concentrações no estado de equilíbrio do soluto, distribuídos entre duas fases imiscíveis, a concentração na fase mais hidrofóbica é, por convenção, o numerador (Dearden e Gaynor 1988).

3.4.2. PROCEDIMENTO

Com o intuito de obter coeficientes de partição biologicamente relevantes, esse parâmetro foi estudado através da partição dos complexos de cobre e vesículas de lecitina multilamelares (MLV's) como miméticos de membranas celulares, a temperatura ambiente. MLV's foram obtidas através de adaptação de outros métodos (Engelmann 2007). Oito mg de lecitina de soja foram dissolvidas em CHCl_3 em tubo de ensaio. A solução foi seca sob N_2 e ressuspensa em 2,5 mL de tampão Tris-HCl (pH 7,2) em vortex por 5 minutos. A suspensão foi centrifugada (14500 rpm) por 3 minutos e o sobrenadante foi descartado. Esse procedimento foi repetido 4 vezes. O produto final foi ressuspensado com o tampão. Cem microlitros da suspensão de MLV e 100 μL da solução de CuL (~30 mM) foram misturados em um tubo eppendorf, agitados em vortex por 5 minutos e centrifugados (14500 rpm) por 3 minutos. Transferiu-se 100 μL do sobrenadante para placa de 96 poços e mediu-se a absorbância no λ_{max} de cada complexo.

3.5. ATIVIDADE PRÓ-OXIDANTE DOS COMPLEXOS DE Cu

3.5.1. INTRODUÇÃO

O cobre tem dois estados de oxidação comuns, Cu^+ e Cu^{2+} , sendo que essa característica é empregada por sistemas biológicos para a conversão de substâncias oxidantes em deri-

vados menos danosos ao organismo. Portanto, enzimas de cobre são parte do sistema antioxidante, e dentre elas destaca-se a superóxido dismutase, que pode converter superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em peróxido e oxigênio de acordo com as reações (Halliwell e Gutteridge 2007):

Entretanto, como outros íons metálicos, o cobre pode participar de processos de *formação* de espécies reativas de oxigênio (ERO) através da reação com substratos biológicos como o peróxido. Em concreto, alguma atenção tem sido dada à formação do altamente reativo radical hidroxila ($OH^{\cdot}$) mediada por espécies de cobre através da reação de Fenton (Halliwell e Gutteridge 2007):

Enquanto que para o íon Cu^+ há um consenso de que a formação do radical hidroxila seja a principal atividade de dano oxidativo, os sistemas Cu^{2+}/H_2O_2 aparentemente envolveriam a formação de 1O_2 (Frelon, Douki et al. 2003) ou de um intermediário altamente oxidante de Cu(III) (Mylonas, Malandrinos et al. 2001). Dado o fato de que o parasita se aloja nos macrófagos, células que por sua vez dependem da atividade oxidante do peróxido para executar seu papel de defesa no organismo, decidimos tentar estabelecer uma conexão entre a atividade pró-oxidante dos complexos (ensaiada com o teste de oxidação da sonda fluorescente dihidro-rodamina) e sua atividade biológica.

3.5.2. PROCEDIMENTO

Os complexos tiveram sua atividade pró-oxidativa frente ao H_2O_2 analisada através da sonda fluorescente dihidrorodamina (DHR). Na forma reduzida, essa sonda não é fluorescente, entretanto, uma série de substâncias (ERO's, O_2) pode convertê-la à forma oxidada, fluorescente. O meio fluorogênico consiste em uma solução de DHR 50 μM , preparada a partir de estoques congelados (100 mM em DMSO), em tampão HBS isento de ferro (pH 7,4). Esse tampão isento de ferro, uma precaução importante contra reações de Fenton colaterais indesejadas catalisadas por traços de Fe(III) , é preparado pela lavagem da solução com Chelex® (1 g/ 100 mL) antes do ajuste de pH. Alíquotas de 180 μL do meio fluorogênico são transferidas para uma placa transparente de 96 poços, nas quais já se encontravam 20 μL da solução de complexo metálico (10 μM em água). A leitura de fluorescência é executada em leitor de microplacas (BMG Fluostar Optima), operando com incubação a 37°C e $\lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{emis}} = 485/515$ nm. A intensidade de fluorescência de cada poço é medida em intervalos de dois minutos durante uma hora. Os dados são apresentados como “intensidade de fluorescência / tempo” e não como pontos finais, para minimizar erros (Esposito, Breuer et al. 2002; Esposito, Breuer et al. 2002; Esposito, Breuer et al. 2003). Um procedimento esquematizado pode ser encontrado na Figura 29.

Figura 29. Princípio de funcionamento do método de detecção fluorimétrica de atividade redox. A adição de um pró-oxidante (peróxido) inicia a produção de ERO's catalisada por Cu^{2+} presente na amostra, convertendo a sonda não-fluorescente DHR à sua forma fluorescente (a). Curvas cinéticas de fluorescência são obtidas para diversas concentrações de peróxido; a partir dessas curvas, determinam-se seus coeficientes angulares (m), que corresponde à taxa de fluorescência para uma dada concentração de peróxido (b). A taxa de fluorescência é linearmente dependente da concentração de peróxido, sendo usada para quantificar a concentração do metal na amostra desejada (c) (Esposito, Breuer et al. 2003).

3.6. ENSAIOS BIOLÓGICOS

3.6.1. INTRODUÇÃO

O cultivo celular é um método desenvolvido por cientistas japoneses em 1961, e utiliza células oriundas de animais ou vegetais. Baseia-se na capacidade de as células multiplica-

rem-se em uma placa de cultura de tecidos em condições adequadas, fora do organismo vivo e mantendo suas características próprias. A cultura de tecidos implica em uma prévia desagregação mecânica ou enzimática do tecido original, e o cultivo de tais células é feito em uma camada aderente, em um substrato sólido ou em uma suspensão em uma cultura, mantendo-se rígido controle de pH, temperatura e disponibilidade de nutrientes (Finn, Sunnerhagen et al. 1987).

3.6.2. PROCEDIMENTO

Os promastigotas do gênero *Leishmania amazonensis* foram cultivados em Meio 199 a 25°C com divisões semanais (Arruda 2005; Souza 2006). Os parasitas foram expostos aos complexos pelo período de 48 a 72 horas e, após isso, foi feita a contagem de parasitas mortos na Câmara de Neubauer, determinando as concentrações inibitórias. Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados são expressos em porcentagem média de redução do número de parasitas por unidade de volume, em comparação com os dados do grupo controle. Os resultados são a média de pelo menos dois experimentos diferentes. A concentração inibitória (IC₅₀) foi determinada através da regressão sigmoidal das curvas de concentração-resposta utilizando o Software ORIGIN 7.5. As células HeLa foram cultivadas em meio DMEM, suplementado com 10% de FCS, sulfato de gentamicina (50mg/L) e anfotericina B (2mg/L) a 37°C e 5% de CO₂. Uma alíquota de 100 µL de uma suspensão ($9,4 \times 10^4$ células/mL) foi plaqeada em microplaca de 96 poços e deixada em repouso por 4 horas. As culturas foram incubadas com concentrações crescentes dos complexos de cobre por 24 horas e a viabilidade celular foi determinada através de medição da clivagem do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) como descrito (Arruda 2005).

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. SÍNTESE E ANÁLISE ELEMENTAR

Como resultado das sínteses, foram obtidos sólidos azuis com os rendimentos apresentados na Tabela 3. Na Tabela 4 são apresentados os resultados de análise elementar de tais complexos.

Tabela 3. Rendimentos da síntese dos complexos de cobre.

Complexos	Sigla	Rend
Lactato de cobre(II)	Cu(L1) ₂	70,85
Trifluorolactato de cobre(II)	Cu(L2) ₂	25,24
2-hidroxi-isobutirato de cobre(II)	Cu(L3) ₂	90,70
2-hidroxi-trifluoroisobutirato de cobre(II)	Cu(L4) ₂	33,53

Tabela 4: Resultados da análise elementar dos complexos de cobre.

Fórmula	%C		%H	
	Calc	Exp	Calc	Exp
Cu(L1) ₂ (H ₂ O) ₂	25,95	25,61	5,08	5,13
Cu(L2) ₂ (H ₂ O) ₅	16,47	16,12	2,76	2,44
Cu(L3) ₂ (H ₂ O) ₂	31,42	31,72	5,93	5,41
Cu(L4) ₂ (H ₂ O) ₂	23,23	23,30	2,92	2,72

Executamos também testes qualitativos de solubilidade em diversos solventes, tendo sido obtidos os seguintes dados (Tabela 5):

Tabela 5. Solubilidade dos complexos de Cu(II) em solventes orgânicos.

Complexos	Acetona	Etanol	Metanol	DMSO	Acetonitrila
Cu(L1) ₂		×	×	×	
Cu(L2) ₂		×	×	×	
Cu(L3) ₂	×	×	×	×	×
Cu(L4) ₂	×	×	×	×	×

Todos os complexos são bastante solúveis em água, com a solubilidade cerca de 1 g/mL de $(\text{Cu}(\text{L1})_2, \text{Cu}(\text{L3})_2, \text{Cu}(\text{L4})_2)$ ou $0,2 \text{ g.mL}^{-1}$ $(\text{Cu}(\text{L2})_2)$ a 25°C . Apesar de sua considerável solubilidade em água, o trifluorolactato de cobre demonstrou ser o complexo mais hidrofóbico, formando complexos metálicos com características anfifílicas, como observadas em outros fluorocarboxilatos metálicos (Esposito, Faljoni-Alario et al. 1999).

4.2. ESPECTROSCOPIA ELETRÔNICA

A fluoração dos ligantes induziu a um desvio hipsocrômico do espectro na região do visível para os complexos 10 nm $(\text{Cu}(\text{L3})_2 \rightarrow \text{Cu}(\text{L4})_2)$ e 30 nm $(\text{Cu}(\text{L1})_2 \rightarrow \text{Cu}(\text{L2})_2)$ (Figura 30 e Tabela 6). Esse efeito foi observado para os complexos em água e DMSO. Esses dados estão de acordo com a π -acidez dos ligantes, proveniente dos grupos CF_3 , melhorando o carácter π -aceptor do L2 e L4 em relação aos ligantes análogos não fluorados, aumentando assim os valores Δ_O dos complexos (Shriver e Atkins 2008). Os efeitos de indução positiva dos grupos metil em L3 e L4 podem compensar o efeito de remoção eletrônica causado pelos grupos CF_3 , o que poderia explicar o menor deslocamento observado para $\text{Cu}(\text{L3})_2 \rightarrow \text{Cu}(\text{L4})_2$. Para qualquer um dos complexos, a troca de água por DMSO leva a um desvio hipsocrômico de 30 nm $(\text{Cu}(\text{L1})_2, \text{Cu}(\text{L2})_2)$ ou 20 nm $(\text{Cu}(\text{L3})_2, \text{Cu}(\text{L4})_2)$. Esse efeito está relacionado ao fato de que o DMSO possui um melhor carácter π -aceptor em relação a água. Além disso, valores de absorvidade molar de $130 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ são coerentes com transições d-d do metal (Shriver e Atkins 2008).

Tabela 6: Comprimentos de onda máximo (λ_{max}) em diferentes solventes.

Complexos	H ₂ O	DMSO
Cu(L1) ₂	762	734
Cu(L2) ₂	732	700
Cu(L3) ₂	770	748
Cu(L4) ₂	760	742

Figura 30: Espectros na região do visível dos complexos (solução aquosa *ca* 10 mM).

4.3. ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL

Os espectros na região do infravermelho (Figura 31) revelaram frequências características da parte orgânica dos complexos (Tabela 7), o que nos permitiu confirmar o modo de coordenação. Tanto as vibrações $\nu_{\text{as}}(\text{COO})$ como $\nu_{\text{s}}(\text{COO})$ estão de acordo com as vibrações de carboxilatos desprotonados (intervalos teóricos de 1550-1650 e 1400 cm^{-1} , respectivamente (Goulden 1960; Silverstein, Webster et al. 2005)), com valores de $\Delta(\text{COO})$ de 200-300 cm^{-1}

indicando ligação monodentada do carboxilato com o centro metálico (Deacon e Philips 1980). Frequências de 3500 cm^{-1} são atribuídas a $\nu(\text{OH})$ nos α -carbonos (Silverstein, Webster et al. 2005), que permaneceram inalteradas em comparação com seus respectivos ácidos α -hidroxicarboxílicos de origem, indicando que o oxigênio da α -hidroxila permanece protonado durante a coordenação. Frequências em torno de $1000\text{-}1260\text{ cm}^{-1}$ podem ser atribuídas à $\nu(\text{CO})$ (estiramento α -carbono-OH). Bandas em torno de $1100\text{-}1350$ e $700\text{-}750\text{ cm}^{-1}$ aparecem somente para os complexos com ligantes fluorados e são indicativos da frequência dos grupos CF_3 (Silverstein, Webster et al. 2005).

Figura 31: Espectros na região do infravermelho dos complexos.

Tabela 7: Frequências medidas para pastilhas de KBr com complexos de cobre na região do infravermelho (cm^{-1}).

Complexos	$\nu_{\text{as}}(\text{COO})$	$\nu_{\text{s}}(\text{COO})$	$\Delta(\text{COO})$	$\nu(\alpha\text{OH})$	$\nu(\text{CO})$	$\nu(\text{CF})$
Cu(L1)_2	1609	1391	218	3447	1124	
Cu(L2)_2	1666	1371	295	3570	1126	1248, 723
Cu(L3)_2	1647	1387	260	3402	1176	
Cu(L4)_2	1643	1393	250	3472	1173	1296, 716

Os ácidos α -hidroxicarboxílicos apresentados agem como ligantes bidentados (Dillon e Rossotti 1966), produzindo complexos neutros 1:2 com lactato (Bobtelsky e Bar-Gadda 1953; Mohanty e Patnaik 1984) e outros (Goulden 1960; Prout 1968). O ajuste do pH para neutro foi fundamental para manter o ligante carboxilato desprotonado, no entanto, os grupos α -OH se coordenaram ao metal sem desprotonação, dado que o pK_a desses grupos é extremamente alto (15,1 para o ácido láctico (Silva, Kong et al. 2009)). De fato, é interessante notar que as hidroxilas dos ácidos α -hidroxicarboxílicos só se desprotonam para coordenar metais que são ácidos de Lewis muito fortes, como Fe(III) e Al(III). Dado que muitos sideróforos (transportadores de ferro produzidos por fungos e bactérias) apresentam α -hidroxicarboxilatos no ambiente de coordenação, é de se supor que essa escolha se deva a uma maior possibilidade de seleção do metal que será assimilado do ambiente (ferro, e não outros) (Silva, Kong et al. 2009).

O efeito Jahn-Teller estabiliza os íons Cu(II) em uma conformação octaédrica tetragonalmente distorcida, com duas moléculas de solvente em posições axiais e dois ligantes bidentados na posição *trans* em relação aos outros no plano. Os α -hidroxicarboxilatos coordenam um oxigênio através do grupo carboxilato e outro da hidroxila do α -carbono, que permanece protonada (Bolard 1965; Carballo 2001). Nossos espectros na região do infravermelho confirmam que nossos complexos se ajustam bem a esse modo de ligação, e para eles se propõem as estruturas apresentadas na Figura 32.

Figura 32: Estruturas propostas para os complexos de cobre.

4.4. PARTIÇÃO

Todos os complexos são bem solúveis em água, com solubilidades de *ca.* 1 g.mL^{-1} (Cu(L1)_2 , Cu(L3)_2) ou $0,2 \text{ g.mL}^{-1}$ (Cu(L2)_2) a 25°C . Os estudos de coeficiente de partição foram feitos em vesículas de lecitina porque elas mimetizam melhor as membranas lipídicas verdadeiras e sua aplicação foi proposta como meio de aumentar a significância dos resultados dos testes biológicos. Os complexos fluorados demonstram ser mais lipofílicos do que seus análogos não fluorados (cujos valores de $\log P$ podem não ser determinados) (Tabela 8), sugerindo que a validade da suposição inicial de que o flúor nas moléculas de ligantes podem produzir uma maior lipofilicidade nos complexos, como ocorreu com outros complexos fluo-

rados (Esposito 1999). O trifluorolactato de Cu(II), Cu(L2)₂, demonstrou a maior lipofilicidade demonstrado pelo experimento, que está correlacionado com a maior IC₅₀ em relação ao teste com promastigotas *L. amazonensis*.

Tabela 8. Coeficientes de partição (P) em vesículas de lecitina multi-camadas (MLV's).

Complexo	P
CuSO ₄	-
Cu(L1) ₂	0,055
Cu(L2) ₂	0,152
Cu(L3) ₂	0,040
Cu(L4) ₂	0,082

4.5. ATIVIDADE PRÓ-OXIDANTE DOS COMPLEXOS DE Cu

A Figura 33 apresenta o *display* do equipamento para as curvas cinéticas de fluorescência obtidas para os diversos tratamentos, sendo que os resultados quantitativos seguem na Figura 34. O complexo nitrilotriacetato de ferro(III), Fe(NTA), foi introduzido nesse teste como um controle positivo de geração de radicais livres, conforme descrito anteriormente (Esposito, Breuer et al. 2003). A Figura 35 mostra o efeito da concentração de peróxido sobre as diversas taxas de fluorescência dos complexos, obtidas para o intervalo entre 10 a 20 minutos a partir das curvas apresentadas na Figura 34.

Figura 33. Apresentação dos dados de cinética de fluorescência pelo aparelho FluoStar Optima (BMG) durante a reação entre complexos metálicos e H₂O₂ em diversas concentrações. A concentração dos complexos é 10 μ M em água.

Figura 34. Dados de fluorescência obtidas pelo tratamento de H₂O₂ (0 a 200 μM) sobre os diversos complexos na concentração de 10 μM. Nas caixas de texto de cada Figura, os números referem-se à concentração de peróxido (em μM). Para o cálculo de taxa de fluorescência (ou seja, fluorescência por unidade de tempo), foram calculados os coeficientes angulares (inclinações) de todas as curvas acima para o intervalo de 10 a 20 minutos. O controle é H₂O₂, sem adição de complexos.

Figura 35: Taxas de fluorescência da rodaminha promovidas por diversos complexos metálicos em presença de peróxido. O controle é H₂O₂, sem adição de complexos.

Considerando os dados de atividade pró-oxidante dos complexos em presença de peróxido (Figura 35), verifica-se que a fluoração dos ligantes produz complexos com diminuída taxa de formação de espécies oxidantes (não identificadas, uma vez que a sonda DHR é inespecífica para uma gama de oxidantes). Postula-se que esse fato esteja correlacionado com diferentes potenciais de redução de tais complexos, o que precisaria ser confirmado através de medidas de voltametria cíclica.

4.6. ENSAIOS BIOLÓGICOS

A atividade biológica dos complexos de Cu(II) e CuSO₄ foi testada em promastigotas de *L. amazonensis* (Figura 36) e a citotoxicidade foi determinada em células HeLa. Os ácidos

α -hidroxicarboxílicos também foram testados, porém, não demonstraram nenhuma atividade (dados não mostrados).

Figura 36: Curvas dose-resposta dos complexos de Cu(II) contra *L. amazonensis*.

As curvas dose-resposta indicam atividade máxima contra os parasitas em 72 horas (Tabela 9). A partir desses valores, está claro que o Cu(II) livre (não quelado) é a espécie mais tóxica para as células *in vitro*. Juntamente com o fato de os ácidos α -hidroxycarboxílicos não exibirem nenhuma atividade, parece claro que o papel dos mesmos como quelantes é o de transportar o centro metálico tóxico até o alvo. A quelação normalmente diminui a biodisponibilidade de íons metálicos, no entanto, também permite uma melhor orientação e defesa contra possíveis efeitos colaterais, tornando possível, em alguns casos, o complexo ser mais reativo que o metal ou os ligantes, separadamente, como demonstrado em uma mistura de Cu(II) e ácido láctico contra *E. coli* ou em um determinado número de estirpes de *Salmonella*, em diferentes meios de crescimento (Ibrahim, Yang et al. 2008). Isso é muito importante para a quimioterapia sistêmica por metalodrogas, que não pode contar com a simples administração de sais metálicos. Especificamente, o Cu(II) tem uma afinidade muito grande para se ligar a sítios da proteína plasmática albumina (Harford e Sarkar 1997), então, a quelação do cobre é importante para proteger o íon metálico e diminuir as doses administradas.

Tabela 9: Valores de IC₅₀ ($\mu\text{M} \pm$ Desvio Padrão em dois experimentos diferentes) dos complexos de cobre após 48 e 72 horas de incubação com promastigotas de *L. amazonensis*

Complexos	48 h	72 h
CuSO ₄	218,4 $\pm$ 40,0	106,5 $\pm$ 11,1
Cu(L1) ₂	242,9 $\pm$ 32,1	292,7 $\pm$ 11,4
Cu(L2) ₂	257,7 $\pm$ 42,5	166,7 $\pm$ 18,3
Cu(L3) ₂	339,6 $\pm$ 41,0	187,4 $\pm$ 21,5
Cu(L4) ₂	412,4 $\pm$ 94,7	272,9 $\pm$ 21,3

Os diferentes quelantes utilizados originaram atividades antileishmânicas ligeiramente distintas dos complexos (Tabela 9 e Figura 36). O Cu(L2)₂ foi o mais hidrofóbico e mais tóxico das espécies, mesmo se comparado a seu análogo não-fluorado Cu(L1)₂. A inserção dos grupos CF₃ ou CH₃ na estrutura do fármaco pode aumentar o caráter hidrofóbico dos complexos e, provavelmente, facilitar a permeação da membrana celular, o que poderia explicar por-

que o $\text{Cu}(\text{L2})_2$ e $\text{Cu}(\text{L3})_2$ exibiram alta atividade. No entanto, o CF_3 e o CH_3 possuem efeitos indutivos opostos, e a inserção de ambos os grupos ao mesmo tempo (como em $\text{Cu}(\text{L4})_2$) poderia causar uma redução na utilidade terapêutica do complexo. Todos os complexos de cobre induziram uma toxicidade máxima de 65% em células HeLa nas suas concentrações mais elevadas, o que nos permite estimar seus valores de IC_{50} como superiores a 300 μM , ou seja, de duas a três vezes maior que os valores para promastigotas (Figura 37). Seria necessária a realização de testes em animais infectados para avaliar se essa diferença terapêutica é útil.

Figura 37: Curvas dose-resposta dos complexos em células HeLa.

Outros metalofármacos foram desenvolvidos para a terapia antileishmânica. Por exemplo, a platina ligada a esterol hidrazonas em concentrações de cerca de 10 μM causa uma diminuição de 70% na proliferação de promastigotas de *L. mexicana* (Visbal, Marchan et al. 2008). Cisteína proteases do parasita foram inibidas com sucesso por uma gama de complexos de $\text{Au}(\text{III})$, $\text{Pd}(\text{II})$ e $\text{Re}(\text{V})$, apresentando valores de IC_{50} entre 0,009 e 1,4 μM (Fricker, Mosi

et al. 2008). Intercaladores de DNA, baseados em Cu(II) ou Au(I) (Navarro, Fernandez-Mestre et al. 2003), são drogas antileishmânicas interessantes; o $[\text{Au}(\text{dppz})_2]\text{Cl}_3$ demonstrou uma atividade antiproliferativa contra *L. mexicana*, com LD₂₆ de 17 nM após 48 horas. Com o nosso trabalho, nós mostramos que a fluoração de complexos de Cu(II) pode aumentar sua atividade (desde que os efeitos indutivos sejam levados em consideração) e, provavelmente, aumentar a atividade de outros complexos também.

O cobre livre, relativamente pouco lipofílico mas com alta taxa de oxidação, apresentou sempre grande atividade antileishmânica. O trifluorolactato de cobre(II), que apresentou atividade biológica discretamente maior que os outros complexos estudados, é dos mais lipofílicos e tem atividade pró-oxidante apreciável. Isso sugere que *a combinação harmoniosa desses dois fatores (lipofilicidade e atividade pró-oxidante) pode ser determinante para o projeto de um metalofármaco anti-leishmânico derivado de Cu(II)*. Já os complexos com quelantes não fluorados apresentam uma velocidade de formação de espécies reativas análoga à do íon livre, sugerindo uma possível explicação para a atividade tóxica dos mesmos (ou seja, fornecedores do metal para o organismo-alvo), embora o fato de integrarem um complexo metálico possa dificultar sua disponibilização.

Finalmente, é extremamente interessante verificar que quaisquer espécies de Cu(II) apresentam uma atividade redox mais intensa do que o complexo de Fe(III), o que pode ser uma via de explicação para o fato de que desequilíbrios no metabolismo de Cu (p. ex., doença de Wilson) tenham efeitos tão dramáticos, embora a concentração de Cu livre no organismo seja várias ordens de magnitude inferior à de Fe (Mak e Lam 2008; Tisato, Marzano et al. 2009).

5. CONCLUSÕES

Nas sínteses dos complexos de Cu^{2+} com ligantes α -hidroxicarboxilatos e seus análogos fluorados, obtivemos compostos na estequiometria ligante:metal 2:1, bastante solúveis em água, mas com a fluoração aumentando sua capacidade de se particionar por miméticos de membranas celulares. Os ligantes estão coordenados ao metal através dos ambientes carboxilato (monodentado) e da hidroxila na posição alfa. Como o cobre divalente pode apresentar estabilização pelo efeito Jahn-Teller e, portanto, assumir preferencialmente número de coordenação igual a 4 com ligantes bidentados, a estequiometria encontrada está de acordo com essa observação.

A atividade pró-oxidante do íon Cu^{2+} livre e dos seus complexos foi estudada. Os complexos não-fluorados apresentam taxas de oxidação da dihidrorodamina semelhantes às do íon livre, enquanto que os derivados fluorados apresentam uma menor taxa de oxidação, o que pode estar relacionado com alterações nos potenciais redox do metal nestes complexos, mediadas pela presença do flúor.

O íon livre e o complexo bis(trifluorolactato) de cobre(II) apresentaram as maiores toxicidades frente a promastigotas de *Leishmania amazonensis*. Ou seja, a espécie mais redox-ativa e a mais lipofílica, respectivamente. Isso nos leva a crer que a toxicidade pode ser ainda mais otimizada, através da formação de complexos de cobre que sejam lipofílicos mas ainda altamente redox-ativos.

A atividade biológica dos complexos, testada em promastigotas de *Leishmania amazonensis*, foi máxima contra os parasitas em 72 horas. A partir desses valores, o Cu^{2+} livre (não quelado) é a espécie mais tóxica para as células *in vitro*, embora a administração de sais inorgânicos de cobre não seja uma alternativa terapeuticamente válida.

A estratégia de aumentar a disponibilidade de um metalofármaco baseado em um metal pouco tóxico apresentou resultados favoráveis, abrindo caminho para novas linhas de pesquisa para otimizar ainda mais a atividade anti-leishmânica desses complexos e, com isso, contribuir para o tratamento de uma doença negligenciada de grande impacto nacional.

6. BIBLIOGRAFIA

- Albuquerque, S., J. C. Prado Jr., et al. (2009). "Atlas Acadêmico de Parasitologia Humana." http://www.fcfrp.usp.br/dactb/Parasitologia/Arquivos/Genero_Leishmania.htm (acesado em novembro de 2009).
- Amato, V., J. Amato, et al. (1998). "Treatment of Mucocutaneous Leishmaniasis with Pentamidine Isothionate." Annales de Dermatologie et de Vénérologie **125**: 492-495.
- Amato, V. S. (1998). "Tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana. Trópicos em Terapêutica." Revista Brasileira de Medicina **53**: 202-212.
- Amato, V. S., A. C. Nicodemo, et al. (2000). "Mucocutaneous Leishmaniasis Associated with HIV Infection Treated Successfully with Liposomal Amphotericin B (AmBisome)." The Journal of Antimicrobial Chemotherapy **46**: 341-342.
- Argirova, M. D. and B. Ortwerth, J. (2003). "Activation of protein-bound copper ions during early glycation: study on two proteins." Archives of Biochemistry and Biophysics **420**: 176-184.
- Arruda, D. (2005). "Synthesis of chalcone analogues with increased antileishmanial activity." Bioorganic and Medicinal Chemistry **14**: 1538-1545.
- Azevedo, F. A. and A. A. M. Chasin (2003). Metais: Gerenciamento da Toxicidade. São Paulo, Atheneu.
- Balanã-Fouce, R., R. M. Reguera, et al. (1998). "The pharmacology of leishmaniasis " Gen. Pharmacol. **30**(4): 435-443.
- Barbieri, R. S., L. C. V. Guedes, et al. (2004). Avaliação do Potencial Biocida de Compostos Organogermânicos contendo ligantes derivados de Ácidos alfa-hidroxycarboxílicos. III Encontro de Pesquisa da Pós-Graduação da UninCor, Três Corações.
- Benite, A. M. C., S. P. Machado, et al. (2007). "Uma Visão da Química Bioinorgânica Medicinal." Química Nova **30**(8): 2062-2067.
- Berman, J. D. (1988). "Chemotherapy for Leishmaniasis - Biochemical-Mechanisms, Clinical Efficacy, and Future Strategies." Reviews of Infectious Diseases **10**(3): 560-586.
- Berman, J. D. (1997). "Human leishmaniasis: Clinical, Diagnostic and Chemotherapeutic Developments in the last 10 years." Clinical Infections Diseases **24**: 684-703.
- Berthelot, M. and E. Jungfleisch (1872). Ann Chim Phys **26**(4): 396-407.
- Bezerra, R. J. S., L. Leon, et al. (2004). "Recentes Avanços da Quimioterapia das Leishmanioses: Moléculas Intracelulares como Alvo de Fármacos." Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences **40**(2): 139-149.
- Bobtelsky, M. and I. Bar-Gadda (1953). "Complexes of copper with alkali salts of phthalic, malonic, succinic, maleic, salicylic, and lactic acids-constitution and properties." Bulletin de la Societe Chimique de France: 276-279.
- Böhm, H. J., D. Banner, et al. (2004). "Fluorine in Medicinal Chemistry." Chem. Bio. Chem. **5**: 637-643.
- Bolard, J. (1965). "Infrared spectra of complex salts of hydroxyacids. I. Cobalt(II)-, nickel(II)- and copper(II) salts." Journal De Chimie Physique Et De Physico-Chimie Biologique **62**: 900-907.
- Brown, M., M. Noursadeghi, et al. (2005). "Successful Liposomal Amphotericin B Treatment of *Leishmania braziliensis* cutaneous leishmaniasis." The British Journal of Dermatology **153**: 203-205.
- Carballo, R. (2001). "Coordination polymers of copper(II) based on mixed N- and O-donor ligands: the crystal structures of CuL₂(4,4'-bipy) (n) (L = lactate or 2-methylactate)." Polyhedron **20**: 899-904.

- Castro, R. M. (1972). "Tratamento da Leishmaniose Tegumentar pela Anfotericina B - A Propósito de 70 casos." Anais Brasileiro de Dermatologia **47**: 230-233.
- Coler, R. N. and S. G. Reed (2005). "Second-generation vaccines against leishmaniasis." Trends in Parasitology **21**(5): 244-249.
- Corbett, C. E. (1973). Elementos de Farmacodinâmica. São Paulo, Livraria Editora Artes Médicas.
- Cotton, F. A. and G. F. R. S. Wilkinson (1971). Química Inorgânica Avanzada. México, Limusa Wisley S. A.
- Danks, D. M. (1988). "Copper deficiency in humans." Annual Reviews in Nutrition **8**: 235-257.
- Deacon, G. B. and R. J. Philips (1980). "Relationships between the carbon-oxygen stretching frequencies of carboxylato complexes and the type of carboxylate coordination." Coordination Chemistry Reviews **33**(3): 227-250.
- Dearden, J. C. and M. B. Gaynor (1988). "The Measurement of Partition Coefficients." Quantitative Structure-Activity Relationships **7**: 133-144.
- Denari, N. S. M. and E. R. Dockal (2008). Síntese e Caracterização de Complexos com Cobre(II) utilizando-se Bases de Schiff Tridentadas. 16o Congresso de Iniciação Científica. UFSCAR. **4**: 1002.
- Dias, A. A. C., R. S. Barbiéri, et al. (2006). "Ação de Ácidos *alfa*-hidroxicarboxílicos sobre Fungos Coletados em Câmara de Maturação de Queijos." Revista Científica de Famílias **3**(1): 263.
- Dillon, K. B. and F. J. Rossotti (1966). "Location of Binding Sites for Cu²⁺ in Carboxylate Ligands by Differential Proton Relaxation." Chemical Communications: 768.
- Dillon, R. (2005). "A Functional Genomics Project for the Investigation of Sandfly-Leishmania Interactions." Archives Institute Pasteur Tunis: 39.
- Doua, F., T. W. Miezán, et al. (1996). "The efficacy of pentamidine in the treatment of early-late stage Trypanosoma brucei gambiense trypanosomiasis." Am. J. Trop. Med. Hyg. **55**(6): 586-588.
- El-Sayed, N. M., P. J. Myler, et al. (2005). "Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa." Science **309**(5733): 404-409.
- Engelmann, F. M. (2007). "Interaction of Cationic Meso-Porphyrins with Liposomes, Mitochondria and Erythrocytes." Journal of Bioenergetics and Biomembranes **39**: 175-185.
- Esposito, B. P. (1999). "A circular dichroism and fluorescence quenching study of the interactions between rhodium(II) complexes and human serum albumin." Journal of Inorganic Chemistry **75**: 55-61.
- Esposito, B. P., W. Breuer, et al. (2002). "Design and applications of methods for fluorescence detection of iron in biological systems." Biochemical Society Transactions **30**: 729-732.
- Esposito, B. P., W. Breuer, et al. (2003). "Labile plasma iron in iron overload: redox activity and susceptibility to chelation." Blood **102**(7): 2670-2677.
- Esposito, B. P., W. Breuer, et al. (2002). "Labile iron in parenteral iron formulations and its potential for generating plasma nontransferrin-bound iron in dialysis patients." European Journal of Clinical Investigation **32**: 42-49.
- Esposito, B. P., A. Faljoni-Alario, et al. (1999). "A circular dichroism and fluorescence quenching study of the interactions between rhodium(II) complexes and human serum albumin." Journal of Inorganic Biochemistry **75**: 55-61.
- Finn, C. W., P. Sunnerhagen, et al. (1987). "Efficient transient and stable expression in mammalian cells of transfected genes using erythrocyte ghost fusion." Danish Medical Research Council **173**(1): 218-231.
- Fiorini, L. S. (2008). "Dossiê: Os minerais na alimentação." Food Ingredients Brasil **4**: 48-58.

- Francis, A. J., C. J. Dodge, et al. (2005). "Decontamination of uranium-contaminated steel surfaces by hydroxycarboxylic acid with uranium recovery." Environmental Science & Technology **39**(13): 5015-5021.
- Frelon, S., T. Douki, et al. (2003). "Hydroxyl radical is not the main reactive species involved in the degradation of DNA bases by copper in the presence of hydrogen peroxide." Chemical Research in Toxicology **16**(2): 191-197.
- Fricker, S. P., R. M. Mosi, et al. (2008). "Metal compounds for the treatment of parasitic diseases." Journal of Inorganic Biochemistry **102**(10): 1839-1845.
- Gaspar, R. D. L., E. B. Stucchi, et al. (2006). Complexos de Európio ou Lantânio com alguns Ácidos alfa-hidroxicarboxílicos - Síntese e Propriedades Luminescentes. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia.
- Gaspar, R. D. L., E. B. Stucchi, et al. (2007). Complexos de neodímio com ácidos α -hidroxicarboxílicos-síntese e propriedades ópticas. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia.
- Gielen, M. and E. R. T. Tiekink (2005). Metallotherapeutic Drugs & Metal-based Diagnostic Agents: The Use of Metals in Medicine, John Wiley & Sons Ltda.
- Goldsmith, R. S. and B. G. Katzung (1998). Farmacologia Básica e Clínica. Rio de Janeiro.
- Goulden, J. D. S. (1960). "Infrared spectra of lactates in aqueous solution " Spectrochimica Acta **16**: 715-720.
- Grillo, R., F. S. M. Nathalie, et al. (2008). "Caracterização físico-química de complexo de inclusão entre hidroximetilnitrofurazona e hidroxipropil-b-ciclodextrina." Química Nova **31**(2): 290-295.
- Grimaldi, G. and R. B. Tesh (1993). "Leishmaniasis of the New-World - Current Concepts and Implications for Future-Research." Clinical Microbiology Reviews **6**(3): 230-250.
- Grimaldi, G., R. B. Tesh, et al. (1989). "A Review of the Geographic-Distribution and Epidemiology of Leishmaniasis in the New-World." American Journal of Tropical Medicine and Hygiene **41**(6): 687-725.
- Grögl, M., T. N. Thomason, et al. (1992). "Drug resistance in leishmaniasis: its implication in systemic chemotherapy of cutaneous and mucocutaneous disease." The American Society of Tropical Medicine and Hygiene **47**: 117-126.
- Gruber, A. and A. M. B. N. Madeira (2009). "Apontamentos de aula - BMF0222 - Introdução à Parasitologia Veterinária." http://www.coccidia.icb.usp.br/disciplinas/BMP222/aulas/Aula_Pratica_4_Protozoarios.pdf (acessado em novembro de 2009).
- Halliwell, B. and J. C. Gutteridge (2007). Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford, Oxford University Press.
- Hansch, C., P. P. Maloney, et al. (1962). Nature **194**: 178-180.
- Harford, C. and B. Sarkar (1997). "Amino Terminal Cu(II)- and Ni(II)-binding (ATCUN) motif of proteins and peptides: Metal binding, DNA cleavage, and other properties." Accounts of Chemical Research **30**: 123-130.
- Hiyama, T. (2000). Organofluorine Compounds: Chemistry and Applications, Springer.
- Ibrahim, S. A., H. Yang, et al. (2008). "Antimicrobial activity of lactic acid and copper on growth of Salmonella and Escherichia coli O157:H7 in laboratory medium and carrot juice." Food Chemistry **109**: 137-143.
- Ivens, A. C., C. S. Peacock, et al. (2005). "The genome of the kinetoplastid parasite, Leishmania major." Science **309**(5733): 436-442.
- Klocker, J., A. Karpfen, et al. (2003). "On the structure and torsional potential of trifluoromethoxybenzene: an ab initio and density functional study." Chem. Phys. Lett. **367**: 566-575.

- Lainson, R. and J. J. Shaw (1987). "The Leishmaniasis in Biology and Medicine - Evolution, classification and Geographical distribution." Biology and Epidemiology **1**: 1-120.
- Lee, J. D. (2003). Química Inorgânica não tão Concisa. São Paulo, Edgard Blucher LTDA.
- Lessa, H. A., P. Machado, et al. (2001). "Successful Treatment of Refractory Mucosal Leishmaniasis with Pentoxifyline Plus Antimony." The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene **65**: 87-89.
- Lima, S. C. (2005). "Banco de informações sobre doenças infecto-parasitárias." (http://www.ig.ufu.br/Lagem/banco/Figuras_leishmaniose_visceral.htm; acessado em novembro de 2009).
- Lira, R., S. Sundar, et al. (1999). "Evidence that the high incidence of treatment failures in Indian kala-azar is due to the emergence of antimony-resistant strains of *Leishmania donovani*." Journal of Infectious Diseases **180**(2): 564-567.
- Luz, K. G., V. M. Ribeiro, et al. (2006). Manual Técnico - Leishmaniose Visceral Canina. Campinas.
- Magill, A. J. (1995). "Epidemiology of the Leishmaniasis." Dermatologic Clinics **13**(3): 505-523.
- Mak, C. M. and C.-W. Lam (2008). "Diagnosis of Wilson's disease: a comprehensive review." Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences **45**(3): 263-290.
- Marsden, P. D. (1985). "Clinical presentations of *Leishmania braziliensis braziliensis*." Parasitology Today **1**(5).
- Martins, R. C. (2009). "Leishmaniose." <http://www.saudeanimal.com.br/leishmaniose.htm> (acessado em novembro de 2009).
- Melnik, M., M. Kabesova, et al. (2000). "Copper(II) coordination compounds: Classification and analysis of crystallographic and structural data V. Polymeric compounds." Journal of Coordination Chemistry **50**(3-4): 177-322.
- Ministério_da_Saúde (2004). Manual de Recomendações para Diagnóstico, Tratamento e Acompanhamento da Co-infecção Leishmania-HIV.
- Ministério_da_Saúde (2006). Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Brasília.
- Mohanty, N. K. and R. K. Patnaik (1984). "Lactate complexes of cadmium(II), zinc(II), cobalt(II), nickel(II) and copper(II)." Journal of the Institution of Chemists (India) **56**: 91-94.
- Monteiro, P. S., M. M. Lacerda, et al. (1994). "Controle da Leishmaniose no Brasil." Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical **27**: 67-72.
- Moore, E., D. O'Flaherty, et al. (2001). "Bulletin of the World Health Organization." **79**: 388.
- Mylonas, M., G. Malandrinos, et al. (2001). "Stray Cu(II) may cause oxidative damage when coordinated to the -TESHHK- sequence derived from the C-terminal tail of histone H2A." Chemical Research in Toxicology **14**(9): 1177-1183.
- Navarro, M., M. Fernandez-Mestre, et al. (2003). "Synthesis, characterization, DNA binding study and biological activity against *Leishmania mexicana* of Cu(dppz)(2)BF₄." Journal Inorganic Chemistry **97**: 364-369.
- NED/ASCOM/FUNASA (2000). "Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana." Único: 62.
- Oliveira, M. R. F., V. O. Macêdo, et al. (1995). "Estudo Evolutivo da Leishmaniose Mucosa (7 a 17 anos de seguimento) causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis* em Três Braços, Bahia." Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical **28**: 325-332.
- Portanova, R., L. H. J. Lajunen, et al. (2003). "Critical Evaluation of Stability Constants for alfa-hidroxicarboxylic Acid Complexes with Protons and Metal Ions and the Accom-

- panying Enthalpy Changes." International Union of Pure and Applied Chemistry **75**(4): 495-540.
- Prout, C. K. (1968). "Structure and Stability of Carboxylate Complexes .1. Crystal and Molecular Structures of Copper(2) Glycollate Di-Lactate 2-Hydroxy-2-Methylpropionate Methoxyacetate and Phenoxyacetate." Journal of the Chemical Society a -Inorganic Physical Theoretical **11**: 2791.
- Rath, S., L. A. Trivelin, et al. (2003). "Antimonials employed in the treatment of leishmaniasis: The state of the art." Quimica Nova **26**(4): 550-555.
- Requena, J. M., S. Iborra, et al. (2004). "Recent advances in vaccines for leishmaniasis." Expert Opinion on Biological Therapy **4**(9): 1505-1517.
- Romero, G. A., M. V. Guerra, et al. (2001). "Comparation of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: therapeutic response to meglumine antimoniate." The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene **65**(456-465).
- Russel, J. B. (1994). Química Geral. São Paulo, Makron Books.
- Sampaio, R. N. and P. D. Marsden (1997). "Treatment of the Mucosal form of Leishmaniasis without Response to Glucantime with liposomal Amphotericin B." Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical **30**: 125-128.
- Shils, M. E. (1994). Modern Nutrition in Health and Disease. Philadelphia, Philadelphia.
- Shimizu, M. and T. Hiyama (2005). "Modern Synthetic Methods for Fluorine-Substituted Target Molecules." Angewandte Chemie **44**: 214-231.
- Shriver, D. and P. Atkins (2008). Química Inorgânica. Porto Alegre, Bookman.
- Sigel, H. and A. Sigel (2000). "Metal ions in environment and biology " J. Indian Chem. Soc. **77**: 501-509.
- Silva, A. M. N., X. L. Kong, et al. (2009). "Determination of the pKa value of the hydroxyl group in the alpha-hydroxycarboxylates citrate, malate and lactate by ¹³C NMR: implications for metal coordination in biological systems." Biometals **22**(5): 771-778.
- Silverstein, R. M., F. X. Webster, et al. (2005). Spectrometric Identification of Organic Compounds, Wiley.
- Skoog, D. A., F. J. Holler, et al. (2002). Princípios de análise instrumental. Porto Alegre, Bookman.
- Smith, D. H., D. K. H. Waterbeemd, et al. (2001). Pharmacokinetics and Metabolism in Drug Design, Methods and Principles in Medicinal Chemistry, Wiley-VCH.
- Soares-Bezerra, R. J., L. Leon, et al. (2004). "Recentes Avanços da Quimioterapia das Leishmanioses: Moléculas Intracelulares como alvo de Fármacos." Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas **40**(2): 139-149.
- Soto, J., B. A. Arana, et al. (2004). "Miltefosine for New World Cutaneous Leishmaniasis." Clinical Infections Diseases **38**(1266-1272).
- Souza, G. F. P. (2006). "Leishmanicidal activity of primary S-nitrosothiols against *Leishmania major* and *Leishmania amazonensis*: Implications for the treatment of cutaneous leishmaniasis." Nitric Oxide-Biology and Chemistry **15**: 209-216.
- Thakur, C. P., S. Bhowmick, et al. (1995). "Aminosalicylic acid plus sodium stibogluconate for treatment of Indian Kala-azar: A randomized dose-finding clinical trial." Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. **89**: 219-223.
- Tisato, F., C. Marzano, et al. (2009). "Copper in diseases and treatments, and copper-based anticancer strategies." Medicinal Research Reviews DOI: 10.1002/med.20174
- Uauy, R., M. Olivares, et al. (1998). "Essentiality of copper in humans." American Journal of Clinical Nutrition **67**(5 (suppl)): 952S-959S.

- Ullman, B., E. Carrero-Valenzuela, et al. (1989). "*Leishmania donovani*. Isolation and characterization of sodium stibogluconate (Pentostan) - Resistant cell lines." Experimental Parasitology **69**(2): 157-163.
- Unger, C., W. Damsch, et al. (1989). "Hexadecylphosphocholine, a new ether-lipid analog. Studies on the antineoplastic activity *in vitro* and *in vivo*." Acta Oncologica **28**: 213-217.
- Veronesi, R. (1985). Doenças Infecciosas e Parasitárias. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan S.A.
- Visbal, G., E. Marchan, et al. (2008). "Synthesis and characterization of platinum-sterol hydrazone complexes with biological activity against *Leishmania (L.) mexicana*." Journal of Inorganic Biochemistry **102**(3): 547-554.
- Williams, D. M. (1983). "Copper deficiency in humans." Seminars in Hematology **20**(2): 118-128.
- Xavier, A. V. (1986). "Frontiers in Bioinorganic Chemistry." VCH.
- Yan, S., L. Jin, et al. (2005). Antimony in Medicine. Metallotherapeutic drugs and metal-based diagnostic agents. M. Gielen and E. R. T. Tiekink, Wiley: 441-461.

SÚMULA CURRICULAR

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Rodrigo da Silva Maffei

Local e data de nascimento: Jales – São Paulo em 28 de Outubro de 1983

2. EDUCAÇÃO

E. E. Francisco Molina Molina

Conclusão: 2000

Local: Santa Salete – São Paulo

UNIFEV – Centro Universitário de Votuporanga

Conclusão: 2006

Local: Votuporanga – São Paulo

Graduação: Licenciatura Plena em Química

USP – Universidade de São Paulo

Conclusão: 2010

Local: São Paulo – São Paulo

Mestrado em Química Inorgânica

3. FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

UNIFEV – Centro Universitário de Votuporanga

Curso: Habilitações Tecnológicas

Local: Votuporanga – São Paulo

Conclusão: 2006

4. OCUPAÇÃO

Cargo: Analista de Validação Jr.

Empresa: Cosmed (Grupo Hypermarcas)

5. PUBLICAÇÕES (*Artigos Completos e Resumos em Congressos*)

Congresso: XIV Brazilian Meeting on Inorganic Chemistry and I Latin American Meeting on Biological Inorganic Chemistry.

Local: Foz do Iguaçu – Paraná

Data: 31/09 a 04/10/2008

Poster: Cu(II) Complexes with Fluorinated Ligands for the Treatment of Leishmaniasis

Publicação: Synthesis, characterization and evaluation of antileishmanial activity of copper(II) with fluorinated α -hydroxycarboxylate ligands.

Revista: Biometals 2009;22(6):1095-1101